ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

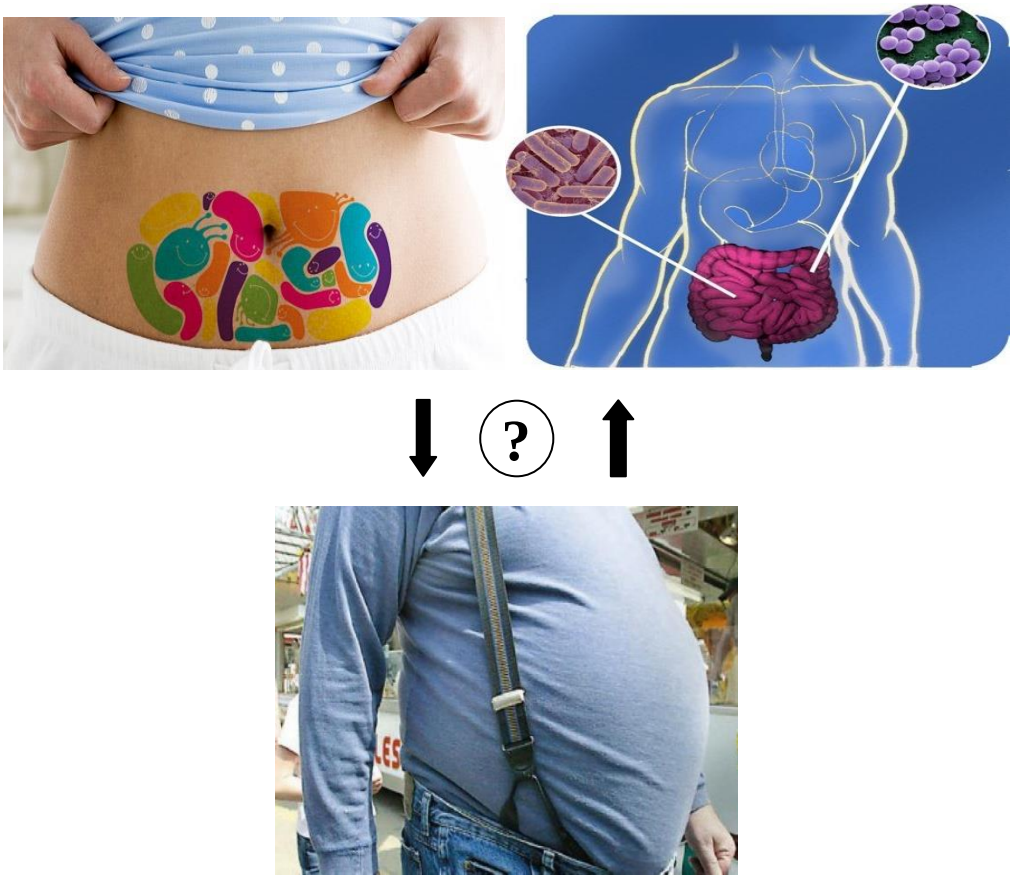
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

Πτυχιακή μελέτη με θέμα:

‘’Εντερικός μικροβιόκοσμος και παχυσαρκία’’

Παπαναστασίου Στέφανος

Α.Μ:20960



Εξεταστική επιτροπή:

Επιβλέπουσα: Κυριακού Αδαμαντίνη, Επίκουρη Καθηγήτρια Βακτηριολογίας
Μέλη:
Γιαννακούλια Μαίρη, Επίκουρη Καθηγήτρια Διατροφής και Διαιτητικής Συμπεριφοράς
Κοντογιάννη Μερόπη, Επίκουρη Καθηγήτρια Κλινικής Διατροφής

ΑΘΗΝΑ, 2014

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου, κα. Κυριακού Μαντώ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντας μου την παρούσα πτυχιακή μελέτη καθώς και για την πολύτιμη βοήθεια της καθ' όλη τη διάρκεια διεκπεραίωσης αυτής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ επίσης στην Μήτσου Ευδοκία, υποψήφια διδάκτορα του τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας και Διατροφής, για τη συνεργασία μας κατά την ερευνητική διαδικασία καθώς και για την απεριόριστη βοήθεια και καθοδήγηση της σε όλα τα στάδια της μελέτης.

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τους εθελοντές που δέχτηκαν να συμμετάσχουν στη μελέτη, χωρίς τους οποίους η παρούσα εργασία θα ήταν αδύνατο να πραγματοποιηθεί.

Τέλος, ευχαριστώ πολύ την οικογένεια μου για την αμέριστη συμπαράσταση, στήριξη και βοήθεια όλα αυτά τα χρόνια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο εντερικός μικροβιόκοσμος διαδραματίζει ένα ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην υγεία του ανθρώπου μέσω πολλών ανοσορρυθμιστικών, μεταβολικών και άλλων λειτουργιών. Τα τελευταία χρόνια αποτελεί μία καινοτόμο προσέγγιση για την κατανόηση των μηχανισμών και στη συνέχεια πιθανά για την πρόληψη και αντιμετώπιση διαταραχών ανάμεσα στις οποίες είναι και η παχυσαρκία. Φαίνεται ότι η διαφοροποιημένη σύσταση και ποικιλομορφία του εντερικού μικροβιόκοσμου επηρεάζει την εμφάνιση και εξέλιξη της παχυσαρκίας. Στη παρούσα πτυχιακή μελέτη πραγματοποιήθηκε κατηγοριοποίηση 16 υγιών ενήλικων εθελοντών σε ομάδες ανάλογα με το Δείκτη Μάζας Σώματος (φυσιολογικού βάρους, υπέρβαροι, παχύσαρκοι). Στη συνέχεια έγινε σύγκριση συγκεκριμένων μικροβιολογικών πληθυσμών του εντερικού μικροβιόκοσμου των εθελοντών που προσδιορίστηκαν μέσω μικροβιολογικής ανάλυσης των κοπράνων τους, των γαστρεντερικών συμπτωμάτων τους, των σωματομετρικών χαρακτηριστικών τους και της διαιτητικής τους πρόσληψης.

Η ολική μεσόφιλη αναερόβια μικροχλωρίδα και ο πληθυσμός των *Clostridium* spp. διέφεραν σημαντικά μεταξύ των ομάδων (p=0,013 και p=0,042 αντίστοιχα), με τους υπέρβαρους και τους παχύσαρκους να εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα ολικών αναερόβιων μικροοργανισμών και τους παχύσαρκους να εμφανίζουν υψηλότερο πληθυσμό *Clostridium* spp. από τα άτομα φυσιολογικού βάρους. Τα επίπεδα *Bacteroides* spp. έτειναν να είναι υψηλότερα στην ομάδα των παχύσαρκων ατόμων (p=0,101) και τα επίπεδα των *Staphylococcus* spp. εμφάνισαν τάση να είναι χαμηλότερα στις ομάδες των παχύσαρκων και των υπέρβαρων ατόμων σε σχέση με τα άτομα φυσιολογικού βάρους (p=0,091).

Όσον αφορά τα γαστρεντερικά συμπτώματα φάνηκε ότι η συχνότητα κενώσεων είχε τάση να διαφέρει μεταξύ των ομάδων (p=0,063) με τους υπέρβαρους να έχουν τη μικρότερη συχνότητα. Μόνο στην ομάδα των παχύσαρκων ατόμων καταγράφηκαν διαρροϊκές κενώσεις (p=0,040) ενώ η σύσταση των κοπράνων βάσει της κλίμακας Bristol είχε τάση να διαφέρει μεταξύ των ομάδων (p=0,103) με τους παχύσαρκους να σημειώνουν το μεγαλύτερο σκορ. Η οσμή των κοπράνων παρουσίασε τάση για διαφοροποίηση μεταξύ των ομάδων (p=0,127) με τα κόπρανα των υπέρβαρων και των παχύσαρκων ατόμων να μυρίζουν πιο έντονα.

Στη σωματική δραστηριότητα σημειώθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων στη μέτριας έντασης φυσική δραστηριότητα (p=0,036) με την ομάδα των ατόμων φυσιολογικού βάρους να παρουσιάζει μεγαλύτερη δραστηριότητα μέτριας έντασης σε σχέση με τις ομάδες των υπέρβαρων και των παχύσαρκων ατόμων. Επιπλέον οι φυσιολογικού βάρους εθελοντές είχαν τάση να περπατούν περισσότερο (p=0,111) και να είναι στο σύνολό τους πιο δραστήριοι σε σχέση με τις άλλες δύο ομάδες (p=0,120). Τέλος, δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφορά μεταξύ

των ομάδων στη διαιτητική τους πρόσληψη πέρα από την κατανάλωση αλκοόλ (p=0,093) όπου η ομάδα των παχύσαρκων ατόμων είχε τάση να καταναλώνει μεγαλύτερες ποσότητες από τις άλλες ομάδες.

Λέξεις κλειδιά: εντερικός μικροβιόκοσμος, παχυσαρκία

ABSTRACT

The gut microbiome seems to exert a significant influence on human health through many immunoregulating, metabolic and other functions. In recent years, it has been considered as an innovative approach for studying the mechanisms and possibly preventing and treating common disorders as obesity. It seems that the diverse composition and diversity of gut microbiome affect the onset and progression of obesity. In this thesis, categorization of 16 healthy adult volunteers into groups according to their Body Mass Index (normal weight, overweight, obese) was conducted in order to compare characteristic microbial groups of their gut microbiome obtained by microbiological analysis of their feces, their gastrointestinal symptoms, their somatometric measurements and their dietary intake.

Total anaerobic mesophilic bacteria and *Clostridium* spp. populations differed significantly between groups (p=0,013 and p=0,042 respectively). Overweight and obese had higher levels of total anaerobes and obese had higher population of *Clostridium* spp. compared to normal weight volunteers. The levels of *Bacteroides* spp. were higher in the group of obese individuals (p=0,101) and levels of *Staphylococcus* spp. were lower in the groups of overweight and obese compared to normal weight individuals, but not in a significant way (p=0,091).

As far as gastrointestinal symptoms are concerned, stool frequency tended to differ between groups (p=0,063) and overweight individuals showed the lowest frequency. Only in the group of obese individuals diarrhea episodes were recorded (p=0,040) and stool consistency measured with Bristol Stool Scale tended to differ between groups (p=0,103) with the highest score achieved by obese individuals. The odor of feces tended to differ between groups (p=0,127) and the feces of overweight and obese individuals had a more intense smell.

In physical activity, significant difference between groups was noticed in moderate physical activity (p=0,036). Normal weight individuals showed higher levels compared to overweight and obese individuals. Furthermore, normal weight volunteers walk more (p=0,111) and overall are more active than the other two groups, but not in a significant way (p=0,120). There was no difference in the dietary intake between groups except for alcohol consumption (p=0,093) which was higher in the group of obese individuals compared to overweight and normal weight individuals.

Key words: human gut microbiome, obesity

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Ι. ΕΙΣΑΓΩΓΗ 7

1. Γαστρεντερικό σύστημα 7

2. Εντερικός μικροβιόκοσμος 7

2.1. Μικροοργανισμοί του εντερικού μικροβιόκοσμου 8

2.1.1. *Bacteroides* spp. 10
2.1.2. *Clostridium* spp. 11
2.1.3. *Lactobacillus* spp. 12
2.1.4. *Bifidobacterium* spp. 14
2.1.5. *Staphylococcus* spp. 15
2.1.6. *Streptococcus* spp. 16
2.1.7. *Enterococcus* spp. 16
2.1.8. E. *coli* 17
2.1.9. *Candida* spp. 18

2.2. Παράγοντες που επηρεάζουν τον εντερικό μικροβιόκοσμο 19

2.2.1.Διατροφή 20
2.2.2. Ηλικία 21
2.2.3. Στρες 22
2.2.4. Πρεβιοτικά και προβιοτικά 23
2.2.5. Αντιβιοτικά 25

2.3. Λειτουργίες εντερικού μικροβιόκοσμου 26

3. Παχυσαρκία 30

4. Παχυσαρκία και εντερικός μικροβιόκοσμος 31

4.1. Έρευνες σε πειραματόζωα και ανθρώπους 32

4.2. Μηχανισμοί αλληλεπίδρασης 34

ΙΙ. ΣΚΟΠΟΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ 37

ΙΙΙ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ 38

1. Δείγμα πτυχιακής μελέτης 38

1.1 Χαρακτηριστικά εθελοντών 38

1.2 Στρατολόγηση εθελοντών 39

1.3 Κατηγοριοποίηση εθελοντών 39

1.4 Βιοηθική 39

2. Συλλογή δεδομένων 39

2.1 Ερωτηματολόγια - ημερολόγια μελέτης 39

2.2. Ανθρωπομετρία 40

2.3. Δειγματοληψία κοπράνων 40

3. Επεξεργασία δειγμάτων κοπράνων, ερωτηματολογίων και ημερολογίων 41

3.1 Μικροβιολογική επεξεργασία δειγμάτων κοπράνων 41

3.1.1. Διαδοχικές αραιώσεις– Επεξεργασία υπό αναερόβιες και αερόβιες συνθήκες 41

3.1.2. Θρεπτικά υλικά..... 42
3.1.3. Περιγραφή αποικιών – Χρώση Gram – Δοκιμασία καταλάσης – Καταμετρήσεις πληθυσμών48

3.2. Μέτρηση pH κοπράνων..... 50

3.3. Ανάλυση ερωτηματολογίων – ημερολογίων..... 51

3.3.1. Τριήμερο ημερολόγιο καταγραφής τροφίμων..... 51
3.3.2. Επταήμερο ημερολόγιο καταγραφής γαστρεντερικών συμπτωμάτων 51
3.3.3. Ερωτηματολόγιο φυσικής δραστηριότητας..... 52

4. Στατιστική επεξεργασία 52

4.1. Υπό μελέτη μικροβιακοί πληθυσμοί..... 53

4.2.Επταήμερο ημερολόγιο καταγραφής γαστρεντερικών συμπτωμάτων 53

4.3. Τριήμερο ημερολόγιο καταγραφής τροφίμων..... 53

ΙΙΙ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 54

IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ 63

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 67

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... 68

Ι. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Γαστρεντερικό σύστημα

Το γαστρεντερικό σύστημα αποτελείται από το στόμα, τον φάρυγγα, τον οισοφάγο, το στομάχι, το λεπτό έντερο, το παχύ έντερο, το ορθό καθώς και από όργανα που βοηθάνε στην διεκπεραίωση των λειτουργιών του (σιελογόνοι αδένες, ήπαρ, χοληδόχος κύστη, πάγκρεας). Το μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα ανέρχεται στα 5 μέτρα περίπου και το εσωτερικό του μέρος, ο γαστρεντερικός αυλός, διαχωρίζεται σαφώς από το εξωτερικό του μέρος. Αυτό συμβαίνει κυρίως για την προστασία από τους μικροοργανισμούς που βρίσκονται κατά μήκος του αυλού, οι οποίοι δρουν ευεργετικά στα σημεία αυτά αλλά αν εισέλθουν στην κυκλοφορία είναι κίνδυνος για την υγεία του ανθρώπου.

Οι βασικές λειτουργίες του γαστρεντερικού συστήματος συνοψίζονται στην πέψη, την έκκριση, την απορρόφηση και την κινητικότητα. Η πέψη της τροφής γίνεται με το υδροχλωρικό οξύ στο στομάχι, την χολή στο δωδεκαδάκτυλο δια μέσω του κοινού χοληφόρου πόρου και τα πεπτικά ένζυμα από εξωκρινείς αδένες. Όλα αυτά απελευθερώνονται στον γαστρεντερικό αυλό με τη διεργασία της έκκρισης. Με τη διαδικασία της απορρόφησης μεταφέρονται τα θρεπτικά συστατικά των τροφών που καταναλώνονται από τον γαστρεντερικό αυλό στην κυκλοφορία ή στη λέμφο. Για να συμβούν όλα αυτά συμβάλει η διεργασία της κινητικότητας του γαστρεντερικού συστήματος μέσω της σύσπασης των λείων μυϊκών ινών του ώστε να προωθείται το περιεχόμενο κατά μήκος του αυλού με κατεύθυνση από το στόμα προς τον πρωκτό.

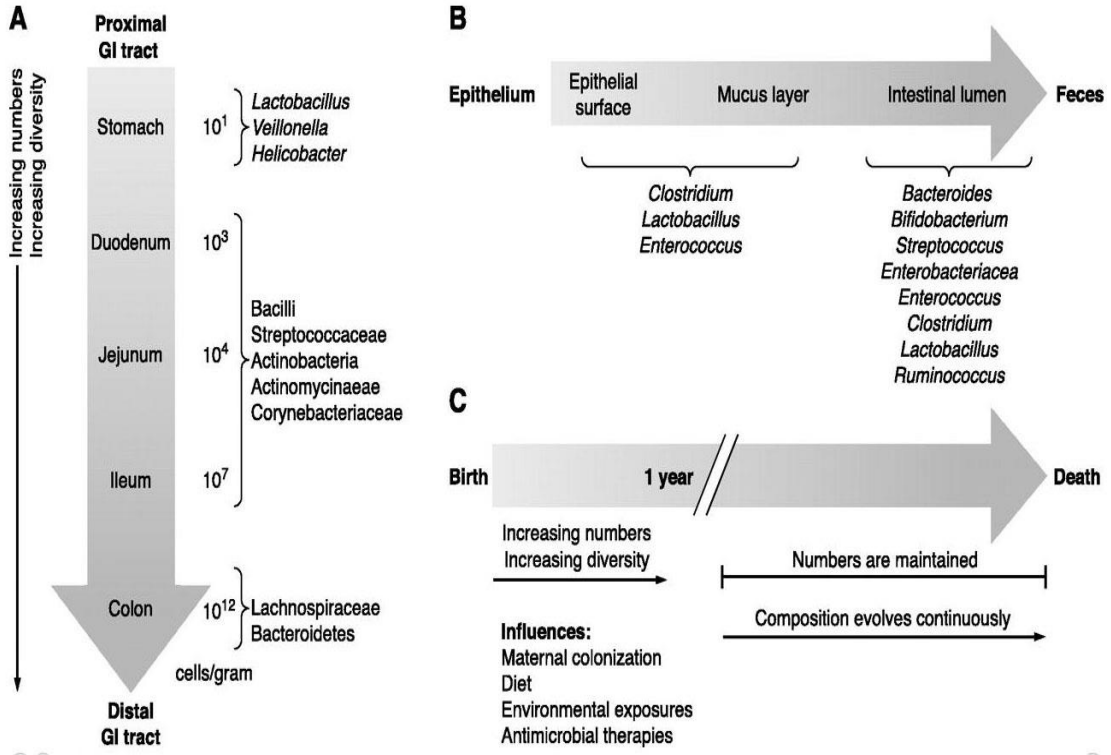
Η κατάληξη της τροφής που καταναλώνεται είναι είτε η πέψη της και απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών της είτε η αποβολή της μέσω κοπράνων. Τα κόπρανα αποτελούνται από τις τροφές που δεν πέπτονται και δεν απορροφούνται και από μικροοργανισμούς [1].

2. Εντερικός μικροβιόκοσμος

Ο μικροβιόκοσμος του γαστρεντερικού συστήματος ξεκινά από την στοματική κοιλότητα, όπου βρίσκεται βακτηριακός πληθυσμός της τάξεως των 10^8-10^{10} CFU/g σάλιου. Μέσω του μηχανισμού της κατάποσης γίνεται προώθηση μέρους των βακτηρίων αυτών κατά μήκος του γαστρεντερικού αυλού. Στο στομάχι που δεν επικρατούν ευνοϊκές συνθήκες εξαιτίας του γαστρικού οξέος παρατηρείται μείωση του αριθμού βακτηρίων (περίπου 10^3 CFU/g γαστρικού χυμού), ενώ στο μέρος του δωδεκαδακτύλου και της νήστιδας ο πληθυσμός των βακτηρίων ανέρχεται στον αριθμό των 10^2-10^4 CFU/g εντερικού περιεχομένου. Στη συνέχεια του γαστρεντερικού σωλήνα, στον ειλεό και το κόλον βρίσκεται η πλειοψηφία των

μικροοργανισμών του ανθρώπινου σώματος (περίπου 10^{10} CFU/g εντερικού περιεχομένου και 10^{10}-10^{12} CFU/g εντερικού περιεχομένου αντίστοιχα) [2].

Η σύσταση του μικροβιόκοσμου του ανθρώπινου σώματος, μιλώντας για τις ανώτερες ιεραρχικές τάξεις των φύλων και των κλάσεων, δεν είναι ομοιογενής σε όλη την έκταση του γαστρεντερικού σωλήνα ενός ατόμου, αλλά φαίνεται να παραμένει σταθερή με την πάροδο του χρόνου. Έχουν βρεθεί διαφορές στους μικροβιακούς πληθυσμούς μεταξύ στόματος-ορθού και μεταξύ νήστιδας-κόλον των ίδιων ατόμων [3].



Εικόνα 1: Α) Πληθυσμοί και είδη μικροοργανισμών κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα. Β) Μικροοργανισμοί κατά μήκος του εντέρου. C) Αλλαγές στον μικροβιόκοσμο με την πάροδο της ηλικίας
[Πηγή: Sekirov I., Russell S.L., et al. (2010) Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiological Reviews* 90, 859-904].

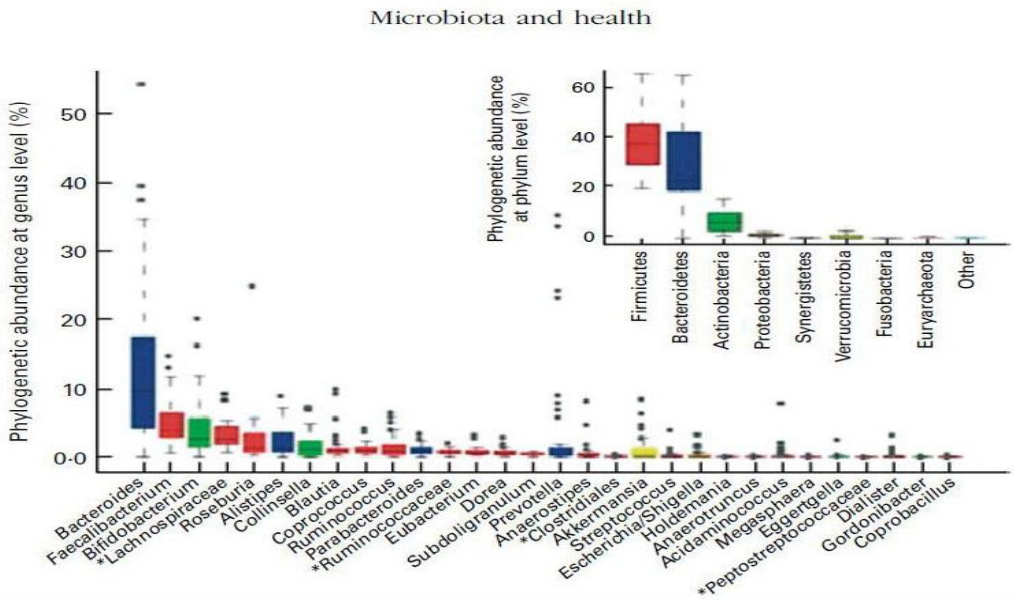
2.1. Μικροοργανισμοί του εντερικού μικροβιόκοσμου

Ο αριθμός των μικροοργανισμών που κατοικούν στο έντερο του ανθρώπου υπολογίζεται στα 100 τρισεκατομμύρια κύτταρα, περίπου 10 φορές περισσότερα από τα κύτταρα του ανθρώπου και το γονιδίωμα τους είναι κατά περίπου 150 φορές μεγαλύτερο του ανθρώπινου γονιδιώματος [4]. Το παχύ έντερο αποτελεί το πιο ελκυστικό μέρος για την αποίκιση και την ανάπτυξη των μικροοργανισμών καθώς δεν έχει εκκρίσεις για τη διαδικασία της πέψης των

τροφών, έχει επιβραδυμένη περίσταλση συγκριτικά με το λεπτό έντερο και είναι περιβάλλον με αφθονία θρεπτικών συστατικών [5].

Με τη βοήθεια μελετών που χρησιμοποιούν μοριακές μεθόδους αλληλούχισης των βάσεων στις υπομονάδες του 16S rRNA γονιδίου έχουν εντοπιστεί 7-9 από τα 15 γνωστά φύλα της κατηγορίας των βακτηρίων σε δείγματα κοπράνων και δείγματα βλέννας του εντέρου. Μάλιστα, το 90% των μικροοργανισμών που εντοπίστηκαν ανήκαν στα φύλα Bacteroidetes και Firmicutes, ενώ τα υπόλοιπα φύλα μικροοργανισμών που βρέθηκαν στα δείγματα ήταν τα Πρωτεοβακτήρια, Ακτινοβακτήρια, Fusobacteria και Verrucomicrobia. Όμως, συγκρίνοντας την σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου σε ιεραρχικό επίπεδο είδους και στελέχους παρατηρείται αξιοσημείωτη διαφορά μεταξύ των ατόμων. Κάθε άτομο φαίνεται να έχει το δικό του ξεχωριστό μοτίβο σύστασης μικροβιακού πληθυσμού που φιλοξενεί, μοναδικό για το άτομο αυτό [6].

Στο φύλο Bacteroidetes ανήκουν τα γένη *Bacteroides, Prevotella* και *Xylanibacter*, τα οποία αποικοδομούν ένα μεγάλο αριθμό γλυκανών. Το φύλο Firmicutes περιέχει τα γένη *Ruminococcus, Clostridium, Lactobacillus, Eubacterium, Faecalibacterium* και *Roseburia.* Το φύλο των Πρωτεοβακτηρίων συμπεριλαμβάνει τα γένη *Escherichia* και *Desulfovibrio* Στο φύλο των Ακτινοβακτηρίων κατατάσσονται τα γένη *Collinsella* και *Bifidobacterium.* Το γένος *Fusobacterium* είναι του φύλου Fusobacteria και τέλος στο φύλο Verrucomicrobia ανήκει το είδος *Akkermansia,* με χαρακτηριστική ιδιότητα να αποικοδομεί την βλέννα [7].



Εικόνα 2: Θηκόγραμμα (Box plot) με τη σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου σε ιεραρχικό επίπεδο φύλων και γενών μικροοργανισμών
[Πηγή: Arumugam M, Raes J, Pelletier E, *et al.* (2011) Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473, 174–180].

2.1.1. *Bacteroides* spp.

Στο γένος *Bacteroidetes* συμπεριλαμβάνονται υποχρεωτικώς αναερόβια είδη που δεν σχηματίζουν ενδοσπόρια. Μορφολογικά είναι βάκιλλοι, αρνητικοί κατά Gram. Είναι από τα πολυπληθέστερα βακτήρια στο κόλον του ανθρώπου καθώς αποτελέσματα μετρήσεων που έγιναν σε δείγματα κοπράνων έδειξαν 10^{10}-10^{11} κύτταρα ανά γραμμάριο κοπράνων [8]. Στα νεογνά εμφανίζονται περίπου 10 μέρες μετά τη γέννηση τους και είναι σε χαμηλούς πληθυσμούς κατά την περίοδο θηλασμού μέχρι και τον απογαλακτισμό των βρεφών. Σε αυτή την περίοδο τα *Bifidobacterium* είναι το επικρατέστερο γένος [9]. Αποτελούν περίπου το 30% της συνολικής ποσότητας του γένους *Bacteroidetes* που εντοπίζεται στον εντερικό μικροβιόκοσμο με πάνω από 20 είδη να είναι εγκατεστημένα στο κόλον του ανθρώπου [8].

1. B. acidifaciens
2. B. caccae
3. B. coprocola
4. B. coprosuis
5. B. dorei
6. B. eggerthii
7. B. finegoldii
8. B. fragilis
9. B. goldsteinii
10. B. helcogenes
11. B. intestinalis
12. B. johnsonii
13. B. massiliensis
14. B. nordii
15. B. ovatus
16. B. plebeius
17. B. pyogenes
18. B. salyersai
19. B. thetaiotaomicron
20. B. uniformis
21. B. vulgatus

Πίνακας 1*:* *Bacteroides* spp. εγκατεστημένα στο κόλον του ανθρώπου.

[Πηγή: Wick E.C., Sears C.L. (2010) *Bacteroides* spp. and diarrhea. *Curr Opin Infect Dis.* 23(5): 470–474]

Τα *Bacteroides* ζυμώνουν τα σάκχαρα κυρίως προς οξικό, ισοβαλερικό και ηλεκτρικό οξύ. Άλλα θρεπτικά υποστρώματα είναι οι πολυσακχαρίτες από τις φυτικές ίνες που καταναλώνονται από τον άνθρωπο (κυτταρίνη, ξυλάνες, πηκτίνες) και το άμυλο (αμυλόζη, αμυλοπηκτίνη). Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό κάποιων ειδών *Bacteroides* είναι η σύνθεση σφιγγολιπιδίων, μίας κατηγορίας λιποειδών που αντί για γλυκερόλη έχουν στη θέση της μία αμινοαλκοόλη [10]. Τα *Bacteroides* μπορούν να αξιοποιούν τις νιτρογενείς ουσίες και μπορούν επίσης να μετατρέπουν τα χολικά οξέα και άλλα στεροειδή [11]. Ένα είδος *Bacteroides,* το B. *thetaiotaomicron* έχει τις περισσότερες υδρολάσες από κάθε άλλο μικροοργανισμό που έχει μελετηθεί με αποτέλεσμα να μπορεί να διασπάσει τους περισσότερους γλυκολυτικούς δεσμός που υπάρχουν στη φύση [12].

Η συμβίωση των *Bacteroides* spp. στον εντερικό σωλήνα φαίνεται να συμβάλει ενεργά στην διατροφική κατάσταση και στην απόκτηση ανοσίας του ξενιστή. Κάποια είδη *Bacteroides* είναι από τα παθογόνα που προκαλούν πολλές από τις μολύνσεις του ανθρώπου [10]. Σε περιπτώσεις αυξημένης εντερικής διαπερατότητας ή διαφυγών της γαστρεντερικής οδού που επιτρέπουν την διέλευση των *Bacteroides* spp. στην περιτοναϊκή κοιλότητα και στο υπόλοιπο σώμα δρουν ως δυνητικά παθογόνα προκαλώντας σχηματισμό αποστημάτων σε σημεία όπως στο ήπαρ, στην κοιλιακή χώρα, στον εγκέφαλο, στους πνεύμονες και στην πύελο έως και βακτηριαιμία [11]. Από τα *Bacteroides* spp. το πιο επικίνδυνο για την υγεία του ξενιστή θεωρείται το B. *fragilis,* το οποίο απαριθμεί πάνω από 20 διαφορετικά είδη και οι μολύνσεις που προκαλεί φτάνουν να έχουν θνησιμότητα γύρω στο 20%. Τα B. *fragilis* παράγουν μία τοξίνη, την B. *fragilis* toxin- BFT, η οποία έχει συσχετιστεί με διαρροϊκές ασθένειες, χρόνια φλεγμονή και καρκινογένεση παχέος εντέρου [8].

Τα *Bacteroidetes* φαίνεται να παίζουν κάποιο ρόλο και στο σωματικό βάρος βάση της βιβλιογραφίας. Ειδικότερα, σημειώνεται η συσχέτιση των επιπέδων των 2 κύριων φύλων του ανθρώπινου εντερικού μικροβιόκοσμου, *Bacteroidetes* και *Firmicutes,* με την παχυσαρκία σε δείγματα ανθρώπων και πειραματόζωων ελεύθερων φυσικού μικροβιόκοσμου [13, 14]. Ορισμένες μελέτες ανέφεραν μάλιστα ότι σε παχύσαρκα άτομα που έχασαν βάρος παρατηρήθηκε αύξηση του πληθυσμού των *Bacteroidetes* [14].

2.1.2. *Clostridium* spp.

Τα είδη του γένους *Clostridium* είναι θετικά κατά Gram βακτήρια που σχηματίζουν ενδοσπόρια και είναι υποχρεωτικώς αναερόβιοι, ενώ το όνομα τους προέρχεται από την ελληνική λέξη <<Κλωστήρ>> [10]. Αναπτύσσονται στον εντερικό σωλήνα του ανθρώπου, στον τράχηλο της μήτρας και στον κόλπο των γυναικών, στο έδαφος, στα ιζήματα της θάλασσας, στην αποσυντιθέμενη βλάστηση και στον εντερικό σωλήνα άλλων σπονδυλωτών και εντόμων [15]. Η ενέργεια που προσλαμβάνουν είναι το ATP από τα υποστρώματα στα οποία αναπτύσσονται. Δεν έχουν σύστημα κυτοχρωμάτων και μηχανισμό οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Οι μηχανισμοί παραγωγής ενέργειας του *Clostridium* spp. είναι αρκετοί και διαφέρουν ανάλογα το είδος του γένους *Clostridium.* Μάλιστα, οι υποδιαιρέσεις του γένους βασίζονται στις ιδιότητες αυτές και στη φύση του υποστρώματος που ζυμώνεται. Κάποια από τα *Clostridium* παράγουν βουτυρικό οξύ ως προϊόν από τη ζύμωση σακχάρων, ενώ άλλα παράγουν επίσης ακετόνη και βουτανόλη. Μερικά *Clostridium* είναι αζωτοδεσμευτικά, δηλαδή δεσμεύουν αναερόβια άζωτο. Πέραν της ζύμωσης των σακχάρων, κάποια είδη *Clostridium* μπορούν να ζυμώνουν αμινοξέα όπως η αλανίνη, η κυστεΐνη, το γλουταμικό οξύ, η γλυκίνη, η ιστιδίνη, η

σερίνη και η θρεονίνη. Τα προϊόντα αυτής της ζύμωσης είναι κυρίως το οξικό οξύ, το βουτυρικό οξύ, το CO_2 και το H_2. Τα προϊόντα αυτά είναι ουσίες δύσοσμες και ευθύνονται για τη μυρωδιά της σήψης από τη δράση των *Clostridium* [10].

Περίπου 30 είδη *Clostridium* από τα 90 συνολικά, έχουν συσχετιστεί με παθολογικές καταστάσεις του ανθρώπου [16]. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στην παραγωγή τοξινών από τα *Clostridium.* Το C. *botulinum* προκαλεί την ασθένεια της αλλαντίασης, το *C. difficile* προκαλεί ψευδομεμβρανώδη κολίτιδα καθώς αναπτύσσεται μετά τη λήψη αντιβιοτικών, το C. *tetani* ευθύνεται για τον τέτανο και το *C. perfringens* για την αεριογόνο γάγγραινα και για την πρόκληση γαστρεντερίτιδας στον άνθρωπο και τα κατοικίδια ζώα [10].

Πίνακας 2: Agents and toxins associated with major clostridial infections in humans.

Syndrome	Clostridial agent	Implicated toxin(s)
Tetanus	*C. tetani*	Tetanospasmin
Botulism	*C. botulinum*	Botulinum toxins A, B, E, F, G
Food poisoning	*C. perfringens* type A	Enterotoxin
Gas gangrene	*C. perfringens* type A	α-Toxin (phospholipase C)
	C. septicum	α-Toxin (pore-forming hemolysin)
Enteritis necroticans	*C. perfringens* type C	β-Toxin
Pseudomembranous colitis	*C. difficile*	Toxin A (enterotoxin), toxin B (cytotoxin)

Πίνακας 2*: Clostridium* spp., μολύνσεις και εμπλεκόμενες τοξίνες

[Πηγή: Johnson S.(1997) Antibody responses to clostridial infection in humans. *Clin Infect Dis.* Sep;25 Suppl 2:S173-7]

Το C. *perfringens* είναι το σημαντικότερο είδος και αποτελεί το 20-40% όλων των απομονώσεων κλωστριδίων [16]. Παράγει πάνω από 16 τοξίνες που προκαλούν ιστολυτικές και εντερικές μολύνσεις, ενώ οι 4 από αυτές είναι θανατηφόρες. Η ανάπτυξη του C. *perfringens* και η δράση των τοξινών του (κυρίως της εντεροτοξίνης) είναι από τις συχνότερες αιτίες τροφικών δηλητηριάσεων ενώ υπολογίζεται ότι στις Ηνωμένες Πολιτείες κάθε χρόνο 1.000.000 περιστατικά τροφογενών ασθενειών οφείλονται στο C. *perfringens* [17].

2.1.3. *Lactobacillus* spp.

Το γένος *Lactobacillus* αποτελείται από τυπικά ραβδόμορφα, θετικά κατά Gram, αρνητικά στη δοκιμασία της καταλάσης βακτήρια τα οποία μπορεί να είναι από επιμήκη λεπτά μέχρι βραχέα κεκαμμένα. Δεν σχηματίζουν σπόρια και το γένος συμπεριλαμβάνει πάνω από 100 είδη λακτοβακίλλων. Απαντώνται συχνά με τη μορφή αλυσίδων ενώ η αυτόνομη κίνηση των κυττάρων τους δεν αποτελεί σύνηθες χαρακτηριστικό. Ζυμώνουν τα σάκχαρα και παράγουν

κυρίως γαλακτικό οξύ, το οποίο αποτελεί περίπου το 50% των προϊόντων. Μπορούν να παραχθούν επίσης αιθανόλη, οξικό οξύ, ηλεκτρικό οξύ, φορμικό οξύ και CO_2. Η πλειοψηφία των ειδών *Lactobacillus* είναι ομοζυμωτικά, ενώ ορισμένα είναι ετεροζυμωτικά. Ανάλογα με τη ζύμωση που κάνουν οι *Lactobacillus* χωρίζονται σε 3 κατηγορίες: α) υποχρεωτικά ομοζυμωτικοί, β) προαιρετικά ετεροζυμωτικοί και γ) υποχρεωτικά ετεροζυμωτικοί [10, 18, 19]. Οι λακτοβάκιλλοι εντοπίζονται παντού στην ανθρώπινη βακτηριακή χλωρίδα, όπως επίσης και σε κλινικές μολύνσεις πιο περιστασιακά. Υπάρχει δυσκολία στη ταυτοποίηση των λακτοβακίλλων σε επίπεδο ειδών, ενώ οι συμβατικές μεθόδοι ταυτοποίησης δείχνουν μόνο το 30-50% των απομονώσεων. Για ακριβή ταυτοποίηση των *Lactobacillus* απαιτείται μοριακή ανάλυση του γονιδίου 16S rRNA [20].

Σε σύγκριση με τα άλλα οξυγαλακτικά βακτήρια οι λακτοβάκιλλοι είναι συνήθως ανθεκτικότεροι σε όξινα περιβάλλοντα αφού έχουν την ιδιότητα να αναπτύσσονται σε τιμές pH έως και 4. Συνεπώς, ευθύνονται για την ολοκλήρωση των τελικών σταδίων πολλών οξυγαλακτικών ζυμώσεων, αφού σε συνθήκες που το pH φτάνει σε χαμηλές τιμές τα άλλα οξυγαλακτικά βακτήρια παύουν να αναπτύσσονται ενώ οι λακτοβάκιλλοι εξακολουθούν να αναπτύσσονται δείχνοντας ανοχή στις όξινες συνθήκες [10].

Τα είδη του γένους *Lactobacillus* είναι πολύ σπάνια, έως καθόλου, παθογόνα. Μάλιστα, παράγουν ένα εύρος αντιμικροβιακών παραγόντων και ανταγωνίζονται άλλους παθογόνους μικροοργανισμούς για το μέρος σχηματισμού αποικίας και για την κατανάλωση θρεπτικών συστατικών με αποτέλεσμα να επιδρούν θετικά στην υγεία του ξενιστή μη επιτρέποντας την ανάπτυξη των παθογόνων [21]. Φαίνεται να έχουν θεραπευτική δράση έναντι οξέων μολύνσεων που προκαλούν επεισόδια διαρροιών στα παιδιά [22] και επίσης ορισμένα στελέχη *Lactobacillus* φαίνεται να έχουν προστατευτική δράση έναντι του καρκίνου παχέος εντέρου μέσω αναστολής δραστηριότητας κάποιων ενζύμων που σχετίζονται με εντερική καρκινογένεση [23].

Από μία μετα-ανάλυση που έγινε μελετώντας την επίδραση της κατανάλωσης προβιοτικών (ζωντανοί μικροοργανισμοί που όταν καταναλωθούν σε επαρκείς ποσότητες, μπορούν να είναι ωφέλιμοι για την υγειά του ξενιστή [24]) που περιέχουν στελέχη λακτοβακίλλων (*Lactobacillus* containing probiotics-LCP) στη ρύθμιση του σωματικού βάρους, φάνηκε ότι κάποια συγκεκριμένα είδη λακτοβακίλλων συσχετίζονται με αύξηση σωματικού βάρους ενώ κάποια άλλα φαίνεται να έχουν προστατευτική δράση έναντι της παχυσαρκίας. Το συμπέρασμα ήταν ότι τα LCP επηρεάζουν το σωματικό βάρος με έναν τρόπο ειδο-εξαρτώμενο και έναν τρόπο που εξαρτάται από τον ξενιστή, δηλαδή ανάλογα το είδος λακτοβακίλλων και τον ξενιστή το σωματικό βάρος επηρεάζεται διαφορετικά. Τονίζεται βέβαια από τους ερευνητές η ανάγκη περαιτέρω έρευνας για να αποσαφηνιστεί ο ρόλος των στελεχών του γένους

Lactobacillus στη ρύθμιση του σωματικού βάρους και στην συνεισφορά τους στο ενεργειακό ισοζύγιο του ανθρώπου [25].

2.1.4. *Bifidobacterium* spp.

Τα μπιφιδοβακτήρια είναι από τις επικρατέστερες ομάδες μικροοργανισμών στο παχύ έντερο του ενήλικου ανθρώπου (~10^8-10^9 CFU/g με καλλιεργητικές μεθόδους, >1% από το συνολικό αριθμό βακτηρίων βάσει μοριακών μεθόδων). Είναι αναερόβια βακτήρια, θετικά κατά Gram, αρνητικά στη δοκιμασία της καταλάσης που δεν σχηματίζουν ενδοσπόρια. Η μορφολογία τους είναι χαρακτηριστική καθώς είναι της μορφής Y, έχοντας ροπαλοειδή άκρα. Κατοικούν στο έντερο του ανθρώπου και των ζώων φυσιολογικά και είναι από τα πρώτους μικροοργανισμούς που εγκαθίσταται στο έντερο ενός νεογνού που ακόμα δεν έχει αποικηθεί από πληθώρα βακτηρίων και από τους επικρατέστερους μικροοργανισμούς στα βρέφη που θηλάζουν μέχρι και τον απογαλακτισμό τους. Μερικά από τα είδη που εντοπίζονται στα παιδιά είναι τα *Bifidobacterium breve, Bifidobacterium infantis* και *Bifidobacterium longum*, ενώ στους ενήλικες τα *Bifidobacterium bifidum* και *Bifidobacterium longum* [10, 26, 27].

Τα μπιφιδοβακτήρια έχουν τη δυνατότητα να παράγουν λιπαρά οξέα βραχέας αλύσου (Short Chain Fatty Acids- SCFAs) όπως το οξικό οξύ, γαλακτικό οξύ και φορμικό οξύ μέσω καταβολισμού ολιγοσακχαριτών, πολυσακχαριτών και πρωτεϊνών [28]. Ζυμώνουν φυτικές ίνες των τροφίμων και ανθεκτικό άμυλο παράγοντας οξικό και βουτυρικό οξύ μέσω του κύκλου της 6-φωσφοφρουκτόζης. Με τον κύκλο αυτό, παράγεται φώσφο-ένολο-πυροσταφυλικό οξύ που μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό μέσω διάσπασης και με τη δράση των μπιφιδοβακτηρίων το πυροσταφυλικό γίνεται ακετυλο-CoA, το οποίο στη συνέχεια δίνει τα προαναφερθέντα SCFAs [29, 30]. Τα SCFAs δρουν πολύ ευεργετικά για τον ξενιστή καθώς μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης γαστρεντερικών διαταραχών, καρκίνου και καρδιαγγειακών ασθενειών. Πιο συγκεκριμένα, το βουτυρικό οξύ είναι η κύρια πηγή ενέργειας των εντεροκυττάρων, το προπιονικό οξύ λαμβάνεται σε μεγάλο βαθμό από το ήπαρ και το οξικό οξύ εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος για να μεταβολιστεί από τους περιφερικούς ιστούς [28]. Τα μπιφιδοβακτήρια ζυμώνουν μία ποικιλία υδατανθράκων και παράγουν οξέα, αλλά όχι αέρια όπως άλλοι μικροοργανισμοί. Μέσω ενός χαρακτηριστικού μεταβολικού μονοπατιού (bifidus shunt) καταβολίζουν εξόζες προς οξικό και γαλακτικό οξύ με μία αναλογία περίπου 3:2, ενώ παράγονται επίσης φορμικό οξύ, αιθανόλη και ηλεκτρικό οξύ σε μικρότερες ποσότητες. Το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση είναι η φωσφοκετολάση της 6-φωσφοφρουκτόζης, το οποίο χρησιμοποιείται επίσης για την ταυτοποίηση των *Bifidobacterium* spp. [31, 32].

Ένα άλλο χαρακτηριστικό των μπιφιδοβακτηρίων είναι η παραγωγή βιοενεργών λιπαρών οξέων, τα οποία όταν γίνει η πέψη τους δρουν ευεργετικά για την υγεία του ξενιστή μειώνοντας τον κίνδυνο για καρδιαγγειακά και καρκίνο, ρυθμίζοντας τις ανοσολογικές και φλεγμονώδεις απαντήσεις και βελτιώνοντας την οστική μάζα του οργανισμού [33, 34]. Τέτοιο λιπαρό οξύ είναι το συζευγμένο λινολεϊκό οξύ (CLA) που παράγουν, του οποίου τα cis-9, trans-11 (c9, t11) και τα trans-10, cis-12 (t10, c12) CLA είναι τα κύρια βιολογικώς ενεργά CLA ισομερή [33]. Η κατανάλωση CLAs από δείγμα ζώων έχει συσχετιστεί με απώλεια σωματικού βάρους [35], ενώ το ίδιο δεν έχει φανεί και για τους ανθρώπους [36].

Τα *Bifidobacterium* spp. που χρησιμοποιούνται ευρέως ως προβιοτικά έχουν συσχετιστεί με οφέλη για την υγεία του ξενιστή. Έχει βρεθεί ότι προλαμβάνουν επεισόδια διαρροιών, ανακουφίζουν καταστάσεις δυσανεξίας στη λακτόζη, έχουν ανοσορρυθμιστικές ιδιότητες διεγείροντας το ανοσοποιητικό σύστημα, έχουν αντικαρκινογενετικές ιδιότητες και τέλος μπορούν να μειώσουν τα επίπεδα χοληστερόλης ορού του ανθρώπου [26, 37]. Επίσης, ανταγωνίζονται άλλα παθογόνα και εμποδίζουν έτσι την προσκόλληση τους στην επιφάνεια του εντερικού επιθηλίου [38].

2.1.5. *Staphylococcus* spp.

Τα είδη του γένους *Staphylococcus* είναι θετικοί κατά Gram κόκκοι, θετικοί στη δοκιμασία της καταλάσης. Είναι προαιρετικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί, δεν έχουν αυτόνομη κίνηση και σχηματίζουν μορφές που μοιάζουν με σταφύλια σε αλυσίδες. Η διαφορά τους από στρεπτόκοκκους που μοιάζουν πολύ μεταξύ τους, είναι ο σχηματισμός αυτών των μορφών (σαν τσαμπιά σταφυλιών) που έχουν 2 επίπεδα σε αντίθεση με τους στρεπτόκοκκους που έχουν απλή μορφή κόκκων σε αλυσίδες και έχουν ένα επίπεδο. Οι σταφυλόκοκκοι απαντώνται στο μικροβιόκοσμο των θηλαστικών με πιο συχνά τα είδη S. *epidermidis* και S. *aureus*. Αντέχουν στα μειωμένα υδατικά δυναμικά και μπορούν να ανεχτούν τις συνθήκες ξήρανσης και τις υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων [10]. Αναπτύσσονται μέσω οξειδωτικής ζύμωσης και επίσης ζυμώνοντας γλυκόζη με παραγωγή γαλακτικού οξέος. Υπάρχουν 2 τυπικά είδη αποικιών που σχηματίζουν, ο ένας είναι κίτρινου χρώματος με σχετικά μεγάλες αποικίες σε μέγεθος που σχηματίζονται από τον S. *aureus* και το άλλο είναι λευκού χρώματος με σχετικά μικρές αποικίες σε μέγεθος που σχηματίζονται από τον S. *epidermitis* στα αντίστοιχα εκλεκτικά υποστρώματα [10, 39].

Το είδος S. *epidermidis* περιλαμβάνει μη παθογόνους μικροοργανισμούς που δεν παράγουν κάποια χρωστική ουσία και βρίσκονται στην επιφάνεια του δέρματος ή σε βλεννώδεις μεμβράνες του ανθρώπου [10].

Ο μικροοργανισμός S. *aureus* είναι μολυσματικός και στον άνθρωπο και στα ζώα. Το 30% των ανθρώπων είναι φορείς. Παράγει μία χρωστική κίτρινου χρώματος και βρίσκεται κυρίως στα ρουθούνια και το δέρμα του ανθρώπου [40]. Αποτελεί την κύρια αιτία ενδονοσοκομειακών και εξωνοσοκομειακών λοιμώξεων καθώς παράγει ένα μεγάλο αριθμό τοξινών και είναι ανθεκτικός στα περισσότερα αντιβιοτικά [41]. Έχει την αξιοσημείωτη δυνατότητα να αποκτά γονίδια από άλλα βακτήρια αποκτώντας κατά αυτό τον τρόπο γενετική ποικιλομορφία [40, 42]. Μερικές από τις μολύνσεις που προκαλεί ο S. *aureus* είναι οι δοθιήνες (καλόγερους), οι φλύκταινες στο πρόσωπο, η πνευμονία, η οστεομυελίτιδα, η μηνιγγίτιδα και η αρθρίτιδα [10].

2.1.6. *Streptococcus* spp.

Το γένος *Streptococcus* είναι μία από τις πιο επεμβατικές ομάδες βακτηρίων. Είναι θετικά κατά Gram οργανισμοί, δεν έχουν αυτόνομη κίνηση και ανήκουν στην ομάδα των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Αναπτύσσονται είτε σε ζευγάρια είτε με τη μορφή αλυσίδων ποικίλου μήκους σε ένα επίπεδο. Οι περισσότεροι στρεπτόκοκκοι είναι αρνητικοί στις δοκιμασίες της οξειδάσης και της καταλάσης και είναι προαιρετικά αναερόβιοι ενώ μερικοί είναι υποχρεωτικά αναερόβιοι [43].

Μέχρι το 1984, στην κατηγορία του γένους *Streptococcus* κατατάσσονταν πολλοί μικροοργανισμοί που τότε χωρίστηκαν στις ξεχωριστές κατηγορίες των εντερόκοκκων (*Enterococcus*) και λακτόκοκκων (*Lactococcus*). Η εφαρμογή των γενετικών συγκρίσεων βοήθησε στη σωστή ταξινόμηση των διαφόρων ειδών στρεπτόκοκκων [44]. Αυτή τη στιγμή οι στρεπτόκοκκοι χωρίζονται σε ομάδες ανάλογα με τη σύσταση των κυτταρικών τοιχωμάτων τους. Οι πιο γνωστές ομάδες είναι η A και η B (group A, group B) που είναι και τα παθογόνα που προκαλούν πιο συχνά λοιμώξεις στους ανθρώπους. Ο κυριότερος εκπρόσωπος της ομάδας A είναι το είδος *S. pyogenes*. Στην ομάδα B συμπεριλαμβάνονται τα είδη *S. pneumonia* και *S. agalactiae* [43].

2.1.7. *Enterococcus* spp.

Το γένος *Enterococcus* αποτελείται από οξυγαλακτικά βακτήρια του φύλου Firmicutes. Οι εντερόκοκκοι είναι θετικοί κατά Gram κόκκοι που είναι είτε με τη μορφή ζευγαριών (diplococci) είτε με τη μορφή μικρών αλυσίδων. Είναι προαιρετικά αναερόβια βακτήρια αρνητικά στη δοκιμασία της καταλάσης που δεν σχηματίζουν ενδοσπόρια ενώ οι αποικίες τους στα τρυβλία είναι λευκού χρώματος και απαλής υφής [45]. Μέχρι και το 1984 κάποια είδη *Enterococcus* συγκαταλέγονταν στην ομάδα των *Streptococcus,* έως ότου μοριακές αναλύσεις αναδείξανε τις διαφορές με αποτέλεσμα την ομαδοποίηση τους σε άλλο γένος [46]. Βάση των

φυσικών χαρακτηριστικών είναι δύσκολα αντιληπτή η διαφορά των εντερόκοκκων από τους στρεπτόκοκκους, αλλά οι εντερόκοκκοι διαφέρουν λόγω της ικανότητας τους να αναπτύσσονται σε NaCl 6,5%, σε pH 9,6 και σε θερμοκρασία 10°C [45, 47].

Οι εντερόκοκκοι μπορούν να ανεχτούν ένα εύρος περιβαλλοντικών συνθηκών, όπως είναι οι ακραίες θερμοκρασίες (5-65°C), το pH (4,5-10) και υψηλές συγκεντρώσεις NaCl [48]. Η γλυκόζη ζυμώνεται από τα στελέχη του γένους *Enterococcus* προς γαλακτικό οξύ, δυνατή είναι η ζύμωση της λακτόζης και άλλων υδατανθράκων ενώ δεν μπορεί να γίνει πέψη της κυτταρίνης, των πηκτινών και των υδρολυμένων τριγλυκεριδίων [45].

Οι εντερόκοκκοι αποτελούν μέρος του μικροβιόκοσμου του ανθρώπου και των ζώων. Στο έντερο του ανθρώπου συναντώνται συχνά 2 είδη του γένους *Enterococcus,* το *E. faecalis* (90-95%) και το *E. faecium*(5-10%) [45]. Στα ζώα πιο συχνά βρίσκονται τα *E.faecium* και στα φυτά τα *E. mundtii* και *E. casseliflavus*.[46]. Επίσης, εντοπίζονται σε μία μεγάλη ποικιλία τροφίμων όπως τυριά, ψάρια, λουκάνικα, μοσχαρίσιο και χοιρινό κρέας. Παράγουν βακτηριοσίνες, αντιμικροβιακές ενώσεις που αναστέλλουν την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών, προστατεύοντας έτσι τα τρόφιμα από μολύνσεις [48].

Κάποια είδη εντερόκοκκων παράγουν υδρολάσες χολικών οξέων οι οποίες διασπούν τα χολικά άλατα προκαλώντας την απέκκριση τους και σχετίζονται με τη μείωση της χοληστερόλης ορού [49, 50].

Ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά εμφανίζουν κάποια είδη εντερόκοκκων είτε έχοντας την εξαρχής είτε αποκτώντας την μέσω οριζόντιας ανταλλαγής γενετικού υλικού με άλλα βακτήρια ή μέσω μεταλλάξεων των εγγενών γονιδίων τους [51-53]. Γι’ αυτό το λόγο οι εντερόκοκκοι συγκαταλέγονται στα σημαντικά ενδονοσοκομειακά παθογόνα [54]. Τα παθογόνα είδη *Enterococcus* μπορούν να προκαλέσουν ουρολοιμώξεις, βακτηριαιμία, βακτηριακή ενδοκαρδίτιδα, μηνιγγίτιδα και εκκολπωματίτιδα [46].

2.1.8. E. *coli*

Ανήκουν στην οικογένεια των εντεροβακτηρίων (Enterobacteriaceae) και είναι αρνητικά κατά Gram, προαιρετικά αναερόβια βακτήρια. Είναι βάκιλλοι και εντοπίζονται στον εντερικό μικροβιόκοσμο του ανθρώπου [55]. Τα προαιρετικά αναερόβια βακτήρια συμπεριλαμβανομένου της *E. coli* αποτελούν το 0,1% περίπου του μικροβιόκοσμου του εντέρου του ανθρώπου όπου και επικρατούν αναερόβιες συνθήκες [56]. Έχουν βρεθεί επίσης στο έντερο πολλών ζώων (βοοειδών κυρίως και κατσικιών, προβάτων και γουρουνιών) όπως και στα κόπρανα αυτών [57]. Έχουν την ιδιότητα να παράγουν βιταμίνη Κ για τον ξενιστή [58] και να τον προφυλάσσουν από παθογόνα εμποδίζοντας την αποίκηση τους στο εντερικό επιθήλιο δρώντας ανταγωνιστικά [59].

Είναι από τα είδη που έχουν μελετηθεί περισσότερο από κάθε άλλο είδος μικροοργανισμών. Έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από 700 διαφορετικοί ορότυποι *E. coli* [60].

Τα περισσότερα στελέχη *E. coli* είναι ακίνδυνα για την υγεία του ξενιστή εκτός κάποιων ορότυπων που μπορούν να προκαλέσουν τροφικές δηλητηριάσεις και είναι περιστασιακά υπεύθυνοι για τις επιστροφές τροφίμων εξαιτίας της μόλυνσης αυτών. Αυτοί οι ορότυποι ευθύνονται για λοιμώξεις του γαστρεντερικού και ουρολοιμώξεις [61].

2.1.9. *Candida* spp.

Οι ζύμες αποτελούν ένα μικρό κομμάτι του εντερικού μικροβιόκοσμου του ανθρώπου (10^2–10^4 CFU/ml εντερικού περιεχομένου) [21]. Το γένος *Candida* απαριθμεί 200 διαφορετικά είδη [62]. Είναι διπλοειδή και έχουν μεγάλη κλωνική λειτουργία αναπαραγωγής. Μπορούν να υποβληθούν σε σημαντική γενετική ποικιλομορφία μέσω ρύθμισης γονιδίων ή/και γενετικών αλλαγών (χρωμοσωμικές μεταβολές, μεταλλάξεις, απώλεια ετεροζυγωτίας) [63].

Οι ζύμες *Candida* όταν το ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου λειτουργεί κανονικά και ο εντερικός μικροβιόκοσμος δεν μεταβάλλεται, λειτουργούν ως συμβιωτικά χωρίς να προκαλούν μολύνσεις [64]. Τα *Candida* spp. είναι ευκαιριακά παθογόνα, δηλαδή μολύνουν τον ξενιστή μόνο όταν είναι εξασθενημένος ή ανοσοκατασταλμένος. Οι μολύνσεις από *Candida* είναι επιφανειακές ή επεμβατικές. Επιφανειακές είναι οι μολύνσεις του δέρματος και των βλεννωδών μεμβρανών που θεραπεύονται επιτυχώς με αντιμυκητιασικά φάρμακα. Οι επεμβατικές μολύνσεις από την άλλη μεριά είναι απειλητικές για την ζωή του ανθρώπου, πιθανώς λόγω έλλειψης αποτελεσματικών διαγνωστικών μεθόδων και ακατάλληλων αντιμυκητιασικών φαρμάκων [62].

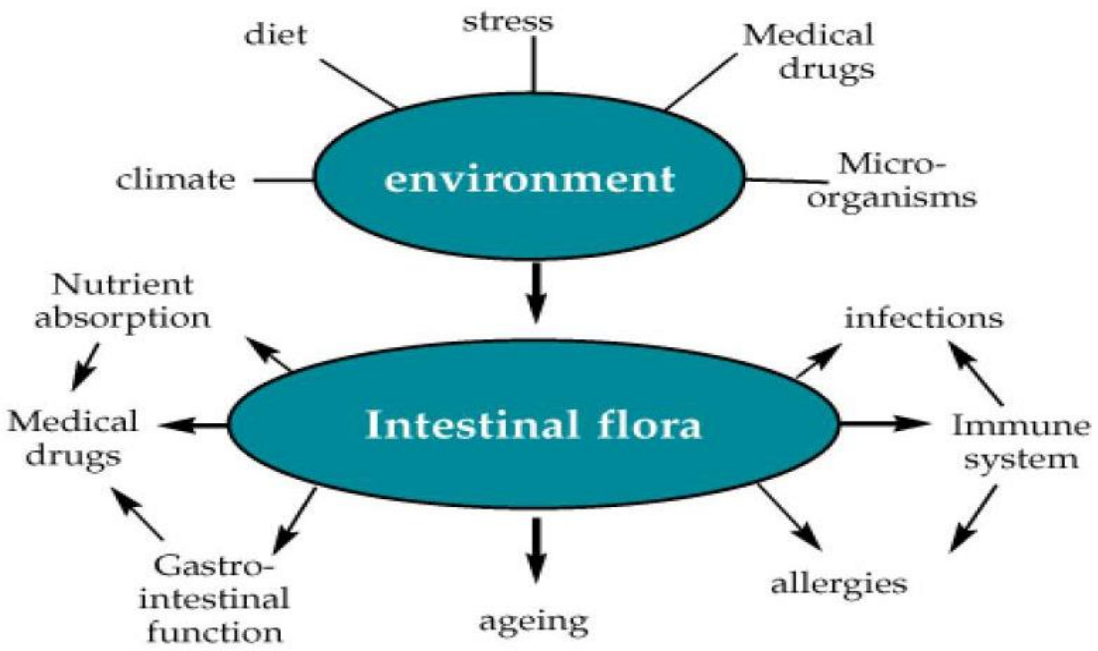
Το είδος *Candida albicans* είναι το πιο σημαντικό ευκαιριακό παθογόνο που ανήκει στην κατηγορία των μυκήτων. Εντοπίζεται στον γαστρεντερικό αυλό, στην ουρογενετική οδό και στον μικροβιόκοσμο της στοματικής κοιλότητας και του επιπεφυκότα [65]. Στην στοματική κοιλότητα μάλιστα αποτελεί το 75% των οργανισμών που εντοπίζονται στο μέρος αυτό [63]. Άλλα είδη *Candida* που έχουν βρεθεί σε υγιείς ανθρώπους είναι το *Candida glabrata*, το *Candida tropicalis*, το *Candida parapsilosis* και το *Candida krusei* [66]. Αυτά τα είδη μαζί με το *Candida albicans* ευθύνονται για το 90% των επεμβατικών μολύνσεων. Ο επιπολασμός των μολύνσεων κάθε είδους εξαρτάται από παράγοντες όπως η γεωγραφική θέση, το σύνολο των ασθενών και τις κλινικές συνθήκες που επικρατούν [67]. Το NNISS (National Nosocomial Infections Surveillance System) των Ηνωμένων Πολιτειών ανέφερε ότι τα *Candida spp.* είναι η 4^{η} πιο συχνή αιτία ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων του αίματος στα νοσοκομεία της Αμερικής,

μετά τον σταφυλόκοκκο αρνητικό στη κοαγκουλάση (coagulase-negative Staphylococci - CoNS), τον Staphylococcus aureus και τους εντερόκοκκους (enterococci) [68].

Χαρακτηριστικό του *Candida albicans* είναι ο σχηματισμός βιοφίλμ. Τα βιοφίλμ είναι δομημένες μικροβιακές κοινότητες που προσκολλούνται σε μία επιφάνεια και περιβάλλονται από εξωκυτταρικές πολυμερείς ουσίες. Η δομή τους, η οποία εξαρτάται από τις συνθήκες ανάπτυξης, αποτελείται από ένα λεπτό στρώμα κυττάρων ζύμης και ένα πιο παχύ στρώμα που περιέχει κύτταρα ζύμης και υφές. Τα βιοφίλμ είναι υπεύθυνα για τις μολύνσεις του αίματος που προκαλεί το είδος *Candida albicans*. Τα κύτταρα του βιοφίλμ είναι πολύ λιγότερο ευάλωτα σε αντιμικροβιακούς παράγοντες, όπως τα αντιβιοτικά. Αυτή η ιδιότητα τα κάνει ανθεκτικά στα αντιμυκητιασικά φάρμακα και δύσκολα στην αντιμετώπιση τους [69].

2.2. Παράγοντες που επηρεάζουν τον εντερικό μικροβιόκοσμο

Η σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου είναι συγκεκριμένη για τον κάθε ξενιστή, εξελίσσεται καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής ενός ατόμου και είναι ευάλωτη σε πολλές ενδογενείς και εξωγενείς τροποποιήσεις [70]. Ορισμένοι από τους παράγοντες που την επηρεάζουν είναι η διατροφή, η ηλικία, ο γονότυπος του ξενιστή, το περιβάλλον και η έκθεση σε διάφορα βακτήρια, το στρες, η κατανάλωση προβιοτικών και πρεβιοτικών, οι κλινικές παρεμβάσεις με αντιβιοτικά φάρμακα και οι χειρουργικές επεμβάσεις [71, 72].



Εικόνα 3: Παράγοντες που επηρεάζουν τον εντερικό μικροβιόκοσμο
[Πηγή: Cedgard Lennart, www.positivehealthonline.com, colon health, published in issue 33, October 1998].

2.2.1.Διατροφή

Ανάλογα το πρότυπο διατροφής, η σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου μεταβάλλεται σημαντικά. Έχει φανεί ότι οι άνθρωποι που καταναλώνουν συχνότερα τρόφιμα από την ομάδα του κρέατος συγκριτικά με τους χορτοφάγους έχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις ειδών του γένους *Bacteroides* και χαμηλότερες συγκεντρώσεις οξυγαλακτικών βακτηρίων και κολίμορφων βακτηρίων [10].

Δίαιτα με υψηλό ποσοστό πρωτεΐνης και χαμηλό ποσοστό υδατανθράκων φάνηκε να μειώνει σημαντικά το σύνολο των παραγόμενων λιπαρών οξέων βραχέως αλύσου (SCFAs) και ιδιαίτερα την συγκέντρωση βουτυρικού οξέος στα κόπρανα των εθελοντών που ακολουθούσαν αυτή τη δίαιτα σε σύγκριση με τη συγκέντρωση αυτών στα κόπρανα άλλων εθελοντών που ακολουθούσαν δίαιτα πλούσια σε πρωτεΐνες/μέτρια σε υδατάνθρακες και δίαιτα διατήρησης σωματικού βάρους. Επίσης παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στις μετρήσεις των μικροβιακών πληθυσμών *Roseburia* spp., *Eubacterium rectale* (υποομάδα του συμπλέγματος XIVa) και bifidobacteria όσο μειώνονταν οι υδατάνθρακες της διατροφής [73].

Τα αποτελέσματα μίας έρευνας που έγινε με δείγματα αφροαμερικανών και καυκάσιων Αμερικανών έδειξαν ότι τα άτομα που κατανάλωναν περισσότερες θερμίδες είχαν μικρότερο πληθυσμό κλωστριδίων. Επίσης ότι η κατανάλωση φυτικών ινών συσχετίζεται θετικά με τους πληθυσμούς οξυγαλακτικών βακτηρίων, οι οποίοι πιστεύεται ότι δρουν ευεργετικά για την υγεία του ξενιστή. Οι ίνες των σιτηρών και των φρούτων αλλά όχι των οσπρίων συσχετίστηκαν με τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Τα άτομα με μεγαλύτερη πρόσληψη ετεροκυκλικών αμίνων φάνηκαν να έχουν μεγαλύτερο πληθυσμό κλωστριδίων συμπλέγματος XIVa. Αυτές οι συγκρίσεις έγιναν με τα δεδομένα των μη λογαριθμημένων μετρούμενων πληθυσμών κάθε είδους μικροοργανισμών και ήταν στατιστικά σημαντικές ($p<0.05$). Βέβαια, η στατιστική σημαντικότητα δεν παρέμεινε και μετά την μετατροπή σε λογαρίθμους των μετρούμενων μικροβιακών πληθυσμών [74].

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ποντίκια τα οποία τρέφονταν με δυτικού τύπου δίαιτα μέχρι να γίνουν παχύσαρκα βρέθηκε μία αύξηση πληθυσμού της Τάξης Mollicutes του φύλου Firmicutes, η οποία έγινε η επικρατέστερη στον εντερικό μικροβιόκοσμο των ποντικών. Παρατηρήθηκε επίσης ότι με διαιτητικούς χειρισμούς που απέβλεπαν στην απώλεια βάρους και στη μείωση λιπώδους ιστού μειώνονταν και οι πληθυσμοί της Τάξης Mollicutes [75].

Διατροφή υψηλή σε απλά σάκχαρα προκαλεί αύξηση της δραστηριότητας του εντερικού μικροβιόκοσμου, μέσω της οποίας παράγονται τοξικά μεταβολικά προϊόντα όπως οξικό οξύ και αλκοόλη. Μειώνεται ο χρόνος διέλευσης της τροφής από το έντερο, το οποίο αυξάνει την έκθεση του εντερικού επιθηλίου σε δυνητικά τοξικά προϊόντα και επίσης αυξάνεται η

συγκέντρωση των δευτερογενών χολικών οξέων που οδηγούν στην αύξηση των ευκαιριακών βακτηριακών ειδών που χρησιμοποιούν τα χολικά οξέα στο μεταβολισμό τους.

Φθορά του εντερικού επιθηλίου και της βλέννης που το προστατεύει παρατηρείται μετά από δίαιτα ανεπαρκή σε υδατάνθρακες. Η αυξημένη χρησιμοποίηση και η πρόκληση φθοράς του επιθηλίου έχει συνέπειες για τον ξενιστή καθώς μετά οδηγείται σε αυξημένη προσκόλληση εντερικών βακτηρίων, δημιουργία χρόνιας φλεγμονής και τελικά βλάβη του επιθηλίου [76, 77].

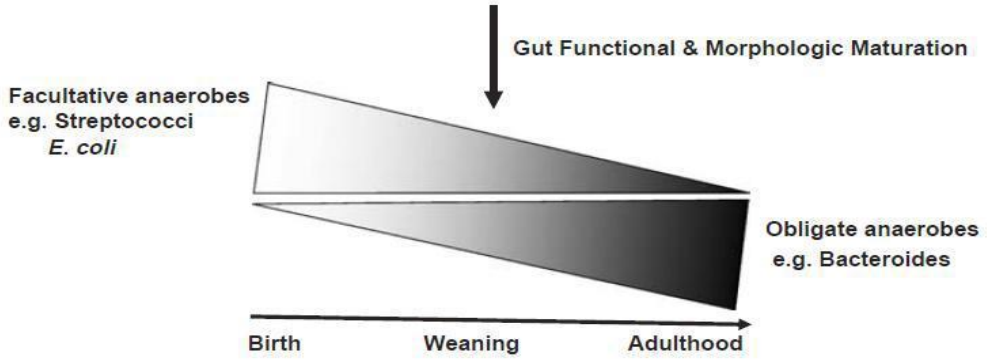
2.2.2. Ηλικία

Ο αποικισμός του εντέρου ξεκινάει με τη γέννηση του ανθρώπου, όπου ο τρόπος γέννησης (φυσιολογικός τοκετός ή καισαρική) διαδραματίζει ρόλο στο ποιοί θα είναι οι πρώτοι μικροοργανισμοί που θα αναπτυχθούν στο έντερο του νεογνού. Οι πηγές από τις οποίες προέρχονται οι μικροοργανισμοί του εντερικού μικροβιόκοσμου των νεογνών είναι ο κόλπος, το δέρμα και τα κόπρανα της μητέρας ενώ αν γίνει η γέννηση με καισαρική τομή τότε πηγές μπορεί να είναι τα μηχανήματα του νοσοκομείου, τα άλλα νεογνά, ο αέρας, το νοσηλευτικό προσωπικό και μάλιστα πιθανό είναι να επικρατήσουν αυτά τα περιβαλλοντικά βακτήρια έναντι των βακτηρίων που μεταδίδονται από τον μικροβιόκοσμο της μητέρας [78].

Οι μικροοργανισμοί των γενών *Bifidobacterium* και *Lactobacillus* εμφανίζονται μετά από 2-3 μέρες από τη γέννηση του νεογνού. Στα νεογνά που γεννιούνται με φυσιολογικό τοκετό κατά τους πρώτους 2-3 μήνες ζωής τους παρατηρείται ανάπτυξη των αναερόβιων βακτηρίων των ειδών *Enterobacteriaceae, Streptococci* και *Staphylococci* στο έντερο τους. Αυτά τα είδη είναι δυνητικά παθογόνα και προέρχονται από το εξωτερικό περιβάλλον, αλλά πιστεύεται ότι συμβάλλουν στη σύσταση ενός ωφέλιμου για την υγεία του ξενιστή μικροβιόκοσμου [78]. Στα νεογνά που γεννιούνται με καισαρική τομή παρατηρείται μειωμένος συνολικός πληθυσμός βακτηρίων συγκριτικά με τα νεογνά που γεννιούνται με φυσιολογικό τοκετό και επίσης το γένος *Bifidobacterium* αργεί να εμφανιστεί έως και τους πρώτους 6 μήνες ζωής του βρέφους [78].

Στη συνέχεια της ζωής του νεογνού πηγή μικροοργανισμών αποτελεί ο θηλασμός, οι αγκαλιές και τα φιλιά που έτσι μεταδίδονται επιδερμικά, περιβαλλοντικά και στοματικά βακτήρια. Ο θηλασμός συμβάλει στη μετάδοση μικροοργανισμών καθώς το μητρικό γάλα έχει υπολογιστεί ότι περιέχει περισσότερους από 109 μικροοργανισμούς/λίτρο στις υγιείς μητέρες. Τα είδη που έχουν για πηγή τη θηλή και το δέρμα της μητέρας και συναντούνται συχνότερα είναι τα *Staphylococci, Streptococci, Corynebacteria, Lactobacilli, Micrococci, Propionibacteria* και *Bifidobacterium.* Τα βρέφη που θηλάζουν και είχαν γεννηθεί με φυσιολογικό τοκετό έχουν ως επικρατές είδος στον εντερικό τους μικροβιόκοσμο το

Bifidobacterium spp. ενώ τα βρέφη που τρέφονται με υποκατάστατο μητρικού γάλακτος έχουν πιο ετερογενή σύσταση εντερικού μικροβιόκοσμου [79].



Εικόνα 4: Μεταβολή της σύστασης του εντερικού μικροβιόκοσμου ενός ατόμου με την πάροδο της ηλικίας.
[Πηγή: Hooper LV. (2004) Bacterial contributions to mammalian gut development. *Trends Microbiol*, 12, 129-134].

Μεγαλώνοντας το άτομο τείνει να έχει στον εντερικό μικροβιόκοσμο του 2 φύλα μικροοργανισμών που επικρατούν και παραμένουν σταθερά, το φύλο Bacteroidetes και το φύλο Firmicutes, ενώ τα φύλα Proteobacteria, Verrucomicrobia, Actinobacteria, Fusobacteria και Cyanobacteria είναι παρόντα σε χαμηλότερους πληθυσμούς [56].

Στην τρίτη ηλικία φαίνεται ότι επέρχεται μία μείωση στους πληθυσμούς των συνολικών αναερόβιων βακτηρίων και του είδους *Bifidobacterium* [80, 81] και ακόμα παρατηρείται ένα χαρακτηριστικό πρότυπο σύστασης μικροοργανισμών του φύλου Firmicutes στους ηλικιωμένους και τους εκατοχρονίτες σε σύγκριση με τους νεαρούς ενήλικες [82]. Επίσης, σημειώνεται αύξηση των πληθυσμών *Enterobacteriaceae* και *E.coli* όπως και στις ενδοτοξίνες που παράγονται από τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως αν αυτές οι αλλαγές του μικροβιόκοσμου γίνονται λόγω της παρόδου της ηλικίας εξ'ολοκλήρου ή συμβάλουν σε αυτό και οι αλλαγές των διατροφικών συνηθειών [80, 81]. Τέλος, σε ηλικιωμένους έχουν βρεθεί μεγαλύτεροι πληθυσμοί του είδους *Clostridium difficile*, το οποίο σχετίζεται με αυξημένη συχνότητα νοσηλείας και χορήγησης αντιβιοτικών [83].

2.2.3. Στρες

Οι κύριες αλλαγές που επιφέρει το στρες στο γαστρεντερικό σύστημα είναι μεταβολή της κινητικότητας του εντέρου, αύξηση της αντίληψης των σπλάχνων, αλλαγές στις γαστρεντερικές εκκρίσεις, αύξηση της εντερικής διαπερατότητας, αρνητική επίδραση στην ικανότητα που έχει η

βλέννα του εντέρου να αναγεννιέται και στην αιμάτωση του βλεννογόνου, αρνητική επίδραση στον εντερικό μικροβιόκοσμο [84]. Το στρες μπορεί να αλλάξει τη σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου επηρεάζοντας αρνητικά τους πληθυσμούς ωφέλιμων προβιοτικών βακτηρίων όπως είναι τα γένη *Lactobacillus* spp. και *Bifidobacterium* spp. και θετικά την ανάπτυξη των δυνητικά παθογόνων. Το συναισθηματικό στρες μπορεί να αυξήσει την αποβολή των λακτοβακίλλων έως και 6 μέρες μετά το επεισόδιο. Η μείωση του πληθυσμού των λακτοβακίλλων καθιστά ευκολότερη την αποίκηση εξωγενών βακτηρίων στον εντερικό επιθήλιο [77]. Έχει παρατηρηθεί επίσης, ότι η νορεπινεφρίνη, νευροδιαβιβαστής που αυξάνεται στο αίμα με το στρες, αυξάνει την μολυσματικότητα των ειδών *E. coli* και *C. jejuni [85]*.

2.2.4. Πρεβιοτικά και προβιοτικά

Πρεβιοτικά

Τα πρεβιοτικά έχουν οριστεί ως τα άπεπτα συστατικά των τροφίμων τα οποία επιλεκτικά διεγείρουν την ανάπτυξη ή/και την δραστηριότητα ενός ή περιορισμένου αριθμού γενών/ειδών μικροβίων στον μικροβιόκοσμο του εντέρου που παρέχουν οφέλη στην υγεία του ξενιστή [86]. Είναι συνήθως ολιγοσακχαρίτες που βασίζονται στη φρουκτόζη (fructo-oligosaccharides-FOS), στη γαλακτόζη (galacto-oligosaccharides-GOS) και σε άλλα σάκχαρα, παρόλο που συχνά εμπεριέχουν και ένα μίγμα μονομερών. Πηγές πρεβιοτικών από τα τρόφιμα είναι ο ηλίανθος, τα ραδίκια (ινουλίνη), τα σπαράγγια, τα κρεμμύδια. Παράγονται επίσης με τη ζύμωση που κάνουν συγκεκριμένοι μύκητες και ζύμες στη σακχαρόζη και τη λακτόζη. Τα πρεβιοτικά δεν αποικοδομούνται κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα και έτσι καταλήγουν σχεδόν άθικτα στο κόλον του ανθρώπου [87].

Στο παχύ έντερο μεταβολίζονται προς λιπαρά οξέα βραχέας αλύσου (SCFAs) από τους μικροοργανισμούς που επικρατούν. Η ζύμωση αυτή των πρεβιοτικών προκαλεί την διέγερση της ανάπτυξης και την αύξηση του πληθυσμού των ειδών *Bifidobacterium* και *Lactobacillus* [88, 89]. Η σημαντική αλλαγή της σύστασης του εντερικού μικροβιόκοσμου που αποδίδεται στα πρεβιοτικά είναι κυρίως η αύξηση του πληθυσμού των ευεργετικών για ην υγεία μικροοργανισμών *Bifidobacterium* [86, 87, 90, 91].

Τα οφέλη της κατανάλωσης πρεβιοτικών είναι η βελτίωση ή/και σταθεροποίηση της σύστασης του εντερικού μικροβιόκοσμου, η βελτίωση εντερικών λειτουργιών (όγκος κένωσης, συχνότητα κενώσεων, σύσταση των κοπράνων), η αύξηση της απορρόφησης μετάλλων και η βελτίωση της υγείας των οστών (πυκνότητα οστών σε ασβέστιο και μέταλλα), η ρύθμιση της παραγωγής γαστρεντερικών πεπτιδίων, του ενεργειακού μεταβολισμού και του κορεσμού, η έναρξη και η ρύθμιση των ανοσοποιητικών λειτουργιών, η αντιμετώπιση του καρκίνου, η θετική

επίδραση στο μεταβολισμό των λιποειδών, η μείωση του κινδύνου γαστρεντερικών λοιμώξεων (επεισόδια διαρροιών), η μείωση της μεταβολικής εντεροτοξαιμίας και η βελτίωση της λειτουργίας του εντερικού φραγμού [86, 92].

Μελέτες που έχουν γίνει σε ποντίκια που τους χορηγήθηκαν πρεβιοτικά στη δίαιτα που ακολουθούσαν έδειξαν μειωμένη ενεργειακή πρόσληψη και προστασία έναντι ανάπτυξης παχυσαρκίας και λιπώδους ιστού σε σύγκριση με άλλα ποντίκια που τους χορηγούνταν δίαιτα χωρίς πρεβιοτικά [93, 94]. Οι συγγραφείς ανέφεραν μάλιστα ότι τα πρεβιοτικά αυξάνουν τον πληθυσμό των *bifidobacterium*, το οποίο συσχετίζεται αρνητικά με την εντεροτοξαιμία [95]. Η επίδραση των πρεβιοτικών στο σωματικό βάρος των υπέρβαρων και παχύσαρκων ανθρώπων που μελετήθηκε σε μία έρευνα φαίνεται να είναι παρόμοια με αυτή των ποντικιών [96].

Προβιοτικά

Τα προβιοτικά είναι ζωντανοί μικροοργανισμοί, που βρίσκονται σε κάποια προϊόντα τροφίμων ή συμπληρώματα, τα οποία, όταν καταναλώνονται σε επαρκείς ποσότητες, μπορεί να είναι ωφέλιμα για την υγεία των ανθρώπων. Βοηθούν στη διατήρηση καλής ισορροπίας των βακτηρίων που υπάρχουν στον γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου [97].

Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται στα προϊόντα προβιοτικών (κυρίως γαλακτοκομικά προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση) είναι οι *Lactobacillus rhamnosus* GG, *L. reuteri*, *bifidobacteria* και συγκεκριμένα στελέχη των ειδών *L. casei* και *L. acidophilus*. Επίσης, έχουν μελετηθεί για τη προβιοτική τους δράση το στέλεχος του είδους E. *coli* Nissle 1917, οι εντερόκοκκοι *Enterococcus faecium* SF68 και οι ζύμες *Saccharomyces boulardii* [92]. Σαν προβιοτικά χρησιμοποιούνται επίσης κάποια στελέχη στρεπτόκοκκων θερμόφιλων. Τα προβιοτικά μπορούν να καταναλωθούν και με συμπληρώματα διατροφής, στα οποία βρίσκονται με τη μορφή σκόνης.

Οι μικροοργανισμοί αυτοί επιβιώνουν κατά την πέψη του τροφίμου και φτάνουν έως το κόλον του ανθρώπου, όπου και ασκούν την ευεργετική τους δράση βελτιώνοντας την υγεία του ξενιστή ενισχύοντας τον εντερικό του μικροβιόκοσμο [98].

Τα προβιοτικά δρουν ευεργετικά για τον ξενιστή καθώς προστατεύουν από αύξηση των παθογόνων στον εντερικό μικροβιόκοσμο ανταγωνίζοντας τα στην πρόσληψη θρεπτικών συστατικών και στην προσκόλληση τους στο βλεννογόνο του εντερικού επιθηλίου, βοηθούν στη σύνθεση βιταμίνης Κ, ζυμώνουν τις άπεπτες φυτικές ίνες των τροφίμων, επιδρούν θετικά στη διέλευση του εντερικού περιεχομένου μέσω γρηγορότερης περίσταλσης, ρυθμίζουν την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή και αποτοξινώνουν τα ξενοβιοτικά (ουσίες ξένες προς ένα ζώντα οργανισμό) [98]. Επίσης, έχει βρεθεί ότι μειώνουν τις διάρροιες που προκαλούνται από

λήψη αντιβιοτικών και ανακουφίζουν τα συμπτώματα δυσανοχής στη λακτόζη, μειώνουν τη συγκέντρωση ενζύμων που προωθούν τη δημιουργία καρκίνου, επιδρούν θετικά στις φλεγμονώδης νόσους του εντέρου, στο ευερέθιστο έντερο και στη δυσκοιλιότητα, προλαμβάνουν αλλεργίες και ατοπικές ασθένειες στα βρέφη, προλαμβάνουν ασθένειες της αναπνευστικής οδού και επίσης μολύνσεις της ουρογενετικής οδού [92].

Αρκετές είναι οι μελέτες που έχουν ενοχοποιήσει τα προβιοτικά για τις ανεπιθύμητες ενέργειες τους σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς αφού μπορούν να προκαλέσουν μέχρι μηκυταιμία (*Saccharomyces boulardii)* και σήψη από βακτήρια [99-101]. Γι αυτό πρέπει να χρησιμοποιούνται με ιδιαίτερη προσοχή από τους ανοσοκατασταλμένους και τους βαρέως πάσχοντες ασθενείς [102].

Μελέτες που έχουν γίνει σε ποντίκια με χορήγηση μίγματος προβιοτικών (λακτοβακίλλων και μπιφιδοβακτηρίων) [103] και σε ανθρώπους με χορήγηση του *Lactobacillus (LG2055)* [104] έδειξαν μείωση της στεάτωσης, βελτίωση ινσουλινοαντίστασης και οφέλη στις μεταβολικές διαταραχές όπως η αύξηση λιπώδους ιστού στην κοιλιακή χώρα και η παχυσαρκία αντίστοιχα.

2.2.5. Αντιβιοτικά

Τα αντιβιοτικά αποτελούν την συνήθη αιτία μεγάλων αλλαγών στη σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου του ανθρώπου. Ο βαθμός επιρροής των αντιβιοτικών στον μικροβιόκοσμο του εντέρου εξαρτάται από τη φαρμακοκινητική τους, το φάσμα της δράσης τους, τη διάρκεια χορήγησης και τη δοσολογία τους [77].

Η λήψη αντιβιοτικών από το στόμα αναστέλλει την ανάπτυξη όχι μόνο των παθογόνων μικροοργανισμών αλλά και του φυσιολογικού μικροβιόκοσμου. Υπό τη δράση των αντιβιοτικών, η συνεχής ροή του εντερικού περιεχομένου προς την αποβολή του από τον οργανισμό οδηγεί προοδευτικά σε απώλεια των βακτηρίων που υπήρχαν και σε ουσιαστική αποστείρωση του εντερικού σωλήνα. Η απουσία του εντερικού μικροβιόκοσμου μπορεί να επιτρέψει την εγκατάσταση ευκαιριακών παθογόνων και να αυξήσει τον κίνδυνο λοίμωξης από αυτά. Μετά τη διακοπή της αντιβιοτικής θεραπείας αποκαθίστανται κατά κανόνα ο φυσιολογικός μικροβιόκοσμος, αν και απαιτείται αρκετό χρονικό διάστημα προτού επιτευχθεί κάτι τέτοιο [10, 105].

Ανεπιθύμητες ενέργειες των αντιβιοτικών είναι η πρόκληση διαρροιών και λοίμωξης που συνεπάγονται προβλήματα υγείας για τον ξενιστή εξαιτίας ανάπτυξης παθογόνων μικροοργανισμών. Επίσης, μπορούν να προκληθούν ηλεκτρολυτικές διαταραχές, περιορισμός θεραπευτικής δράσης φαρμακευτικών βοτάνων και φυτοοιστρογόνων ενώ παρατηρείται

αυξημένη επιρρέπεια στις λοιμώξεις από ευκαιριακά παθογόνα λόγω αλλαγής της σύστασης του εντερικού μικροβιόκοσμου [77].

2.3. Λειτουργίες εντερικού μικροβιόκοσμου

Ανάπτυξη ανοσοποιητικού συστήματος

Ο βλεννογόνος του εντέρου είναι η μεγαλύτερη επιφάνεια του ανθρωπίνου σώματος που έρχεται σε επαφή με τα αντιγόνα του εξωτερικού περιβάλλοντος. Ο εντερικός μικροβιόκοσμος απλώνεται πάνω από το βλεννογόνο δημιουργώντας ένα παχύ στρώμα μικροοργανισμών που προβάλλει το μεγαλύτερο ποσοστό αντιγόνων στα ανοσοκύτταρα του εντερικού επιθηλίου προκαλώντας την ενεργοποίηση τους [106]. Ο βλεννογόνος έχει ένα εκτεταμένο ανοσοποιητικό σύστημα, το GALT (Gut Associated Lymphoid Tissue), το οποίο διεκπεραιώνει 2 σημαντικές λειτουργίες. Η πρώτη είναι να ελέγχει το μικροβιόκοσμο προλαμβάνοντας και εμποδίζοντας καταστάσεις επιζήμιων και γενικευμένων συστηματικών ανοσοαποκρίσεων και η δεύτερη είναι να εμποδίζει το μικροβιόκοσμο να υπεραναπτύσσεται και να μετατοπίζεται σε συστηματικές θέσεις [70]. Φαίνεται λοιπόν ότι ο εντερικός μικροβιόκοσμος παίζει μείζονα ρόλο στην ανάπτυξη του ανοσοποιητικού συστήματος του ανθρώπου. Αυτό αποδεικνύεται από μελέτες που έχουν γίνει σε πειραματόζωα ελεύθερα μικροβίων και έχουν δείξει τη σημασία του εντερικού μικροβιόκοσμου στην ανάπτυξη του ανοσοποιητικού συστήματος. Για παράδειγμα, χορήγηση ενός πολυσακχαρίτη που επεξεργάζεται το είδος *Bacteroides fragilis* σε πειραματόζωα ελεύθερα μικροβίων διόρθωσε την έλλειψη κυττάρων-Τ και την δυσαναλογία Th1/Th2 κυττάρων ενώ επηρέασε και την ανάπτυξη των λεμφοειδών τους οργάνων [107]. Συμβιωτικά βακτήρια όπως τα είδη *Bifidobacterium infantis* και *Faecalibacterium prausnitzii* έχουν παρατηρηθεί να επάγουν τη δράση των Τ-ρυθμιστικών κυττάρων (Tregs) προκαλώντας παραγωγή αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών ιντερλευκίνων (IL)-10 [108].

Προστευτική δράση

Ο εντερικός μικροβιόκοσμος παρέχει στο ξενιστή ένα φυσικό εμπόδιο για το νεοεισερχόμενα παθογόνα μέσω ανταγωνιστικού αποκλεισμού. Αυτό μπορεί να γίνει με κατάληψη των θέσεων προσκόλλησης, κατανάλωση θρεπτικών συστατικών και παραγωγή αντιμικροβιακών ενώσεων [70].

Κάποια βακτήρια του εντέρου παράγουν ενώσεις που εμποδίζουν την ανάπτυξη και θανατώνουν τους ευκαιριακά παθογόνους μικροοργανισμούς. Αυτές οι ενώσεις μπορούν να είναι από μη εξειδικευμένα λιπαρά οξέα μέχρι εξαιρετικά εξειδικευμένες βακτηριοσίνες [109].

Ανοσορύθμιση

Ο εντερικός μικροβιόκοσμος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανοσορύθμιση, στην ρύθμιση της αύξησης των κυτταροπροστατευτικών γονιδίων, στη πρόληψη και στη ρύθμιση της απόπτωσης των κυττάρων και στη διατήρηση της λειτουργίας του εντερικού φραγμού [110].

Μεταβολική λειτουργία

Τα βακτήρια του εντερικού μικροβιόκοσμου μπορούν να μεταβολίζουν τα σάκχαρα των τροφίμων που δεν απορροφώνται όπως η λακτόζη, άλλες αλκοόλες, άπεπτους υδατάνθρακες όπως κυτταρίνες, ημικυτταρίνες, πηκτίνες, ανθεκτικό άμυλο καθώς και την βλέννα. Με τη ζύμωση αυτών, παράγονται τα λιπαρά οξέα βραχέας αλύσου (SCFAs) όπως το βουτυρικό, προπιονικό, οξικό οξύ και άλλα, τα οποία χρησιμοποιούνται ως πηγή ενέργειας από τον εντερικό βλεννογόνο [111] (**Εικόνα 5**). Με τα SCFAs προάγεται η ανάπτυξη και ελέγχεται ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου [112]. Επίσης τα SCFAs ρυθμίζουν το pH του εντέρου και εμποδίζουν την ανάπτυξη παθογόνων [113].

Το βουτυρικό οξύ θεωρείται μεταβολίτης υγείας και είναι το λιπαρό οξύ που χρησιμοποιείται κυρίως από τα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου ως πηγή ενέργειας καλύπτοντας το 70% των αναγκών τους. Έχει αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινογόνες ιδιότητες. Βέβαια, τα βακτήρια που παράγουν βουτυρικό οξύ έχουν συσχετιστεί με αύξηση της εντερικής μεταβολικής δραστηριότητας που οδηγεί στην παχυσαρκία [114, 115]. Το οξικό οξύ διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του εντέρου και μειώνει τη συχνότητα σπαστικών συσπάσεων των λείων μυών του εντέρου σε αρουραίους. Επίσης, βελτιώνει την κινητικότητα του ειλεού, αυξάνει την αιματική ροή στο έντερο, παίζει κάποιο ρόλο στην λιπογένεση και έχει ανοσορυθμιστικές ιδιότητες [116]. Το προπιονικό οξύ μειώνει επίσης τις αυθόρμητες συσπάσεις που κάνουν οι λείοι μύες του εντέρου αρουραίων, μειώνει τη κατανάλωση φαγητού και αυξάνει τον κορεσμό, προστατεύει έναντι της καρκινογένεσης στο κόλον και έχει ανοσορυθμιστικές ιδιότητες [116].

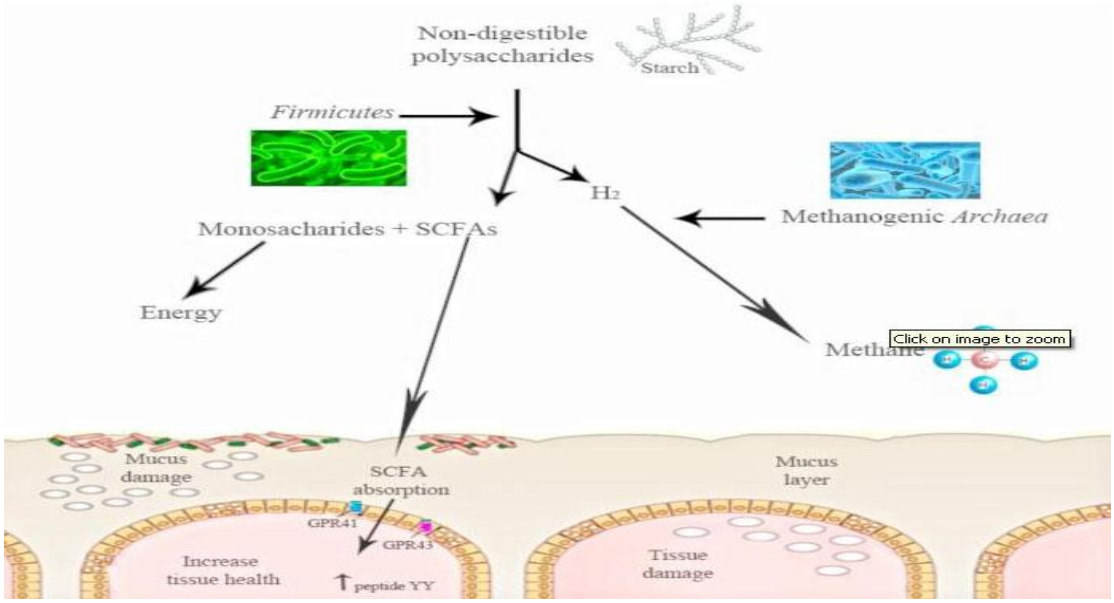
Ο εντερικός μικροβιόκοσμος μπορεί να παράγει τις βιταμίνες K, B1, B2, B6, βιοτίνη και φυλλικό οξύ [115]. Επίσης, μπορεί να γίνει αποσύζευξη των χολικών αλάτων [117] και καταβολισμός των τοξινών της διατροφής από τους μικροοργανισμούς του παχέος εντέρου [118]. Τα βακτήρια του εντέρου συμβάλλουν και στην απορρόφηση μετάλλων όπως ασβεστίου, μαγνησίου και σιδήρου [119].

Ο μικροβιόκοσμος του εντέρου μπορεί να μεταβολίσει επίσης πρωτεΐνες όπως κολλαγόνο, ελαστίνη, άλλες πρωτεΐνες της διατροφής βιομετατρέποντας τις δομές τους στον

εντερικό αυλό. Παράγονται βιοενεργείς ενώσεις όπως SCFAs, αμμωνία, αμίνες, θειόλες και φαινόλες [118, 120].

Αλληλεπίδραση του μικροβιόκοσμου με τον οργανισμό έχει ως αποτέλεσμα την ανταλλαγή μεταξύ τους λιπαρών οξέων, φωσφολιπιδίων και χολίνης, η οποία παίζει ιδιαίτερο ρόλο στο μεταβολισμό των λιποειδών και εμπλέκεται στις ηπατικές και καρδιαγγεακές νόσους [121, 122].

Συγκεκριμένα συμβιωτικά του εντέρου έχουν βρεθεί να παράγουν νευροδιαβιβαστές και νευροτροποποιητές (neuromodulators) που επηρεάζουν λειτουργίες του εντέρου όπως η κινητικότητα του [123-125]. Φαίνεται ακόμα ότι ο μικροβιόκοσμος επηρεάζει την ανάπτυξη και τη λειτουργία του κεντρικού νευρικού συστήματος δημιουργώντας έτσι την έννοια του άξονα εντερικού μικροβιόκοσμου-εντέρου-εγκεφάλου (microbiota-gut-brain axis) [126-128].



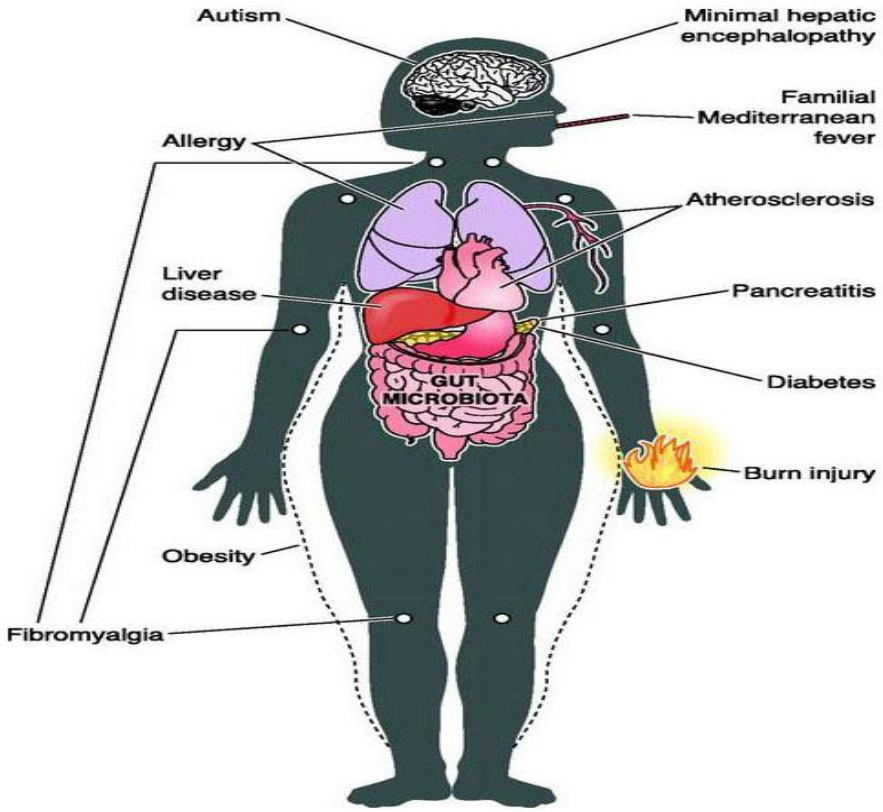
Εικόνα 5: Δράση εντερικού μικροβιόκοσμου για την πέψη πολυσακχαριτών με αποτέλεσμα την παραγωγή μονοσακχαριδίων και SCFAs
[Πηγή: Moreno-Indias I., Cardona F., et al. (2014) Impact of the gut microbiota on the development of obesity and type 2 diabetes mellitus. *Front Microbiol*, 5:190].

<u>Αρνητικές επιπτώσεις εντερικού μικροβιόκοσμου</u>

Η απορύθμιση του εντερικού μικροβιόκοσμου οδηγεί σε ένα πλήθος ασθενειών. Εμπλέκεται στην εξέλιξη πολλών διαταραχών καθώς είναι ένας παράγοντας που παίζει ρόλο στην ομοιόσταση του εντερικού βλεννογόνου [70]. Οι διαταραχές που έχουν συσχετιστεί με τον εντερικό μικροβιόκοσμο φαίνονται στην **εικόνα 6**, πέρα από τις οποίες είναι και το σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου [129] ενώ παρακάτω αναλύονται ο καρκίνος του παχέος εντέρου και οι φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου.

Καρκίνος παχέος εντέρου

Μηχανισμοί της παθογένεσης του καρκίνου παχέος εντέρου έχουν αποδειχτεί ότι επηρεάζονται από την αλληλεπίδραση μεταξύ διατροφικών συστατικών και μικροβιόκοσμου του εντέρου. Η αυξημένη κατανάλωση λιπαρών και κόκκινου κρέατος και η μειωμένη πρόσληψη φρούτων, λαχανικών, ολικής άλεσης προϊόντων, ψαριών και ασβεστίου επηρεάζει τη μεταβολική δραστηριότητα και τη σύσταση της εντερικής μικροχλώριδας. Κατά αυτό τον τρόπο οι μικροοργανισμοί του εντέρου εκκρίνουν καρκινογόνα, προ-καρκινογόνα και συν-καρκινογόνα. Συγκεκριμένα είδη βακτηρίων έχουν συσχετιστεί με τον καρκίνου παχέος εντέρου θετικά ή αρνητικά. Τα γένη *Bacteroides* και *Clostridium* και πιο συγκεκριμένα τα είδη *Bacteroides vulgatus* και *Bacteroides stercoris* έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση καρκίνου ενώ τα γένη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* και πιο συγκεκριμένα τα είδη *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus S06, Bifidobacterium longum* και *Eubacterium aerofaciens* έχουν συσχετιστεί με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου και παρεμπόδιση της καρκινογένεσης [130, 131].



Εικόνα 6: Συσχετίσεις που έχουν γίνει μεταξύ εντερικού μικροβιόκοσμου και ασθενειών, εκτός αυτών που συναντούνται στη γαστρεντερική οδό.
[Πηγή: Sekirov I., Russell S.L., et al. (2010) Gut microbiota in Health and Disease. *Physiological Reviews*, 90,859-904].

Φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου

Οι ασθενείς με φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου φαίνεται να έχουν μεγαλύτερο στρώμα βακτηρίων προσκολλημένο στον εντερικό βλεννογόνο σε σύγκριση με τους υγιείς ανθρώπους. Μεταξύ πολλών άλλων μικροοργανισμών, έχουν βρεθεί στατιστικά σημαντικές ποσότητες *Bacteroides* spp. στο βλεννογόνο και στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου. Η φλεγμονή σχετίζεται με την απορύθμιση του εντερικού μικροβιόκοσμου που εμφανίζει σχετική υπεροχή <<επιθετικών>> βακτηρίων και σχετικά μικρή συγκέντρωση <<προστατευτικών>> βακτηρίων. Μικροοργανισμοί που έχουν συσχετιστεί με τη φλεγμονή του εντέρου είναι το είδος *E. coli,* τα γένη *Bacteroides, Enterococcus, Klebsiella* και το φύλο Actinobacteria ενώ μικροοργανισμοί που δρουν προστατευτικά είναι τα γένη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*, τα οποία δίνονται και σαν θεραπεία με τη μορφή των προβιοτικών στους ασθενείς με φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου [120, 132].

3. Παχυσαρκία

Ορισμός

Ως παχυσαρκία ορίζεται η κλινική κατάσταση στην οποία η υπερβολική συσσώρευση λίπους στο σώμα μπορεί να έχει αρνητικές συνέπειες για την υγεία του ανθρώπου. Ένας δείκτης που έχει ορισθεί προκειμένου να διαγιγνώσκεται η παχυσαρκία είναι ο Δείκτης Μάζας Σώματος-ΔΜΣ (Body Mass Index-BMI), ο οποίος ισούται με το πηλίκο του βάρους προς το τετράγωνο του ύψους σε μέτρα. Τιμές του δείκτη μάζας σώματος πάνω από 30kg/m^2 χαρακτηρίζει κάποιον άνθρωπο παχύσαρκο [133].

Ομάδες εθελοντών	ΔΜΣ (kg/m^2)	Κατάταξη	Κίνδυνος Νοσηρότητας
Φυσιολογικού σωματικού βάρους	18.5 - 24.9	Φυσιολογικό	Φυσιολογικός
Υπέρβαροι	25.0 - 29.9	Υπέρβαρο	Αυξημένος
Παχύσαρκοι	≥ 30.0	Παχυσαρκία	Πολύ έως πολύ σοβαρά αυξημένος
Υποκατηγορίες παχύσαρκων	30.0 - 34.9	Παχυσαρκία 1ου βαθμού	Πολύ αυξημένος
	35.0 - 39.9	Παχυσαρκία 2ου βαθμού	Σοβαρά αυξημένος
	≥ 40.0	Παχυσαρκία 3ου βαθμού	Πολύ σοβαρά αυξημένος

Πίνακας 3*:* Διεθνή κριτήρια κατάταξης ανάλογα με ΔΜΣ και αντίστοιχος κίνδυνος νοσηρότητας. [Πηγή: World Health Organization, 2000]

Επιδημιολογικά στοιχεία

Τα ποσοστά της παχυσαρκίας παγκοσμίως έχουν διπλασιαστεί τις τελευταίες 2 δεκαετίες. Γύρω στα 3.4 εκατομμύρια ενηλίκων πεθαίνουν κάθε χρόνο εξαιτίας της παχυσαρκίας και του

υπέρβαρου σώματος. Το 40% των περιστατικών διαβήτη, το 23% των ισχαιμικών καρδιακών νόσων και μεταξύ 7-41% των διαφόρων τύπων καρκίνου αποδίδονται στο υπέρβαρο και την παχυσαρκία [133] ενώ πλήθος άλλων μεταβολικών και συστηματικών διαταραχών έχουν συσχετιστεί με τη παχυσαρκία όπως η αντίσταση στην ινσουλίνη, ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2, η λιπώδης διήθηση του ήπατος, η αθηροσκλήρωση και η αρτηριακή υπέρταση [118].

Στην Ελλάδα, ο επιπολασμός της παχυσαρκίας στο γενικό πληθυσμό είναι από τους υψηλότερους σε όλη την δυτική Ευρώπη, με το 26% των ενήλικων ανδρών και το 18,2% των ενήλικων γυναικών να είναι παχύσαρκοι σύμφωνα με στοιχεία του 2008 [134].

Αιτιολογία

Η εμφάνιση της παχυσαρκίας είναι αιτία του θετικού ενεργειακού ισοζυγίου που αποτελείται από την ενεργειακή πρόσληψη και την ενεργειακή κατανάλωση ενός ατόμου. Η ενεργειακή κατανάλωση εξαρτάται από το βασικό μεταβολικό ρυθμό (Basal Metabolic Rate-BMR) και τη σωματική δραστηριότητα του ατόμου [118].

Παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνιση της παχυσαρκίας

Η παχυσαρκία επηρεάζεται από γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες [135].

Τα γονίδια φαίνεται ότι επηρεάζουν από 6-85% την εμφάνιση της παχυσαρκίας. Έχουν βρεθεί πολυμορφισμοί σε γονίδια που μπορούν να προκαλέσουν αλλαγές στην όρεξη και το μεταβολισμό ενώ μέχρι το 2006 είχαν βρεθεί 41 διαφορετικοί γενετικοί τόποι οι οποίοι σχετίζονται με την παθοφυσιολογία της παχυσαρκίας, ακόμα και όταν οι περιβαλλοντικοί παράγοντες είναι ευνοϊκοί [136, 137].

Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες από τους οποίους εξαρτάται η εμφάνιση της παχυσαρκίας είναι η διατροφή και η άσκηση όπου τα τελευταία χρόνια παρατηρείται υπερβολική ενεργειακή πρόσληψη και μειωμένη σωματική δραστηριότητα [138].

Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνιση της παχυσαρκίας είναι ορμονικής και ψυχολογικής φύσεως [139] ενώ τα τελευταία χρόνια φαίνεται ότι και ο εντερικός μικροβιόκοσμος παίζει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση της παχυσαρκίας [102, 140].

4. Παχυσαρκία και εντερικός μικροβιόκοσμος

Οι έρευνες σε πειραματόζωα ελεύθερα μικροβίων έδωσαν το έναυσμα για τη δημιουργία και υποστήριξη της υπόθεσης ότι ο εντερικός μικροβιόκοσμος παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της προσλαμβανόμενης ενέργειας και την αύξηση του λιπώδους ιστού [141]. Το 2005, ο Bäckhead και οι συνεργάτες του ερεύνησαν τον ρόλο του μικροβιόκοσμου σε ποντίκια

ελεύθερα μικροβίων. Τα ευρήματα τους ήταν ότι μεταβάλλοντας το μικροβίωμα των ελεύθερα μικροβίων ποντικών με μικροβιόκοσμο που λαμβάνονταν από παχύσαρκα ποντίκια αυξάνονταν κατά 60% το σωματικό τους λίπος, ανέπτυσσαν αντίσταση στην ινσουλίνη μέσα σε 2 εβδομάδες ανεξάρτητα από τη μειωμένη κατανάλωση (κατά 29%) και αυξημένη δραστηριότητα τους (κατά 27%) σε σύγκριση με τα ποντίκια ελεύθερα μικροβίων που δεν μεταβάλλονταν το μικροβίωμα τους [142]. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν από τον Turnbaugh και τους συνεργάτες του το 2006 που σημείωσαν ότι το μικροβίωμα των παχύσαρκων έχει μία αυξημένη ικανότητα να προσλαμβάνει ενέργεια από τη δίαιτα [14].

Από τότε και μετά, αποτελέσματα από έρευνες σε ανθρώπους, με συνήθως μικρά δείγματα εθελοντών, δείχνουν ότι η παχυσαρκία συσχετίζεται με διαφορές στη σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου των ατόμων [13, 72, 143-146], με μειωμένη βακτηριακή ποικιλότητα [144] και διαφοροποιημένα μεταβολικά μονοπάτια βακτηρίων [144].

4.1. Έρευνες σε πειραματόζωα και ανθρώπους

Είχε γίνει η υπόθεση ότι σε ιεραρχικό επίπεδο φύλων, η αυξημένη αναλογία Firmicutes/Bacteroidetes ίσως συμβάλει στη παθογένεση της παχυσαρκίας του ανθρώπου [13, 14], αλλά στην πορεία αυτή η υπόθεση δεν υποστηρίχθηκε από τις μελέτες που ακολούθησαν [72, 74, 143, 145, 147]. Ο εντερικός μικροβιόκοσμος έχει φανεί να διαφέρει ανάλογα με το βαθμό που διαμεσολαβεί από τα γονίδια η αύξηση του λιπώδους ιστού. Μελέτη με ποντίκια παχύσαρκα χωρίς λεπτίνη έδειξε μειωμένη ποσότητα Bacteroidetes και αναλογικά αυξημένη ποσότητα Firmicutes [148]. Η Kalliomäki και οι συνεργάτες της σε έρευνα που κάνανε με παιδιά έδειξαν ότι στη βρεφική ηλικία, τα παιδιά φυσιολογικού βάρους είχαν περισσότερα Bifidobacteria και τα υπέρβαρα παιδιά εμφάνιζαν μεγαλύτερους αριθμούς *Staphylococcus aureus* [149].

Μερικές έρευνες έχουν δείξει επίσης ότι η απώλεια σωματικού βάρους στους ανθρώπους μεταβάλλει τον εντερικό μικροβιόκοσμο. Όσον αφορά τα Bacteroidetes σε σύγκριση με τα Firmicutes, τα παχύσαρκα άτομα φαίνεται να έχουν λιγότερα [14, 144], περισσότερα [72, 146] ή την ίδια ποσότητα [143, 147]. Κάποιες έρευνες έχουν δείξει διαφορές στο ιεραρχικό επίπεδο των γενών [145, 150]. Άλλη έρευνα με απώλεια βάρους από δίαιτα μειωμένη σε λίπος και δίαιτα μειωμένη σε υδατάνθρακες έδειξε μείωση των Firmicutes και αύξηση των Bacteroidetes [13].

Ο Collado και οι συνεργάτες του, παρατήρησαν σημαντικές διαφορές στη σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου σύμφωνα με το σωματικό βάρος κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Στις υπέρβαρες γυναίκες βρήκαν σημαντικά περισσότερα *Bacteroides* spp. και S. *aureus* συγκριτικά με τις γυναίκες φυσιολογικού βάρους και ανέπτυξαν μία θετική σχέση μεταξύ

αριθμού *Bacteroides* spp. και ΔΜΣ (πριν και μετά την εγκυμοσύνη). Βρήκαν επίσης μεγαλύτερους αριθμούς του γένους *Bifidobacterium* στις γυναίκες φυσιολογικού βάρους συγκριτικά με τις υπέρβαρες γυναίκες και επίσης στις γυναίκες που είχαν πάρει λιγότερο βάρος κατά την εγκυμοσύνη [145].

Μελέτη που έγινε σε 36 έφηβους (13-15 ετών) οι οποίοι ακολούθησαν πρόγραμμα αντιμετώπισης παχυσαρκίας έδειξε σημαντικές αλλαγές σε ομάδες βακτηρίων μέσω μοριακών αναλύσεων με ποσοτική-PCR [150]. Στο γκρουπ των εφήβων που έχασε >4kg μετά την παρέμβαση σημειώθηκαν στατιστικά σημαντικές αλλαγές του μικροβιόκοσμου του εντέρου, όπως αύξηση των B. *fragilis* και του *Lactobacillus* group και μείωση των ειδών C. *coccoides* και B. *longum.* Να αναφερθεί επίσης ότι στην ομάδα εφήβων που έχασε <2kg δεν σημειώθηκαν αλλαγές. Ο Duncan και οι συνεργάτες του μελέτησαν της ομάδες βακτηρίων των κοπράνων με τη μέθοδο FISH σε παχύσαρκα και μη παχύσαρκα άτομα που ακολουθούσαν δίαιτα διατήρησης του σωματικού βάρους και δίαιτα απώλειας σωματικού βάρους μειωμένη σε υδατάνθρακες [147]. Δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική αλλαγή στα Bacteroidetes των παχύσαρκων ατόμων μετά από 4 εβδομάδες παρέμβασης, όμως υπήρξε μία μείωση της ομάδας των Firmicutes που παράγουν βουτυρικό οξύ (*Roseburia* spp. και *E. rectale*).

Ο Armougom και η επιστημονική του ομάδα μελέτησαν τον εντερικό μικροβιόκοσμο 20 παχύσαρκων ατόμων, 9 ατόμων με νευρική ανορεξία και 20 ατόμων φυσιολογικού βάρους με τα αποτελέσματα τους να δείχνουν στατιστικά σημαντική μεγαλύτερη ποσότητα *Lactobacillus* spp. και μικρότερη Bacteroidetes στα παχύσαρκα άτομα σε σύγκριση με τα άτομα φυσιολογικού βάρους [143].

Μία μελέτη σε ποντίκια που τους δόθηκε δίαιτα για απώλεια βάρους εξέτασε την επιρροή της απώλειας βάρους στον εντερικό μικροβιόκοσμο μέσα από δίαιτα πλούσια και δίαιτα φτωχή σε λίπος (60% και 10% της συνολικής προσλαμβανόμενης ενέργειας αντίστοιχα) [151]. Έγινε σύγκριση της επίδρασης της απώλειας βάρους στα ισχνά και στα παχύσαρκα ποντίκια και επίσης μελετήθηκε η επίδραση της δίαιτας στον εντερικό μικροβιόκοσμο ανεξάρτητα από το σωματικό βάρος των ποντικών. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι οι διαφορές στη σύσταση της δίαιτας είχαν τη μεγαλύτερη επίδραση στις διαφορές του εντερικού μικροβιόκοσμου [151].

Υπάρχει η υπόθεση επίσης ότι η μεταφορά του υδρογόνου από τα βακτήρια που παράγουν υδρογόνο στα Αρχαία που το καταναλώνουν αυξάνει την αποτελεσματικότητα της ζύμωσης και την παραγωγή SCFAs και συμβάλει στην αύξηση του λιπώδους ιστού. Τα μεθανογόνα που τρέφονται με υδρογόνο (Αρχαία) και τα βακτήρια που μειώνουν το θείο καταναλώνουν το υδρογόνο που παράγεται από τη ζύμωση των πολυσακχαριτών και η γρήγορη

χρησιμοποίηση του οδηγεί στην αύξηση της ταχύτητας της ζύμωσης [141]. Αυτή η υπόθεση έχει αποδειχτεί σε δείγμα πειραματόζωων [152] αλλά δεν είναι τόσο ξεκάθαρη και σε δείγματα ανθρώπων. Σε δείγμα 1,294 ατόμων, η παχυσαρκία εμφανιζόταν σημαντικά πιο αραιά σε άτομα με παραγωγή μεθανίου από ότι σε άτομα με μη παραγωγή μεθανίου με πολλούς όμως παράγοντες να επηρεάζουν τη σχέση αυτή που παρατηρήθηκε [153]. Από την άλλη, ο Zhang και οι συνεργάτες του συσχέτισαν τα αρχαία με την παχυσαρκία προτείνοντας ότι προκαλούν μεγαλύτερη εξαγωγή ενέργειας από τα άπεπτα θρεπτικά συστατικά που καταναλώνουν [72].

4.2. Μηχανισμοί αλληλεπίδρασης

Εξαγωγή ενέργειας από τη δίαιτα

Ο μικροβιόκοσμος του εντέρου παίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην εξαγωγή της ενέργειας από άπεπτα συστατικά των τροφίμων, το οποίο εξαρτάται από τη σύσταση του και τις μεταβολικές διεργασίες του. Έχει υπολογιστεί ότι η ενέργεια που αποδίδει ο εντερικός μικροβιόκοσμος στην συνολική ημερήσια ενεργειακή πρόσληψη του ανθρώπου ανέρχεται στο 10% περίπου [141].

Μελέτη που έγινε σε 12 φυσιολογικού βάρους και 9 παχύσαρκα άτομα αναλύοντας το βακτηριακό γονιδίωμα τους και μετρώντας με θερμιδομετρητή οβίδας τις θερμίδες που τους δόθηκαν και που παρέλαβαν πίσω μέσω των κοπράνων τους έδειξε ότι αλλαγή στην ενέργεια που δίνεται επιφέρει αλλαγή στον μικροβιόκοσμο που συσχετίστηκε με απώλεια θερμίδων από τα κόπρανα γύρω στις 150kcal [154].

Το 2011, ο Conterno και οι συνεργάτες του ανέλυσαν την ικανότητα του μικροβιόκοσμου να ζυμώνει θρεπτικά συστατικά και βρήκαν ότι ήταν αυξημένη στους παχύσαρκους. Συγκεκριμένα, ποσοτικοποιώντας τις συγκεντρώσεις SCFAs 30 φυσιολογικού βάρους, 35 υπέρβαρων και 33 παχύσαρκων ατόμων βρήκαν ότι οι συγκεντρώσεις των παχύσαρκων ήταν σημαντικά υψηλότερες των συγκεντρώσεων SCFAs των άλλων ατόμων [155].

Καταστολή του παράγοντα λιποκυττάρων που διεγείρεται με τη νηστεία (fasting-induced adipocyte factor-Fiaf)

Η λιποπρωτεϊνική λιπάση (lipoprotein lipase-LPL) είναι το ένζυμο που υδρολύει τα τριγλυκερίδια και απελευθερώνει λιπαρά οξέα που μεταφέρονται στα κύτταρα του λιπώδους ιστού. Εκεί, τα λιπαρά οξέα επανεστεροποιούνται σε τριγλυκερίδια και αποθηκεύονται. Ο παράγοντας Fiaf εκκρίνεται από το λιπώδη ιστό, το ήπαρ, το έντερο και ανταγωνίζεται τη δράση της LPL εμποδίζοντας έτσι την αποθήκευση των τριγλυκεριδίων στο λιπώδη ιστό [156]. Οι μελέτες του Bäckhead έδειξαν συσχέτιση του μικροβιόκοσμου με τον παράγοντα Fiaf. Η μία

έδειξε αύξηση δραστηριότητας της LPL και ταυτόχρονη μείωση του παράγοντα Fiaf μετά την μεταφορά μικροβιόκοσμου σε ποντίκια ελεύθερα μικροβίων [142]. Η άλλη μελετώντας την επίδραση του παράγοντα Fiaf στον καταβολισμό λιπιδίων σε ποντίκια ελεύθερα μικροβίων σε σύγκριση με ποντίκια επίσης χωρίς μικροοργανισμούς αλλά και γενετικά τροποποιημένα να μην διαθέτουν τον παράγοντα Fiaf, έδειξε ότι τα ποντίκια χωρίς τον παράγοντα Fiaf δεν είχαν αντίσταση στην παχυσαρκία προκαλούμενη από δυτικού-τύπου δίαιτα σε σύγκριση με τα άλλα ποντίκια. Οι ερευνητές μπόρεσαν να αναπτύξουν μία θεωρία που ο εντερικός μικροβιόκοσμος καταστέλλει την έκφραση του παράγοντα Fiaf σε απάντηση της ευαισθησίας του ξενιστή στην υπερβολική πρόσληψη φαγητού αυξάνοντας έτσι τη δραστηριότητα της LPL και τελικά την εναποθέτηση λίπους στα κύτταρα του λιπώδους ιστού [157].

Καταστολή της πρωτεϊνικής κινάσης ενεργοποιούμενη από τη μονοφωσφορική αδενοσίνη (Adenosine monophosphate-activated protein kinase-AMPK)

Η AMPK είναι ένα ένζυμο που παίζει ρόλο στην ομοιόσταση της ενέργειας. Η έκφραση της γίνεται από τον εγκέφαλο, το ήπαρ και τους σκελετικούς μύες σε απάντηση του μεταβολικού στρες. Η δράση της είναι να διεγείρει την οξείδωση λιπαρών οξέων, τη κετογένεση, την απορρόφηση γλυκόζης και την έκκριση ινσουλίνης και παράλληλα να εμποδίζει τη σύνθεση χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων και τη λιπογένεση [158]. Αποίκηση του εντέρου ποντικών ελεύθερων μικροβίων με μικροοργανισμούς φαίνεται να μειώνει την έκφραση της AMPK. Έτσι, οι ερευνητές της έρευνας αυτής υποστηρίζουν πως το μικροβίωμα καταστέλλει τη δραστηριότητα της AMPK έχοντας αρνητική επίδραση στην οξείδωση των λιπαρών οξέων [157].

Αλληλεπίδραση μεταξύ SCFAs και υποδοχέων που συνδέονται με G πρωτεΐνες (G-protein-coupled receptors-GPCRs)

Τα SCFAs που παράγονται από τον εντερικό μικροβιόκοσμο οδηγούν στη ρύθμιση εντερικών ορμονών υπεύθυνων για τον κορεσμό όπως το πεπτίδιο τύπου γλυκαγόνης (glucagon-like peptide-GLP) και το πεπτίδιο YY (peptide YY-PYY) [141]. Οι ορμόνες αυτές ρυθμίζουν τη σύνθεση και την απελευθέρωση των πεπτικών ενζύμων [155]. Τα χαμηλά επίπεδα PYY στο αίμα φαίνεται να προδιαθέτουν την ανάπτυξη και τη διατήρηση της παχυσαρκίας [159]. Ο καταρράκτης σηματοδότησης των SCFAs σχετίζεται με τους GCPRs. Οι GCPRs είναι οι FFAR2 και ο FFAR3 γνωστοί και ως GCPR43 και GCPR41 αντίστοιχα, οι οποίοι ρυθμίζουν τη κινητικότητα του εντέρου και τον κορεσμό μέσω του GLP-1 [160]. Το οξικό και το προπιονικό οξύ (SCFAs) δεσμεύονται στον FFAR3 και τον FFAR2 αντίστοιχα. Έχει φανεί ότι η αλληλεπίδραση SCFAs και FFA3 ίσως αυξάνει τα επίπεδα του PYY μετά από έρευνα με ποντίκια που τους έλειπε ο υποδοχέας FFA3 [161]. Επίσης ενεργοποίηση του FFA2 από SCFAs

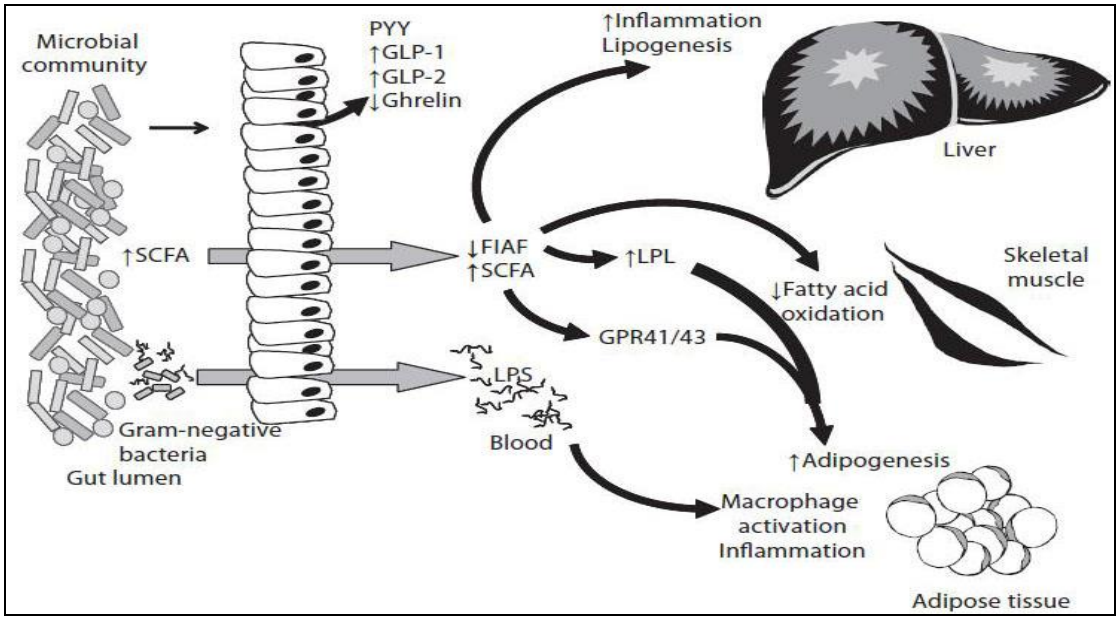
παρατηρήθηκε να εμποδίζει τη λιπόλυση και την διαφοροποίηση των λιποκυττάρων σε μελέτη με ποντίκια [162].

Ρύθμιση λιπογένεσης

Μελέτη με ποντίκια ελεύθερα μικροβίων έχει δείξει ότι αποίκηση του εντέρου με μικροβιόκοσμο οδηγεί στη δραστική αύξηση ηπατικής λιπογένεσης, διαδικασία κατά την οποία η πλεονάζουσα γλυκόζη μετατρέπεται σε λίπος για αποθήκευση [156]. Τελευταία έχει αναφερθεί επίσης ότι οι μικροοργανισμοί του εντέρου που παράγουν t10, c12 συζευγμένα λινολεϊκά οξέα ενεργοποιούν τη de novo λιπογένεση και τη σύνθεση τριγλυκεριδίων που οδηγεί στη συσσώρευση λίπους και σε ηπατική στεάτωση [163].

Μεταβολική ενδοτοξαιμία και επίδραση στη φυσική ανοσία

Ο εντερικός μικροβιόκοσμος επηρεάζει επίσης την χαμηλού-βαθμού, χρόνια φλεγμονή. Η μεταβολική ενδοτοξαιμία που προκαλείται από βακτηριακούς λιποπολυσακχαρίτες (bacterial lipopolysaccharide-LPS) προερχόμενους από τον εντερικό μικροβιόκοσμο λειτουργεί ως έναυσμα για το ξεκίνημα και την ανάπτυξη φλεγμονής και μεταβολικών διαταραχών όπως η αύξηση βάρους και ο διαβήτης σύμφωνα με τον Cani και τους συνεργάτες του [164]. Οι toll-like υποδοχείς (Toll-like Receptors-TLRs) είναι πρωτεΐνες που αναγνωρίζουν αντιγόνα (τα LPS) και ενεργοποιούν τη φυσική ανοσία του οργανισμού. Η αλληλεπίδραση του εντερικού μικροβιόκοσμου με τον TLR5 είναι πολύ σημαντική για την εντερική ομοιόσταση [156]. Μελέτη που έχει διεξαχθεί με δείγμα ποντικών χωρίς τους TLR5 έδειξε επιρρέπεια στην ανάπτυξη ινσουλινοαντίστασης, αρτηριακής υπέρτασης και υπερλιπιδαιμίας. Τα ίδια ποντίκια εμφάνισαν επίσης υπερφαγία που οδήγησε στην αύξηση του λιπώδους ιστού τους [165].



Εικόνα 7: Ο εντερικός μικροβιόκοσμος και οι μεταβολίτες του ίσως επηρεάζουν το μεταβολισμό και την ενεργειακή ομοιόσταση μέσω πολλών μηχανισμών.
[Πηγή: Hullar M.A.J., Lampe J.W. (2012) The Gut Microbiome and Obesity. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser*, 73, 67-79].

ΙΙ. ΣΚΟΠΟΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής μελέτης είναι η αποτύπωση των χαρακτηριστικών του εντερικού μικροβιόκοσμου και των γαστρεντερικών συμπτωμάτων ενός τυχαίου δείγματος του ελληνικού πληθυσμού και η διερεύνηση πιθανών συσχετίσεων τους με μια σειρά ανθρωπομετρικών, διατροφικών και άλλων παραμέτρων. Απώτερος στόχος της μελέτης είναι η κατηγοριοποίηση των εθελοντών σε ομάδες ανάλογα με το δείκτη μάζας σώματος τους (φυσιολογικού βάρους, υπέρβαροι, παχύσαρκοι) και η σύγκριση των χαρακτηριστικών του εντερικού μικροβιόκοσμου και των γαστρεντερικών συμπτωμάτων τους.

ΙΙΙ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Η παρούσα αυτή πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της συγχρονικής μελέτης <<Εντερικός μικροβιόκοσμος και παχυσαρκία>> στην Αθήνα κατά την περίοδο Οκτωβρίου 2013-Μαΐου 2014.

Με την συγχρονική μελέτη καθίσταται δυνατή η κατηγοριοποίηση των εθελοντών σε ομάδες ανάλογα με το σωματικό βάρους τους και η μετέπειτα παρατήρηση διαφορών πολλών παραμέτρων μεταξύ των διαμορφούμενων ομάδων.

1. Δείγμα πτυχιακής μελέτης

1.1 Χαρακτηριστικά εθελοντών

Οι εθελοντές που συμμετείχαν στη μελέτη ήταν ηλικίας 18-65 ετών και των δύο φύλων. Τα κριτήρια αποκλεισμού εθελοντών από τη μελέτη ήταν το ιστορικό γαστρεντερικών νοσημάτων και διαταραχών (Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Νόσοι Εντέρου, σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου, χρόνια διάρροια ή οξεία διάρροια τις προηγούμενες τέσσερις εβδομάδες, χρόνια δυσκοιλιότητα, ιστορικό καρκίνου πεπτικού συστήματος, πολύποδες παχέος εντέρου, γαστρίτιδα, έλκος πεπτικού συστήματος, γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση, χολοκυστεκτομή κ.ά), τα αυτοάνοσα νοσήματα, το ιστορικό επιληπτικών κρίσεων, το ιστορικό στεφανιαίας νόσου (ισχαιμικό καρδιακό επεισόδιο, αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο), το ιστορικό ηπατικών και νεφρικών παθήσεων, ο σακχαρώδης διαβήτης, η παρουσία κρυολογήματος ή γρίπης, η νοσηλεία για πάνω από τέσσερις εβδομάδες και η παρουσία λοίμωξης τον τελευταίο μήνα (π.χ. CRP>5mg/L), η παρουσία εγκυμοσύνης, οι ακραίες διαιτητικές συμπεριφορές (π.χ. αποκλειστικά χορτοφάγοι), η τρέχουσα απώλεια βάρους λόγω δίαιτας, η κατανάλωση αντιβιοτικών τουλάχιστον δύο μήνες πριν την μελέτη, η κατανάλωση συμπληρωμάτων διατροφής (π.χ. ω-3 λιπαρά, αντιοξειδωτικά όπως βιταμίνες A, E, C, β-καροτένιο, συνένζυμο Q10, σελήνιο, ψευδάργυρος κ.α.) καθώς και η κατανάλωση προβιοτικών ή/και πρεβιοτικών δύο εβδομάδες πριν τη μελέτη. Επίσης, αν και δεν αποτελούσαν κριτήρια αποκλεισμού από τη μελέτη, πραγματοποιήθηκε λεπτομερής καταγραφή της συνύπαρξης άλλων χρόνιων καταστάσεων, της παρουσίας αλλεργίας, της παρουσίας περιοδοντίτιδας ή άλλων προβλημάτων στα ούλα, καθώς και της ορμονικής θεραπείας με οιστρογόνα, της λήψης αντισυλληπτικών δισκίων και της κατανάλωσης μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων τουλάχιστον ένα μήνα πριν τη μελέτη.

1.2 Στρατολόγηση εθελοντών

Η αναζήτηση και η στρατολόγηση των εθελοντών που δεν πληρούσαν τα παραπάνω κριτήρια αποκλεισμού ξεκίνησε από το κοινωνικό περιβάλλον των ερευνητών της μελέτης (φίλοι, συνάδελφοι) και συνεχίστηκε στον ευρύτερο κοινωνικό κύκλο των εθελοντών. Επίσης έγινε αφισοκόλληση ενημερωτικής επιστολής **(παράρτημα Ι)** σε πίνακες ανακοινώσεων του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου και του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου ‘’Αττικόν’’ για αναζήτηση εθελοντών από το κοινωνικό σύνολο που επισκέπτεται τους χώρους αυτούς.

1.3 Κατηγοριοποίηση εθελοντών

Οι εθελοντές θα κατανεμηθούν σε τρεις ομάδες ανάλογα με τον ΔΜΣ τους (φυσιολογικού βάρους, υπέρβαροι, παχύσαρκοι), βάσει των διεθνών κριτηρίων (**Πίνακας 3, σελ.27**).

1.4 Βιοηθική

Η παρούσα πτυχιακή μελέτη εντάσσεται στα πλαίσια της συγχρονικής μελέτης «Εντερική Μικροβιόκοσμος και Παχυσαρκία», η οποία έχει λάβει την έγκριση της επιτροπής Βιοηθικής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου. Όλοι οι εθελοντές δίνουν την έγγραφη συγκατάθεσή τους πριν τη συμμετοχή τους στη μελέτη και διατηρούν το δικαίωμά τους να αποχωρήσουν σε οποιαδήποτε φάση της μελέτης.

2. Συλλογή δεδομένων

Αρχικά οι εθελοντές επισκέπτονταν το χώρο του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου για να ενημερωθούν προφορικά και να υπογράψουν συμφωνητικό εθελοντικής συμμετοχής στην έρευνα. Στη συνέχεια, στο πλαίσιο της μελέτης οι εθελοντές προχώρησαν σε συμπλήρωση μιας σειράς ερωτηματολογίων και ημερολογίων με τη βοήθεια των ερευνητών, ενώ πραγματοποιήθηκε ανθρωπομετρία στο χώρο του πανεπιστημίου και λήψη μίας πλήρους κένωσης σε ειδικούς συλλέκτες κοπράνων προκειμένου να γίνει η μικροβιολογική ανάλυση του εντερικού μικροβιόκοσμου.

2.1 Ερωτηματολόγια - ημερολόγια μελέτης

Ο εθελοντής καλείται με τη βοήθεια του ερευνητή να συμπληρώσει ερωτηματολόγια και ημερολόγια σχετικά με τα κοινωνικο-δημογραφικά του δεδομένα, το κλινικό ιστορικό του, τη λειτουργία του γαστρεντερικού του συστήματος και τα χαρακτηριστικά των κενώσεων του, τις διατροφικές του συνήθειες και τη φυσική του δραστηριότητα. Πιο συγκεκριμένα, για τις ανάγκες τις έρευνας δημιουργήθηκε ένα ερωτηματολόγιο, το οποίο περιλαμβάνει τα ακόλουθα

τμήματα: (α) γενικά στοιχεία του εθελοντή, συμπεριλαμβανομένων των στοιχείων επικοινωνίας του, (β) κοινωνικο-δημογραφικά στοιχεία, με ερωτήσεις σχετικές με το φύλο, ηλικία, το κάπνισμα, την οικογενειακή κατάσταση και το επίπεδο μόρφωσης του εθελοντή, (γ) ιατρικό ιστορικό, με ερωτήσεις σχετικές με ιατρικώς διαγνωσμένες παθήσεις, αλλεργίες, παθήσεις των ούλων και την εφαρμογή ειδικού τύπου δίαιτας ή δίαιτας απώλειας βάρους, (δ) ιστορικό λήψης φαρμάκων, με αναλυτική περιγραφή του είδους φαρμάκου, της δοσολογίας, της συχνότητας και διάρκειας λήψης του, συμπεριλαμβανομένων πληροφοριών σχετικά με τα συμπληρώματα διατροφής και τη λήψη μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών παραγόντων, (ε) ανθρωπομετρικά δεδομένα, με καταγραφή του ύψους, του σωματικού βάρους, της περιφέρειας μέσης, ισχίου και μέσου δεξιού βραχίονα του ατόμου, και (στ) τριήμερο ημερολόγιο καταγραφής τροφίμων (2 καθημερινές και μια μέρα Σαββατοκύριακου), το οποίο αποσκοπεί στη ποσοτική καταγραφή της διαιτητικής πρόσληψης και στην αποτύπωση των διατροφικών συνηθειών των εθελοντών. Επιπλέον, οι εθελοντές συμπληρώνουν με τη βοήθεια του ερευνητή τη σύντομη έκδοση (short form) του ημερολογίου καταγραφής φυσικής δραστηριότητας (International Physical Activity Questionnaire Short form, IPAQ-SF, www.ipaq.ki.se).

Συμπληρωματικά του ερωτηματολογίου της μελέτης, οι εθελοντές συμπληρώνουν ένα προσαρμοσμένο επταήμερο ημερολόγιο καταγραφής γαστρεντερικών συμπτωμάτων και των χαρακτηριστικών των κενώσεων τους [166], το οποίο φέρει και μια οπτική απεικόνιση της κλίμακας Bristol (Bristol Stool Chart) για τη πιο λεπτομερή περιγραφή της σύστασης των κενώσεων καθημερινά [167]. Εντός των πρώτων ημερών συμπλήρωσης του ημερολογίου πραγματοποιείται και η συλλογή του δείγματος κοπράνων.

2.2. Ανθρωπομετρία

Η ανθρωπομετρική ανάλυση περιλαμβάνει μέτρηση του σωματικού βάρους των εθελοντών σε ζυγαριά ακριβείας (Seca) χωρίς παπούτσια και με ελαφρύ ρουχισμό, μέτρηση ύψους σε αναστημόμετρο χωρίς παπούτσια με το βλέμμα ευθεία μπροστά, λήψη περιφερειών μέσης, ισχίων και δεξιού δικεφάλου με χρήση εκτατής ταινίας και εκτίμηση της σύστασης σώματος σε αναλυτή σύστασης σώματος TANITA BC-418 μέσω βιοηλεκτρικής εμπέδησης (BIA) υπό κατάλληλες συνθήκες.

2.3. Δειγματοληψία κοπράνων

Η κένωση πραγματοποιείται σε ειδικό περιέκτη που παρέχεται στον εθελοντή, και η συλλογή του δείγματος κοπράνων πραγματοποιείται με τη βοήθεια αποστειρωμένου συλλέκτη κοπράνων, ο οποίος φέρει προσαρτημένο στο καπάκι του κοχλιάριο για τη διευκόλυνση της

συλλογής. Ο αποστειρωμένος συλλέκτης με το δείγμα κοπράνων στη συνέχεια κλείνεται σε φορητή συσκευή δημιουργίας αναερόβιας ατμόσφαιρας (OXOID™, AnaeroGen™ COMPACT, AN0010C).

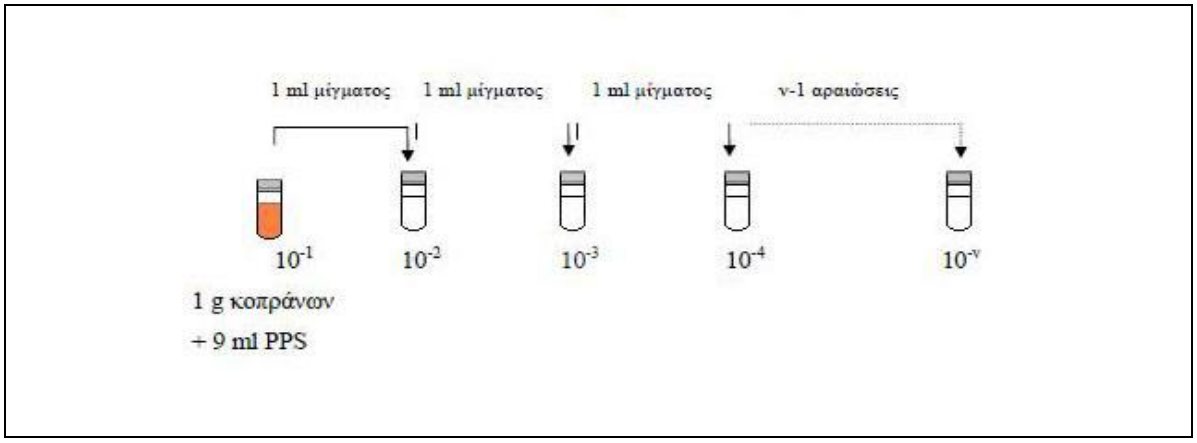
Το δείγμα κοπράνων πρέπει να προσκομιστεί υπό αναερόβιες συνθήκες το συντομότερο δυνατόν (≤ 2 ώρες) στο Εργαστήριο Βιολογίας, Βιοχημείας, Φυσιολογίας του Ανθρώπου και των Μικροοργανισμών του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, προκειμένου να προσδιοριστεί το pH του και να ξεκινήσει η μικροβιολογική επεξεργασία του.

3. Επεξεργασία δειγμάτων κοπράνων, ερωτηματολογίων και ημερολογίων

3.1 Μικροβιολογική επεξεργασία δειγμάτων κοπράνων

3.1.1. Διαδοχικές αραιώσεις– Επεξεργασία υπό αναερόβιες και αερόβιες συνθήκες

Κατά προσέγγιση 1g κοπράνων από κάθε δειγματοληψία μεταφέρεται σε γυάλινο φιαλίδιο Universal με 9 ml προβρασμένου διάλυματος PPS (Peptone-Physiological Saline) ως κατάλληλου μέσου αραίωσης. Υπό αναερόβιες συνθήκες (H_2 5%, CO_2 5%, N_2 balance) εντός αναερόβιου επωαστικού θαλάμου (BACTRON™ 1,5 Anaerobic Environmental Chamber, SHELLAB), πραγματοποιείται ομογενοποίηση των κοπράνων και του διαλύματος PPS με τη βοήθεια πιπέττας των 1000μl, χωρίς ανάδευση με το υπερκείμενο αέρα. Ακολούθως, πραγματοποιούνται διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις με διαδοχική λήψη και μεταφορά 1 ml του προκύπτοντος μίγματος σε φιαλίδια Universal με 9 ml προβρασμένου διάλυματος PPS (**Εικόνα 8**) και επιλέγονται οι κατάλληλες αραιώσεις που θα χρησιμοποιηθούν για την επίστρωση στα στερεά θρεπτικά υλικά (2 ή 3 αραιώσεις ανά θρεπτικό υλικό, 3 επαναλήψεις ανά αραίωση).



Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων

Η επιλογή των χρησιμοποιούμενων αραιώσεων εξαρτάται από το είδος του θρεπτικού υλικού και τα αναμενόμενα επίπεδα των υπό μελέτη μικροοργανισμών βάσει της διεθνούς βιβλιογραφίας.

Τα θρεπτικά υλικά και οι αραιώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τους αναερόβιους μικροοργανισμούς ήταν οι εξής:

-Ολική αναερόβια μεσόφιλη μικροχλωρίδα:CBA(αναερόβια επώαση)→10^{-6}, 10^{-7}

-Μπιφιδοβακτήρια (*Bifidobacterium* spp.): Beerens' agar → 10^{-2}, 10^{-4}, 10^{-6}

-*Bacteroides* spp. : Wilkins-Chalgren agar → 10^{-3}, 10^{-5}, 10^{-6}

-Λακτοβάκιλλοι (*Lactobacillus* spp.) : Rogosa agar → 10^{-1}, 10^{-3}, 10^{-5}

-*Clostridium* spp. και *Clostridium perfringens*: TSC agar + D-cycloserine→ 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-4}

Τα θρεπτικά υλικά και οι αραιώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τους αερόβιους μικροοργανισμούς:

-Ολική αερόβια μεσόφιλη μικροχλωρίδα: CBA (αερόβια επώαση)→ 10^{-5}, 10^{-6}

-Εντερόκοκκοι: Slanetz & Bartley medium → 10^{-2}, 10^{-4}, 10^{-5}

-Ολικά κολίμορφα και *E. coli*: Chromocult Coliform agar → 10^{-1}, 10^{-3}, 10^{-5}

-Σταφυλόκοκκοι (*Staphylococcus* spp.) και *S. aureus*: MSA & Baird Parker → 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-4}

-Ζύμες και μύκητες: SDA → 10^{-1}, 10^{-3}, 10^{-5}

˙*Candida* spp.: Candida Merck → 10^{-1}

Ύστερα από κατάλληλη επιλογή των αραιώσεων, μεταφέρονται 100μl διαλύματος σε κάθε ένα τρυβλίο petri 90 mm (3 τρυβλία ανά αραίωση) με τα εκλεκτικά και μη- θρεπτικά υλικά, τα οποία πρόκειται να επωαστούν υπό αναερόβιες συνθήκες στον επωαστικό θάλαμο του αναερόβιου θαλάμου (CBA, Rogosa agar, Wilkins-Chalgren agar, Beeren's agar, TSC agar) και πραγματοποιείται επίστρωση (plating) εντός του αναερόβιου επωαστικού θαλάμου υπό ασηπτικές συνθήκες, με τη χρήση αποστειρωμένης γυάλινης ράβδου και με φορά επίστρωσης από τα τρυβλία με τη μεγαλύτερη προς τα τρυβλία με τη μικρότερη αραίωση. Με παρόμοιες διαδικασίες, πραγματοποιείται επίστρωση (plating) σε θάλαμο νηματικής ροής (laminar) υπό ασηπτικές συνθήκες και στα εκλεκτικά και μη- θρεπτικά υλικά, τα οποία πρόκειται να επωαστούν υπό αερόβιες συνθήκες σε επωαστικό θάλαμο (CBA, Slanetz & Bartley medium, Chromocult Coliform agar, MSA & Baird Parker, SDA, Candida Merck).

3.1.2. Θρεπτικά υλικά

3.1.2.1. Μέσο αραίωσης

Ως κατάλληλο μέσο για τη πραγματοποίηση των διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων επιλέχθηκε το διάλυμα PPS (Peptone-Physiological Saline) [168, 169]. Το διάλυμα PPS παρασκευάζεται με 0,1% Bacteriological peptone (LAB M®, MC024) (0,1g ανά 100ml διαλύματος) και 0,85% NaCl (HIMEDIA®, RM031, Sodium Chloride extra pure) (0,85g ανά 100ml διαλύματος) σε απιονισμένο νερό. Με τη βοήθεια διανομέα, το διάλυμα PPS μοιράζεται ανά 9ml σε γυάλινα φιαλίδια Universal και υποβάλλεται σε αποστείρωση στους 121°C για 15 λεπτά.

Πριν την επεξεργασία του δείγματος κοπράνων, τα φιαλίδια Universal με το διάλυμα PPS βράζονται στους 100°C για 20 λεπτά προκειμένου να απομακρυνθεί το διαλυμένο οξυγόνο από το μέσο αραίωσης.

3.1.2.2. Συνολική εντερική μεσόφιλη μικροχλωρίδα

Για τη καταμέτρηση της συνολικής εντερικής μικροχλωρίδας χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό γενικής χρήσης Columbia Blood Agar (CBA) [170], εμπλουτισμένο με 5-7% απινωδογονωμένου αίματος (50ml αίματος ανά 1000ml τελικού όγκου θρεπτικού υλικού). Σε 950 ml απιονισμένου ύδατος προστίθενται 41g Columbia Agar Base (LAB M®, LAB001) και διαλύονται μέσω βρασμού για ένα λεπτό. Η προσθήκη του αίματος (E&O Laboratories Ltd® REF DHB100, Defibrinated Horse blood 100mL) πραγματοποιείται υπό ασηπτικές συνθήκες ύστερα από αποστείρωση του υλικού τους 121°C για 15 λεπτά και ψύξη του σε θερμοκρασία 45-50°C. Το CBA, όπως όλα τα στερεά θρεπτικά υλικά, μοιράζεται εντός του θαλάμου νηματικής ροής υπό ασηπτικές συνθήκες σε τρυβλία petri 90 mm με αναλογία περίπου 20ml υλικού/τρυβλίο.

Τα τρυβλία επωάζονται σε αναερόβιες συνθήκες (BACTRON™ 1,5 Anaerobic Environmental Chamber, SHELLAB) στους 37°C για 48 ώρες για την καταμέτρηση της συνολικής αναερόβιας μεσόφιλης μικροχλωρίδας και σε αερόβιες συνθήκες αντίστοιχα για τη καταμέτρηση της συνολικής αερόβιας μεσόφιλης μικροχλωρίδας.

3.1.2.3. *Bacteroides* spp.

Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια του γένους *Bacteroides* είναι το Wilkins-Chalgren anaerobe agar (OXOID™, CM0619) [171] εμπλουτισμένο με το συμπλήρωμα G-N Anaerobe supplement (OXOID™, SR0108) και 5% αποστειρωμένο αίμα αλόγου. Συγκεκριμένα, για τη παρασκευή 500ml τελικού υλικού προστίθενται 21,5g Wilkins–Chalgren anaerobe agar σε 475ml αποσταγμένου νερού και θερμαίνεται μέχρι βρασμού προκειμένου να διαλυθεί πλήρως υπό ανάδευση. Το υλικό αποστειρώνεται στους 121°C για 15

λεπτά, ενώ παράλληλα αποστειρώνονται και τουλάχιστον 10 ml απιονισμένου ύδατος που απαιτούνται για το G-N Anaerobe supplement. Μετά το τέλος της αποστείρωσης, προστίθενται μετά από καλή ψύξη στους 50°C, τα 10ml απιονισμένου ύδατος σε 1 φιαλίδιο G-N Anaerobe supplement εντός του θαλάμου νηματικής ροής υπό ασηπτικές συνθήκες. Το θρεπτικό υλικό ψύχεται στους 50-55°C και προστίθεται υπό ασηπτικές συνθήκες το περιεχόμενο του φιαλιδίου G-N Anaerobe supplement καθώς και 25ml αποστειρωμένο αίμα αλόγου (OXOID™, SR0050). Το υλικό αναδεύεται ελαφρώς και μοιράζεται εντός του θαλάμου νηματικής ροής υπό ασηπτικές συνθήκες. Τα έτοιμα τρυβλία αποθηκεύονται στους 2-8°C μακριά από το φως και καταναλώνονται το ταχύτερο δυνατό.

Τα τρυβλία μετά τον εμβολιασμό επωάζονται σε αναερόβιες συνθήκες στους 37°C για 48 ώρες. Τα *Bacteroides* spp. είναι αρνητικοί κατά Gram, βάκιλλοι μικρού μήκους, με ποικίλη αντίδραση στη δοκιμή της καταλάσης, οι οποίοι δίνουν στρογγυλές αποικίες χρώματος γκρι/άσπρο στο εμπλουτισμένο Wilkins-Chalgren anaerobe agar.

3.1.2.4. Μπιφιδοβακτήρια (*Bifidobacterium* spp.)

Για τη καταμέτρηση του γένους *Bifidobacterium* spp. χρησιμοποιείται το εκλεκτικό υλικό Beerens' agar [172]. Η σύσταση του θρεπτικού υλικού ανά λίτρο είναι 42,5g Columbia Agar Base (LAB M®, LAB001), 5g άγαρ (LAB M®, MC006, Agar No2 Bacteriological) με συνολική τελική συγκέντρωση 15 g άγαρ/L, 5g γλυκόζης (LAB M®, MC013, Dextrose), 0,5g υδροχλωρική κυστεϊνη (Applichem®, A3698) ως αναγωγικό παράγοντα και 5 ml προπιονικού οξέος (MERCK®, 8.00605.1000) ως εκλεκτικός παράγοντας των μπιφιδοβακτηρίων (αναστέλλει την ανάπτυξη μελών της οικογένειας των Enterobacteriaceae και άλλων Gram (-) βακτηρίων, καθώς επίσης και στελεχών του γένους *Enterococcus*, *Staphylococcus*, και *Micrococcus*) [172]. Αρχικά, προστίθενται το Columbia Agar Base, το άγαρ και η υδροχλωρική κυστεΐνη στο απιονισμένο νερό και το υλικό υποβάλλεται σε βρασμό μέχρι διάλυσης. Στη συνέχεια, το υλικό ψύχεται στους 40-50°C, προστίθενται η γλυκόζη και το προπιονικό οξύ, προκαλείται διάλυση με ανάδευση και γίνεται ρύθμιση του pH στο 5± 0,1 με διάλυμα NaOH 1N. Το Beerens' agar δεν απαιτεί αποστείρωση σε αυτόκαυστο και πρέπει να χρησιμοποιείται εντός 48 ωρών από τη παρασκευή του.

Η επίστρωση του δείγματος και η επώαση των μπιφιδοβακτηρίων στο εκλεκτικό υλικό Beerens' πραγματοποιείται υπό αναερόβιες συνθήκες στους 37°C για 72 ώρες. Τα μπιφιδοβακτήρια είναι Gram (+), καταλάση (-), βάκιλλοι σχήματος Y ή με ροπαλοειδείς υφές και οι αποικίες που σχηματίζουν είναι λευκές και στρογγυλές.

3.1.2.5. Λακτοβάκιλλοι (*Lactobacillus* spp.)

Για τη καταμέτρηση του γένους *Lactobacillus* spp. χρησιμοποιείται το εκλεκτικό υλικό Rogosa agar (Becton, Dickinson and Company®, 248020, Difco™ Rogosa SL agar) [173]. Η προετοιμασία του Rogosa agar απαιτεί ανάμιξη 75 g υλικού σε 1L απιονισμένου ύδατος και θέρμανση μέχρι βρασμού για 1 λεπτό προκειμένου να διαλυθεί πλήρως. Ακολουθεί προσθήκη 1,32ml οξικού οξέος, καλή ανάδευση και βρασμός για 2-3 λεπτά, ώστε να γίνει ρύθμιση του pH στη τιμή 5,4 ± 0,2. Το υλικό ψύχεται στους 40-50°C και μοιράζεται εντός του θαλάμου νηματικής ροής υπό ασηπτικές συνθήκες σε τρυβλία petri 90 mm με αναλογία περίπου 20ml υλικού/τρυβλίο. Τα έτοιμα τρυβλία αποθηκεύονται στους 2-8°C και καταναλώνονται το ταχύτερο δυνατό (3-4 μέρες).

Η επίστρωση του δείγματος και η επώαση των λακτοβακίλλων στο εκλεκτικό υλικό Rogosa agar πραγματοποιήθηκε υπό αναερόβιες συνθήκες στους 37°C για 48 ώρες. Οι λακτοβάκιλλοι είναι Gram (+), καταλάση (-), βάκιλλοι ποικίλου μεγέθους και σχηματίζουν λευκές, γυαλιστερές και στρογγυλές αποικίες.

3.1.2.6. *Clostridium* spp. και *Clostridium perfringens*

Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια του γένους *Clostridium* είναι το Perfringens Agar Base (LAB M®, LAB194) εμπλουτισμένο με το αντιβιοτικό D-cycloserine (LAB M®, X194) και Egg Yolk Emulsion (LAB M®, X073) [Tryptose Sulphite Cycloserine (TSC) Agar]. Το TSC για το C. *perfringens*, το οποίο είναι το πλέον σύνηθες είδος κλωστριδίων στα κόπρανα, θεωρείται εκλεκτικό [174]. Συγκεκριμένα, για τη παρασκευή 500ml τελικού υλικού προστίθενται 23g Perfringens Agar Base σε 500ml απιονισμένου ύδατος και διαλύονται καλά υπό ανάδευση. Το υλικό αποστειρώνεται στους 121°C για 10 λεπτά, ενώ παράλληλα αποστειρώνονται και τουλάχιστον 5 ml απιονισμένου ύδατος που απαιτούνται για το D-Cycloserine. Μετά το τέλος της αποστείρωσης, προσθέτετε, αφού ψύξετε καλά, τα 5ml απιονισμένου ύδατος σε 1 φιαλίδιο D-Cycloserine εντός του θαλάμου νηματικής ροής υπό ασηπτικές συνθήκες. Η κυκλοσερίνη αναστέλλει την ανάπτυξη διαφόρων άλλων βακτηριακών γενών από τον εντερικό μικροβιόκοσμο ή σε περίπτωση ανάπτυξης αποικιών διατηρεί το μέγεθός τους μικρό. Το θρεπτικό υλικό ψύχετε στους 47°C και προστίθεται υπό ασηπτικές συνθήκες το περιεχόμενο του φιαλιδίου D-Cycloserine και 25ml Egg Yolk Emulsion. Το υλικό αναδεύεται ελαφρώς και μοιράζεται εντός του θαλάμου νηματικής ροής υπό ασηπτικές συνθήκες. Τα έτοιμα τρυβλία αποθηκεύονται στους 2-8°C στο σκοτάδι έως και 7 ημέρες.

Τα τρυβλία μετά τον εμβολιασμό επωάζονται σε αναερόβιες συνθήκες στους 37°C για 18-24 ώρες. Το γένος *Clostridium* είναι Gram (+), καταλάση (-) βάκιλλοι που σχηματίζουν ενδοσπόρια και δίνουν στρογγυλές αποικίες μαύρου ή μπεζ χρώματος στο εμπλουτισμένο Perfringens Agar

Base.Το *Clostridium perfringens* πέραν των μαύρων αποικιών που δίνει, λόγω της αντίδρασης της λεκιθινάσης με τον κρόκο αυγού του θρεπτικού υλικού σχηματίζει μία θολή περιοχή (άλω) γύρω από την αποικία και έτσι συνήθως ξεχωρίζει από το γένος των κλωστριδίων.

3.1.2.7. Ολικά κολίμορφα/ E.*coli* (Total coliforms/E.*coli*)

Το εκλεκτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την ταυτόχρονη ανίχνευση των ολικών κολίμορφων και του *Escherichia coli* είναι το Chromocult Coliform agar (MERCK, Chromocult® Coliform Agar, 1.10426.0500). Συγκεκριμένα, για τη παρασκευή 1L τελικού υλικού προστίθενται 26,5g Chromocult Coliform agar σε 1L απιονισμένου ύδατος, διαλύονται καλά υπό ανάδευση με ταυτόχρονη προσεχτική θέρμανση μέχρι βρασμού χωρίς αποστείρωση και ψύξη στους 45-50°C. Τα έτοιμα τρυβλία αποθηκεύονται καλά κλεισμένα στους 4°C μακριά από φως έως και 6 μήνες.

Η επώαση των ολικών κολίμορφων/*E.coli* στο εκλεκτικό υλικό Chromocult Coliform agar πραγματοποιείται υπό αερόβιες συνθήκες στους 37°C για 24 ώρες. Η *E.coli* δίνει αποικίες χρώματος μπλε σκούρο προς βιολετί (dark blue to violet), ενώ τα ολικά κολίμορφα προκύπτουν από το σύνολο των ροζ προς ερυθρών αποικιών (salmon to red) και των μπλε σκούρο προς βιολετί (dark blue to violet) αποικιών (*E.coli*). Αποικίες χρώματος ανοιχτό μπλε/τυρκουάζ ή αποικίες χωρίς χρώμα δεν καταμετρώνται. Τα ολικά κολίμορφα και η *E.coli* είναι Gram (-), καταλάση (+) βάκιλλοι μικρού μήκους.

3.1.2.8. Εντερόκοκκοι (*Enterococcus* spp.)

Το εκλεκτικό υλικό που χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια των εντερόκοκκων είναι το Slanetz & Bartley medium (LAB M®, LAB166) [175]. Για την παρασκευή 1L τελικού υλικού προστίθενται 43,5g Slanetz & Bartley medium σε 1L απιονισμένου ύδατος, διαλύονται καλά υπό ανάδευση με ταυτόχρονη προσεχτική θέρμανση μέχρι βρασμού χωρίς αποστείρωση και ψύξη στους 45-50°C. Τα έτοιμα τρυβλία αποθηκεύονται καλά κλεισμένα στους 2-8°C έως και 7 ημέρες.

Η επώαση των εντερόκοκκων στο εκλεκτικό υλικό Slanetz & Bartley medium πραγματοποιείται υπό αερόβιες συνθήκες στους 37°C για 48 ώρες. Όλες οι κόκκινες και καστανέρυθρες (maroon) αποικίες καταμετρώνται ως ενδεχόμενοι εντερόκοκκοι. Οι εντερόκοκκοι είναι Gram (+), καταλάση (-) κόκκοι. Η επιβεβαίωση των απομονωμένων εντερόκοκκων γίνεται μετά από θετική αντίδραση με το Kanamycin Aesculin Azide Agar (LAB M®, LAB106).

3.1.2.9. Σταφυλόκοκκοι και S.*aureus*

Τα εκλεκτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την καταμέτρηση των σταφυλόκοκκων και του *S.aureus* είναι το Baird Parker Medium Base (BP) και το Mannitol Salt Agar (MSA) [176, 177]. Για την παρασκευή 1L τελικού υλικού BP προστίθενται 63g Baird Parker Medium Base (LAB M®, LAB285, Baird Parker Medium Base ISO) σε 950ml απιονισμένου ύδατος, διαλύονται καλά υπό ανάδευση με ταυτόχρονη προσεχτική θέρμανση μέχρι βρασμού. Το υλικό αποστειρώνεται στους 121°C για 15 λεπτά. Μετά το τέλος της αποστείρωσης, προστίθενται μετά από καλή ψύξη στους 45-50°C, 50ml Egg Yolk Tellurite Emulsion (LAM M®, X085) εντός του θαλάμου νηματικής ροής υπό ασηπτικές συνθήκες. Τα έτοιμα τρυβλία αποθηκεύονται καλά κλεισμένα στους 2-8°C. Για την παρασκευή 1L τελικού υλικού MSA προστίθενται 108g Mannitol Salt Agar (LAB M®, LAB007) σε 1L απιονισμένου ύδατος, διαλύονται καλά υπό ανάδευση με ταυτόχρονη προσεχτική θέρμανση μέχρι βρασμού. Το υλικό αποστειρώνεται στους 121°C για 15 λεπτά. Μετά το τέλος της αποστείρωσης, το υλικό ψύχεται καλά στους 45-50°C. Τα έτοιμα τρυβλία αποθηκεύονται καλά κλεισμένα στους 2-8°C.

Η επώαση των σταφυλόκοκκων στο εκλεκτικό υλικό Baird Parker Medium Base πραγματοποιείται υπό αερόβιες συνθήκες στους 37°C για 48 ώρες. Όλες οι αποικίες με μαύρο χρώμα, με ή χωρίς θολή ή/και διαυγή άλω, εξετάζονται ως υποψήφιοι σταφυλόκοκκοι, ενώ αποικίες με μαύρο χρώμα και παρουσία θολής και διαυγούς άλω εξετάζονται ως υποψήφιοι εκπρόσωποι του είδους *S. aureus*. Η επώαση των σταφυλόκοκκων στο εκλεκτικό υλικό Mannitol Salt Agar πραγματοποιείται υπό αερόβιες συνθήκες στους 37°C για 48 ώρες. Όλες οι λευκές/ροζ αποικίες, που δεν αλλάζουν το χρώμα του θρεπτικού υλικού, εξετάζονται ως υποψήφιοι σταφυλόκοκκοι, ενώ όλες οι κίτρινες αποικίες με αλλαγή του χρώματος του θρεπτικού υλικού από κόκκινο σε φωτεινό κίτρινο εξετάζονται ως υποψήφιοι εκπρόσωποι του είδους *S. aureus*. Οι σταφυλόκοκκοι είναι Gram (+), καταλάση (+) κόκκοι.

3.1.2.10. Ζύμες και μύκητες

Το εκλεκτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια των ζυμών και των μυκήτων είναι το Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (LAB M®, LAB009), με προσθήκη του αντιβιοτικού Chloramphenicol για την αναστολή ανάπτυξης της πλειοψηφίας των βακτηρίων [177]. Για την παρασκευή 1L τελικού υλικού SDA προστίθενται 62g Sabouraud Dextrose Agar σε 1L απιονισμένου ύδατος, διαλύονται καλά υπό ανάδευση με ταυτόχρονη προσεχτική θέρμανση μέχρι βρασμού. Το υλικό αποστειρώνεται στους 121°C για 15 λεπτά. Μετά το τέλος της αποστείρωσης, προσθέτονται 2 φιαλίδια Chloramphenicol (LAB M®, X009), γίνεται καλή ανάμιξη και καλή ψύξη στους 45-50°C. Ακολουθεί η διανομή σε τρυβλία υπό ασηπτικές συνθήκες. Τα έτοιμα τρυβλία αποθηκεύονται καλά κλεισμένα στους 2-8°C, μακριά από φως.

Η επώαση των ζυμών στο εκλεκτικό υλικό Sabouraud Dextrose Agar πραγματοποιείται υπό αερόβιες συνθήκες στους 30°C για 96 ώρες, ενώ η επώαση των μυκήτων παρατείνεται έως τις 7 ημέρες. Οι ζύμες δίνουν κρεμώδεις αποικίες, με ευμεγέθη κύτταρα κατά τη μικροσκοπική παρατήρηση (40Χ μεγέθυνση), ενώ οι μύκητες δίνουν ευμεγέθεις αποικίες βαμβακώδους υφής με ενδεχόμενη παρουσία σπορίων ποικίλου χρώματος.

3.1.2.11. *Candida* spp.

Το εκλεκτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια των ζυμών του γένους *Candida* είναι το Candida Merck (MERCK®, 1.10412.0001, Merckoplate Candida elective agar acc. to NICKERSON) [178]. Το θρεπτικό υλικό Candida Merck δεν ετοιμάζονταν στο εργαστήριο αλλά παραλαμβάνονταν έτοιμο σε τρυβλία των 20ml από τον αντίστοιχο προμηθευτή. Η επώαση των ζυμών *Candida* spp. στο εκλεκτικό υλικό Candida Merck πραγματοποιείται υπό αερόβιες συνθήκες στους 30°C για 96 ώρες. Αποικίες σκούρου καφέ χρώματος, με ευμεγέθη κύτταρα κατά τη μικροσκοπική παρατήρηση (40Χ μεγέθυνση), καταμετρώνται ως εκπρόσωποι του γένους *Candida* spp.

3.1.3. Περιγραφή αποικιών – Χρώση Gram – Δοκιμασία καταλάσης – Καταμετρήσεις πληθυσμών

Μετά την επεξεργασία του δείγματος κοπράνων και την επώαση των τρυβλίων υπό τις κατάλληλες συνθήκες, πραγματοποιείται περιγραφή της μορφολογίας των παρατηρούμενων αποικιών στα εκλεκτικά υλικά. Μετά την περιγραφή των διαφορετικών τύπων αποικιών ακολουθεί η χρώση Gram, η δοκιμασία καταλάσης και η παρατήρηση των χρώσεων στο μικροσκόπιο.

Στο συνολικό εντερικό μικροβιόκοσμο, πραγματοποιήθηκε απλή αριθμητική καταμέτρηση των καλλιεργήσιμων μικροοργανισμών που σχημάτισαν αποικίες στο θρεπτικό υλικό (CBA), οι οποίοι αναπτύχθηκαν υπό αναερόβιες και υπό αερόβιες συνθήκες επώασης. Οι μικροβιακοί πληθυσμοί εκφράζονται ως βιώσιμες αναπαραγωγικές μονάδες (Colony Forming Units, CFU) ανά g αρχικού δείγματος κοπράνων.

Στο Chromocult Coliform Agar (θρεπτικό υλικό των ολικών κολίμορφων/E.coli), πραγματοποιήθηκε απλή αριθμητική καταμέτρηση των σχηματιζόμενων αποικιών και κατάταξη τους σε αποικίες ολικών κολίμορφων ή *E.coli* ως εξής: το *E.coli* δίνει αποικίες χρώματος μπλε σκούρο προς βιολετί (dark blue to violet), ενώ τα ολικά κολίμορφα προκύπτουν από το σύνολο των ροζ προς ερυθρών αποικιών (salmon to red) και των μπλε σκούρο προς βιολετί (dark blue to violet) αποικιών (*E.coli*).

Στα υπόλοιπα βακτήρια (εντερόκοκκοι, σταφυλόκοκκοι, μπιφιδοβακτήρια, λακτοβάκιλλοι, *Bacteroides* spp. , *Clostridium* spp. και *Clostridium perfringens*) πραγματοποιήθηκε περιγραφή των μορφολογικών χαρακτηριστικών των διαφόρων τύπων αποικιών στα αντίστοιχα εκλεκτικά θρεπτικά υλικά, χρώση Gram, δοκιμασία καταλάσης με 3% H_2O_2 και μικροσκοπική παρατήρηση των παρασκευασμάτων. Για τη περαιτέρω ταυτοποίηση των εντερόκοκκων και των σταφυλόκοκκων πραγματοποιήθηκε και γραμμική διασπορά των υποψήφιων τύπων αποικιών σε εκλεκτικά υλικά (ΚΑΑ και MSA, αντίστοιχα), με επακόλουθη χρώση Gram, δοκιμασία καταλάσης με 3% H_2O_2 και μικροσκοπική παρατήρηση των παρασκευασμάτων. Οι αποικίες εντερόκοκκων δίνουν λευκές/γκρι αποικίες με αλλαγή χρώματος υλικού στο ΚΑΑ, ενώ οι σταφυλόκοκκοι δίνουν λευκές/ροζ αποικίες χωρίς αλλαγή χρώματος και ο *S. aureus* δίνει κίτρινες/μπεζ αποικίες με αλλαγή χρώματος υλικού.

Στις ζύμες και τους μύκητες παρατηρήθηκε η ανάπτυξη τυπικών αποικιών στα θρεπτικά τους υλικά μετά τον προβλεπόμενο χρόνο επώασης τους και η μικροσκοπική παρατήρηση τους σε υγρά παρασκευάσματα (40Χ μεγέθυνση). Αποικίες που πληρούν τις απαραίτητες προϋποθέσεις αξιοποιήθηκαν για καταμέτρηση.

3.1.3.1.Χρώση Gram

Η διαδικασία της χρώσης Gram έχει ως εξής:

i. Σε καθαρή αντικειμενοφόρο πλάκα μεταφέρεται μία μικρή σταγόνα απιονισμένου ύδατος με το σταγονόμετρο. Αποστειρώνεται στη φλόγα ο βακτηριολογικός κρίκος και αφού κρυώσει γίνεται μεταφορά μιας πολύ μικρής ποσότητας της καλλιέργειας και ανάμιξη της με το νερό στην αντικειμενοφόρο απλώνοντας την. Στη συνέχεια, ο βακτηριολογικός κρίκος αποστειρώνεται στη φλόγα προτού γίνει απόθεση του στον πάγκο. Αφήνεται η αντικειμενοφόρος να στεγνώσει κανονικά και περνιέται πάνω από τη φλόγα του λύχνου για να θανατωθούν κύτταρα και να προσηλωθούν στην επιφάνεια της αντικειμενοφόρου (βακτηριακό επίχρισμα).

ii. Καλύπτεται το βακτηριακό επίχρισμα με κρυσταλλικό ιώδες (crystal violet) και αφήνεται για 20 δευτερόλεπτα.

iii. Ξεπλένεται η περίσσεια χρωστικής με λίγο απεσταγμένο νερό (2 δευτερόλεπτα).

iv. Καλύπτεται το επίχρισμα με διάλυμα ιωδίου Gram (Lugol) και αφήνεται για 1 λεπτό.

v. Απομακρύνεται η περίσσεια του διαλύματος ιωδίου Gram και καλύπτεται η αντικειμενοφόρος με 95% αλκοόλη για 10-20 δευτερόλεπτα ή μέχρις ότου ο διαλύτης να εκρέει από την αντικειμενοφόρο άχρωμος.

vi. Διακόπτεται η δράση της αλκοόλης με ξέπλυμα της αντικειμενοφόρου με απεσταγμένο νερό (2 δευτερόλεπτα).
vii. Καλύπτεται το επίχρισμα με σαφρανίνη για 20 δευτερόλεπτα.
viii. Γίνεται προσεχτική πλύση της αντικειμενοφόρου για μερικά δευτερόλεπτα με απεσταγμένο νερό (2 δευτερόλεπτα) και στη συνέχεια τοποθετείται ανάμεσα σε δύο φύλλα διηθητικού χαρτιού για να απομακρυνθεί η περίσσεια ύδατος και να στεγνώσει στον αέρα.
ix. Ακολουθεί εξέταση του παρασκευάσματος στο μικροσκόπιο πρώτα με το φακό 40X για εστίαση και μετά με τον ελαιοκαταδυτικό φακό (100X), αφού έχει τοποθετηθεί πρώτα μία μικρή σταγόνα κεδρέλαιου πάνω στη χρώση.

3.1.3.2. Δοκιμασία καταλάσης

Σε μία αντικειμενοφόρο πλάκα τοποθετείται μία μικρή σταγόνα 3% H_2O_2. Αποστειρώνεται στη φλόγα ο βακτηριολογικός κρίκος και αφού κρυώσει μεταφέρεται μία πολύ μικρή ποσότητα της καλλιέργειας και αναμιγνύεται με το 3% H_2O_2 στην αντικειμενοφόρο, απλώνοντας την καλλιέργεια πάνω στην πλάκα. Εάν παρατηρηθεί αφρισμός, τότε ο μικροοργανισμός χαρακτηρίζεται ως θετικός στη δοκιμασία της καταλάσης.

3.1.3.3. Καταμέτρηση αριθμού αποικιών

Μετά την περιγραφή των διαφορετικών τύπων αποικιών, τη χρώση Gram, τη δοκιμασία καταλάσης και τη παρατήρηση των χρώσεων στο μικροσκόπιο πραγματοποιείται η καταμέτρηση του αριθμού των αποικιών με τα αντίστοιχα επιθυμητά χαρακτηριστικά στις κατάλληλες αραιώσεις των εκλεκτικών υλικών. Μετά από αυτό ακολουθεί η μετατροπή του αριθμού των αποικιών σε βιώσιμες αναπαραγωγικές (Colony Forming Units, CFU) ανά g αρχικού δείγματος κοπράνων.

3.2. Μέτρηση pH κοπράνων

Μία μικρή ποσότητα του δείγματος (1g κοπράνων) ομογενοποιείται σε 10ml αποστειρωμένου νερού με τη χρήση αναδευτήρα (Stuart Scientific Autovortex SA6). Στη συνέχεια το pH μετράται σε θερμοκρασία δωματίου με τη χρήση πεχάμετρου (WTW Inolab) και με ηλεκτρόδιο το οποίο δεν καταστρέφεται από τις πρωτεΐνες των κοπράνων (WTW SenTix).

3.3. Ανάλυση ερωτηματολογίων – ημερολογίων

3.3.1. Τριήμερο ημερολόγιο καταγραφής τροφίμων

Το τριήμερο ημερολόγιο καταγραφής τροφίμων συμπληρώνεται από τους εθελοντές για την εκτίμηση της πρόσληψης ενέργειας, μακροθρεπτικών και μικροθρεπτικών συστατικών. Οι εθελοντές θα πρέπει να καταγράφουν για τρεις ημέρες (2 καθημερινές και 1 μέρα του Σαββατοκύριακου) όλα τα τρόφιμα (φαγητά και ποτά) που κατανάλωσαν μέσα στην ημέρα καθώς και τις ποσότητες αυτών με όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ακρίβεια. Επίσης καλούνται να καταγράφουν την ώρα την οποία κατανάλωσαν το κάθε τρόφιμο, τους συνδαιτυμόνες όπως και επίσης την επωνυμία του τροφίμου. Τα δεδομένα που προκύπτουν από τα τριήμερα ερωτηματολόγια καταγραφής τροφίμων επεξεργάζονται με το πρόγραμμα Nutritionist Pro™ (Axxya Systems LLC) ώστε να εκτιμηθεί η πρόσληψη ενέργειας, των θρεπτικών συστατικών (πρωτεϊνών, υδατανθράκων, λιπαρών, κορεσμένων λιπαρών οξέων, μονοακόρεστων λιπαρών οξέων, πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, και διαιτητικών ινών, απλών σακχάρων, χοληστερόλης, ασβεστίου, βιταμίνης C) και του αλκοόλ.

3.3.2. Επταήμερο ημερολόγιο καταγραφής γαστρεντερικών συμπτωμάτων

Το ημερολόγιο καταγραφής γαστρεντερικών συμπτωμάτων συμπληρώνεται από τους εθελοντές για 7 συνεχόμενες ημέρες μετά την ένταξη τους στη μελέτη και αξιολογεί καθημερινά τα γαστρεντερικά συμπτώματα (κοιλιακό άλγος, κοιλιακή διόγκωση, μετεωρισμός, κοιλιακό γουργουρητό) και τα χαρακτηριστικά των κοπράνων (οσμή, χρώμα) με μία κλίμακα από το 0 (καθόλου συμπτώματα/χωρίς οσμή/κίτρινο χρώμα) έως το 4 (σοβαρά συμπτώματα/έντονη οσμή/σκούρο καφέ). Η επταήμερη βαθμολογία για κάθε σύμπτωμα (το άθροισμα της έντασης του συμπτώματος στη διάρκεια των επτά ημερών) κυμαίνεται από 0 έως 28, ενώ το συνολικό άθροισμα της εβδομαδιαίας βαθμολογίας των τεσσάρων συμπτωμάτων κυμαίνεται από 0 έως 112 [166]. Επιπλέον, το ερωτηματολόγιο περιλαμβάνει ερωτήσεις σχετικές με την συχνότητα των κενώσεων και τη παρουσία διαρροϊκών κενώσεων, ενώ για τη πιο λεπτομερή περιγραφή της σύστασης των κενώσεων, παρατίθεται στο επταήμερο ημερολόγιο και μια οπτική απεικόνιση της κλίμακας Bristol (Bristol Stool Chart), οπού ο εθελοντής καλείται ημερησίως να χαρακτηρίσει τη υφή των κενώσεων του από το 1 (πολύ σκληρά κόπρανα, μικρού μεγέθους) έως το 7 (τελείως υδαρή κόπρανα) [167].

3.3.3. Ερωτηματολόγιο φυσικής δραστηριότητας

Για την εκτίμηση της φυσικής δραστηριότητας, καταγράφονται με τη χρήση του ερωτηματολογίου φυσικής δραστηριότητας (IPAQ-SF) η συχνότητα και η διάρκεια (σε min) τριών κατηγοριών φυσικής δραστηριότητας διαφορετικής έντασης (περπάτημα, μέτρια, έντονη δραστηριότητα) τις τελευταίες επτά ημέρες, ενώ καταγράφεται ξεχωριστά και το συνολικό χρονικό διάστημα που το άτομο ήταν καθιστό την τελευταία εβδομάδα. Τα δεδομένα προσαρμόζονται κατάλληλα ώστε να υπολογιστούν τα λεπτά των μεταβολικών ισοδυνάμων (metabolic equivalent of task, MET) ανά εβδομάδα (MET-min/week), βάσει της εξίσωσης «Διάρκεια Χ Συχνότητα ανά εβδομάδα Χ Επίπεδο MET» για κάθε επίπεδο φυσικής δραστηριότητας και του αθροίσματος των αποτελεσμάτων [179, 180] (www.ipaq.ki.se).

4. Στατιστική επεξεργασία

Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα Microsoft Office Excel 2007 και IBM SPSS Statistics 22. Στη βάση δεδομένων που δημιουργήθηκε στο Microsoft Office Excel 2007, καταχωρήθηκαν όλα τα δεδομένα που συλλέχθηκαν μέσω των ερωτηματολογίων και χρειάζονται για την στατιστική επεξεργασία.

Ο έλεγχος της κανονικότητας της κατανομής των συνεχών μεταβλητών θα πραγματοποιηθεί με τη δοκιμασία κανονικότητας Kolmogorov-Smirnov (One Sample Kolmogorov-Smirnov Normality test) σε επίπεδο σημαντικότητας α=0,05.

Οι συνεχείς μεταβλητές, που κατανέμονται κανονικά, θα εκφραστούν ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση. Στις μεταβλητές με κανονική κατανομή, ο έλεγχος της διαφοράς των μέσων ανάμεσα σε δύο ομάδες θα πραγματοποιηθεί με τον έλεγχο Student's t-test, ενώ η σύγκριση των μέσων τιμών μεταξύ 3 ομάδων (π.χ. ομάδες σωματικού βάρους) θα πραγματοποιηθεί με την ανάλυση διακύμανσης (One-Way ANOVA), με επακόλουθη post-hoc ανάλυση των μέσων (Tukey's test). Στις μεταβλητές, που δεν ακολουθούν τη κανονική κατανομή, ο έλεγχος της διαφοράς των μέσων ανάμεσα σε δύο ομάδες θα πραγματοποιηθεί με τον έλεγχο Mann-Whitney U test, ενώ η σύγκριση των μέσω τιμών μεταξύ 3 ομάδων θα πραγματοποιηθεί με τον έλεγχο Kruskal-Wallis test. Οι έλεγχοι θα πραγματοποιηθούν σε επίπεδο σημαντικότητας α=0,05.

Οι κατηγορικές μεταβλητές θα εκφραστούν ως απόλυτες και σχετικές συχνότητες (%) και οι συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων ως προς τις κατηγορικές μεταβλητές θα πραγματοποιηθούν με τη χρήση πινάκων συνάφειας και εφαρμογή της δοκιμασίας X^2 (Chi-Square test)

4.1. Υπό μελέτη μικροβιακοί πληθυσμοί

Οι πληθυσμοί των μικροοργανισμών εκφράζονται ως μέσοι όροι των καταμετρήσεων των αποικιών στις επαναλήψεις της επιλεγμένης αραίωσης του θρεπτικού υλικού, αφού προηγηθεί η αναγωγή τους στο βάρος του αντίστοιχου δείγματος κοπράνων της δειγματοληψίας (CFU/g κοπράνων). Η στατιστική επεξεργασία των πληθυσμών των εξεταζόμενων μικροοργανισμών θα πραγματοποιηθεί βάσει των μέσων τιμών των δεκαδικών λογαρίθμων των καταμετρήσεων των αποικιών (log_{10}CFU), αφού προηγηθεί η αναγωγή τους στο βάρος του αντίστοιχου δείγματος κοπράνων της δειγματοληψίας (log_{10}CFU/g κοπράνων) . Η σύγκριση των μικροβιακών πληθυσμών μεταξύ των κατηγοριών των εθελοντών έγινε με τη χρήση των στατιστικών μέσων των log_{10}CFU/g κοπράνων με τη βοήθεια της ανάλυσης διακύμανσης (One-Way ANOVA) σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$. Οι υποθέσεις που ελέγθηκαν είναι οι εξής:

H_0: Οι μέσοι πληθυσμοί των μικροοργανισμών στις εξεταζόμενες ομάδες είναι όμοιοι

H_α: Οι μέσοι πληθυσμοί των μικροοργανισμών στις εξεταζόμενες ομάδες διαφέρουν στατιστικά σημαντικά

Η μηδενική υπόθεση H_0 απορρίπτονταν σε επίπεδο σημαντικότητας $p<0,05$.

4.2.Επταήμερο ημερολόγιο καταγραφής γαστρεντερικών συμπτωμάτων

Στη συχνότητα κενώσεων/ημέρα, συχνότητα διαρροϊκών κενώσεων/ημέρα, σύσταση των κοπράνων, χρώμα των κοπράνων και οσμή των κοπράνων χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος. Για τα συμπτώματα κοιλιακού άλγους, κοιλιακής διόγκωσης, μετεωρισμό και γουργουρητό υπολογίστηκε το άθροισμα για το καθένα, καθώς και το συνολικό τους άθροισμα.

4.3. Τριήμερο ημερολόγιο καταγραφής τροφίμων

Μετά την καταχώρηση των δεδομένων στο Nutritionist Pro™ υπολογίστηκαν μέσω του ίδιου προγράμματος οι μέσοι όροι της πρόσληψης ενέργειας, των θρεπτικών συστατικών (πρωτεϊνών, υδατανθράκων, λιπαρών, κορεσμένων λιπαρών οξέων, μονοακόρεστων λιπαρών οξέων, πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, και διαιτητικών ινών, απλών σακχάρων, χοληστερόλης, ασβεστίου, βιταμίνης C) και του αλκοόλ.

ΙΙΙ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Περιγραφικά στοιχεία

Ο αριθμός των ατόμων που συμμετείχαν στη μελέτη ήταν 16 ενήλικες [75% άνδρες(12 άτομα) και 25% γυναίκες (4 άτομα)] ηλικίας 19-49 ετών, εκ των οποίων:

- οι 3 ήταν φυσιολογικού βάρους (1 άνδρας, 2 γυναίκες)
- οι 9 υπέρβαροι (7 άνδρες, 2 γυναίκες)
- οι 4 παχύσαρκοι (4 άνδρες, 0 γυναίκες)

Φύλο	BMI (18,5-25kg/m^2)	BMI (25-30kg/m^2)	BMI (>30kg/m^2)	Σύνολο
Άνδρες	1	7	4	12
Γυναίκες	2	2	0	4
Σύνολο	3	9	4	

Ο μέσος όρος ηλικίας του συνόλου των εθελοντών ήταν 27,8 έτη και του Δείκτη Μάζας Σώματος (ΔΜΣ) τους 28,3kg/m^2. Οι εθελοντές φυσιολογικού βάρους είχαν μέσο όρο ηλικίας 21έτη και ΔΜΣ 22,23kg/m^2. Οι υπέρβαροι εθελοντές είχαν μέσο όρο ηλικίας 28,1έτη και ΔΜΣ 27,03kg/m^2 και οι παχύσαρκοι 32,5έτη και 35,73kg/m^2 αντίστοιχα. Ο μέσος όρος ηλικίας, σύμφωνα με την ανάλυση διακύμανσης (One-way ANOVA), δε διαφέρει σημαντικά μεταξύ των ομάδων οπότε δεν επηρεάζει τα αποτελέσματα της μελέτης.

Το μορφωτικό επίπεδο όλων των ατόμων του δείγματος (100%) ήταν επιπέδου τριτοβάθμιας εκπαίδευσης με μέσο όρο τα 16,8 χρόνια εκπαίδευσης.

Το ποσοστό καπνιζόντων του δείγματος ήταν 37,5% (6 άτομα) και των μη καπνιζόντων 62,5% (10 άτομα).

Κάπνισμα	BMI (18,5-25kg/m^2)	BMI (25-30kg/m^2)	BMI (>30kg/m^2)	Σύνολο
Καπνίζοντες	0	5	1	6
Μη καπνίζοντες	3	4	3	10
Σύνολο	3	9	4	

Όπως φαίνεται και στον πίνακα, 25% των παχύσαρκων (1 από 4 άτομα) και 55% των υπέρβαρων (5 από 9 άτομα) κάπνιζαν ενώ κανείς από την ομάδα των ατόμων φυσιολογικού βάρους (0 από 3 άτομα) δεν κάπνιζε. Γίνεται αντιληπτό πως οι υπέρβαροι ήταν αυτοί που κάπνιζαν σε μεγαλύτερο ποσοστό από τις άλλες ομάδες.

Σωματομετρικά χαρακτηριστικά και αρτηριακή πίεση εθελοντών

Τα αποτελέσματα της ανθρωπομετρικής ανάλυσης και των μετρήσεων αρτηριακής πίεσης των εθελοντών καταγράφονται στον παρακάτω πίνακα ανά ομάδα ατόμων **(σε μέσο όρο ± τυπική απόκλιση)**.

	BMI 18,5-25kg/m^2 (n=3)	**BMI 25-30 kg/m^2 (n=9)**	**BMI >30 kg/m^2 (n=4)**	**P-group**
Σωματικό βάρος (kg)	64,0 ±13,75	82,7 ±8,95	114,6 ±31,3	0,006
Ύψος (cm)	168,6 ±11,15	174,7 ±8,49	178,0 ±8,04	0,406
Σωματικό λίπος (%)	21,2 ±4,87	25,7 ±4,00	30,7 ±6,27	0,062
Περιφέρεια μέσης (cm)	76,6 ±10,01	89,3 ±5,75	111,0 ±16,77	0,002
Περιφέρεια ισχίων (cm)	102,3 ±8,02	110,5 ±2,20	126,1 ±13,43	0,002
Πηλίκο περιφέρειας μέσης προς περιφέρεια ισχίων	0,74 ±0,03	0,80 ±0,04	0,87 ±0,05	0,012
Συστολική αρτηριακή πίεση (mmHg)	106,8 ±3,75	112,1 ±8,93	137,8 ±21,48	0,008
Διαστολική αρτηριακή πίεση (mmHg)	68,6 ±9,25	75,0 ±11,58	94,2 ±19,41	0,050

Παρατηρούνται σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων στο σωματικό βάρος, στο σωματικό λίπος, στην περιφέρεια μέσης, στην περιφέρεια ισχίων, στο πηλίκο περιφέρειας μέσης προς περιφέρεια ισχίων, στη συστολική αρτηριακή πίεση και στη διαστολική αρτηριακή πίεση. Οι διαφορές αυτές ήταν αναμενόμενες καθώς ο διαχωρισμός των εθελοντών σε ομάδες έγινε ανάλογα με το ΔΜΣ τους που επηρεάζει όλες αυτές τις μετρήσεις.

Καταμέτρηση πληθυσμών μικροοργανισμών

Με τη χρήση του προγράμματος SPSS, υπολογίστηκε η μέγιστη, και η ελάχιστη τιμή, ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση των μικροβιακών πληθυσμών (**σε log10CFU/g κοπράνων**) στο σύνολο των εθελοντών. Τα αποτελέσματα αυτών φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Μικροοργανισμοί	**Ελάχιστο**	**Μέγιστο**	**Μ.Ο.**	**Τυπ.απόκλιση**
Ολικοί αερόβιοι μο	6,82	9,45	8,32	0,92

Ολικά Κολίμορφα	4,46	9,13	7,08	1,16
E. *coli*	4,45	9,12	6,75	1,30
***Enterococcus* spp.**	3,67	8,28	5,87	1,16
***Staphylococcus* spp.**	2,48	4,58	3,24	0,58
S. aureus	1,88	4,55	3,11	0,66
Ολικοί αναερόβιοι μο	9,39	10,34	10,04	0,26
***Bacteroides* spp.**	8,16	9,78	9,17	0,47
***Bifidobacterium* spp.**	4,05	10,07	8,94	1,45
***Lactobacillus* spp.**	4,10	9,02	5,54	1,36
***Clostridium* spp.**	1,98	7,67	4,78	1,42
C. perfringens	2,33	7,66	4,14	1,46
Ζύμες	1,97	5,37	3,15	1,14
***Candida* spp.**	1,51	5,29	3,34	1,16
Μύκητες	1,51	5,47	2,40	1,01

Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί αερόβιοι και αναερόβιοι (ολικά κολίμορφα, Enterococcus spp., Bacteroides spp., Bifidobacterium spp., Lactobacillus spp., και Clostridium spp.) καταμετρήθηκαν στο σύνολο των εθελοντών.

Το E. coli εντοπίστηκε στα 15 από τα 16 άτομα του δείγματος (93%), έχοντας έναν εθελοντή φυσιολογικού βάρους με δείγμα κοπράνων που δεν έδωσε καταμετρήσεις E. coli. Έτσι, η ομάδα ατόμων με φυσιολογικό βάρος εμφάνισε E. coli στα 2 από τα 3 άτομα που την αποτελούν.

Καταμέτρηση σταφυλόκοκκων έγινε στα 14 από τα 16 άτομα του δείγματος (87%), με 2 από τα 4 παχύσαρκα άτομα (50% της ομάδας) να εμφανίζουν ποσότητες Staphylococcus spp. Από τα θετικά δείγματα σε σταφυλόκοκκους (14 εθελοντές), 11 άτομα χαρακτηρίστηκαν από την παρουσία του S. aureus.

Το είδος C. perfringens ανιχνεύτηκε στα 14 από τα 16 άτομα του δείγματος (87%). Δεν ανιχνεύτηκε σε ένα άτομο φυσιολογικού βάρους και σε ένα εθελοντή από την ομάδα των υπέρβαρων.

Ζύμες μετρήθηκαν στα 13 από τα 16 άτομα του δείγματος (81%) καθώς δεν εντοπίστηκαν σε ένα άτομο φυσιολογικού βάρους και σε 2 από τους 9 υπέρβαρους. Το γένος Candida καταμετρήθηκε σε ακόμη λιγότερους εθελοντές (10 από τα 16 άτομα του δείγματος).

Τέλος, μύκητες βρέθηκαν στα 15 από τα 16 άτομα του δείγματος (93%). Μόνο ένας εθελοντής από την ομάδα των υπέρβαρων δεν παρουσίασε μυκηλιακούς μύκητες.

Αερόβιοι μικροοργανισμοί

Διαφορές των πληθυσμών των προαιρετικά αερόβιων μικροοργανισμών μεταξύ των ομάδων. Οι πληθυσμοί εκφράζονται ως **log10CFU/g κοπράνων (μέσος όρος ± τυπική απόκλιση).**

Μικροοργανισμοί	BMI 18,5-25kg/m^2 (n=3)	BMI 25-30 kg/m^2 (n=9)	BMI >30 kg/m^2 (n=4)	P-group
Ολικοί αερόβιοι μο	7,92 ±0,37 (3)	8,47 ±1,14 (9)	8,27 ±0,66 (4)	0,697
***Enterococcus* spp.**	5,56 ±0,91 (3)	6,30 ±1,19 (9)	5,12 ±1,02 (4)	0,226
Ολικά κολίμορφα	6,32 ±1,61 (3)	7,31 ±1,21 (9)	7,13 ±0,56 (4)	0,469
E. *coli*	5,87 ±2,00 (2)	6,86 ±1,39 (9)	6,95 ±0,86 (4)	0,617
***Staphylococcus* spp.**	3,84 ±0,80 (3)	3,15[a] ±0,43 (9)	2,79[b] ±0,22 (2)	0,091
S. *aureus*	3,13 ±1,33 (3)	3,15 ±0,31 (7)	2,69[c] (1)	No sign
Ζύμες	2,74 ±0,52 (2)	2,95 ±1,23 (7)	3,71 ±1,22 (4)	0,529
***Candida* spp.**	2,15 ±0,91 (2)	3,64 ±1,16 (4)	3,63 ±1,12 (4)	0,307
Μύκητες	1,84 ±0,15 (3)	2,74 ±1,31 (8)	2,14 ±0,22 (4)	0,385

[a]Τάση για σημαντική διαφορά από τα άτομα φυσιολογικού βάρους (p=0,15)
[b]Τάση για σημαντική διαφορά από τα άτομα φυσιολογικού βάρους (p=0,10)
[c]Τάση

Τα επίπεδα των *Staphylococcus* spp. τείνουν να διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των ομάδων (p=0,091), με τα επίπεδά τους να είναι υψηλότερα στους φυσιολογικού βάρους εθελοντές σε σχέση με τους υπέρβαρους και τους παχύσαρκους.

Αναερόβιοι μικροοργανισμοί

Διαφορές των πληθυσμών των αναερόβιων μικροοργανισμών μεταξύ των ομάδων. Οι πληθυσμοί εκφράζονται ως **log10CFU/g κοπράνων (μέσος όρος ± τυπική απόκλιση).**

Μικροοργανισμοί	BMI 18,5-25kg/m^2 (n=3)	BMI 25-30 kg/m^2 (n=9)	BMI >30 kg/m^2 (n=4)	P-group
Ολικοί αναερόβιοι μο	9,67 ±0,26 (3)	10,14[a] ±0,18 (9)	10,10[b] ±0,19 (4)	0,013
***Bacteroides* spp.**	8,86 ±0,62 (3)	9,10 ±0,42 (9)	9,58[c,d] ±0,24 (4)	0,101
***Bifidobacterium* spp.**	8,81 ±0,78 (3)	8,85 ±1,89 (9)	9,24 ±0,67 (4)	0,906
***Lactobacillus* spp.**	4,80 ±0,29 (3)	5,73 ±1,61 (9)	5,66 ±1,29 (4)	0,611
***Clostridium* spp.**	3,32 ±0,05 (3)	4,75 ±1,30 (9)	5,93[e] ±1,28 (4)	0,042
C. *perfringens*	3,29 ±0,03 (2)	4,08 ±1,21 (8)	4,69 ±2,22 (4)	0,575

[a]Σημαντική διαφορά από τα άτομα φυσιολογικού βάρους (p=0,01)
[b]Σημαντική διαφορά από τα άτομα φυσιολογικού βάρους (p=0,04)
[c]Τάση για σημαντική διαφορά από τα άτομα φυσιολογικού βάρους (p=0,10)
[d]Τάση για σημαντική διαφορά από τους υπέρβαρους (p=0,18)
[e]Σημαντική διαφορά από τα άτομα φυσιολογικού βάρους (p=0,03)

Ο πληθυσμός της ολικής αναερόβιας μεσόφιλης μικροχλωρίδας και των κλωστριδίων διέφεραν σημαντικά μεταξύ των ομάδων της μελέτης (p=0,013 και p=0,042 αντίστοιχα). Οι υπέρβαροι και οι παχύσαρκοι εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα ολικών αναερόβιων μικροοργανισμών, σε σχέση με τα άτομα φυσιολογικού βάρους. Επιπλέον οι παχύσαρκοι χαρακτηρίστηκαν και από υψηλότερο πληθυσμό κλωστριδίων σε σχέση με τα άτομα φυσιολογικού βάρους.

Τα επίπεδα των *Bacteroides* spp. τείνουν να διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των ομάδων (p=0,101) με τους παχύσαρκους να εμφανίζουν σχετικά υψηλότερα επίπεδα συγκριτικά με τις άλλες δύο ομάδες.

Η συχνότητα εμφάνισης των συγκεκριμένων μικροοργανισμών στις ομάδες ατόμων του δείγματος ήταν 100%, καθώς σε όλα άτομα των 3 ομάδων (16/16) γίνανε καταμετρήσεις αυτών.

<u>Γαστρεντερολογικά συμπτώματα και pH κοπράνων εθελοντών</u>

Οι πληροφορίες για τα γαστρεντερικά συμπτώματα συλλέχθηκαν μέσω 7ήμερων ερωτηματολογίων γαστρεντερικών συμπτωμάτων. Τα χαρακτηριστικά των κενώσεων που συλλέχθηκαν μέσω των ερωτηματολογίων καταγράφονται στον παρακάτω πίνακα.

Μεταβολές των γαστρεντερικών συμπτωμάτων (μέσος όρος 7 ημερών ± τυπική απόκλιση) και pH κοπράνων.

	BMI 18,5-25kg/m^2	BMI 25-30 kg/m^2	BMI >30 kg/m^2	P-group
Συχνότητα κενώσεων	9,66 ±2,30	6,77[a] ±1,98	9,00[b] ±1,41	0,063
Διαρροϊκές κενώσεις	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,50[c,d] ±0,57	0,040
Σύσταση κοπράνων	3,33 ±0,57	3,22 ±0,44	4,75[e] ±1,50	0,103
Χρώμα κοπράνων	2,66 ±0,57	2,66 ±0,50	2,75 ±0,50	0,961
Οσμή κοπράνων	1,00 ±0,00	2,00[f] ±0,86	2,50[g] ±1,29	0,127
Κοιλιακό άλγος	1,66 ±2,08	1,11 ±1,36	1,25 ±1,50	0,863
Κοιλιακή διόγκωση	3,00 ±1,73	3,44 ±5,38	1,25 ±2,50	0,718
Μετεωρισμός	3,00 ±2,64	6,77 ±4,40	8,25 ±10,71	0,549
Κοιλιακό γουργουρητό	0,00 ±0,00	1,11 ±2,20	1,50 ±2,38	0,392
Σύνολο συμπτωμάτων	7,66 ±2,08	12,44 ±7,41	12,2 ±9,39	0,621
pH κοπράνων	6,68 ±0,68	6,66 ±0,74	6,57 ±0,65	0,969

[a]Τάση για σημαντική διαφορά από τα άτομα φυσιολογικού βάρους (p=0,10)
[b]Τάση για σημαντική διαφορά από τους υπέρβαρους (p=0,17)
[c]Τάση για σημαντική διαφορά από τα άτομα φυσιολογικού βάρους (p=0,18)
[d]Σημαντική διαφορά από τους υπέρβαρους (p=0,02)
[e]Τάση για σημαντική διαφορά από τους υπέρβαρους (p=0,07)
[f]Τάση για σημαντική διαφορά από τα άτομα φυσιολογικού βάρους (p=0,10)
[g]Τάση για σημαντική διαφορά από τα άτομα φυσιολογικού βάρους (p=0,11)

- Ως προς τα χαρακτηριστικά των κενώσεων παρατηρήθηκε ότι η ομάδα των υπέρβαρων τείνει να εμφανίζει μικρότερη συχνότητα κενώσεων σε σχέση με τους φυσιολογικού βάρους (p=0,100) και η ομάδα των παχύσαρκων τείνει να εμφανίζει μεγαλύτερη συχνότητα κενώσεων σε σχέση με τους υπέρβαρους (p=0,172).
- Η σύσταση των κοπράνων βάσει της κλίμακας Bristol παρουσίασε τάση για διαφοροποίηση μεταξύ της ομάδας των παχύσαρκων και της ομάδας των υπέρβαρων (p=0,076). Και στις τρεις ομάδες η σύσταση των κοπράνων εντάσσεται στα φυσιολογικά όρια σε σχέση με την κλίμακα.
- Το χρώμα των κοπράνων δεν παρουσίασε διαφορές μεταξύ των τριών ομάδων, ενώ η οσμή φαίνεται ότι παρουσιάζει τάση να διαφοροποιείται. Τα κόπρανα της ομάδας των υπέρβαρων και των παχύσαρκων είχαν την τάση να μυρίζουν περισσότερο έντονα από τα κόπρανα της ομάδας φυσιολογικού βάρους (p=0,100 και p=0,114, αντίστοιχα).

- Κανένας εθελοντής από την ομάδα φυσιολογικού βάρους, αλλά ούτε και από την ομάδα των υπέρβαρων δεν ανέφερε διαρροϊκές κενώσεις. Μόνο στην ομάδα των παχύσαρκων καταγράφηκαν διαρροϊκές κενώσεις.
- Ως προς τα γαστρεντερολογικά συμπτώματα που καταμετρήθηκαν (κοιλιακό άλγος, κοιλιακή διόγκωση, μετεωρισμός, κοιλιακό γουργουρητό) δεν παρατηρήθηκε καμία διαφοροποίηση μεταξύ των ομάδων.
- Δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφορά στο pH κοπράνων μεταξύ των ομάδων εθελοντών.

Φυσική δραστηριότητα

Οι πληροφορίες για την φυσική δραστηριότητα των εθελοντών συλλέχθηκαν μέσω ειδικού ερωτηματολογίου φυσικής δραστηριότητας. Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν αφορούν την φυσική δραστηριότητα των εθελοντών σε όλη τη διάρκεια μίας εβδομάδας.

Μεταβολές στη φυσική δραστηριότητα (MET-min/week ± τυπική απόκλιση).

	BMI 18,5-25kg/m^2	**BMI 25-30 kg/m^2**	**BMI >30 kg/m^2**	**P-group**
Έντονη φυσική δραστηριότητα	373,33 ±514,32	515,55 ±871,88	320,00 ±640,00	0,904
Μέτριας έντασης φυσική δραστηριότητα	1440,00 ±1099,81	377,33[a] ±333,53	420,00[b] ±494,77	0,036
Περπάτημα	1419,00 ±1172,77	533,50[c] ±362,81	757,35 ±442,26	0,111
Καθιστική ζωή	2520,00 ±1260,00	2806,66 ±1209,25	2835,00 ±1727,45	0,943
Συνολικό σκορ	3232,33 ±1778,20	1426,38[d] ±1007,00	1497,35[e] ±1379,49	0,120

[a]Σημαντική διαφορά από τα άτομα φυσιολογικού βάρους (p=0,03)
[b]Τάση για σημαντική διαφορά από τα άτομα φυσιολογικού βάρους (p=0,07)
[c]Τάση για σημαντική διαφορά από τα άτομα φυσιολογικού βάρους (p=0,09)
[d]Τάση για σημαντική διαφορά από τα άτομα φυσιολογικού βάρους (p=0,11)
[e]Τάση για σημαντική διαφορά από τα άτομα φυσιολογικού βάρους (p=0,20)

- Η φυσική δραστηριότητα μέτριας έντασης σε MET-min/week διέφερε σημαντικά μεταξύ των ομάδων (p=0,036**).** Η ομάδα των ατόμων φυσιολογικού βάρους έδειξε μεγαλύτερη σωματική δραστηριότητα μέτριας έντασης από τους υπέρβαρους (p=0,034) και τάση για μεγαλύτερη σωματική δραστηριότητα μέτριας έντασης από τους παχύσαρκους (p=0,078).
- Επιπλέον οι φυσιολογικού βάρους εθελοντές τείνουν να περπατούν περισσότερο και να είναι στο σύνολό τους πιο δραστήριοι σε σχέση με τις άλλες δύο ομάδες.

Τριήμερο ημερολόγιο καταγραφής τροφίμων

Οι πληροφορίες για τη διατροφική πρόσληψη των εθελοντών συλλέχθηκαν από 3ήμερα ημερολόγια καταγραφής τροφίμων. Οι ποσότητες των θρεπτικών συστατικών που καταγράφονται στον παρακάτω πίνακα είναι οι μέσοι όροι των ποσοτήτων 3 ημερών.

Μεταβολές στη διαιτητική πρόσληψη (μέσος όρος ± τυπική απόκλιση)

	BMI 18,5-25kg/m^2	BMI 25-30 kg/m^2	BMI >30 kg/m^2	P-group
Προσλαμβανόμενη ενέργεια (kcal)	2139,47 ±369,70	2255,23 ±534,76	2165,74 ±566,93	0,927
Πρωτεΐνες (g)	100,28 ±34,75	96,04 ±31,13	83,90 ±17,40	0,725
Υδατάνθρακες (g)	234,53 ±25,27	224,97 ±78,37	221,07 ±93,07	0,973
Λίπος (g)	84,96 ±11,09	103,85 ±20,46	91,69 ±34,09	0,435
Κορεσμένα λιπαρά οξέα (g)	27,61 ±5,89	32,97 ±7,23	23,74[a] ±7,84	0,127
Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (g)	34,80 ±8,13	44,62 ±9,69	43,43 ±13,21	0,387
Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (g)	14,91 ±0,76	17,16 ±5,40	14,19 ±8,76	0,676
Φυτικές ίνες (g)	20,19 ±1,62	20,26 ±12,54	16,94 ±5,15	0,855
Σάκχαρα (g)	72,92 ±13,13	69,73 ±33,87	77,28 ±53,57	0,945
Χοληστερόλη (mg)	286,67 ±167,90	299,97 ±183,75	226,68 ±59,30	0,752
Ασβέστιο (mg)	1091,35 ±6,92	1052,57 ±270,26	832,78 ±395,65	0,396
Βιταμίνη C (mg)	132,42 ±54,03	110,55 ±81,02	57,03 ±28,29	0,324
Αλκοόλ (g)	7,74 ±6,78	8,86 ±9,28	20,43[b,c] ±7,67	0,093

[a] Τάση για σημαντική διαφορά από τους υπέρβαρους (p=0,12)
[b] Τάση για σημαντική διαφορά από τα άτομα φυσιολογικού βάρους (p=0,16)
[c] Τάση για σημαντική διαφορά από τους υπέρβαρους (p=0,10)

- Παρατηρείται ότι δεν εμφανίζονται διαφορές ως προς την ενεργειακή πρόσληψη και την πρόσληψη μακροθρεπτικών και μικροθρεπτικών συστατικών, με εξαίρεση την πρόσληψη κορεσμένων λιπαρών οξέων, όπου η ομάδα των υπέρβαρων ατόμων φάνηκε να έχει μία τάση να προσλαμβάνει μεγαλύτερες ποσότητες σε σύγκριση με την ομάδα παχύσαρκων ατόμων (p=0,121).

- Η πρόσληψη αλκοόλ τείνει να διαφέρει μεταξύ των ομάδων και πιο συγκεκριμένα η ομάδα των παχύσαρκων ατόμων τείνει να καταναλώνει μεγαλύτερη ποσότητα αλκοόλ σε σύγκριση με την ομάδα ατόμων φυσιολογικού βάρους (p=0,169) και σε σύγκριση με την ομάδα των υπέρβαρων (p=0,101).

IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο εντερικός μικροβιόκοσμος επηρεάζει άμεσα τη φυσιολογία του ξενιστή μέσα από πληθώρα μεταβολικών, ανοσορρυθμιστικών και άλλων λειτουργιών ζωτικής σημασίας για την υγεία του. Η επιστημονική κοινότητα έχει δείξει αυξημένο ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια γύρω από τον ρόλο που παίζει ο εντερικός μικροβιόκοσμος στην κατάσταση της παχυσαρκίας. Πρόσφατα, έχει προταθεί ότι η διαφοροποιημένη σύσταση και ποικιλομορφία του εντερικού μικροβιόκοσμου επηρεάζει την εμφάνιση και εξέλιξη της παχυσαρκίας [181].

Η συμβολή του εντερικού μικροβιόκοσμου στην εμφάνιση της παχυσαρκίας είναι άγνωστη ακόμα και αυτό οφείλεται στο ότι η παχυσαρκία είναι πολυπαραγοντική νόσος και κατά συνέπεια είναι πολύ δύσκολο να διερευνηθεί η δράση μεμονωμένων παραγόντων [13, 148]. Από τη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν πολλές αναφορές για την επίδραση διαφόρων ειδών μικροοργανισμών, ή αναλογίες φύλων μικροοργανισμών που επικρατούν στον παχύσαρκο φαινότυπο, αλλά δεν επιβεβαιώνονται από όλες τις μελέτες [182, 183]. Ένα άλλος παράγοντας που δυσχεραίνει την μελέτη του φαινομένου είναι ότι οι μελέτες που ερευνούν το συγκεκριμένο θέμα μελετούν εθελοντές διαφορετικής εθνικότητας με διαφορετικές διατροφικές συνήθειες, έχοντας μεγάλη διακύμανση στη σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου μεταξύ των ατόμων και χρησιμοποιώντας διαφορετικές μεθόδους για την καταμέτρηση των μικροβιακών πληθυσμών (καλλιεργητική μέθοδος, μέθοδος FISH, μέθοδος της Real-Time PCR) [183].

Στη συγκεκριμένη πτυχιακή μελέτη χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των διαδοχικών αραιώσεων του δείγματος και υπολογισμού βιώσιμων αναπαραγωγικών μονάδων (CFU/g κοπράνων) βασισμένη σε μικροβιολογικές τεχνικές. Το μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι κάποια είδη μικροοργανισμών δεν μπορούν να αναπτυχθούν και δεν ανιχνεύονται μολονότι ευάριθμα, επειδή τα προτεινόμενα θρεπτικά υλικά είναι κατάλληλα για περιορισμένο αριθμό ειδών μικροοργανισμών και επίσης επειδή δεν μπορούν να ανταπεξέλθουν στις συνθήκες ανταγωνισμού που δημιουργούνται από τα άλλα είδη μικροοργανισμών. Το πλεονέκτημα είναι ότι προσφέρεται η δυνατότητα εκτίμησης του αριθμού και της ποικιλομορφίας του μικροβιακού πληθυσμού άμεσα και μπορεί να απομονωθούν και να μελετηθούν στελέχη από τον εντερικό μικροβιόκοσμο.

Ο σχεδιασμός αυτής της μελέτης προέβλεπε τη λήψη ενός μόνο δείγματος κοπράνων από τους εθελοντές προς ανάλυση και είναι γνωστό πως η ποικιλομορφία της σύστασης του εντερικού μικροβιόκοσμου επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες. Επίσης, ένας άλλος παράγοντας που μπορεί να επηρέασε τα αποτελέσματα της μελέτης είναι ότι ένα δείγμα κοπράνων υψηλής περιεκτικότητας σε νερό εμφανίζει μειωμένη πυκνότητα σε βακτήρια ενώ

δείγμα κοπράνων με χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό ίσως έχει αυξημένη πυκνότητα σε βακτήρια [74].

Σε προηγούμενες έρευνες έχει φανεί ότι η παχυσαρκία συνδέεται με αυξημένο αριθμό Firmicutes και μειωμένο αριθμό Bacteroidetes [13, 143] ή μόνο με μειωμένο αριθμό Bacteroidetes (*Bacteroides, Prevotella*) χωρίς κάποια διαφοροποίηση στα Firmicutes [144, 184] ενώ άλλες μελέτες δεν έχουν δείξει κάποια σημαντική διαφορά σε επίπεδο φύλων Firmicutes και Bacteroidetes μεταξύ παχύσαρκων και φυσιολογικού βάρους εθελοντών [74, 147, 154].

Στη συγκεκριμένη έρευνα φάνηκε ότι τα υπέρβαρα και παχύσαρκα άτομα είχαν περισσότερα *Bacteroides* spp. και λιγότερους σταφυλόκοκκους. Υπάρχουν πολλές μελέτες σε ανθρώπους που έχουν μελετήσει το φύλο Bacteroidetes αλλά δεν υπάρχουν αρκετές μελέτες που να έχουν μελετήσει συγκεκριμένα τα *Bacteroides* spp. Ο Santacruz και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι υπέρβαρες εγκυμονούσες γυναίκες εμφάνιζαν μειωμένη ποσότητα *Bacteroides* spp. στον εντερικό τους μικροβιόκοσμο [185] ενώ ο Collado και η ομάδα του έδειξαν αυξημένες ποσότητες *Bacteroides* spp. στις υπέρβαρες εγκυμονούσες γυναίκες [145], αποτέλεσμα που επιβεβαιώνει το εύρημα της μεγαλύτερης ποσότητας *Bacteroides* spp. στα υπέρβαρα και παχύσαρκα άτομα. Ο Nadal και η επιστημονική του ομάδα έδειξαν αύξηση των *Bacteroides* spp. στα άτομα που έχασαν σωματικό βάρος μετά από παρέμβαση [186] ενώ άλλοι ερευνητές βρήκαν ότι τα παχύσαρκα άτομα έχουν μικρότερες ποσότητες *Bacteroides* spp. σε σχέση με τα άτομα φυσιολογικού βάρους [187], αποτέλεσμα που έρχεται σε αντίθεση με το εύρημα της συγκεκριμένης μελέτης. Όσον αφορά τους λιγότερους σταφυλόκοκκους, το αποτέλεσμα αυτό δεν επιβεβαιώνεται από μελέτες που έχουν δείξει αυξημένη ποσότητα σταφυλόκοκκων σε υπέρβαρες εγκυμονούσες γυναίκες [145, 185].

Στη συγκεκριμένη μελέτη βρέθηκε επίσης μεγαλύτερος αριθμός *Clostridium* spp. στους παχύσαρκους σε σύγκριση με τα άτομα φυσιολογικού βάρους. Αυτό δεν επιβεβαιώνεται από τον Zhang και τους συνεργάτες του που βρήκαν λιγότερα Clostridia σε παχύσαρκα άτομα [72] ενώ άλλοι ερευνητές με τις ομάδες τους δεν έχουν δείξει κάποια συσχέτιση [74, 144, 147]. Από την άλλη μεριά υπάρχουν ευρήματα άλλων ερευνών που έδειξαν μειωμένη ποσότητα κάποιων ειδών *Clostridium* spp. σε άτομα που έχασαν βάρος μετά από παρέμβαση απώλειας σωματικού βάρους [150, 186].

Τέλος, η αυξημένη ποσότητα ολικής αναερόβιας μεσόφιλης μικροχλωρίδας (*Bacteroides* spp., *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Clostridium* spp.) που παρατηρήθηκε στις ομάδες των υπέρβαρων και παχύσαρκων ατόμων σε σύγκριση με τα άτομα φυσιολογικού βάρους και ο μη εντοπισμός κάποιας σημαντικής διαφοράς των ομάδων στα επίπεδα των *Bifidobacterium* spp.

δεν συμφωνούν με τα ευρήματα μελετών που συσχετίζουν την αυξημένη ποσότητα *Bifidobacterium* spp. με το φυσιολογικό βάρος [145, 146, 149].

Τα παραπάνω αντιφατικά αποτελέσματα οφείλονται πιθανώς στο διαφορετικό σχεδιασμό και πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε. Πολλές από τις άλλες έρευνες έχουν διαφορετικές πληθυσμιακές ομάδες εθελοντών που μελετούν όπως για παράδειγμα εγκυμονούσες [145] ή παιδιά [149] και χρησιμοποιούν διαφορετικές μεθόδους προσδιορισμού μικροβιακών πληθυσμών όπως τη μέθοδο FISH [147] και την Real-Time PCR [146] σε αντίθεση με την καλλιεργητική μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη έρευνα. Το σημαντικότερο όμως πρόβλημα είναι ότι ο αριθμός των εθελοντών είναι μικρός για να μπορέσει να γίνει ασφαλής στατιστική επεξεργασία.

Δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική διαφορά στον πληθυσμό των μικροοργανισμών *E. coli, Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Candida* spp. και ολικής αερόβιας μεσόφιλης μικροχλωρίδας μεταξύ των ομάδων. Το γεγονός ότι ο πληθυσμός του *Lactobacillus* spp. δεν διαφοροποιείται στις τρεις ομάδες, έρχεται σε αντίθεση με το εύρημα του Armougom και της επιστημονικής του ομάδας που έδειξαν ότι οι παχύσαρκοι εμφανίζουν μεγαλύτερες ποσότητες *Lactobacillus* spp. σε σύγκριση με τα άτομα φυσιολογικού βάρους [143].

Από τη στατιστική ανάλυση των γαστρεντερικών συμπτωμάτων των εθελοντών της μελέτης φάνηκε ότι οι υπέρβαροι είχαν μικρότερη συχνότητα κενώσεων, οι παχύσαρκοι είχαν περισσότερες διαρροϊκές κενώσεις και το μεγαλύτερο σκορ στην κλίμακα Bristol για τη σύσταση των κοπράνων και τα άτομα φυσιολογικού βάρους είχαν τα κόπρανα με τη λιγότερη οσμή. Το εύρημα των διαρροϊκών κενώσεων δεν θα μπορούσε παρά να χαρακτηριστεί συμπτωματικό γιατί ο μικρός αριθμός των εθελοντών (4άτομα) στην ομάδα των παχύσαρκων δεν μας επιτρέπει να βγάλουμε ασφαλή συμπεράσματα. Παρόλα αυτά σε πρόσφατη μετα-ανάλυση φάνηκε συσχέτιση του αυξημένου BMI με τα επεισόδια διαρροιών [188]. Τα υπόλοιπα γαστρεντερικά συμπτώματα δεν παρουσίασαν κάποια σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων.

Όσον αφορά τη φυσική δραστηριότητα παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ατόμων φυσιολογικού βάρους και των άλλων ομάδων στη διάρκεια και τη συχνότητα σωματικής δραστηριότητας μέτριας έντασης, του περπατήματος και στο συνολικό χρόνο και συχνότητα σωματικής δραστηριότητας. Τα άτομα φυσιολογικού βάρους εμφάνισαν σημαντικά μεγαλύτερη σωματική δραστηριότητα και αυτό μπορεί να εξηγήσει σε ένα βαθμό την επίτευξη και διατήρηση του σωματικού βάρους τους σε φυσιολογικά επίπεδα, με όλες τις επιφυλάξεις που γεννά ο μικρός αριθμός των εθελοντών.

Τέλος, αναφορικά με τη διατροφική πρόσληψη η στατιστική ανάλυση έδειξε διαφορά μεταξύ των παχύσαρκων και των άλλων ομάδων στην πρόσληψη αλκοόλ με τους παχύσαρκους

να καταναλώνουν μεγαλύτερες ποσότητες. Το αλκοόλ αποδίδει ενέργεια και έτσι αυξημένη κατανάλωση συμβάλει κατά ένα μέρος στο θετικό ενεργειακό ισοζύγιο που οδηγεί στην παχυσαρκία. Ωστόσο, πρέπει να αναφερθεί η παρατηρούμενη υπο-καταγραφή διατροφικής πρόσληψης από τις ομάδες των υπέρβαρων και παχύσαρκων ατόμων του δείγματος όπου εμφανίζουν χαρακτηριστικά ενεργειακή πρόσληψη παρόμοια με αυτή των ατόμων φυσιολογικού βάρους. Η υπο-καταγραφή, που συναντάται συχνά στη βιβλιογραφία [189], σε συνδυασμό με το μικρό δείγμα ατόμων της μελέτης δεν μπορεί να οδηγήσει σε ασφαλή συμπεράσματα για τις διαφορές των ομάδων ως προς τη διατροφική τους πρόσληψη.

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα μέχρι τώρα δεδομένα, θα μπορούσε η ρύθμιση του εντερικού μικροβιόκοσμου να αποτελέσει μία καινοτόμο προσέγγιση αντιμετώπισης της πολυπαραγοντικής νόσου της παχυσαρκίας παρόλο που σε καμία περίπτωση δεν μπορεί να αντικαταστήσει την παρέμβαση υποθερμιδικής δίαιτας και άσκησης. Μία διατροφή συγκεκριμένη σε θρεπτικά συστατικά και ενέργεια που θα οδηγούσε στην ανάπτυξη των ωφέλιμων μικροοργανισμών που βρίσκονται σε χαμηλούς πληθυσμούς στο έντερο του ανθρώπου και μειώνοντας τους πληθυσμούς άλλων μικροοργανισμών όχι τόσο ωφέλιμων οδηγώντας στη ρύθμιση του εντερικού μικροβιόκοσμου ίσως επηρέαζε με θετικό τρόπο το σωματικό βάρος.

Υπάρχουν ενδείξεις για τις διαφορές μεταξύ των ατόμων φυσιολογικού βάρους και παχύσαρκων στον εντερικό μικροβιόκοσμο τους όπως και για την επίδραση της διατροφής στην σύσταση του, αλλά το σίγουρο είναι πως δεν έχουν κατανοηθεί πλήρως. Έτσι, γίνεται σαφές ότι χρειάζεται περαιτέρω και εκτενέστερη έρευνα από την επιστημονική κοινότητα για να γίνει κατανοητή η σχέση της παχυσαρκίας και της διατροφικής πρόσληψης με τον εντερικό μικροβιόκοσμο.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

I)

Σας ενδιαφέρει το σωματικό σας βάρος και οι παράγοντες που το επηρεάζουν;

Σας ενδιαφέρει η σύσταση του σώματος σας;

Σας ενδιαφέρει η υγεία του εντέρου σας;

Επιθυμείτε ΔΩΡΕΑΝ αιματολογικές αναλύσεις;

Επιθυμείτε μια ΔΩΡΕΑΝ εξειδικευμένη ανάλυση της εντερικής σας χλωρίδας;

Τότε λάβετε μέρος στην ερευνητική μελέτη με θέμα

«Εντερική μικροχλωρίδα και παχυσαρκία»

Η συμμετοχή περιλαμβάνει μια επίσκεψη στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο.

Κριτήρια συμμετοχής

Υγιείς άνδρες και γυναίκες 18-65χρονών, χωρίς προβλήματα του πεπτικού

Για περαιτέρω πληροφορίες και δηλώσεις συμμετοχής

Μήτσου Ευδοκία

τηλ. 210-9549301, κιν. 6932777680, email: emitsou@hua.gr

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Vander A., S.J., Luciano D., *Φυσιολογία του ανθρώπου, Μηχανισμοί της λειτουργίας του οργανισμού.* Πασχαλίδης, 2001.
2. Hakansson, A. and G. Molin, *Gut microbiota and inflammation.* Nutrients, 2011. **3**(6): p. 637-82.
3. Costello, E.K., et al., *Bacterial community variation in human body habitats across space and time.* Science, 2009. **326**(5960): p. 1694-7.
4. Wu, G.D. and J.D. Lewis, *Analysis of the human gut microbiome and association with disease.* Clin Gastroenterol Hepatol, 2013. **11**(7): p. 774-7.
5. Boroni Moreira, A.P., et al., *Gut microbiota and the development of obesity.* Nutr Hosp, 2012. **27**(5): p. 1408-14.
6. Robles Alonso, V. and F. Guarner, *Linking the gut microbiota to human health.* Br J Nutr, 2013. **109 Suppl 2**: p. S21-6.
7. Tremaroli, V. and F. Backhed, *Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism.* Nature, 2012. **489**(7415): p. 242-9.
8. Wick, E.C. and C.L. Sears, *Bacteroides spp. and diarrhea.* Curr Opin Infect Dis, 2010. **23**(5): p. 470-4.
9. Mackie, R.I., A. Sghir, and H.R. Gaskins, *Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract.* Am J Clin Nutr, 1999. **69**(5): p. 1035S-1045S.
10. Madigan M.T., M.J.M., Parker J., *Βιολογία των μικροοργανισμών.* Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, 2007.
11. Wexler, H.M., *Bacteroides: the good, the bad, and the nitty-gritty.* Clin Microbiol Rev, 2007. **20**(4): p. 593-621.
12. Xu, J., et al., *Message from a human gut symbiont: sensitivity is a prerequisite for sharing.* Trends Microbiol, 2004. **12**(1): p. 21-8.
13. Ley, R.E., et al., *Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity.* Nature, 2006. **444**(7122): p. 1022-3.
14. Turnbaugh, P.J., et al., *An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest.* Nature, 2006. **444**(7122): p. 1027-31.
15. Cato E.P., G.W.L., Finegold S.M. , *Genus Clostridium.* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol.2. The Williams & Wilkins co., Baltimore, pp.1141-1200, 1986.
16. Summanen P., B.E., Citron DM, Strong CA, Wexler HM, Wadsworth SM., *Anaerobic Bacteriology Manual, 5th Edition.* Star Publishing Co., Belmont, CA, 1993.
17. Grass, J.E., L.H. Gould, and B.E. Mahon, *Epidemiology of foodborne disease outbreaks caused by Clostridium perfringens, United States, 1998-2010.* Foodborne Pathog Dis, 2013. **10**(2): p. 131-6.
18. Heilig, H.G., et al., *Molecular diversity of Lactobacillus spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA.* Appl Environ Microbiol, 2002. **68**(1): p. 114-23.
19. Claesson, M.J., D. van Sinderen, and P.W. O'Toole, *The genus Lactobacillus--a genomic basis for understanding its diversity.* FEMS Microbiol Lett, 2007. **269**(1): p. 22-8.
20. Salminen, M.K., et al., *Lactobacillus bacteremia, species identification, and antimicrobial susceptibility of 85 blood isolates.* Clin Infect Dis, 2006. **42**(5): p. e35-44.
21. Rastall, R.A., *Bacteria in the gut: friends and foes and how to alter the balance.* J Nutr, 2004. **134**(8 Suppl): p. 2022S-2026S.
22. Van Niel, C.W., et al., *Lactobacillus therapy for acute infectious diarrhea in children: a meta-analysis.* Pediatrics, 2002. **109**(4): p. 678-84.
23. Adolfsson, O., S.N. Meydani, and R.M. Russell, *Yogurt and gut function.* Am J Clin Nutr, 2004. **80**(2): p. 245-56.
24. Sanders, M.E., *Probiotics: considerations for human health.* Nutr Rev, 2003. **61**(3): p. 91-9.

25. Million, M., et al., *Comparative meta-analysis of the effect of Lactobacillus species on weight gain in humans and animals.* Microb Pathog, 2012. **53**(2): p. 100-8.
26. Schell, M.A., et al., *The genome sequence of Bifidobacterium longum reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(22): p. 14422-7.
27. Bevilacqua, L., et al., *Screening of Bifidobacterium strains isolated from human faeces for antagonistic activities against potentially bacterial pathogens.* Microbiol Res, 2003. **158**(2): p. 179-85.
28. Hijova, E. and A. Chmelarova, *Short chain fatty acids and colonic health.* Bratisl Lek Listy, 2007. **108**(8): p. 354-8.
29. Topping, D.L. and P.M. Clifton, *Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides.* Physiol Rev, 2001. **81**(3): p. 1031-64.
30. Arunachalam, K., *Role of bifidobacteria in nutrition, medicine and technology.* Nutrition Research, 1999: p. 1559-1597.
31. Sgorbati, B., M.B. Smiley, and T. Sozzi, *Plasmids and phages in Bifidobacterium longum.* Microbiologica, 1983. **6**(2): p. 169-73.
32. Tannock, G.W., *Identification of lactobacilli and bifidobacteria.* Curr Issues Mol Biol, 1999. **1**(1-2): p. 53-64.
33. Coakley, M., et al., *Conjugated linoleic acid biosynthesis by human-derived Bifidobacterium species.* J Appl Microbiol, 2003. **94**(1): p. 138-45.
34. Dilzer, A. and Y. Park, *Implication of conjugated linoleic acid (CLA) in human health.* Crit Rev Food Sci Nutr, 2012. **52**(6): p. 488-513.
35. Belury, M.A., *Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action.* Annu Rev Nutr, 2002. **22**: p. 505-31.
36. Onakpoya, I.J., et al., *The efficacy of long-term conjugated linoleic acid (CLA) supplementation on body composition in overweight and obese individuals: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials.* Eur J Nutr, 2012. **51**(2): p. 127-34.
37. Russell, D.A., et al., *Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria.* Int J Food Microbiol, 2011. **149**(1): p. 88-105.
38. Cheikhyoussef, A., et al., *Antimicrobial proteinaceous compounds obtained from bifidobacteria: from production to their application.* Int J Food Microbiol, 2008. **125**(3): p. 215-22.
39. Gill, S.R., et al., *Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant Staphylococcus aureus strain and a biofilm-producing methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis strain.* J Bacteriol, 2005. **187**(7): p. 2426-38.
40. Kuroda, M., et al., *Whole genome sequencing of meticillin-resistant Staphylococcus aureus.* Lancet, 2001. **357**(9264): p. 1225-40.
41. Tokajian, S., *New epidemiology of Staphylococcus aureus infections in the Middle East.* Clin Microbiol Infect, 2014.
42. Xia, J., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus antibiotic resistance and virulence.* Biosci Trends, 2013. **7**(3): p. 113-21.
43. Ryan KJ, R.C., *(2004) Sherris Medical Microbiology (4th ed.).* McGraw Hill.
44. Facklam, R., *What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes.* Clin Microbiol Rev, 2002. **15**(4): p. 613-30.
45. Gilmore, M.S., *The enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance.* ASM Press, 2002.
46. Klein, G., *Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract.* Int J Food Microbiol, 2003. **88**(2-3): p. 123-31.
47. Klein, G., A. Pack, and G. Reuter, *Antibiotic resistance patterns of enterococci and occurrence of vancomycin-resistant enterococci in raw minced beef and pork in Germany.* Appl Environ Microbiol, 1998. **64**(5): p. 1825-30.
48. Fisher, K. and C. Phillips, *The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus.* Microbiology, 2009. **155**(Pt 6): p. 1749-57.

49. Franz, C.M., et al., *Bile salt hydrolase activity of Enterococci isolated from food: screening and quantitative determination.* J Food Prot, 2001. **64**(5): p. 725-9.
50. Gomes, B.C., et al., *Prevalence and characterization of Enterococcus spp. isolated from Brazilian foods.* Food Microbiol, 2008. **25**(5): p. 668-75.
51. Kacmaz, B. and A. Aksoy, *Antimicrobial resistance of enterococci in Turkey.* Int J Antimicrob Agents, 2005. **25**(6): p. 535-8.
52. Tunger, A., et al., *In vitro activity of linezolid & quinupristin/dalfopristin against Gram-positive cocci.* Indian J Med Res, 2004. **120**(6): p. 546-52.
53. Peters, J., et al., *Species distribution and antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from food of animal origin in Germany.* Int J Food Microbiol, 2003. **88**(2-3): p. 311-4.
54. Hollenbeck, B.L. and L.B. Rice, *Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus.* Virulence, 2012. **3**(5): p. 421-33.
55. Singleton, P., *Bacteria in Biology, Biotechnology and Medicine (5th ed.)*. Wiley. 1999. pp 444–454.
56. Eckburg, P.B., et al., *Diversity of the human intestinal microbial flora.* Science, 2005. **308**(5728): p. 1635-8.
57. Keen, J.E., et al., *Shiga-toxigenic Escherichia coli O157 in agricultural fair livestock, United States.* Emerg Infect Dis, 2006. **12**(5): p. 780-6.
58. Bentley, R. and R. Meganathan, *Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria.* Microbiol Rev, 1982. **46**(3): p. 241-80.
59. Reid, G., J. Howard, and B.S. Gan, *Can bacterial interference prevent infection?* Trends Microbiol, 2001. **9**(9): p. 424-8.
60. Griffin, P.M. and R.V. Tauxe, *The epidemiology of infections caused by Escherichia coli O157:H7, other enterohemorrhagic E. coli, and the associated hemolytic uremic syndrome.* Epidemiol Rev, 1991. **13**: p. 60-98.
61. Vogt, R.L. and L. Dippold, *Escherichia coli O157:H7 outbreak associated with consumption of ground beef, June-July 2002.* Public Health Rep, 2005. **120**(2): p. 174-8.
62. Spampinato, C. and D. Leonardi, *Candida infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents.* Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 204237.
63. Spampinato, C. and D. Leonardi, *Molecular fingerprints to identify Candida species.* Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 923742.
64. Smeekens, S.P., et al., *Genetic susceptibility to Candida infections.* EMBO Mol Med, 2013. **5**(6): p. 805-13.
65. Naglik, J.R., et al., *Candida albicans interactions with epithelial cells and mucosal immunity.* Microbes Infect, 2011. **13**(12-13): p. 963-76.
66. Maccallum, D.M., *Hosting infection: experimental models to assay Candida virulence.* Int J Microbiol, 2012. **2012**: p. 363764.
67. Miceli, M.H., J.A. Diaz, and S.A. Lee, *Emerging opportunistic yeast infections.* Lancet Infect Dis, 2011. **11**(2): p. 142-51.
68. Wisplinghoff, H., et al., *Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study.* Clin Infect Dis, 2004. **39**(3): p. 309-17.
69. Mathe, L. and P. Van Dijck, *Recent insights into Candida albicans biofilm resistance mechanisms.* Curr Genet, 2013. **59**(4): p. 251-64.
70. Sekirov, I., et al., *Gut microbiota in health and disease.* Physiol Rev, 2010. **90**(3): p. 859-904.
71. Dethlefsen, L., et al., *Assembly of the human intestinal microbiota.* Trends Ecol Evol, 2006. **21**(9): p. 517-23.
72. Zhang, H., et al., *Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(7): p. 2365-70.

73. Duncan, S.H., et al., *Reduced dietary intake of carbohydrates by obese subjects results in decreased concentrations of butyrate and butyrate-producing bacteria in feces.* Appl Environ Microbiol, 2007. **73**(4): p. 1073-8.
74. Mai, V., et al., *Associations between dietary habits and body mass index with gut microbiota composition and fecal water genotoxicity: an observational study in African American and Caucasian American volunteers.* Nutr J, 2009. **8**: p. 49.
75. Turnbaugh, P.J., et al., *Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome.* Cell Host Microbe, 2008. **3**(4): p. 213-23.
76. Salminen, S., et al., *Demonstration of safety of probiotics -- a review.* Int J Food Microbiol, 1998. **44**(1-2): p. 93-106.
77. Hawrelak, J.A. and S.P. Myers, *The causes of intestinal dysbiosis: a review.* Altern Med Rev, 2004. **9**(2): p. 180-97.
78. Favier, C.F., et al., *Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates.* Appl Environ Microbiol, 2002. **68**(1): p. 219-26.
79. Morelli, L., *Postnatal development of intestinal microflora as influenced by infant nutrition.* J Nutr, 2008. **138**(9): p. 1791S-1795S.
80. O'Toole PW, C.M., *Gut microbiota: Changes throughout the lifespan from infancy to elderly.* Elsevier Ltd, 2010. **20**(4): p. 281–291.
81. Hopkins, M.J., R. Sharp, and G.T. Macfarlane, *Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S rRNA abundance, and community cellular fatty acid profiles.* Gut, 2001. **48**(2): p. 198-205.
82. O'Toole, P.W., *Changes in the intestinal microbiota from adulthood through to old age.* Clin Microbiol Infect, 2012. **18 Suppl 4**: p. 44-6.
83. Ljungberg, B., et al., *Influence of ciprofloxacin on the colonic microflora in young and elderly volunteers: no impact of the altered drug absorption.* Scand J Infect Dis, 1990. **22**(2): p. 205-8.
84. Konturek, P.C., T. Brzozowski, and S.J. Konturek, *Stress and the gut: pathophysiology, clinical consequences, diagnostic approach and treatment options.* J Physiol Pharmacol, 2011. **62**(6): p. 591-9.
85. Lyte, M., L. Vulchanova, and D.R. Brown, *Stress at the intestinal surface: catecholamines and mucosa-bacteria interactions.* Cell Tissue Res, 2011. **343**(1): p. 23-32.
86. Roberfroid, M., et al., *Prebiotic effects: metabolic and health benefits.* Br J Nutr, 2010. **104 Suppl 2**: p. S1-63.
87. Bosscher, D., et al., *Food-based strategies to modulate the composition of the intestinal microbiota and their associated health effects.* J Physiol Pharmacol, 2009. **60 Suppl 6**: p. 5-11.
88. Salvini, F., et al., *A specific prebiotic mixture added to starting infant formula has long-lasting bifidogenic effects.* J Nutr, 2011. **141**(7): p. 1335-9.
89. Costabile, A., et al., *A double-blind, placebo-controlled, cross-over study to establish the bifidogenic effect of a very-long-chain inulin extracted from globe artichoke (Cynara scolymus) in healthy human subjects.* Br J Nutr, 2010. **104**(7): p. 1007-17.
90. Langlands, S.J., et al., *Prebiotic carbohydrates modify the mucosa associated microflora of the human large bowel.* Gut, 2004. **53**(11): p. 1610-6.
91. da Silva, S.T., C.A. dos Santos, and J. Bressan, *Intestinal microbiota; relevance to obesity and modulation by prebiotics and probiotics.* Nutr Hosp, 2013. **28**(4): p. 1039-48.
92. de Vrese, M. and J. Schrezenmeir, *Probiotics, prebiotics, and synbiotics.* Adv Biochem Eng Biotechnol, 2008. **111**: p. 1-66.
93. Cani, P.D., C. Dewever, and N.M. Delzenne, *Inulin-type fructans modulate gastrointestinal peptides involved in appetite regulation (glucagon-like peptide-1 and ghrelin) in rats.* Br J Nutr, 2004. **92**(3): p. 521-6.
94. Delzenne, N.M., et al., *Impact of inulin and oligofructose on gastrointestinal peptides.* Br J Nutr, 2005. **93 Suppl 1**: p. S157-61.

95. Cani, P.D., et al., *Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia.* Diabetologia, 2007. **50**(11): p. 2374-83.
96. Parnell, J.A. and R.A. Reimer, *Weight loss during oligofructose supplementation is associated with decreased ghrelin and increased peptide YY in overweight and obese adults*. Am J Clin Nutr, 2009. **89**(6): p. 1751-9.
97. Schrezenmeir, J. and M. de Vrese, *Probiotics, prebiotics, and synbiotics--approaching a definition.* Am J Clin Nutr, 2001. **73**(2 Suppl): p. 361S-364S.
98. Hardy, H., et al., *Probiotics, prebiotics and immunomodulation of gut mucosal defences: homeostasis and immunopathology.* Nutrients, 2013. **5**(6): p. 1869-912.
99. Cassone, M., et al., *Outbreak of Saccharomyces cerevisiae subtype boulardii fungemia in patients neighboring those treated with a probiotic preparation of the organism.* J Clin Microbiol, 2003. **41**(11): p. 5340-3.
100. Cohen, L., S. Ranque, and D. Raoult, *Saccharomyces cerevisiae boulardii transient fungemia after intravenous self-inoculation.* Med Mycol Case Rep, 2013. **2**: p. 63-4.
101. Land, M.H., et al., *Lactobacillus sepsis associated with probiotic therapy.* Pediatrics, 2005. **115**(1): p. 178-81.
102. Parekh, P.J., et al., *The Role and Influence of Gut Microbiota in Pathogenesis and Management of Obesity and Metabolic Syndrome.* Front Endocrinol (Lausanne), 2014. **5**: p. 47.
103. Ma, X., J. Hua, and Z. Li, *Probiotics improve high fat diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance by increasing hepatic NKT cells.* J Hepatol, 2008. **49**(5): p. 821-30.
104. Kadooka, Y., et al., *Regulation of abdominal adiposity by probiotics (Lactobacillus gasseri SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial.* Eur J Clin Nutr, 2010. **64**(6): p. 636-43.
105. Robinson, C.J. and V.B. Young, *Antibiotic administration alters the community structure of the gastrointestinal micobiota.* Gut Microbes, 2010. **1**(4): p. 279-284.
106. Rakoff-Nahoum, S. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition of the indigenous microbial flora.* Mucosal Immunol, 2008. **1 Suppl 1**: p. S10-4.
107. Mazmanian, S.K., et al., *An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system.* Cell, 2005. **122**(1): p. 107-18.
108. O'Mahony, C., et al., *Commensal-induced regulatory T cells mediate protection against pathogen-stimulated NF-kappaB activation.* PLoS Pathog, 2008. **4**(8): p. e1000112.
109. O'Hara, A.M. and F. Shanahan, *Gut microbiota: mining for therapeutic potential.* Clin Gastroenterol Hepatol, 2007. **5**(3): p. 274-84.
110. Patel, R.M. and P.W. Lin, *Developmental biology of gut-probiotic interaction.* Gut Microbes, 2010. **1**(3): p. 186-95.
111. Sanz, Y., A. Santacruz, and G. De Palma, *Insights into the roles of gut microbes in obesity.* Interdiscip Perspect Infect Dis, 2008. **2008**: p. 829101.
112. Quigley, E.M., *Gut bacteria in health and disease.* Gastroenterol Hepatol (N Y), 2013. **9**(9): p. 560-9.
113. Shoaie, S. and J. Nielsen, *Elucidating the interactions between the human gut microbiota and its host through metabolic modeling.* Front Genet, 2014. **5**: p. 86.
114. Hamer, H.M., et al., *Review article: the role of butyrate on colonic function.* Aliment Pharmacol Ther, 2008. **27**(2): p. 104-19.
115. Jeffery, I.B. and P.W. O'Toole, *Diet-microbiota interactions and their implications for healthy living.* Nutrients, 2013. **5**(1): p. 234-52.
116. Zeng, H., D.L. Lazarova, and M. Bordonaro, *Mechanisms linking dietary fiber, gut microbiota and colon cancer prevention.* World J Gastrointest Oncol, 2014. **6**(2): p. 41-51.
117. Jones, B.V., et al., *Functional and comparative metagenomic analysis of bile salt hydrolase activity in the human gut microbiome.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(36): p. 13580-5.

118. Devaraj, S., P. Hemarajata, and J. Versalovic, *The human gut microbiome and body metabolism: implications for obesity and diabetes.* Clin Chem, 2013. **59**(4): p. 617-28.
119. Scholz-Ahrens, K.E., et al., *Prebiotics, probiotics, and synbiotics affect mineral absorption, bone mineral content, and bone structure.* J Nutr, 2007. **137**(3 Suppl 2): p. 838S-46S.
120. Guarner, F. and J.R. Malagelada, *Gut flora in health and disease.* Lancet, 2003. **361**(9356): p. 512-9.
121. Wang, Z., et al., *Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease.* Nature, 2011. **472**(7341): p. 57-63.
122. Serino, M., et al., *Metabolic adaptation to a high-fat diet is associated with a change in the gut microbiota.* Gut, 2012. **61**(4): p. 543-53.
123. Picard, C., et al., *Review article: bifidobacteria as probiotic agents -- physiological effects and clinical benefits.* Aliment Pharmacol Ther, 2005. **22**(6): p. 495-512.
124. Wang, B., et al., *Luminal administration ex vivo of a live Lactobacillus species moderates mouse jejunal motility within minutes.* FASEB J, 2010. **24**(10): p. 4078-88.
125. Lesniewska, V., et al., *Relationship between dietary-induced changes in intestinal commensal microflora and duodenojejunal myoelectric activity monitored by radiotelemetry in the rat in vivo.* Exp Physiol, 2006. **91**(1): p. 229-37.
126. Diaz Heijtz, R., et al., *Normal gut microbiota modulates brain development and behavior.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(7): p. 3047-52.
127. Neufeld, K.M., et al., *Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice.* Neurogastroenterol Motil, 2011. **23**(3): p. 255-64, e119.
128. Cryan, J.F. and S.M. O'Mahony, *The microbiome-gut-brain axis: from bowel to behavior.* Neurogastroenterol Motil, 2011. **23**(3): p. 187-92.
129. Spiller, R. and C. Lam, *An Update on Post-infectious Irritable Bowel Syndrome: Role of Genetics, Immune Activation, Serotonin and Altered Microbiome.* J Neurogastroenterol Motil, 2012. **18**(3): p. 258-68.
130. Davis, C.D. and J.A. Milner, *Gastrointestinal microflora, food components and colon cancer prevention.* J Nutr Biochem, 2009. **20**(10): p. 743-52.
131. Mai, V. and J.G. Morris, Jr., *Colonic bacterial flora: changing understandings in the molecular age.* J Nutr, 2004. **134**(2): p. 459-64.
132. Gentschew, L. and L.R. Ferguson, *Role of nutrition and microbiota in susceptibility to inflammatory bowel diseases.* Mol Nutr Food Res, 2012. **56**(4): p. 524-35.
133. *"Obesity and overweight", Fact sheet 311, World Health Organization, 2014*
134. *World Health Organization, 2008.*
135. Cani, P.D., et al., *Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity.* Gut Microbes, 2012. **3**(4): p. 279-88.
136. Poirier, P., et al., *Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(5): p. 968-76.
137. Yang, W., T. Kelly, and J. He, *Genetic epidemiology of obesity.* Epidemiol Rev, 2007. **29**: p. 49-61.
138. Caballero, B., *The global epidemic of obesity: an overview.* Epidemiol Rev, 2007. **29**: p. 1-5.
139. Haslam, D.W. and W.P. James, *Obesity.* Lancet, 2005. **366**(9492): p. 1197-209.
140. Park, J.S., J.H. Seo, and H.S. Youn, *Gut Microbiota and Clinical Disease: Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease.* Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr, 2013. **16**(1): p. 22-27.
141. Hullar, M.A. and J.W. Lampe, *The gut microbiome and obesity.* Nestle Nutr Inst Workshop Ser, 2012. **73**: p. 67-79.
142. Backhed, F., et al., *The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(44): p. 15718-23.
143. Armougom, F., et al., *Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in Lactobacillus in obese patients and Methanogens in anorexic patients.* PLoS One, 2009. **4**(9): p. e7125.

144. Turnbaugh, P.J., et al., *A core gut microbiome in obese and lean twins.* Nature, 2009. **457**(7228): p. 480-4.
145. Collado, M.C., et al., *Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women.* Am J Clin Nutr, 2008. **88**(4): p. 894-9.
146. Schwiertz, A., et al., *Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects.* Obesity (Silver Spring), 2010. **18**(1): p. 190-5.
147. Duncan, S.H., et al., *Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss.* Int J Obes (Lond), 2008. **32**(11): p. 1720-4.
148. Ley, R.E., et al., *Obesity alters gut microbial ecology.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(31): p. 11070-5.
149. Kalliomaki, M., et al., *Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight.* Am J Clin Nutr, 2008. **87**(3): p. 534-8.
150. Santacruz, A., et al., *Interplay between weight loss and gut microbiota composition in overweight adolescents.* Obesity (Silver Spring), 2009. **17**(10): p. 1906-15.
151. Ravussin, Y., et al., *Responses of gut microbiota to diet composition and weight loss in lean and obese mice.* Obesity (Silver Spring), 2012. **20**(4): p. 738-47.
152. Samuel, B.S. and J.I. Gordon, *A humanized gnotobiotic mouse model of host-archaeal-bacterial mutualism.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(26): p. 10011-6.
153. Haines, A.P., J.D. Imeson, and H.S. Wiggins, *Relation of breath methane with obesity and other factors.* Int J Obes, 1984. **8**(6): p. 675-80.
154. Jumpertz, R., et al., *Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans.* Am J Clin Nutr, 2011. **94**(1): p. 58-65.
155. Conterno, L., et al., *Obesity and the gut microbiota: does up-regulating colonic fermentation protect against obesity and metabolic disease?* Genes Nutr, 2011. **6**(3): p. 241-60.
156. Shen, J., M.S. Obin, and L. Zhao, *The gut microbiota, obesity and insulin resistance.* Mol Aspects Med, 2013. **34**(1): p. 39-58.
157. Backhed, F., et al., *Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(3): p. 979-84.
158. Winder, W.W. and D.G. Hardie, *AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes.* Am J Physiol, 1999. **277**(1 Pt 1): p. E1-10.
159. Karra, E., K. Chandarana, and R.L. Batterham, *The role of peptide YY in appetite regulation and obesity.* J Physiol, 2009. **587**(Pt 1): p. 19-25.
160. Cuche, G., J.C. Cuber, and C.H. Malbert, *Ileal short-chain fatty acids inhibit gastric motility by a humoral pathway.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2000. **279**(5): p. G925-30.
161. Samuel, B.S., et al., *Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(43): p. 16767-72.
162. Bjursell, M., et al., *Improved glucose control and reduced body fat mass in free fatty acid receptor 2-deficient mice fed a high-fat diet.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2011. **300**(1): p. E211-20.
163. Go, G.W., et al., *t10,c12 conjugated linoleic acid upregulates hepatic de novo lipogenesis and triglyceride synthesis via mTOR pathway activation.* J Microbiol Biotechnol, 2013. **23**(11): p. 1569-76.
164. Cani, P.D., et al., *Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance.* Diabetes, 2007. **56**(7): p. 1761-72.
165. Vijay-Kumar, M., et al., *Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5.* Science, 2010. **328**(5975): p. 228-31.
166. Kajander, K., et al., *A probiotic mixture alleviates symptoms in irritable bowel syndrome patients: a controlled 6-month intervention.* Aliment Pharmacol Ther, 2005. **22**(5): p. 387-94.
167. Lewis, S.J. and K.W. Heaton, *Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time.* Scand J Gastroenterol, 1997. **32**(9): p. 920-4.

168. Straka, R.P. and J.L. Stokes, *Rapid destruction of bacteria in commonly used diluents and its elimination.* Appl Microbiol, 1957. **5**(1): p. 21-5.
169. Roy, D., *Media for the isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products.* Int J Food Microbiol, 2001. **69**(3): p. 167-82.
170. Ellner, P.D., et al., *A new culture medium for medical bacteriology.* Am J Clin Pathol, 1966. **45**(4): p. 502-4.
171. Wilkins, T.D. and S. Chalgren, *Medium for use in antibiotic susceptibility testing of anaerobic bacteria.* Antimicrob Agents Chemother, 1976. **10**(6): p. 926-8.
172. Beerens, H., *Detection of bifidobacteria by using propionic acid as a selective agent.* Appl Environ Microbiol, 1991. **57**(8): p. 2418-9.
173. Rogosa, M., J.A. Mitchell, and R.F. Wiseman, *A selective medium for the isolation and enumeration of oral and fecal lactobacilli.* J Bacteriol, 1951. **62**(1): p. 132-3.
174. Araujo, M., et al., *Enumeration of Clostridium perfringens spores in groundwater samples: comparison of six culture media.* J Microbiol Methods, 2004. **57**(2): p. 175-80.
175. Manafi, M. and W. Kneifel, *[A combined chromogenic-fluorogenic medium for the simultaneous detection of coliform groups and E. coli in water].* Zentralbl Hyg Umweltmed, 1989. **189**(3): p. 225-34.
176. Baird-Parker, A.C., *An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase-positive staphylococci.* J. Appl. Bacteriol, 1962. **25**: p. 12-19.
177. MacFaddin, J.F., *Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria.* 1985. **Vol.1**(Williams and Wilkins, Baltimore).
178. Nadeem, S.G., S.T. Hakim, and S.U. Kazmi, *Use of CHROMagar Candida for the presumptive identification of Candida species directly from clinical specimens in resource-limited settings.* Libyan J Med, 2010. **5**.
179. Craig, C.L., et al., *International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity.* Med Sci Sports Exerc, 2003. **35**(8): p. 1381-95.
180. Lee, P.H., et al., *Validity of the International Physical Activity Questionnaire Short Form (IPAQ-SF): a systematic review.* Int J Behav Nutr Phys Act, 2011. **8**: p. 115.
181. Moreno-Indias, I., et al., *Impact of the gut microbiota on the development of obesity and type 2 diabetes mellitus.* Front Microbiol, 2014. **5**: p. 190.
182. Angelakis, E., et al., *The relationship between gut microbiota and weight gain in humans.* Future Microbiol, 2012. **7**(1): p. 91-109.
183. Tagliabue, A. and M. Elli, *The role of gut microbiota in human obesity: recent findings and future perspectives.* Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2013. **23**(3): p. 160-8.
184. Furet, J.P., et al., *Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss: links with metabolic and low-grade inflammation markers.* Diabetes, 2010. **59**(12): p. 3049-57.
185. Santacruz, A., et al., *Gut microbiota composition is associated with body weight, weight gain and biochemical parameters in pregnant women.* Br J Nutr, 2010. **104**(1): p. 83-92.
186. Nadal, I., et al., *Shifts in clostridia, bacteroides and immunoglobulin-coating fecal bacteria associated with weight loss in obese adolescents.* Int J Obes (Lond), 2009. **33**(7): p. 758-67.
187. Zuo, H.J., et al., *Gut bacteria alteration in obese people and its relationship with gene polymorphism.* World J Gastroenterol, 2011. **17**(8): p. 1076-81.
188. Eslick, G.D., *Gastrointestinal symptoms and obesity: a meta-analysis.* Obes Rev, 2012. **13**(5): p. 469-79.
189. Trabulsi, J. and D.A. Schoeller, *Evaluation of dietary assessment instruments against doubly labeled water, a biomarker of habitual energy intake.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2001. **281**(5): p. E891-9.