

**UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI**  
**COLLEGIUM MEDICUM**  
**WYDZIAŁ LEKARSKI**

**Henryk Szymański**

**WPŁYW SZCZEPÓW *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS***  
**(573L/1, 573L/2, 573L/3) NA PRZEBIEG OSTREJ**  
**BIEGUNKI U NIEMOWLĄT I DZIECI**  
**DO 6-GO ROKU ŻYCIA.**

**Praca doktorska**

**Promotor: Prof.dr hab.med. Piotr B.Heczko**

**Pracę wykonano w Oddziale Dziecięcym Szpital Św.Jadwigi Śląskiej w Trzebnicy**  
**Kierownik jednostki: Dr n.med. Jerzy Pejcz**

**Kraków 2005**

## *Podziękowania*

*Serdecznie dziękuję,*

*Panu Profesorowi Piotrowi B. Heczko, Kierownikowi Katedry Mikrobiologii CMUJ, za umożliwienie mi wykonania tej pracy oraz pomoc i życzliwość okazaną mi w trakcie jej realizacji.*

*Panu Dr n.med Jerzemu Pejczowi Ordynatorowi Oddziału Dziecięcego Szpitala Św.Jadwigi Śląskiej w Trzebnicy, mojemu Nauczycielowi pediatrii, za cenne wskazówki i wsparcie okazane mi przy realizacji niniejszej pracy.*

*Koleżankom z Oddziału Dziecięcego Szpitala Św.Jadwigi Śląskiej w Trzebnicy oraz z Zakładu Lecznictwa AmbulATORYJNEGO w Trzebnicy za pomoc w czasie prowadzenia badania.*

*Pani mgr Lilli Rejek i Pani mgr Ewie Jaworskiej z Laboratorium Szpitala Św.Jadwigi Śląskiej w Trzebnicy za wykonanie oznaczeń laboratoryjnych.*

*Pani Dr Magdalenie Strus, Pani Mgr Agnieszce Chmielarczyk, Panu Dr Mirosławowi Jawieniowi z Katedry Mikrobiologii CMUJ za pomoc w izolacji szczepów *Lactobacillus rhamnosus* oraz twórczą atmosferę w czasie trwania badania.*

*Mojej żonie Agnieszce i dzieciom Kubie, Basi i Hani za pomoc i cierpliwość w oczekiwaniu na zakończenie tej pracy.*

Realizacja badań klinicznych przedstawionych w niniejszej pracy była możliwa dzięki finansowemu wsparciu Komitetu Badań Naukowych w ramach grantu 3P05E06822.

| <b>SPIS TREŚCI</b>   | <b>Strona</b> |
|--|---------------|
| <b>1. WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW</b>  | 6             |
| <b>2. WSTĘP</b>  | 7             |
| 2.1. Definicja biegunki  | 7             |
| 2.2. Podział biegunek  | 8             |
| 2.3. Przebieg kliniczny biegunki   | 11            |
| 2.4. Biegunka jako problem epidemiologiczny  | 12            |
| 2.5. Leczenie biegunki   | 14            |
| 2.6. Probiotyki  | 20            |
| 2.6.1. Historia probiotyków  | 20            |
| 2.6.2. Definicja probiotyków   | 21            |
| 2.6.3. Właściwości probiotyków   | 22            |
| 2.6.4. Bakterie probiotyczne jako składnik flory<br>przewodu pokarmowego                         | 25            |
| 2.7. Wyniki badań klinicznych dotyczących stosowania<br>probiotyków w leczeniu biegunki u dzieci | 27            |
| 2.8. Bezpieczeństwo stosowania probiotyków   | 29            |
| 2.9. Dostępne w Polsce preparaty probiotyczne  | 29            |
| <b>3. CHARAKTERYSTYKA BADANEGO PREPARATU</b>   | 31            |
| <b>4. CEL BADANIA</b>  | 35            |
| <b>5. MATERIAŁ I METODY</b>  | 35            |
| 5.1. Kryteria włączenia do badania   | 35            |
| 5.2. Kryteria wyłączenia   | 36            |
| 5.3. Metodyka badania  | 36            |
| 5.4. Pierwotny punkt końcowy   | 36            |
| 5.5. Wtórne punkty końcowe   | 36            |
| 5.6. Obliczenie wielkości próby  | 37            |
| 5.7. Randomizacja  | 37            |
| 5.8. Utajenie alokacji   | 37            |
| 5.9. Zaślepienie badania   | 37            |

|  | <b>Strona</b> |
|--|---------------|
| <b>6. OPIS INTERWENCJI</b>   | 38            |
| 6.1. Wstępna kwalifikacja  | 38            |
| 6.2. Interwencja   | 38            |
| 6.3. Plan badania  | 39            |
| 6.4. Przygotowanie materiału do wykonania badań mikrobiologicznych                           | 40            |
| 6.5. Badanie mikrobiologiczne stolca   | 41            |
| <b>7. ANALIZA STATYSTYCZNA</b>   | 45            |
| <b>8. ASPEKT ETYCZNY</b>   | 45            |
| <b>9. WYNIKI</b>   | 45            |
| 9.1. Charakterystyka badanej populacji   | 46            |
| 9.2. Punkty końcowe  | 50            |
| 9.3. Analiza czynników nie objętych protokołem   | 52            |
| 9.4. Kolonizacja przewodu pokarmowego przez<br>badane szczepy <i>Lactobacillus rhamnosus</i> | 52            |
| 9.5. Bezpieczeństwo badanego preparatu   | 53            |
| <b>10. DYSKUSJA</b>  | 54            |
| <b>11. WNIOSKI</b>   | 60            |
| <b>12. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM</b>   | 61            |
| <b>13. STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM (SUMMARY)</b>  | 62            |
| <b>14. SPIS RYCIN I ZAŁĄCZNIKÓW</b>  | 63            |
| <b>15. SPIS TABEL</b>  | 64            |
| <b>16. ZAŁĄCZNIKI</b>  | 65            |
| <b>17. PIŚMIENNICTWO</b>   | 67            |

## **1. Wykaz używanych skrótów**

### **LISTA SKRÓTÓW**

**API** - Biochemiczny szereg identyfikacyjny

**CFU** - (colony forming units) – jednostki tworzące kolonie

**CI** - (confidence interval) – przedział ufności

**CM UJ** - Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego

**ESPGHAN** – (European Society for Paediatric Gastroenterology  
Hepatology and Nutrition) - Europejskie Towarzystwo  
Gastroenterologii Hepatologii i Żywienia Dzieci

**GALT**– (gut-associated lymphoid tissues) – tkanka limfoidalna  
przewodu pokarmowego

**IgG** – immunoglobulina G

**MRS** – (de Man, Rogosa, Sharpe) – wybiórcze podłoże wzrostowe dla  
Lactobacillus

**PCR** - (Polymerase Chain Reaction) łańcuchowa reakcja polimerazy

**PFGE** – (Pulse Field Gel Electrophoresis) - elektroforeza w zmiennym  
polu elektrycznym

**RR** – (relative risk) - ryzyko względne

**SCFA** – (short chain fatty acids) – krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe

**SD** – (standard deviation) - odchylenie standardowe

**sIgA** – (secretory IgA) – wydzielnicza immunoglobulina A

**WHO** – (World Health Organization ) Światowa Organizacja Zdrowia

## 2. WSTĘP

Ostra biegunka jest jedną z najczęściej występujących na świecie chorób<sup>1,2,3</sup>. Przez cały czas poszukuje się skutecznych metod leczniczych oraz sposobów jej zapobiegania. Ze względu na powszechność choroby ważne jest aby nowe leki były bezpieczne, łatwo dostępne i tanie. W ostatnich latach duże zainteresowanie wzbudzają preparaty probiotyczne, których skuteczność jest coraz lepiej udokumentowana w leczeniu ostrej biegunki u dzieci<sup>4,5,6,7</sup>.

### 2.1. Definicja biegunki

Według definicji Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) biegunką określamy stan, w którym niemowlę karmione sztucznie oddaje 3 lub więcej stolców w ciągu 24 godzin lub 1 tzw. stolec patologiczny - czyli zawierający krew, śluz lub ropę<sup>3,8</sup>. Według niektórych autorów biegunka zaczyna się od 4 stolców w ciągu doby<sup>9</sup>. Ponadto istnieje wiele definicji i określeń biegunki. Do najczęściej używanych należą: znamienne zwiększenie liczby wypróżnień w ciągu doby w porównaniu do poprzedniego okresu i/lub zmiana konsystencji stolca na płynną lub półpłynną oraz każdy stolec patologiczny bez względu na wiek dziecka i sposób żywienia<sup>3,8,9</sup>. Biegunką ostrą można również określić stan chorobowy, w którym zwiększa się objętość stolców, a masa stolca dzieci poniżej 2 roku życia przekracza 10 g/kg mc/dobę, a u starszych dzieci powyżej 200 g/dobę<sup>3,9,10,11,12</sup>.

Aktualnie brak jest powszechnie akceptowanej definicji, co szczególnie wyraźnie widać w badaniach naukowych, gdzie autorzy stosują definicje według własnego uznania<sup>4,9</sup>. Pomimo tego, że definicje oparte na liczbie stolców są uznawane za mało precyzyjne, to jednak ich pomiar jest najłatwiejszy, pozostaje nadal najbardziej praktyczny i jest stosowany w większości badań naukowych jako miara oceny skuteczności różnych metod leczniczych<sup>3,9</sup>.

## 2.2. Podział biegunek

Istnieje kilka podziałów biegunek. Dzieli się je ze względu na czas trwania, czynniki etiologiczne oraz patomechanizm<sup>12,13</sup>.

Jeżeli czas trwania biegunki nie przekracza 14 dni, to jest ona określana jako ostra. Jeżeli biegunka przedłuża się ponad 14 dni, stan ten określamy biegunką przewlekłą. Granica w 14. dniu między biegunką ostrą i przewlekłą jest powszechnie akceptowana, choć została ustalona arbitralnie<sup>3,13</sup>.

W oparciu o mechanizm powstania biegunki wyróżnia się cztery główne typy: biegunkę osmotyczną, sekrecyjną, wysiękową oraz biegunkę spowodowaną zaburzeniami motoryki przewodu pokarmowego<sup>3,11,12,14</sup>.

Do biegunki osmotycznej dochodzi, gdy znajdująca się w świetle przewodu pokarmowego nie strawiona treść pokarmowa posiada wysoki ładunek osmotyczny i powoduje ściąganie wody do przewodu pokarmowego. Biegunka tego typu występuje w przebiegu przewlekłego zapalenia trzustki, w przebiegu celiakii, a także może być następstwem diety zawierającej owoce, zwiększoną zawartość laktozy, sorbitol lub fruktozę<sup>3,11,14</sup>.

Biegunka sekrecyjna jest spowodowana zwiększonym wydzielaniem do światła jelita cienkiego i grubego wody i elektrolitów. Jej przyczyną mogą być toksyny bakteryjne, zakażenia wirusowe i leki<sup>3,11,14</sup>.

Stan zapalny i owrzodzenie błony śluzowej jelit może powodować przedostawanie się osocza, białek, śluzu i krwi do światła przewodu pokarmowego i doprowadzić do powstania biegunki wysiękowej<sup>3,11,14</sup>.

Zespół jelita drażliwego jest najczęstszą przyczyną biegunki związanej z zaburzeniami motoryki przewodu pokarmowego<sup>3,11,14</sup>.

Ze względu na czynniki etiologiczne wyróżnia się biegunki wywołane przez zakażenia bakteryjne, wirusowe i pierwotniakowe<sup>3,11,14</sup>.

Do bakterii wywołujących biegunki u ludzi należą: *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* (szczepy: *Enteropatogenne*-EPEC, *Enterokrwotoczne*-EHEC, *Enteroinwazyjne*-EIEC, *Enterotoksyczne*-ETEC, *Enteroagregacyjne*-EAEC), *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella shigae*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Clostridium perfringens*, *Aeromonas hydrophila* i *Plesiomonas shigelloides*<sup>3, 11,13,14,15</sup>.



Do najczęstszych wirusowych czynników etiologicznych biegunki należą: rotawirusy grupy A i C, norowirusy, caliciwirusy, astrowirusy, adenowirusy i koronawirusy<sup>3, 11,13,14,15,16</sup>.

Zakażenia wirusowe i bakteryjne są główną przyczyną ostrej biegunki u dzieci. Najczęściej chorują dzieci do 3 roku życia. Zachorowania mogą mieć charakter epidemiczny lub sporadyczny<sup>12,16</sup>. Zakażenia sporadyczne są wywoływane przez rotawirusy grupy A i C, caliciwirusy, astrowirusy oraz adenowirusy<sup>12,16</sup>. Głównym czynnikiem zachorowań epidemicznych są norowirusy genogrupa I (Norwalk, Southampton, Desert Shield, Cruise Ship), norowirusy genogrupa II (Snow Mountain, Mexico, White River, Lordsdale, Bristol, Camberwell, Toronto, Hawaii, Melksham) oraz sapowirusy ( Sapporo, Parkville, Manchester, Houston, London). Również zakażenia rotawirusowe i astrowirusowe mogą mieć charakter epidemiczny<sup>16</sup>.

Ostra biegunka może być również spowodowana infestacjami pierwotniakami: *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, *Entamoeba histiolytica* *Dientamoeba fragilis*, *Balantidium stercoralis* oraz zatruciami pokarmowymi wywołanymi przez toksyny bakteryjne produkowane przez *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* i *Bacillus cereus*<sup>3,11,13,14,15</sup>.

Poszczególne czynniki etiologiczne występują z różną częstotliwością w krajach rozwijających się i w krajach uprzemysłowionych (tabela 1.)<sup>12,17</sup>.

**Tabela 1. Porównanie częstości występowania czynników etiologicznych ostrej biegunki w Stanach Zjednoczonych i w krajach rozwijających się<sup>12,17</sup>.**

|                                   | Stany Zjednoczone (%) | Kraje rozwijające się (%) |
|-----------------------------------|-----------------------|---------------------------|
| <b>Wirusy</b>                     |                       |                           |
| Rotawirusy                        | 8-50                  | 4-45                      |
| Adenowirusy                       | 5-15                  | 5-15                      |
| Norowirusy                        | 5-15                  | 1-2                       |
| Astrowirusy                       | 1-5                   | Brak danych               |
| Caliciwirusy                      | 1-2                   | Brak danych               |
| Coronawirusy                      | < 1                   | Brak danych               |
| <b>Bakterie</b>                   |                       |                           |
| Campylobacter jejuni              | 5-15                  | 1-7                       |
| Salmonella                        | 3-5                   | 0-15                      |
| E.coli – szczepy enterotoksyczne  | 1-4                   | 7-50                      |
| E.coli – szczepy enterokrwotoczne | 1-3                   | brak danych               |
| Shigella                          | 1-3                   | 3-16                      |
| Yersinia                          | 1-3                   | brak danych               |
| Clostridium difficile             | 1-2                   | brak danych               |
| <b>Pierwotniaki</b>               |                       |                           |
| Giardia lamblia                   | wysoka                | 4-20                      |
| Cryptosporidium parvum            | wysoka                | 4-8                       |
| Entamoeba histiolytica            | < 1                   | 2-15                      |
| Dientamoeba fragilis              | < 1                   | brak danych               |
| <b>Zatrucia pokarmowe</b>         |                       |                           |
| Staphylococcus aureus             | 1                     | brak danych               |
| Clostridium perfringens           | 1                     | brak danych               |
| Bacillus cereus                   | < 1                   | brak danych               |

W diagnostyce różnicowej ostrej biegunki należy rozważyć przyczyny niezakaźne, do których należą: nieprawidłowe karmienie, nieprawidłowości anatomiczne, zaburzenie wchłaniania, endokrynopatie, zatrucia pokarmowe, nowotwory, stany zapalne jelit oraz rzadko występujące zespoły chorobowe (zespół hemolityczno-mocznicowy, zespół Kawasaki czy choroba Hartnupów i inne.)<sup>11,12</sup>.

### 2.3. Przebieg kliniczny biegunki

Do zakażenia dochodzi na drodze kontaktów bezpośrednich, najczęściej drogą fekalno-oralną, poprzez zanieczyszczoną wodę bądź zanieczyszczone przedmioty, a także prawdopodobnie na drodze kropelkowej<sup>12,15,18,19,20</sup>. Manifestacja kliniczna zależy od czynnika etiologicznego oraz stanu odporności organizmu. W przypadku zakażeń wirusowych okres wylegania jest krótki i zwykle wynosi 1-3 dni (z wyjątkiem zakażeń adenowirusowych gdzie trwa do 7 dni)<sup>12,14,15,16,18,19,20</sup>. Przebieg kliniczny jest zwykle łagodny i samoograniczający się. Cechą charakterystyczną wszystkich zakażeń wirusowych jest ostra, wodnista biegunka często poprzedzona intensywnymi wymiotami (zwłaszcza w infekcjach rotawirusowych) oraz gorączką. Wymioty ustępują zwykle w ciągu pierwszych 48 godzin choroby a biegunka trwa od 2 do 7 dni. W trakcie infekcji rotawirusowej mogą także współistnieć objawy infekcji górnych dróg oddechowych<sup>12,15,18,19</sup>. Najczęstszym i najcięższym powikłaniem ostrej biegunki jest odwodnienie i wynikające z niego zaburzenia metaboliczne, które są częstą przyczyną hospitalizacji dzieci<sup>12,15,18,19</sup>. Przebieg zakażenia wirusowego nie daje trwałej odporności. Powtórne infekcje są częste, ale zazwyczaj mają przebieg łagodny lub bezobjawowy. Zakażenia rotawirusowe są jednym z głównych czynników zakażeń wewnątrzszpitalnych u dzieci<sup>18,19,21,22,23</sup>. Wynika to z dużej zakaźności wirusa oraz długiego okresu trwania biegunki. Rotawirusy są wydalane z kałem zakażonej osoby już przed wystąpieniem objawów choroby. Maksymalna liczba cząstek wirusa ( $10^8$ - $10^{10}$  w gramie kału) znajduje się w kale pomiędzy 3 a 4 dobą od wystąpienia objawów i systematycznie obniża się do 8 doby, po czym utrzymuje się czasem przez dłuższy czas na niewielkim poziomie<sup>15,18,19,20</sup>. Wirus może utrzymywać się przy życiu na ludzkich dłoniach przez godzinę, a na powierzchniach takich przedmiotów jak zabawki i końcówki termometrów przez cały dzień<sup>15,18,19,20</sup>. Ponieważ rotawirusy nie posiadają osłonki lipidowej, nie ulegają zniszczeniu pod wpływem rozpuszczalników lipidów. Dobrze przechowują się w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$ , są stosunkowo odporne na kilkakrotnie zamrażanie i odmrażanie oraz na inkubację w temperaturze  $56^{\circ}\text{C}$  przez 1 godzinę. Rotawirus ma cechy zakaźności w przedziale pH od 3 do 9. Można zredukować jego zakaźność przez działanie takich środków dezynfekcyjnych jak: alkohol etylowy, formalina, podchloryn, czy lizol<sup>18,19,20</sup>.

U chorych z ostrą biegunką bakteryjną zwykle stwierdza się wysoką gorączkę, bóle brzucha, a w stolcach często obecna jest krew i śluz. Cechą charakterystyczną biegunek wywołanych przez enterotoksyny bakteryjne jest obecność wodnistych stolców oraz wymiotów. Biegunki bakteryjne, podobnie jak wirusowe, mają zwykle przebieg samoograniczający się<sup>12,14,15,16</sup>.

#### **2.4. Biegunka jako problem epidemiologiczny**

Ostra biegunka jest powszechną chorobą w populacji dziecięcej. W krajach rozwijających się jednym z głównych problemów medycznych jest duża liczba zachorowań na biegunkę oraz wysoka śmiertelność dzieci z tego powodu<sup>1,2,3,24,25</sup>. Analiza przeprowadzona u dzieci do 5-go roku życia wykazała, że 15% zgonów w tej grupie wiekowej jest spowodowanych biegunką, co sprawia, że jest to trzecia z kolei przyczyna śmierci w tej grupie wiekowej, po zakażeniach i powikłaniach okołoporodowych, które odpowiadają za 23% zgonów i infekcjach dróg oddechowych, które odpowiadają za 18% zgonów<sup>24</sup>. Zachorowalność na biegunkę w krajach rozwijających się jest najwyższa w grupie dzieci do 11 m.ż. i wynosi 4,8 epizodów biegunki na dziecko na rok<sup>1,3</sup>, w porównaniu z 1-2 epizodami na dziecko na rok w krajach uprzemysłowionych<sup>3</sup>. W kolejnych latach życia częstość epizodów biegunkowych zmniejsza się. Średnia częstość występowania biegunki u dzieci poniżej 5-go roku życia w krajach rozwijających się wynosi 3,2 epizody na dziecko na rok<sup>1</sup>. W sumie liczbę epizodów biegunki w grupie dzieci poniżej 5-go roku życia szacuje się na 1,5 miliarda na rok<sup>1,2,26</sup>.

W 1982 roku, na podstawie danych z lat 50-tych, 60-tych i 70-tych, Światowa Organizacja Zdrowia oszacowała, że każdego roku na całym świecie, z powodu biegunki zmarło średnio 4,6 miliona dzieci do 5-go roku życia<sup>27</sup>. W latach 80-tych obserwowano zmniejszenie się śmiertelności z powodu biegunki w tej grupie wiekowej do 3,3 miliona zgonów rocznie<sup>28</sup>. W 2003 roku opublikowano analizę badań przeprowadzonych w latach 1992-2000, której celem była ocena częstości występowania chorób biegunkowych. W tym okresie umieralność z tego powodu wynosiła 2,5 miliona rocznie, z obserwowaną tendencją spadkową – do 1,6 miliona zgonów w 1999 roku. Obniżająca się śmiertelność dzieci do 5-go roku życia

z powodu biegunki jest skorelowana z obniżeniem się całkowitej śmiertelności w tej grupie wiekowej <sup>1</sup>.

W krajach uprzemysłowionych zgony z powodu biegunki zdarzają się rzadko. W Stanach Zjednoczonych z powodu biegunki umiera rocznie ok. 300-400 dzieci <sup>29, 30</sup>. Jednak infekcje przewodu pokarmowego, a w szczególności zakażenia rotawirusowe są częstym powodem hospitalizacji <sup>2,3,31</sup>. W Stanach Zjednoczonych w grupie dzieci do 5-go roku życia notuje się około 25 milionów incydentów biegunkowych rocznie. 200 tysięcy dzieci wymaga hospitalizacji, co stanowi 4% wszystkich hospitalizacji w tej grupie wiekowej (przeciętny koszt 2307 US\$) oraz jest przyczyną 2 % wizyt ambulatoryjnych <sup>3</sup>.

Głównym czynnikiem etiologicznym biegunki w krajach rozwijających się oraz w krajach uprzemysłowionych są rotawirusy, które każdego roku na świecie powodują około 111 milionów łagodnych zachorowań, które nie wymagają pomocy medycznej, 25 milionów zachorowań będących przyczyną wizyt lekarskich, 2 miliony zachorowań wymagających hospitalizacji oraz od 352 do 592 tysięcy zgonów w grupie dzieci do 5-go roku życia <sup>2</sup>. To znaczy, że 1 dziecko spośród 5 które zachorowały wymagało wizyty u lekarza, 1 na 65 wymagało hospitalizacji, a 1 na 293 zmarło. Każdego dnia z powodu biegunki rotawirusowej umiera ok. 1200 dzieci <sup>2</sup>. Szacuje się, że 82% zgonów ma miejsce w krajach o niskim statusie ekonomicznym, gdzie dochód narodowy na mieszkańca nie przekracza 756 US\$ <sup>2</sup>.

Także badania przeprowadzone w Polsce wykazały, że rotawirusy są częstą przyczyną biegunki w grupie dzieci do 5-go roku życia oraz że zakażenia rotawirusowe są częstą przyczyną hospitalizacji <sup>21,22</sup>. Podobnie jak w innych krajach uprzemysłowionych stanowi to duże obciążenie budżetu służby zdrowia. Wprawdzie koszt hospitalizacji w Polsce jest znacznie mniejszy niż w USA i wynosi 150\$ vs 2307\$, ale czas trwania hospitalizacji z powodu infekcji rotawirusowej jest znacznie dłuższy niż w innych krajach <sup>3,21,22,32</sup>. W 1996 roku częstość hospitalizacji w Polsce z powodu infekcji rotawirusowej wynosiła 3,1 na 1000 dzieci poniżej 5-go roku życia oraz 5,2 na 1000 dzieci poniżej 2-go roku życia <sup>22</sup>. W kolejnych latach obserwowano tendencję wzrastającą. W grupie dzieci do 5-go roku życia częstość hospitalizacji wynosiła odpowiednio (na 1000 dzieci) w sezonie 1997/1998 - 9,1

w sezonie 1998/1999 – 8,2 a w sezonie 1999/2000 – 12,25. Wskaźnik ten był wyższy w grupie dzieci poniżej 2-go roku życia i w poszczególnych sezonach wynosił odpowiednio – 17,3 ; 19,4; 22,4<sup>21</sup>.

Pomimo tego, że zmniejsza się liczba zgonów w grupie dzieci do 5-go roku życia, to według prognoz WHO w 2025 roku w krajach rozwijających się umrze około 5 milionów dzieci, a biegunka będzie nadal jedną z głównych przyczyn śmiertelności w tej grupie wiekowej<sup>25</sup>.

## 2.5. Leczenie biegunki

Biegunka towarzyszyła ludzkości od zarania dziejów i fakt ten zmuszał ludzi zajmujących się leczeniem we wszystkich epokach do podejmowania prób terapii. Biorąc pod uwagę liczbę i rozmiar epidemii chorób biegunkowych (cholera, dur brzuszny, dyzenteria) mieli oni duże możliwości eksperymentowania, rozwijania i praktykowania metod leczniczych. Leczenie biegunki przebiegało dwutorowo. Jednym elementem leczniczym była szeroko pojęta farmakoterapia, a drugim dieta stosowana przez pacjenta w czasie choroby.

Jednymi z głównych leków stosowanych w leczeniu biegunki były zioła, które do XIX wieku były powszechnie używane i stanowiły podstawowy surowiec leczniczy. W publikowanych współcześnie poradnikach i artykułach dotyczących fitoterapii znajduje się również wiele informacji na temat zastosowania ziół w leczeniu biegunki<sup>33,34</sup>.

Aktualnie do roślin o działaniu przeciwbiegunkowym zalicza się: pokrzyk wilczą jagodę (*Atropa belladonna*), lulek czarny (*Hyoscyamus niger*) i bieleń dziędzierzawy (*Datura stramonium*) – zawierające atropinę i hioscynę – alkaloidy zmniejszające napięcie mięśni gładkich i hamujące ruchy perystaltyczne układu pokarmowego. W bulwach rzodkwi czarnej (*Raphanus sativus*), maliny właściwej (*Rubus idaeus*), poziomki pospolitej (*Fragaria vesca*), bzu czarnego (*Sambucus nigra*), berberysu zwyczajnego (*Berberis vulgaris*), głogu dwuszyjkowego (*Crataegus oxyacantha*) i śliwy tarniny (*Prunus spinosa*) znajdują się pektyny, które mają zdolność żelowania i przypisuje się im właściwości przeciwbakteryjne, absorpcyjne i przeciwbiegunkowe.

Kolejna grupa roślin to zioła bogate w śluzy, które pokrywają mechanicznie powierzchnię błony śluzowej przewodu pokarmowego, izolując ją od bodźców

drażniących a także hamują wydzielanie soków trawiennych i ruchy robaczkowe jelit. Do tej grupy należą min.: korzeń i liść prawoślazu lekarskiego (*Althaea officinalis*), nasienie lnu zwyczajnego (*Linum usitatissimum*), liść podbiału pospolitego (*Tussilago farfara*) oraz nasienie kozieradki pospolitej (*Trigonella foenum graecum*). Właściwości ściągające przypisuje się roślinom zawierającym garbniki i kwasy fenolowe, substancje które strącając białko, dają połączenia nierozpuszczalne w wodzie i w ten sposób na powierzchni błony śluzowej powodują powstanie warstwy zdenaturowanych białek, która hamuje dalsze drażnienie, odczyn zapalny i powstrzymują powstawanie wysięku. Do surowców roślinnych o silnym działaniu ściągającym należą: kłaczce pięciornika gęsiego (*Potentilla anserina*) i pięciornika kurze ziele (*Potentilla erecta*), ziele cząbrzu ogrodowego (*Satureia hortensi*), kłaczce rdestu wężownika (*Polygonum bistorta*), owoc i liść borówki czernicy (*Vaccinium myrtillus*), kora dębu szypułkowego (*Quercus robur*) i dębianki – *Galla*, ziele rzepiku pospolitego (*Agrimonia eupatoria*) i ziele przywrotnika pospolitego (*Alchemilla vulgaris*)<sup>34</sup>.

Obecnie obfity arsenał potencjalnych leków poszedł w zapomnienie. Współczesna medycyna z jednej strony wykorzystuje surowce roślinne do produkcji leków, z drugiej jednak strony dotychczas opublikowano tylko jedno prawidłowo przeprowadzone badanie kliniczne oceniające skuteczność korzenia pięciornika kurze ziele (*Potentilla tormentilla*) w leczeniu biegunki rotawirusowej<sup>35</sup>.

Jednym z największych wyzwań dla lekarzy w XIX wieku były liczne epidemie cholery, która do 1817 roku była rzadką chorobą występującą głównie w Indiach. W 1817 roku rozpoczęła się pierwsza pandemia choroby, która trwała do 1823 roku i objęła kraje południowo-wschodniej Azji, Japonię, Chiny, a także poprzez Rosję dotarła do Europy. Druga pandemia w 1831 roku objęła swym zasięgiem również Polskę<sup>36</sup>.

Pomysłowość i zaangażowanie lekarzy w leczeniu chorych w trakcie epidemii cholery było bardzo duże. Doktor F.V. Raspail w książce „Lekarz domowy i domowa apteka” wydanej w 1850 roku w Warszawie<sup>37</sup> zalecał chorym aromatyczne pokarmy (z czosnkiem, pieprzem i imbirem), nacieranie się alkoholem kamforowym i końską wodą, okłady na brzuch zmieniane co 15 minut, lewatywy z tytoniu, połykanie kamfory popijanej wodą smołową co 3 godziny oraz częste płukanie gardła słoną wodą<sup>37</sup>. Trudno sobie dziś wyobrazić skuteczność tak intensywnej i męczącej terapii.

Cholera nie stanowi aktualnie problemu w krajach rozwiniętych, ale to jej epidemie były motorem postępu medycyny. Przyczyniły się do poprawy warunków sanitarnych w krajach rozwiniętych oraz do odkrycia znaczenia nawadniania doustnego w leczeniu biegunki. W 1831 roku po raz pierwszy opisano próby leczenia odwodnienia w następstwie biegunki. O'Shaughnessy<sup>38</sup>, a potem Latta<sup>39</sup> opisali w „The Lancet” terapię odwodnienia w przebiegu cholery, którą opracowali w oparciu o analizę surowicy i stolca chorych. W pierwszej połowie XX wieku upowszechnienie nawadniania parenteralnego przyczyniło się do zmniejszenia śmiertelności z powodu cholery z 70% do 40%<sup>26,40</sup>. W latach 40. XX wieku opracowano doustne płyny nawadniające i odkryto, że uzupełnianie potasu zmniejsza umieralność prowadząc do istotnego zmniejszenia liczby zgonów<sup>26,40,41</sup>. W latach 60. i 70. wykazano skuteczność doustnych płynów nawadniających u chorych na cholere oraz zastosowano tę metodę w czasie epidemii w Bangladeszu<sup>26,40,41</sup>. Uzyskane wówczas wyniki – obniżenie śmiertelności z powodu biegunki w przebiegu cholery z 30 % do 3,6% - przyczyniły się do opracowania przez WHO pierwszych wytycznych nawadniania doustnego i produkcji standardowych płynów do nawadniania doustnego<sup>26,40</sup>.

Wprowadzenie do powszechnego leczenia doustnego płynu nawadniającego oraz opisanie procesów fizjologicznych leżących u podstawy jego skuteczności jest określane jako jedno z największych odkryć medycznych XX wieku. Na równi ze szczepieniami i poprawą warunków sanitarnych jest uważane za czynnik, który znacząco zmniejszył śmiertelność dzieci na świecie<sup>40,41</sup>.

Drugim czynnikiem, który odgrywa istotną rolę w leczeniu biegunki jest dieta w czasie choroby. W starożytności szczególną wagę przykładano do właściwego żywienia w chorobach, jako jednego z głównych elementów leczniczych. Na przełomie setek lat zalecenia lecznicze nie zmieniały się, a niektóre przetrwały aż do dziś<sup>42</sup>. Ponad 3000 lat temu indyjski lekarz Sushruta stosował ryż, sok z kokosów oraz marchwiankę w leczeniu cholery<sup>41</sup>. Hipokrates żyjący w latach 460 – 370 przed naszą erą, zalecał znaczne ograniczenia w przyjmowaniu pokarmów – zrezygnowanie z obiadu oraz ograniczenie kolacji do 1/3 porcji a także znaczne restrykcje płynowe, po to aby ochłodzić i osuszyć pacjenta z choroby, która była według ówczesnego pojmowania istoty choroby, gorąca i mokra. W powszechnym użyciu były wówczas również środki przeciwwymiotne, lewatywy, upusty krwi i masaże<sup>42</sup>.



Za „ojca” propagowanej współcześnie szybkiej doustnej rehydratacji można uznać Erasistratusa lekarza z Aleksandrii, żyjącego około 250 roku przed naszą erą, który w trakcie biegunki zalecał mieszaninę wody z odrobiną wina, każdorazowo po wymiotach i wypróżnieniach <sup>42</sup>. Aktualnie zmieniono jedynie skład podawanego płynu.

W ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat dokonał się olbrzymi postęp medycyny, opisano wiele potencjalnie skutecznych leków. W ostatnich latach, w związku z nowym spojrzeniem na medycynę przez pryzmat metodologii EBM, rzetelność, wiarygodność i skuteczność różnych metod leczniczych została zakwestionowana.

Według aktualnych wytycznych Amerykańskiej Akademii Pediatrii <sup>43</sup>, Europejskiego Towarzystwa Gastroenterologii, Hepatologii i Żywienia Dzieci (ESPGHAN)<sup>44</sup> oraz Sekcji ds. Ostrej Biegunki Polskiego Towarzystwa Gastroenterologii, Hepatologii i Żywienia Dzieci (PTGHŻD)<sup>13</sup> leczenie ostrej biegunki powinno polegać przede wszystkim na nawadnianiu za pomocą doustnego płynu nawadniającego, a w cięższych przypadkach na nawadnianiu dożylnym oraz na wczesnej realimentacji. Upowszechnienie zasad nawadniania doustnego, mającego na celu skorygowanie zaburzeń i utrzymanie równowagi wodno-elektrolitowej w ostrej fazie biegunki, spowodowało wprawdzie zmniejszenie śmiertelności, ale ma niewielki wpływ na czas trwania choroby i liczbę biegunkowych stolców. Często niepokoi to pacjentów oraz lekarzy i bywa interpretowane jako niepowodzenie tej formy terapii biegunki <sup>45</sup>.

Niekiedy, w przypadku biegunki bakteryjnej korzystne może być leczenie przeciwbakteryjne, jednak wskazania do swobodnego leczenia zakażeń przewodu pokarmowego są bardzo ograniczone <sup>13,26,45,46</sup>.

Aktualnie zaleca się, aby leki przeciwbakteryjne w trakcie ostrej biegunki podawać jedynie w sytuacjach wyjątkowych, do których należą<sup>13,15,45</sup>:

1. Empiryczna antybiotykoterapia biegunki przebiegającej z gorączką  $> 38^{\circ}\text{C}$  i co najmniej jednym z takich objawów jak świeża krew w stolcu, duża liczba leukocytów lub laktoferyny w stolcu.
2. Empiryczna antybiotykoterapia umiarkowanej lub ciężkiej biegunki podróżnych – leki przeciwbakteryjne mogą skrócić czas jej trwania z 3-5 do 1-2 dni.
3. Potwierdzona czerwotka bakteryjna (*Shigella*) lub cholera (*Vibrio*).
4. Ciężka salmonelloza przebiegająca z wysoką gorączką i innymi objawami ogólnymi.
5. Salmonelloza bez względu na przebieg u chorych z grup zwiększonego ryzyka uogólnionego zakażenia: wiek  $< 6$ .mż. lub  $> 65$  r.ż., niedobory odporności, immunosupresja, sztuczne zastawki serca, nieswoiste zapalenia jelit, niedokrwistość sierpowatokrwinkowa, mocznica, niedożywienie znacznego stopnia, hipoproteinemia.
6. Biegunka wywołana przez pałeczki *Yersinia* u chorych z grup zwiększonego ryzyka uogólnionego zakażenia: wiek  $< 3$ .mż., niedobory odporności, zespół przeładowania żelazem, hemochromatoza w przebiegu marskości wątroby, choroba nowotworowa, długotrwałe leczenie preparatami żelaza chorych przewlekle dializowanych, leczenie desferoksaminą.

Wspomnieć należy jeszcze leki będące w powszechnym użyciu w leczeniu biegunek zarówno u dzieci jak i dorosłych. Eksperci uważają<sup>26,45</sup>, że pomimo tego, że istnieją dowody naukowe wskazujące na większą skuteczność w porównaniu z placebo adsorbentów kaolinowo-pektynowych (smektyn dwuoktanościenny)<sup>47,48</sup> oraz inhibitora enkefalinazy (racekadotril)<sup>49,50</sup> to w chwili obecnej nie zaleca się ich rutynowego stosowania. Bezwzględnie przeciwwskazane w leczeniu ostrej biegunki u dzieci jest stosowanie, często używanych przez dorosłych leków hamujących

perystaltykę jelit (loperamid), gdyż opisano przypadki zgonów jako powikłanie stosowania tej grupy leków<sup>26,51</sup>.

Duże zainteresowanie badaczy budzi zastosowanie cynku w leczeniu i zapobieganiu ostrej biegunki u dzieci. Opublikowano wiele prac potwierdzających jego skuteczność<sup>52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62</sup>. Jednak trzeba podkreślić, że wszystkie cytowane powyżej badania zostały przeprowadzone w krajach rozwijających się. Aktualnie brakuje informacji na temat znaczenia suplementacji cynku w leczeniu ostrej biegunki u dzieci w krajach uprzemysłowionych.

Autorzy jednego z ostatnio opublikowanych przeglądów sposobów leczenia biegunki u dzieci podkreślają, że poleganie na środkach farmakologicznych odwraca uwagę od właściwego leczenia płynami, elektrolitami i żywieniem, może też powodować zdarzenia niepożądane i zwiększać koszty leczenia. Ponieważ ostra biegunka jest częstą chorobą, przed zaleceniem rutynowego stosowania środków farmakologicznych należy przeprowadzić bilans korzyści i strat<sup>26</sup>.

## 2.6. Probiotyki

Bakterie probiotyczne towarzyszą człowiekowi równie długo jak biegunka.

W ostatnich latach budzą ogromne zainteresowanie badaczy. Wyniki wielu opublikowanych badań klinicznych i przeglądów piśmiennictwa sugerują, że mogą one mieć korzystny wpływ na przebieg ostrej biegunki a także na inne choroby przewodu pokarmowego<sup>4,5,6,7,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74</sup>.

### 2.6.1. Historia probiotyków

Pomimo, że bakterie kwasu mlekowego zostały odkryte i opisane dopiero w drugiej połowie XIX wieku przez Ludwika Pasteura, to ich stosowanie było zjawiskiem powszechnym już w medycynie starożytnej<sup>75</sup>. Schrezenmeier podaje, że w perskiej wersji Starego Testamentu, w Księdze Rodzaju (18,8) jest informacja, że długowieczność Abrahama, jest związana ze spożywaniem kwaśnego mleka. Jednak nie tylko perska wersja Starego Testamentu zawiera taką informację<sup>75</sup>. W słowniku biblijnym<sup>76</sup> i komentarzu do Starego Testamentu<sup>77</sup> znajduje się wyjaśnienie, że hebrajskie słowo חַמְצָה, jest tłumaczone na język angielski jako *curd* (modern leben) i oznacza kwaśne mleko. Pewną nadinterpretacją w komentarzu Schrezenmeiera jest dopatrywanie się w cytowanym powyżej fragmencie biblijnym wpływu kwaśnego mleka na długowieczność Abrahama. Można jedynie stwierdzić, że podanie odwiedzającym kwaśnego mleka było przejawem gościnności i że fermentowane produkty mleczne były wówczas w powszechnym użyciu.

Rzymski historyk Pliniusz w 76 roku p.n.e. zalecał produkty fermentowanego mleka w leczeniu chorób przewodu pokarmowego<sup>75</sup>. Przed rozwojem ery mikrobiologii pojawiły się informacje w prasie medycznej o potencjalnie prozdrowotnych właściwościach bakterii fermentujących, publikowane przez Carre w 1887 roku<sup>78</sup> i Tissiera w 1906 roku<sup>79</sup>. Również Pasteur, któremu zawdzięczamy początki współczesnej bakteriologii, prowadził badania nad zjawiskiem probiozy. W 1877 roku opublikował wraz z Joubertem wyniki badań, które dotyczyły eliminacji chorobotwórczych gatunków bakterii (m.in. laseczek wąglika) przez pospolite pałeczki jelitowe<sup>36</sup>. Jednak za ojca współczesnej bakterioterapii jest uznawany laureat Nagrody

Nobla, rosyjski uczony Elias Miecznikow. W 1907 roku zaproponował on leczenie polegające na „okresowej wymianie flory jelitowej”. Taki sposób postępowania miał, według jego koncepcji, eliminować nagromadzone w przewodzie pokarmowym produkty metabolizmu bakterii, a także miał hamować proces starzenia się organizmu ludzkiego<sup>80</sup>. Za idealne do zrealizowania swojego założenia uznał Miecznikow bakterie wyizolowane w Instytucie Pasteura z jogurtu bułgarskiego, które nazwał „pałeczkami bułgarskimi”. Współcześnie bywają one niekiedy błędnie utożsamiane ze szczepami używanymi do produkcji jogurtu – *Lactobacillus bulgaricus* lub *Lactobacillus delbureckii subsp. bulgaricus*, choć w rzeczywistości są aktualnie opisywane jako *Lactobacillus helveticus*<sup>81</sup>.

W ślad za Miecznikowem poszli kolejni naukowcy. Mikrobiolog A. Nissle w 1916 roku opisał szczep *Escherichia coli*, który zastosował w leczeniu czerwonki, duru brzuszego i zaparc<sup>82</sup>. W 1921 roku Rettgerer<sup>83</sup>, a w 1926 roku Kopeloff<sup>84</sup> opublikowali wyniki badań, pokazujące, że szczepy *Lactobacillus acidophilus* mogą przeżyć w przewodzie pokarmowym człowieka. Właściwości tych nie wykazywały wówczas opisywane wcześniej przez Miecznikowa „pałeczki bułgarskie”<sup>75</sup>. W kolejnych latach w badaniach na modelach zwierzęcych wykazano znaczenie flory jelitowej jako czynnika chroniącego przed zakażeniem. Bohnhoff (1954)<sup>85</sup>, Frerer (1954, 1956)<sup>86,87</sup> oraz Collins i Carter (1978) wykazali, że podawanie zwierzętom antybiotyków zwiększa ich podatność na infekcje powodowane *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* i *Vibrio cholerae*. *Salmonella enteritidis* w ilości 10<sup>1</sup> powodowała śmierć świnek morskich germ-free, podczas gdy skolonizowane zwierzęta ginęły dopiero po podaniu bakterii w ilości 10<sup>(9)</sup><sup>88</sup>.

### 2.6.2. Definicja probiotyków

W 1965 roku skończyła się historia bakterii fermentujących, a zaczęła historia probiotyków, ponieważ termin ten pojawił się w literaturze po raz pierwszy. Lilly i Stillwell w „Nature” użyli go dla opisanego „substancji wydzielanych przez jedne organizmy, które stymulowały wzrost innych”. Zaczepnięty z języka greckiego termin probiotyki został użyty jako przeciwieństwo do terminu antybiotyki<sup>89</sup>.

W kolejnych latach definicja probiotyków zmieniała się wielokrotnie. W 1971 roku Sperti opisał, że są to ekstrakty tkanek, które stymulują wzrost

mikroorganizmów <sup>90</sup>. W 1974 roku Parker po raz pierwszy wprowadził definicję, w której określił istotę działania probiotyków. Opisał probiotyki jako organizmy i substancje które wpływają na równowagę mikroflory jelitowej <sup>91</sup>. Takie rozumienie probiotyków zostało zawarte we wszystkich kolejnych definicjach. W 1989 roku Fuller rozbudował definicję Parkera – i opisał probiotyki jako „żywe mikroorganizmy obecne w pożywieniu, które wywierają korzystne działanie na ustrój gospodarza poprzez poprawę równowagi mikroflory jelitowej” <sup>92</sup>. Również kolejne definicje były rozbudowaniem poprzednich wersji. W 1992 roku Havenaar definiuje probiotyki jako „żywe pojedyncze, lub mieszane kultury mikroorganizmów, które podane zwierzętom lub ludziom korzystnie wpływają na gospodarza poprzez poprawę właściwości miejscowej mikroflory” <sup>93</sup>. W kolejnych modyfikacjach Salminen i Schaafsma (1996) proponują, aby nie ograniczać probiotyków jedynie do poprawy właściwości miejscowej mikroflory ale podkreślają ich korzystny wpływ na zdrowie i odżywienie gospodarza <sup>94,95</sup>. Aktualnie najczęściej cytowaną jest definicja opublikowana przez Schrezenmeier i de Vrese w 2001 roku opisująca probiotyki zawarte w preparatach lub produktach jako wystarczającą ilość żywych, ściśle zdefiniowanych drobnoustrojów, które wpływają (przez implantację lub kolonizację) na mikroflorę określonego obszaru organizmu gospodarza i dzięki temu wywierają korzystny efekt zdrowotny <sup>75</sup>. Jednak, w związku z opublikowanymi pracami <sup>96,97,98</sup> pojawiły się sugestie, że definicja ta może ulec zmianie w związku z tym że efekt probiotyczny wywierają również zabite bakterie, a nawet samo DNA wyizolowane z bakterii <sup>99</sup>.

### 2.6.3. Właściwości probiotyków

Do grupy drobnoustrojów probiotycznych należą pałeczki produkujące kwas mlekowy z rodzaju *Lactobacillus*: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii subsp.bulgaricus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus* i *Bifidobacterium*: *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*. Do grupy drobnoustrojów probiotycznych są również zaliczane inne bakterie: *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* (wywołujący duże kontrowersje w opinii badaczy ze względu na potencjalną możliwość przenoszenia plazmidów oporności), *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Bacillus cereus*,

*Clostridium butyricum*, *Escherichia coli* oraz drożdżaki *Saccharomyces boulardi* i *Saccharomyces cerevisiae*<sup>99,100,101</sup>.

Uważa się, że idealny probiotyk powinien cechować następujące właściwości<sup>81,102,103,104</sup>:

1. Ludzkie pochodzenie.
2. Oporność na działanie kwasu solnego i żółci.
3. Zdolność do adhezji do komórek nabłonkowych jelita człowieka.
4. Zdolność do kolonizacji przewodu pokarmowego.
5. Zdolność do produkcji substancji przeciwdrobnoustrojowych.
6. Dobre właściwości wzrostowe.
7. Korzystne oddziaływanie na zdrowie człowieka.
8. Bezpieczeństwo stosowania.

Mechanizm działania probiotyków nie jest dokładnie poznany. Udokumentowano wpływ probiotyków na przebieg różnych jednostek chorobowych jak infekcje przewodu pokarmowego, alergia czy nieswoiste zapalenia jelit. Wielu autorów uważa, że potwierdzona skuteczność kliniczna dla różnych gatunków bakterii probiotycznych jest związana z kilkoma różnymi mechanizmami działania<sup>64,65,105,106</sup>. Zakłada się dwa główne sposoby działania probiotyków: pierwszy – bezpośredni, który jest związany z modyfikacją endogennego ekosystemu przewodu pokarmowego oraz drugi – pośredni, który jest związany z modyfikacją odpowiedzi immunologicznej przez bakterie probiotyczne poprzez interakcję z układem immunologicznym błon śluzowych (GALT)<sup>105,107,108</sup>.

Aktualnie są brane pod uwagę i dyskutowane następujące mechanizmy działania bakterii probiotycznych<sup>99,105,108,109</sup>:

1. Konkurencja o receptor lub przyleganie do komórek nabłonkowych uniemożliwiający dostęp patogenów do nabłonka jelitowego (*Lactobacillus rhamnosus* GG i *Lactobacillus plantarum* 299v kompetencyjnie blokują przyleganie *Escherichia coli* O157 H7 do komórek linii HT-29<sup>110</sup>).

2. Wytwarzanie związków o działaniu przeciwdrobnoustrojowym (*Lactobacillus rhamnosus* GG wytwarza min. nadtlenek wodoru i kwas piroglutaminowy, które hamują wzrost bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych <sup>111</sup>).
3. Współzawodnictwo z innymi mikroorganizmami o składniki odżywcze (zużywanie cukrów prostych przez drobnoustroje probiotyczne hamuje wzrost *Clostridium difficile*) <sup>112</sup>.
4. Zakwaszanie treści jelitowej hamujące wzrost niektórych bakterii chorobotwórczych <sup>113</sup>.
5. Modyfikacja receptorów dla toksyn bakteryjnych na drodze enzymatycznej (np. *Saccharomyces boulardii* ma receptor dla toksyny A *Clostridium difficile*) <sup>114,115</sup>.
6. Modulacja odpowiedzi odpornościowej komórkowej i humoralnej <sup>107</sup>, poprzez aktywację limfocytów <sup>116</sup>, stymulowanie fagocytozy <sup>117</sup>, pobudzanie syntezy przeciwciał (sIgA, IgG) oraz produkcję cytokin INF-gamma <sup>118</sup> i Il-10 <sup>119</sup>. Podkreśla się ochronne działanie wydzielniczych przeciwciał IgA, które są odporne na proteolizę w świetle jelita oraz nie indukują układu dopełniacza ani odpowiedzi zapalnej, przez co wydają się być idealnym czynnikiem ochronnym błony śluzowej jelita <sup>120</sup>.
7. Zwiększona sekrecja mucyn (glikoprotein, które mają działanie ochronne w zakażeniach jelitowych) w wyniku stymulowania ekspresji mRNA MUC2 i MUC3 (*Lactobacillus rhamnosus* GG oraz *Lactobacillus plantarum* 299v) <sup>121</sup>.

Należy jeszcze raz podkreślić, że opisane powyżej koncepcje dotyczące potencjalnych mechanizmów działania probiotyków sformułowano głównie na podstawie badań *in vitro* i na zwierzętach, jednak nie zostały one jak dotychczas potwierdzone w badaniach klinicznych przeprowadzonych u ludzi.



#### 2.6.4. Bakterie probiotyczne jako składnik flory przewodu pokarmowego

Kolonizacja przewodu pokarmowego.

Bakterie zasiedlające przewód pokarmowy są określane mianem flory lub flory jelitowej. Termin mikroflora znaczy dosłownie „małe rośliny”. Ponieważ bakterie, wirusy, grzyby i pierwotniaki są taksonomicznie różne od roślin, niektórzy autorzy sugerują zmianę tej nazwy. Proponują zastąpienie jej terminem mikrobiota, co dosłownie znaczyłoby „małe życia” i pozostałoby w logicznym związku z poprzednią nazwą<sup>122</sup>.

Bezpośrednio po porodzie zaczyna się proces kolonizacji, jałowego wcześniej, przewodu pokarmowego przez bakterie z klasy fakultatywnych beztlenowców i bezwzględnych beztlenowców. Pierwsze bakterie kolonizujące przewód pokarmowy u dzieci urodzonych siłami natury pochodzą z kanału rodniego i należą do rodzaju *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Peptostreptococcus* i *Peptococcus*<sup>122</sup>. Po ukończeniu drugiej doby życia beztlenowce są głównymi bakteriami znajdowanymi w próbkach kału<sup>122</sup>. Najprawdopodobniej wynika to z faktu, że fakultatywne beztlenowce zmniejszając potencjał redukcyjny w jelicie stwarzają środowisko korzystne dla rozwoju bezwzględnych beztlenowców. Po porodach zakończonych cesarskim cięciem kolonizację rozpoczynają bakterie z otoczenia, fakultatywne beztlenowce, głównie *Enterobacteriaceae*, *Coliformis* i *Lactobacillus*. Opisywano opóźnioną w stosunku do dzieci urodzonych siłami natury kolonizację przez *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* oraz istotnie mniej liczną kolonizację przez *Bacteroides fragilis*<sup>123,124</sup>. Jednak według innych autorów dalsza kolonizacja przebiega w podobny sposób, jak u dzieci urodzonych siłami natury, a kierunek dalszych zmian składu i aktywności flory bakteryjnej jest zależny od diety dziecka<sup>125,126</sup>. U dzieci karmionych wyłącznie piersią dominują *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*, natomiast u dzieci karmionych sztucznie występują częściej *Bacteroides*, *Clostridium* i *Enterobacteriaceae*<sup>125,126,127,128</sup>.

W trakcie kolonizacji, na poszczególnych piętrach przewodu pokarmowego widoczna jest dysproporcja w odniesieniu do liczby i gatunków bakterii<sup>122</sup>. W żołądku i dwunastnicy, ze względu na niskie pH i szybki pasaż znajduje się najmniej bakterii –  $10^3$ - $10^4$  CFU/g treści (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bacteroides*). W górnej części jelita cienkiego przeważają *Lactobacillus*, *Streptococcus* i *Bacteroides* –  $10^5$ - $10^7$  CFU/g, natomiast w dystalnej części jelita cienkiego występuje

zróżnicowana flora bakteryjna: *Bacteroides*, *Clostridium*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Veillonella* w ilości  $10^8$  CFU/g. Obecność *Lactobacillus* w tej części przewodu pokarmowego jest związana z ich zdolnością adhezji do komórek nabłonkowych. Największa ich ilość –  $10^{10}$ - $10^{11}$  CFU/g – znajduje się w świetle jelita grubego. Czynniki predysponującymi do kolonizacji tej okolicy jest wolny pasaż jelitowy, niski potencjał redukcyjny oraz duża zawartość krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA) <sup>122,129</sup>. Ponad 90% bakterii kolonizujących przewód pokarmowy stanowią bezwzględne beztlenowce <sup>129,130</sup>. Głównymi składnikami ekosystemu są: *Bacteroides*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium*, *Ruminococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* i *Veillonella* <sup>122,130</sup>.

Rozwój flory jelitowej przebiega w czterech fazach wg Cooperstocka i Zedda <sup>131</sup>.

*Faza I* - związana z rozpoczęciem kolonizacji trwa około dwóch tygodni.

*Faza II* - obejmuje okres wyłącznego karmienia piersią.

*Faza III* - zaczyna się w momencie rozszerzania diety dziecka karmionego piersią, a kończy całkowitym odstawieniem od piersi.

*Faza IV* - flora dziecka upodabnia się do flory przewodu pokarmowego dorosłego.

W efekcie tego procesu w przewodzie pokarmowym znajduje się powyżej  $10^{11}$  komórek bakteryjnych/g treści jelitowej co najmniej 400 różnych gatunków bakterii, które tworzą stabilny ekosystem <sup>125,129</sup>. Inni autorzy uważają, że w świetle przewodu pokarmowego znajduje się nawet do 500 gatunków bakterii <sup>122</sup>. U ludzi dorosłych bakterie stanowią 35-50% objętości treści jelitowej. Mikroflora przewodu pokarmowego ma znaczący wpływ na organizm gospodarza poprzez stworzenie funkcjonalnej bariery jelitowej <sup>65</sup>. Szczególnie wyraźnie pokazuje to eksperyment porównujący parametry biochemiczne, fizjologiczne i immunologiczne pomiędzy zwierzętami hodowanymi w warunkach sterylnych (germ-free) i zwierzętami posiadającymi florę w przewodzie pokarmowym <sup>132</sup>. Aktywność metaboliczna flory przewodu pokarmowego jest porównywana z aktywnością metaboliczną wątroby, najbardziej aktywnego metabolicznie narządu człowieka <sup>122,133</sup>.

W większości badań opisujących kolonizację przewodu pokarmowego informacje na temat składu mikroflory jelitowej były uzyskiwane z posiewów kału. W ostatnich latach, w związku z rozwojem diagnostyki molekularnej, pojawiło się kilka prac badających różnice między mikroflorą błony śluzowej jelita a mikroflorą znajdującą się w świetle przewodu pokarmowego<sup>134,135,136</sup>. Wykazano dysproporcje zarówno w stosunku do *Bifidobacterium* – czterokrotnie większą liczbę bakterii stwierdzono w świetle przewodu pokarmowego w stosunku do liczby bakterii w błonie śluzowej jelita oraz w stosunku do *Lactobacillus* – które były równomiernie rozmieszczone w błonie śluzowej jelita w różnych jego odcinkach i istotnie nierównomiernie w świetle przewodu pokarmowego<sup>134,136</sup>. Cytowani powyżej autorzy sugerują, że dopiero poznanie mikroflory błony śluzowej jelit umożliwi dokładniejsze zrozumienie wpływu flory fizjologicznej a także bakterii probiotycznych na organizm człowieka.

## **2.7. Wyniki badań klinicznych dotyczących stosowania probiotyków w leczeniu biegunki u dzieci.**

W badaniach eksperymentalnych i artykułach poglądowych opisano korzystny wpływ bakterii probiotycznych na układ immunologiczny i funkcjonowanie bariery jelitowej, na mikroflorę przewodu pokarmowego oraz antagonistyczne działanie wobec patogenów jelitowych *in vitro*<sup>65,97,100,107,118,137, 138,139</sup>. Również wyniki opublikowanych badań klinicznych wskazują na to, że stosowanie probiotyków może mieć korzystny wpływ na przebieg ostrej biegunki u dzieci. Rzetelną ocenę skuteczności probiotyków w leczeniu ostrej biegunki umożliwiają narzędzia, którymi posługuje się Evidence Based Medicine.

Opublikowano dotychczas cztery metaanalizy oceniające skuteczność stosowania probiotyków w leczeniu ostrej biegunki u dzieci<sup>4,5,6,7</sup>. Pomimo różniącej się metodologii zastosowanej w przytoczonych pracach zwraca uwagę fakt, że spośród badań opublikowanych od roku 1966 tylko nieliczne zostały zaplanowane i przeprowadzone w sposób umożliwiający wiarygodną ocenę interwencji. W metaanalizie przeprowadzonej przez Szajewską i Mrukowicza<sup>6</sup> analizowano 10 badań, w metaanalizie van Niela i wsp.<sup>7</sup> 9 z 26, w metaanalizie Huang i wsp.<sup>5</sup> 18 z 29, a w ostatniej z opublikowanych przez Allen i wsp.<sup>4</sup> 23 z 64 prac wstępnie zakwalifikowanych do oceny.

Autorzy wszystkich metaanaliz podkreślają dużą heterogenność analizowanych badań. Heterogenność dotyczyła zastosowany szczepów probiotycznych w trakcie interwencji: *Lactobacillus bulgaricus* i *Streptococcus thermophilus*<sup>140</sup>, *Lactobacillus acidophilus* LB<sup>141,142</sup>, *Enterococcus* LAB SF68<sup>143,144,145</sup>, *Lactobacillus acidophilus* i *Lactobacillus bifidus*<sup>146</sup>, *Saccharomyces boulardi*<sup>147,148</sup>, *Streptococcus faecium*<sup>149</sup>, *Lactobacillus* GG ATC 53103<sup>150</sup>, *Lactobacillus casei* GG<sup>151,152,153</sup>, *Lactobacillus acidophilus* i *Lactobacillus bifidus*<sup>154</sup>, *Lactobacillus* GG<sup>155,156,157</sup>, *Lactobacillus rhamnosus* 19070-2 i *Lactobacillus reuterii* DSM<sup>158 159</sup>, *Lactobacillus reuterii* SD2112<sup>160,161</sup>, *Lactobacillus casei*<sup>162</sup>.

Dawki probiotyków stosowanych w trakcie interwencji różniły się 1000 – krotnie: od  $10^7$  –  $10^8$  CFU<sup>157</sup> do  $10^{10}$  –  $10^{11}$  CFU<sup>155,156</sup>. Czas podawania leku w trakcie choroby wynosił od 2-ch<sup>155,156</sup> do 10-ciu dni<sup>143,144</sup>. W cytowanych powyżej badaniach stosowano różne definicje biegunki oraz różne definicje punktu końcowego biegunki.

Pomimo tych dysproporcji autorzy podkreślają, że dane uzyskane z przeprowadzonych metaanaliz wskazują na umiarkowane lecz statystycznie znamienne korzyści ze stosowania probiotyków w leczeniu ostrej biegunki u małych dzieci. Probiotyki, a zwłaszcza *Lactobacillus* GG skracając jej czas trwania (od 14 do 26 godzin), a najwyraźniejszy efekt zaobserwowano w biegunce rotawirusowej gdzie średnie skrócenie czasu trwania biegunki wynosi 38,1 godzin (95% CI 8,1 do 68,1)<sup>4</sup>. Wydaje się natomiast, że nie przynoszą one korzyści dzieciom chorującym na biegunkę bakteryjną<sup>4,6</sup>. Wykazano również, że zmniejszają nasilenie biegunki w kolejnych dniach choroby. W grupie otrzymującej probiotyki było średnio o 1,51 stolca mniej w drugiej dobie choroby i o 1,31 mniej w 3 dobie w porównaniu z grupą leczoną placebo<sup>4,6</sup>. A także zmniejszają ryzyko przedłużania się biegunki powyżej 3 dni<sup>4,6</sup>.

## 2.8. Bezpieczeństwo stosowania probiotyków w trakcie leczenia ostrej biegunki.

W opublikowanej przez Allana i wsp. metaanalizie <sup>4</sup> wśród włączonych do analizy 23 badań, w 12 nie odnotowano wystąpienia zdarzeń niepożądanych, w 8 badaniach nie monitorowano występowania zdarzeń niepożądanych, a w 3 badaniach opisano wystąpienie zdarzeń niepożądanych <sup>155,156,157</sup>. Jedynym raportowanym zdarzeniem były wymioty, które występowały rzadziej i trwały krócej w grupie otrzymującej probiotyk w porównaniu z grupą otrzymującą placebo <sup>155,157</sup>. Żaden z autorów raportujących zdarzenia niepożądane nie wiązał ich wystąpienia z podawaniem probiotyków.

## 2.9. Dostępne w Polsce preparaty probiotyczne.

Z dostępnych na naszym rynku probiotyków potwierdzoną skuteczność w leczeniu ostrej biegunki u dzieci posiada preparat Enterol zawierający *Saccharomyces boulardi* <sup>4,6,163</sup> oraz Trilac zawierający *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* i *Lactobacillus bulgaricus*, który w sposób umiarkowany skraca czas trwania ostrej biegunki u dzieci poniżej 4 roku życia <sup>164</sup>. Efekt ten udokumentowano jednak wyłącznie w analizie w grupach wyodrębnionych zgodnie z protokołem.

Dostępne na polskim rynku preparaty probiotyczne przedstawiono w tabeli 2. <sup>165</sup>:

**Tabela 2. Dostępne w Polsce preparaty probiotyczne<sup>165</sup>.**

| <b>Nazwa preparatu i producent</b>            | <b>Forma i skład preparatu</b>  |
|---|---|
| <b>Beneflora</b> (Ortis)                      | proszek   |
| <b>Lacidofil</b><br>(Merc)                    | 1 kapsułka zawiera 100mln pałeczek <i>Lactobacillus acidophilus</i> i 1,9 mld pałeczek <i>Lactobacillus rhamnosus</i>   |
| <b>Lakcid</b><br>(Biomed-Lublin)              | proszek do sporządzania zawiesiny – 1 amp. zawiera 2 mld CFU pałeczek <i>Lactobacillus rhamnosus</i>  |
| <b>Lakcid forte</b><br>(Biomed-Lublin)        | proszek do sporządzania zawiesiny – 1 amp. zawiera 10 mld CFU pałeczek <i>Lactobacillus rhamnosus</i>   |
| <b>Nutrilac</b><br>(Agropharm)                | 1 kapsułka zawiera 100 mln pałeczek <i>Lactobacillus rhamnosus</i>  |
| <b>Nutriplant</b><br>(Agropharm)              | 1 kapsułka zawiera 100 mln pałeczek <i>Lactobacillus plantarum</i>  |
| <b>Trilac</b><br>(Allergon AB)                | 1 kapsułka zawiera 600 mln pałeczek <i>Lactobacillus acidophilus</i> , 400 mln pałeczek <i>Lactobacillus delbrueckii subsp.bulgaricus</i> i 600 mln pałeczek <i>Bifidobacterium bifidum</i> |
| <b>Enterol 250</b><br>(Laboratories Biocodex) | proszek i kapsułki - 250mg preparatu zawiera $5 \times 10^{10}$ żywych, liofilizowanych komórek <i>Saccharomyces boulardi</i>   |

### 3. Charakterystyka badanego preparatu

#### Charakterystyka preparatu Lakcid L

Lakcid L jest preparatem zawierającym trzy szczepy bakteryjne gatunku *Lactobacillus rhamnosus*: 573L/1, 573L/2, 573L/3 zliofilizowane w roztworze odtłuszczonego mleka z sacharozą.

1 fiolka zawiera 12 mld bakterii (  $1,2 \times 10^{10}$  CFU ) trzech szczepów *Lactobacillus rhamnosus* ( 573L/1, 573L/2, 573L/3 ) w stosunku 1:1:1, zliofilizowanych w roztworze mleka z sacharozą.

Szczepy te zostały wyizolowane z kału zdrowego noworodka urodzonego siłami natury przez matkę nie leczoną antybiotykami przez co najmniej 3 miesiące przed porodem. Zostały zidentyfikowane za pomocą metod fenotypowych (zestaw API 50 CHL) i genotypowych za pomocą reakcji PCR ze starterami swoistymi dla gatunku *Lactobacillus rhamnosus* jako *Lactobacillus rhamnosus* i złożone do depozytu Polskiej Kolekcji Drobnoustrojów w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu.

*Lactobacillus rhamnosus* są to powszechnie występujące Gram-dodatnie katalazo-ujemne laseczki, które w preparacie często ułożone są w łańcuszki. Na podłożach wzrostowych rosną w postaci białych, mlecznych kolonii, w szerokim zakresie temperatur. Są względnie beztlenowe i dobrze znoszą niskie pH. Procent par GC w genomie waha się w granicach 45-47.

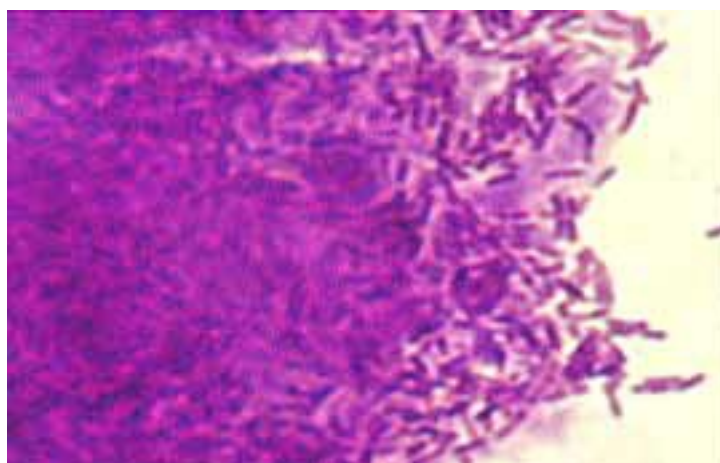
Szczepy znajdujące się w preparacie charakteryzują się typowymi właściwościami probiotycznymi<sup>81,102, 103,104</sup>.

1. Pochodzą ze zdrowej mikroflory ludzkiego organizmu.
2. Posiadają precyzyjnie określony rodzaj i gatunek, potwierdzony badaniami molekularnymi.
3. W badaniach *in vitro* wykazują antagonistyczną aktywność wobec typowych patogenów przewodu pokarmowego, hamującą wzrost bakteryjnych czynników

etiologicznych zakażeń przewodu pokarmowego: *Salmonella*, *Shigella* i *Escherichia coli* (rycina 2). Ponadto są aktywne wobec bakterii beztlenowych powodujących przewlekłe stany zapalne żołądka i jelit - *Helicobacter pylori*. Działają też na ziarenkowce Gram-dodatnie.

Szczepy wykazują zakres oporności na antybiotyki odpowiadającą gatunkowi *Lactobacillus rhamnosus*: wrażliwość na penicylinę, erytromycynę, klindamycynę oraz gatunkowo-swoistą oporność na kotrymoksazol, metronidazol i wankomycynę. Nie zawierają plazmidów mogących przenosić geny oporności na antybiotyki.

4. Posiadają zdefiniowane właściwości powierzchniowe i adherencyjne, potwierdzone za pomocą hodowli tkankowej. Wykazują duże powinowactwo do komórek ustroju ludzkiego dzięki unikalnym właściwościom powierzchniowym opisanym na podstawie badania hydrofobowości bakterii, testu na produkcję śluzu oraz badania adherencji do komórek ustroju ludzkiego.



Rycina 1. Zdjęcie z adherencji szczepu *Lactobacillus rhamnosus* do linii komórkowej HT-29.





Rycina 2. Zahamowanie wzrostu pałeczek *Salmonella* na podłożu przez szczepy *Lactobacillus rhamnosus* 573L/1, 573L/2, 573L/3.

5. Wykazują oporność na sok żołądkowy i sole żółci.

Wszystkie badane szczepy za pomocą metodą Clarka i metody Dashkevich i Feighner wykazywały oporność na działanie soku żołądkowego oraz soli żółci, co świadczy o ich doskonałym przystosowaniu się do niesprzyjających warunków panujących w ludzkim przewodzie pokarmowym.

Przeprowadzone badania *in vitro* potwierdziły właściwości probiotyczne szczepów zawartych w preparacie Lakcid L. Zostały one wykonane zgodnie z obowiązującą i publikowaną w analogicznych analizach metodologią<sup>139,166,167</sup>. Wyniki badań znajdują się u producenta preparatu.

Dla każdego dziecka przygotowano w oddzielnym opakowaniu zestaw 10 ampulek oznaczonych nazwą badania i kodem liczbowym z listy randomizacyjnej. Opakowania zewnętrzne były również oznaczone nazwą badania i kodem liczbowym. Wygląd zestawów zawierających badany lek i placebo był identyczny (rycina 3.). Placebo stanowił nośnik stosowany do zawieszania szczepów *Lactobacillus rhamnosus*.

Ampułki zawierające szczepy *Lactobacillus rhamnosus* oraz ampułki zawierające placebo zostały wyprodukowane przez Wytwórnię Surowic i Szczepionek „Biomed” w Lublinie.



Rycina 3. Zdjęcie przedstawiające preparat przygotowany do potrzeb badania.

#### **4. Cel badania**

Celem badania była ocena skuteczności trzech szczepów *Lactobacillus rhamnosus* 573L/1, 573L/2, 573L/3 w leczeniu ostrej biegunki u dzieci od 2. miesiąca do 6. roku życia spowodowanej różnymi czynnikami etiologicznymi ze szczególnym uwzględnieniem zakażeń rotawirusowych.

#### **Hipoteza badawcza**

Przyjęto hipotezę badawczą, że podawanie preparatu Lakcid L dzieciom chorującym na ostrą biegunkę skraca jej czas trwania przynajmniej o 24 godziny.

#### **Miejsce prowadzenia badania**

Badanie przeprowadzono w Oddziale Dziecięcym Szpitala Świętej Jadwigi Śląskiej w Trzebnicy.

#### **5. Materiał i metody**

##### **5.1. Kryteria włączenia do badania**

1. Wiek od 2. miesiąca życia do 6. roku życia.
2. Ostra biegunka (wg definicji WHO) [152] trzy lub więcej stolców w ciągu doby lub stolec z patologiczną treścią: ropa, krew, śluz.
3. Początek objawów nie dłużej niż 5 dni przed dniem włączenia do badania.
4. Pisemna zgoda rodziców lub prawnych opiekunów na udział dziecka w badaniu.

## **5.2. Kryteria wykluczenia przed rozpoczęciem badania**

1. Rozpoznana choroba jelita cienkiego (np. zespół krótkiego jelita, choroba trzewna, nietolerancja mleka krowiego z objawami ze strony przewodu pokarmowego).
2. Rozpoznane nieswoiste zapalenie jelit.
3. Każda inna choroba przewlekła oraz stan immunosupresji .
4. Leczenie immunosupresyjne.
5. Karmienie wyłącznie piersią.

## **5.3. Metodyka badania**

Przeprowadzono badanie kliniczne z randomizacją, metodą podwójnie ślepej próby z użyciem placebo.

## **5.4. Pierwotny punkt końcowy**

Za pierwotny punkt końcowy badania przyjęto czas trwania biegunki bez względu na etiologię oraz czas trwania biegunki o etiologii rotawirusowej.

Za moment rozpoczęcia interwencji uznano dzień i godzinę podania pierwszej dawki badanego preparatu. Koniec biegunki zdefiniowano jako brak stolca w ciągu 12 godziny lub drugi z kolei prawidłowy stolec, po którym nie występowały nieprawidłowe stolce. Czas trwania biegunki mierzono w godzinach.

## **5.5. Wtórne punkty końcowe**

Do wtórnych punktów końcowych zaliczono:

1. Przyrost masy ciała w pierwszej dobie leczenia.
2. Liczbę stolców w kolejnych dobach choroby.
3. Przedłużanie się biegunki (ponad 7 dni).
4. Wystąpienie działań niepożądanych .
5. Czas nawadniania parenteralnego.
6. Ocenę kolonizacji przewodu pokarmowego przez badane szczepy *Lactobacillus rhamnosus*.

## **5.6. Obliczenie wielkości próby**

Do obliczenia wielkości próby stosowano test T dla zmiennych niepowiązanych (porównanie średnich) korzystając z programu komputerowego StatsDirect (wersja 1.9.14, Camcode, UK). Przy randomizacji 1:1 i założeniu, że różnica między badanymi grupami wynosi 24 godziny (odchylenie standardowe [SD]: 24h), przyjmując możliwość popełnienia błędu  $\beta = 20\%$  (moc 80%) i  $\alpha = 5\%$ , obliczono, że do każdej z grup należy zakwalifikować przynajmniej 17 dzieci.

## **5.7. Randomizacja**

Listę randomizacyjną tworzyła osoba niezależna, niezwiązana z badaniem, poza miejscem prowadzenia badania. Do sporządzenia listy wykorzystano program Statistica Pl. V.6.0. Zastosowano randomizację 1:1 w blokach po 4.

## **5.8. Utajenie alokacji**

Kolejne numery randomizacyjne były przydzielane dzieciom zgodnie z kolejnością włączania do badania, co po rozkodowaniu pozwoliło dokonać podziału na 2 grupy: I – otrzymującą badany lek (Lakcid L) i II – kontrolną, otrzymującą placebo.

## **5.9. Zaślepienie badania**

Dwie kopie listy randomizacyjnej zostały umieszczone w zaślepionych kopertach. Jedną otrzymała Wytwórnia Surowic i Szczepionek „Biomed” w Lublinie, natomiast druga lista została zabezpieczona do momentu zakończenia badania i wykonania wszystkich oznaczeń. Listy zostały odkodowane po zakończeniu badania przez ostatniego pacjenta.

## 6. Opis interwencji

### 6.1. Wstępna kwalifikacja

W czasie pierwszej wizyty, lekarz pediatra w trakcie badania fizykalnego oceniał stopień odwodnienia, a następnie dziecko było ważone przez pielęgniarkę na wadze lekarskiej. Po okresie rehydratacji (doustny płyn nawadniający lub nawadnianie dożylne) zgodnie z zaleceniami ESPGHAN<sup>44</sup> rozpoczynano fazę realimentacji w oparciu o dietę stosowaną u dziecka przed wystąpieniem biegunki.

### 6.2. Interwencja

Dzieci spełniające kryteria włączenia losowo kwalifikowano do jednej z dwóch grup, w których podawano (1) Lacid L lub (2) identycznie wyglądające i smakujące placebo. Zarówno aktywny preparat, jak i placebo podawano doustnie, 2 razy dziennie po 1 ampułce, przez 5 kolejnych dni. Jedna ampłka leku zawierała 12 mld bakterii (  $1,2 \times 10^{10}$  CFU ) trzech szczepów *Lactobacillus rhamnosus* ( 573L/1, 573L/2, 573L/3 ) w stosunku 1:1:1, zliofilizowanych w roztworze mleka z sacharozą. Placebo stanowił nośnik stosowany do zawieszania szczepów *Lactobacillus rhamnosus*. Ampułki przed użyciem były przechowywane w lodówce w temperaturze 2-8<sup>0</sup> C. Przed podaniem preparat rozpuszczano w 2 ml 10 % glukozy i podawano po 30 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej. Puste ampułki i opakowania zwracano osobie prowadzącej badanie, co umożliwiło dodatkową kontrolę dawkowania preparatu. Podczas trwania badania z diety dziecka wykluczono produkty sfermentowanego mleka (jogurt, kefir, itp.) oraz nie podawano innych preparatów probiotycznych.

Skuteczność badanego preparatu oceniano w oparciu o parametry kliniczne i laboratoryjne.

Ocenę czasu trwania biegunki, ocenę przyrostu masy ciała w pierwszej dobie życia, liczbę stolców w kolejnych dniach choroby oraz ocenę wystąpienia działań niepożądanych wykonano w oparciu o informacje zawarte w dokumentacji medycznej hospitalizowanych pacjentów oraz w oparciu o informacje zawarte w Dzienniczkach Pacjentów prowadzonych przez rodziców lub opiekunów prawnych dzieci w trakcie trwania badania. W czasie podawania preparatu pielęgniarki lub rodzice zaznaczali w Dzienniczku Pacjenta liczbę i konsystencję oddawanych stolców, liczbę wymiotów, temperaturę dziecka oraz rodzaj i ilość wypijanych płynów. Kartę obserwacji

przedstawiona jest w załączniku 1. Po zakończeniu podawania preparatu rodzice dzieci zaznaczali codziennie liczbę i konsystencję oddawanych przez dzieci stolców do 14 dnia od momentu rozpoczęcia interwencji. Karta obserwacji przedstawiona jest w załączniku 2. Ocenę kolonizacji przewodu pokarmowego przez badane szczepy *Lactobacillus rhamnosus* wykonano w oparciu o wyniki posiewów kału wykonanych w Zakładzie Bakteriologii Instytutu Mikrobiologii CM UJ w Krakowie.

### **6.3. Plan badania**

W trakcie przebiegu badania zaplanowano trzy wizyty pacjenta. Wizyta pierwsza miała miejsce w dniu włączenia do badania. Wizyta 2 odbywała się w 6 dobie po włączeniu do badania, a wizyta 3 w 14 dobie od włączenia dziecka do badania.

U wszystkich dzieci po włączeniu do badania pobierano próbkę kału celem oznaczenia czynnika etiologicznego oraz celem hodowli szczepów *Lactobacillus rhamnosus*. Kolejne próbki kału celem hodowli szczepów *Lactobacillus rhamnosus* pobierano po zakończeniu podawania leków (w 6 dobie) oraz około 14 doby od rozpoczęcia leczenia. U dzieci hospitalizowanych oceniano masę ciała po 6 i 24 godzinach od włączenia do badania oraz codziennie w każdym kolejnym dniu hospitalizacji. U dzieci leczonych ambulatoryjnie wagę ciała oceniano tylko przy przyjęciu. Liczbę stolców, wymiotów oraz ilość stosowanego DPN w kolejnych dobach choroby zapisywali rodzice lub opiekunowie dziecka w Dzienniczku Pacjenta, który był zwracany badaczowi w czasie wizyty kontrolnej po zakończeniu podawania badanego preparatu. Trzecia wizyta kontrolna, w trakcie której rodzice dostarczali próbkę kału oraz kartę obserwacji stolców odbywała się około 14 dnia od włączenia dziecka do badania. Plan przebiegu badania zawiera tabela 3.

**Tabela 3. Plan przebiegu badania**

|                                    | <b><u>WIZYTA 1</u></b><br>Włączenie do badania | 4-6<br>godzina<br>po<br>włączeniu | 2 dzień  | 3 dzień  | 4 dzień  | <b><u>WIZYTA 2</u></b><br>6 dzień | <b><u>WIZYTA 3</u></b><br>14 dzień |
|------------------------------------|--|-----------------------------------|----------|----------|----------|-----------------------------------|------------------------------------|
| Badanie fizyczne                   | <b>X</b>                                       |                                   |          |          |          | <b>X</b>                          | <b>X</b>                           |
| Masa ciała                         | <b>X</b>                                       | <b>X</b>                          | <b>X</b> |          |          |                                   |                                    |
| Temperatura                        | <b>X</b>                                       |                                   |          |          |          |                                   |                                    |
| Badanie w kierunku rotawirusów     | <b>X</b>                                       |                                   |          |          |          |                                   |                                    |
| Badanie w kierunku adenowirusów    | <b>X</b>                                       |                                   |          |          |          |                                   |                                    |
| Posiew kału (SS, E.coli)           | <b>X</b>                                       |                                   |          |          |          |                                   |                                    |
| Posiew kału w kierunku L.rhamnosus | <b>X</b>                                       |                                   |          |          |          | <b>X</b>                          | <b>X</b>                           |
| Podawanie badanego preparatu       | <b>X</b>                                       | <b>X</b>                          | <b>X</b> | <b>X</b> | <b>X</b> | <b>X</b>                          |                                    |
| L.stolców/dobę                     |  | <b>X</b>                          | <b>X</b> | <b>X</b> | <b>X</b> | <b>X</b>                          | <b>X</b>                           |
| Kontrola dzienniczka               |  |                                   |          |          |          | <b>X</b>                          | <b>X</b>                           |

#### 6.4. Przygotowanie materiału do wykonania badań mikrobiologicznych

Pierwszą próbkę kału pobierano, po włączeniu dziecka do badania, do probówki z podłożem transportowym oraz do probówki z podłożem MRS. Kolejne próbki kału (w 6-tej i 14-tej dobie) pobierano do probówki z podłożem MRS i umieszczano w lodówce. Próbki były przesyłane pocztą kurierską do Zakładu Bakteriologii Katedry Mikrobiologii CMUJ. Próbki pobierane w dni robocze od poniedziałku do czwartku były dostarczane do Katedry Mikrobiologii CMUJ



w ciągu 24 godzin. Próbkę pobierane w dni wolne od pracy były przechowywane w lodówce i wysyłane pocztą kurierską w pierwszym, następującym po dniach wolnych dniu pracy.

## 6.5. Badanie mikrobiologiczne stolca

Badanie w kierunku rotawirusów i adenowirusów wykonano w Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej Szpitala Św.Jadwigi Śląskiej w Trzebnicy za pomocą testów lateksowych Slidex Rota-Kit 2 (bioMerieux, Lyon, Francja) i Adenolex (Orion Diagnostica Espoo, Finlandia).

Posiewy kału w kierunku zakażenia pałeczkami *Salmonella*, *Shigella* oraz patogennymi szczepami *Escherichia coli* wykonano w Katedrze Mikrobiologii CMUJ.

Materiał z podłoża transportowego diagnozowano w kierunku *Escherichia coli*, *Salmonella* i *Shigella*. Wysiewano go równolegle na dwa podłoża: stałe, wybiórczo-różnicujące McConkey'a i płynne SF (selenianowo-fosforanowe). Obie pożywki inkubowano 24h w temperaturze 37°C w warunkach tlenowych. Następnie hodowlę z pożywki dzielono na pół, jedną część ogrzewano we wrzącej łaźni wodnej przez 15 minut a drugą wysiewano na podłoże wybiórcze w kierunku *Salmonella* i *Shigella* (SS) i podłoże Wilson-Blaira. Ogrzana próbka hodowli bakteryjnej była wystudzona do temperatury pokojowej i wykorzystana do wykonania odczynu lateksowego w kierunku antygenów pałeczek *Salmonella* (Biomex). Na wydzielone pole szklanej płytki nanoszono ok. 25µl próbki badanej hodowli oraz kroplę wieloważnego odczynnika lateksowego. Po dokładnym wymieszaniu pałeczką z tworzywa sztucznego, umieszczano płytkę w wilgotnej komorze na wytrząsarce i kołysano przez 10 minut. Do dalszego badania z odczynnikami jednoważnymi przeznaczano tylko te próbki, w których w pierwszym etapie uzyskano dodatnią reakcję. Każdą taką próbkę nanoszono w objętości ok. 25µl na sześć pól płytki szklanej i dodawano po jednej kropli kolejnych odczynników jednoważnych: B, C1, C2, D, E. Następnie mieszano reagenty i powtórnie kołysano 10 minut na wytrząsarce. Wystąpienie znaczącej reakcji zlepnej (przynajmniej 50% drobnogrudkowa aglutynacja) z odczynnikiem wieloważnym i jednym z grupowych odczynników jednoważnych świadczyła o obecności w badanej próbce antygenów pałeczek *Salmonella* należących do danej grupy. Wzrost charakterystycznych drobnych przejrzystych kolonii z czarno zabarwionym czubkiem na podłożu Wilson-Blaira

i drobnych, przejrzystych kolonii na podłożu SS dodatkowo potwierdzał obecność pałeczek *Salmonella* w badanej próbce.

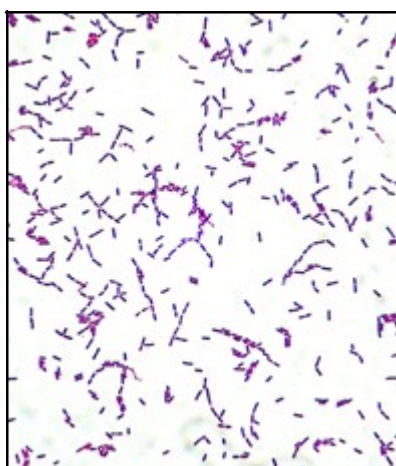
Spośród kolonii bakteryjnych wyrosłych na podłożu McConkey'a wybierano 10 typowych laktozo-dodatnich kolonii odpowiadających wyglądem koloniom *Escherichia coli*. Wybrane kolonie przesiewano na dwa komplety pożywek płynnych: wodę peptonową z tryptofanem i podłoże z malonianem sodu, następnie inkubowano je przez 18-20 godzin w temperaturze 37°C. Po inkubacji obserwowano zabarwienie podłoża z malonianem sodu. Do dalszego badania serologicznego przeznaczano tylko te hodowle szczepów na wodzie peptonowej z tryptofanem, które nie spowodowały zmiany zabarwienia podłoża z malonianem (hodowle maloniano-ujemne). Pożywki z przeznaczonymi do identyfikacji szczepami ogrzewano we wrzącej łaźni wodnej przez 15 minut, następnie chłodzono do temperatury pokojowej. Z tak przygotowanych hodowli pobierano 2 ml do osobnych probówek i wykonywano próbę na obecność indolu dodając parę kropel odczynnika Erlicha. Do dalszego badania przeznaczano te hodowle szczepów na wodzie peptonowej, które oceniono jako indolo-dodatnie. Szczepy te badano wykorzystując test lateksowy Coli Lateks EPEC (BIOMED Kraków). Na zaznaczonych polach płytki umieszczano po jednej kropeli odczynnika lateksowego dla grup A, B i C. Pipetą pasterską dodawano po jednej kropeli badanej hodowli i mieszano przy pomocy bagietki. Następnie umieszczano płytkę na kołysce laboratoryjnej na 3 minuty. Wystąpienie aglutynacji, czyli dodatni wynik reakcji z jednym z trzech odczynników lateksowych A, B lub C wskazywało na obecność pałeczek EPEC. Jeżeli na podłożu wybiórczym McConkey'a stwierdzono wzrost licznych, innych morfologicznie od *Escherichia coli* pałeczek Gram ujemnych zakładano test biochemiczny API 20E w celu zdiagnozowania gatunku. W ten sposób w kilku przypadkach zdiagnozowano pałeczki *Klebsiella oxytoca*, *Proteus sp.* i *Pseudomonas sp.*

Materiał z wymazówki umieszczonej w podłożu MRS wysiewano w kierunku pałeczek *Lactobacillus*. W tym celu wymazówkę wypłukiwano w 1ml podłoża MRS, następnie robiono kolejne rozcieńczenia dziesiętne i wysiewano je po 100µl na płytki z podłożem MRS (jest to wybiórcze podłoże dla *Lactobacillus*). Płytki inkubowano przez 24 godziny w warunkach beztlenowych w temperaturze 37°C. Następnie izolowano białe, mleczne kolonie, wyglądające jak typowe kolonie *Lactobacillus*

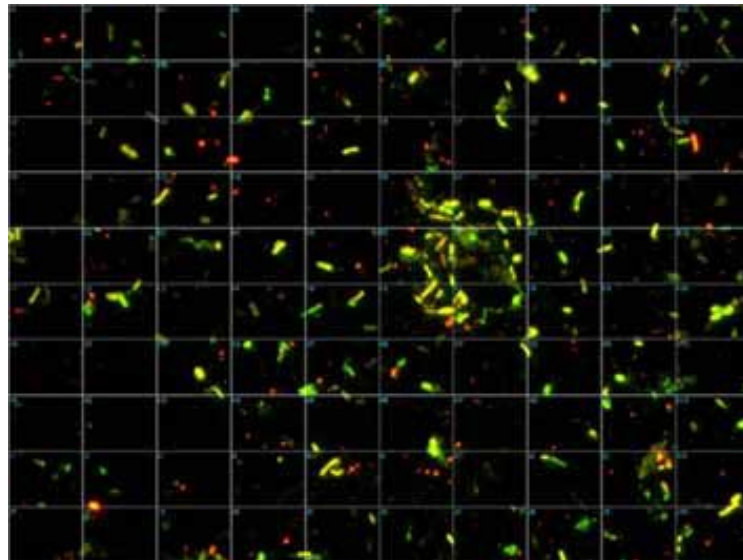
i wykonywano preparaty barwione metodą Grama. *Lactobacillus* w preparacie barwionym metodą Grama ma wygląd Gram-dodatnich laseczek. Identyfikację gatunkową *Lactobacillus* prowadzono metodami fenotypowymi (API CHL) i molekularnymi (metoda PCR z gatunkowo specyficznymi starterami). W ten sposób wyselekcjonowano kolonie *Lactobacillus rhamnosus*. Z tych szczepów izolowano DNA genomowe i porównywano wzór genotypowy wyizolowanych szczepów ze szczepami *Lactobacillus rhamnosus* 573l/1, 573L/2 i 573L/3 stosując metodę elektroforezy pulsacyjnej (PFGE).



Rycina 4. Płytką z podłożem MRS i rosnącymi na niej koloniami *Lactobacillus*.

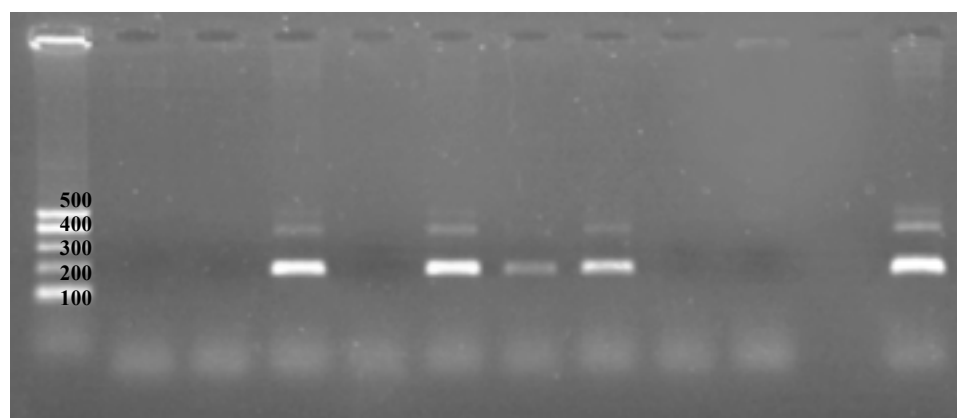


Rycina 5. Preparat *Lactobacillus* barwiony metodą Grama.



Rycina 6. Próbkka kawy inkubowana z sondami EUB i sondą do rodzaju *Lactobacillus*.

|                         |   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |
|-------------------------|---|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|
| numer ścieżki           | 1 | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11  |
| 12                      |   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |
| numer pacjenta/pobranie | M | 42/3 | 43/2 | 43/2 | 44/3 | 45/2 | 45/3 | 45/3 | 46/2 | 47/2 | NEG |
| GG                      |   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |
| numer szczepu           |   | 3    | 2    | 3    | 5    | 2    | 2    | 8    | 1    | 1    |     |



Rycina 7. Przykładowe zdjęcie produktów reakcji PCR z izolatów *Lactobacillus* z próbek kawy. Ścieżka 1- marker wielkości, ścieżki 2-10 szczepy *Lactobacillus* izolowane od pacjentów, ścieżka 11- kontrola negatywna, ścieżka 12- kontrola pozytywna (szczep *Lactobacillus rhamnosus* GG).

## 7. Analiza statystyczna

### Analiza wyników

Do analizy różnic pomiędzy wyróżnionymi grupami stosowano w przypadku danych o charakterze ciągłym test t-Studenta. Do zbadania różnic w większej liczbie grup niż 2 zastosowano analizę wariancji. Do porównania częstości występowania zjawisk  $q$  w obydwu grupach wykorzystano test  $\chi^2$ . W obliczeniach zastosowano program komputerowy Statistica Pl. V.6.0. Za próg istotności statystycznej przyjęto wartość  $p < 0,05$ .

Przeprowadzono analizę wyników w grupach wyodrębnionych zgodnie z zaplanowanym leczeniem uwzględniając tylko osoby, u których dokonano oceny punktów końcowych (*ang. available case analysis*)<sup>168</sup>.

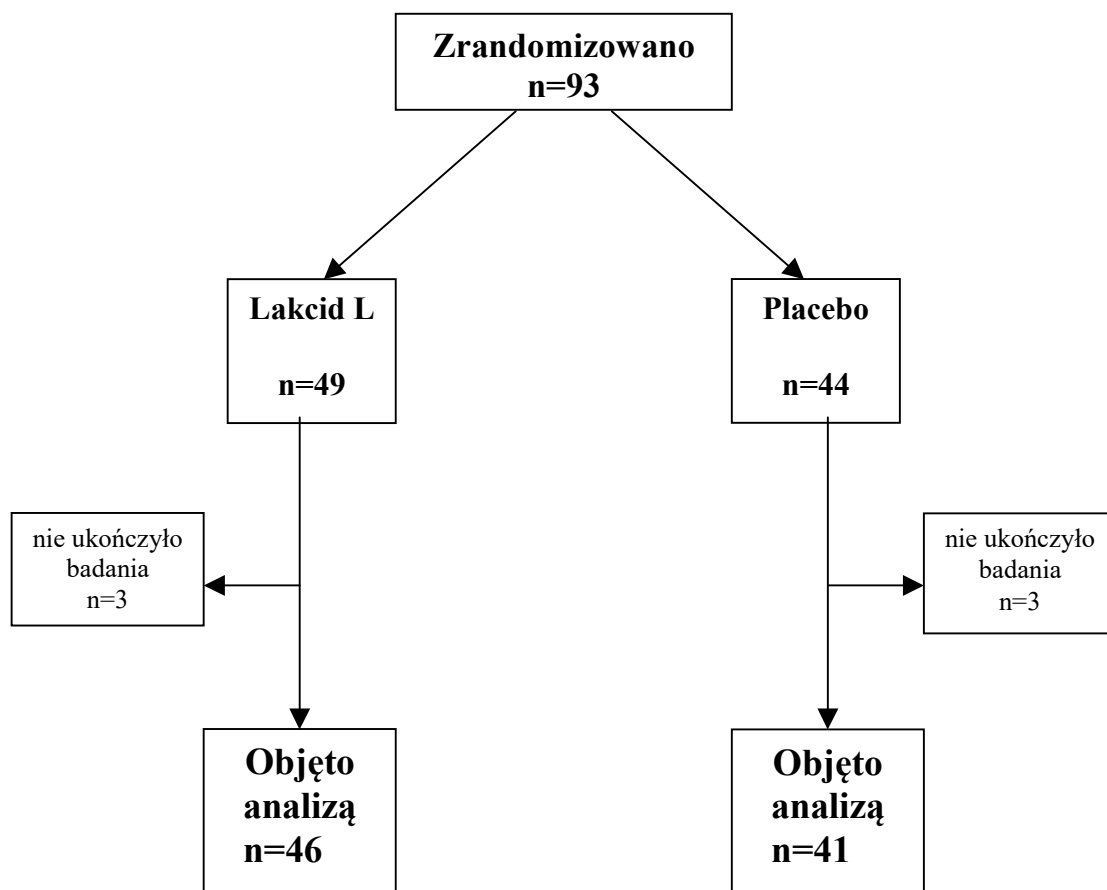
## 8. Aspekty etyczne

Przed rozpoczęciem badania protokół kliniczny uzyskał akceptację Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego – opinia nr KBET/90/L/2001 z dnia 28 czerwca 2001 r.

## 9. Wyniki

W okresie od września 2003 do czerwca 2004 do badania włączono 93 dzieci z ostrą biegunką. W wyniku randomizacji do grupy eksperymentalnej otrzymującej Lakcid L włączono 49 dzieci, a do grupy kontrolnej otrzymującej placebo 44 dzieci. Badanie zgodnie z protokołem ukończyło 87 dzieci. W grupie 6 pozostałych dzieci, rodzice 2 dzieci zrezygnowali z udziału w badaniu po randomizacji, 3 dzieci wykluczono z analizy z powodu niepełnej dokumentacji, a 1 dziecko zostało wykluczone z powodu włączenia do badania niezgodnie z protokołem (wiek powyżej 6 lat). Kończącą analizą objęto 87/93 (93,5%) dzieci (46 w grupie eksperymentalnej i 41 w grupie kontrolnej).

**Rycina 8. Diagram przebiegu badania.**



### **9.1. Charakterystyka badanej populacji**

Charakterystykę obu grup przedstawiono w tabeli 4. Grupy nie różniły się znamienne pod względem: wieku, płci, trybu leczenia, czasu trwania biegunki przed rozpoczęciem interwencji, czasu karmienia piersią, średniej liczby stolców i wymiotów, występowania gorączki oraz stopnia odwodnienia.

**Tabela 4. Charakterystyka badanych grup pacjentów przed rozpoczęciem**

**interwencji.**

|   | <b>Lakcid L</b>                    | <b>placebo</b>                      | <b>p</b>                          |
|---|------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| <b>Liczebność grupy</b>   | <b>n=46</b>                        | <b>n=41</b>                         |                                   |
| <b>Tryb leczenia</b> (liczba dzieci)<br><b>hospitalizacja</b><br><b>ambulatoryjny</b>             | <b>31</b><br><b>15</b>             | <b>29</b><br><b>12</b>              | <b>p=0,74</b><br>test $\chi^2$    |
| <b>Wiek</b> (miesiące)  | <b>24,6 ± 17,7</b>                 | <b>26,8 ± 20,8</b>                  | <b>p= 0,59</b><br>test t-Studenta |
| <b>Płeć</b> (chłopcy, dziewczynki)  | <b>24; 22</b>                      | <b>21; 20</b>                       | <b>p=0,93</b><br>test $\chi^2$    |
| <b>Czas trwania biegunki przed rozpoczęciem leczenia</b> (godziny)                                | <b>46,3 ± 27,1</b>                 | <b>41,8 ± 26,4</b>                  | <b>p=0,43</b><br>test t-Studenta  |
| <b>Czas karmienia piersią</b> (miesiące)  | <b>7,7 ± 6,8</b>                   | <b>8,7 ± 6,9</b>                    | <b>p=0,53</b><br>test t-Studenta  |
| <b>Średnia liczba stolców</b>   | <b>8,5 ± 5,5</b>                   | <b>8,2 ± 4,1</b>                    | <b>p=0,77</b><br>test t-Studenta  |
| <b>Średnia liczba wymiotów</b>  | <b>3 ± 2,8</b>                     | <b>4,3 ± 4,1</b>                    | <b>p=0,08</b><br>test t-Studenta  |
| <b>Występowanie gorączki</b> (liczba dzieci)  | <b>33</b>                          | <b>26</b>                           | <b>p=0,41</b><br>test $\chi^2$    |
| <b>Stopień odwodnienia</b> (liczba dzieci)<br><b>brak</b><br><b>umiarkowane</b><br><b>średnie</b> | <b>12</b><br><b>27</b><br><b>7</b> | <b>10</b><br><b>21</b><br><b>10</b> | <b>p=0,58</b><br>test $\chi^2$    |

W badanej grupie czynnik etiologiczny ostrej biegunki ustalono u 53/87 (60,9%) dzieci. Częstość występowania poszczególnych czynników przedstawiono

w tabeli 5. Nie było istotnych różnic pomiędzy częstością występowania poszczególnych czynników etiologicznych biegunki w badanych grupach.

**Tabela 5. Czynniki etiologiczne biegunki.**

| <b>Czynnik etiologiczny</b>   | <b>liczba</b>              | <b>Lakcid L</b>            | <b>placebo</b>             |
|---|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| <b>Rotawirus</b>  | <b>n=39/97<br/>(44,8%)</b> | <b>n=22/39<br/>(56,4%)</b> | <b>n=17/39<br/>(43,6%)</b> |
| <b>Adenowirus</b>   | <b>n=5/87<br/>(5,8%)</b>   | <b>n=4/5<br/>(80%)</b>     | <b>n=1/5<br/>(20%)</b>     |
| <b>Czynniki bakteryjne</b><br><i>(Salmonella enteritidis, EPEC gr.B,<br/>Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis,<br/>Pseudomonas aeruginosa),</i> | <b>n=7/87<br/>(8%)</b>     | <b>n=4/7<br/>(57%)</b>     | <b>n=3/7<br/>(43%)</b>     |
| <b>nie ustalony</b>   | <b>36/87<br/>(41,4%)</b>   | <b>16/36<br/>(44,4%)</b>   | <b>20/36<br/>(45,6%)</b>   |

Charakterystykę grup pacjentów z infekcją rotawirusową przedstawiono w tabeli 6. Grupy nie różniły się znamienne pod względem: wieku, płci, trybu leczenia,



czasu trwania biegunki przed rozpoczęciem interwencji, czasu karmienia piersią, średniej liczby stolców, występowania gorączki oraz stopnia odwodnienia.

W grupie pacjentów otrzymujących Lakcid L liczba wymiotów przed rozpoczęciem leczenia była znamiennej mniejsza niż u pacjentów otrzymujących placebo.

**Tabela 6. Charakterystyka badanych grup pacjentów z biegunką rotawirusową przed rozpoczęciem interwencji.**

|   | <b>Lakcid L</b>                   | <b>placebo</b>                    | <b>p</b>                          |
|---|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| <b>Liczebność grupy</b>   | <b>n=22</b>                       | <b>n=17</b>                       |                                   |
| <b>Tryb leczenia</b> (liczba dzieci)<br><b>hospitalizacja</b><br><b>ambulatoryjny</b> | <b>20</b><br><b>2</b>             | <b>16</b><br><b>1</b>             | <b>p=0,71</b><br>test $\chi^2$    |
| <b>Wiek</b> (miesiące)  | <b>18,6 ± 13,3</b>                | <b>18,2 ± 9,1</b>                 | <b>p= 0,91</b><br>test t-Studenta |
| <b>Płeć</b><br>chłopcy, dziewczynki   | <b>12; 10</b>                     | <b>8; 9</b>                       | <b>p=0,64</b><br>test $\chi^2$    |
| <b>Czas trwania biegunki przed rozpoczęciem leczenia</b> (godziny)                    | <b>50,6 ± 32,1</b>                | <b>40,8 ± 26,9</b>                | <b>p=0,31</b><br>test t-Studenta  |
| <b>Czas karmienia piersią</b> (miesiące)  | <b>6 ± 5,8</b>                    | <b>7,9 ± 5,9</b>                  | <b>p=0,32</b><br>test t-Studenta  |
| <b>Średnia liczba stolców</b>   | <b>7,5 ± 5,2</b>                  | <b>8,7 ± 5,4</b>                  | <b>p=0,52</b><br>test t-Studenta  |
| <b>Średnia liczba wymiotów</b>  | <b>3,5 ± 2,2</b>                  | <b>6 ± 4,7</b>                    | <b>p=0,04</b><br>test t-Studenta  |
| <b>Występowanie gorączki</b> (liczba dzieci)  | <b>21</b>                         | <b>17</b>                         | <b>p=0,37</b><br>test $\chi^2$    |
| <b>Stopień odwodnienia</b><br><b>brak</b><br><b>umiarkowane</b><br><b>średnie</b>     | <b>3</b><br><b>16</b><br><b>3</b> | <b>1</b><br><b>10</b><br><b>6</b> | <b>p=0,33</b><br>test $\chi^2$    |

## 9.2. Punkty końcowe

Nie obserwowano istotnego statystycznie skrócenia czasu trwania biegunki u pacjentów otrzymujących Lakcid L w porównaniu z pacjentami otrzymującymi placebo w całej badanej grupie.

Nie wykazano również znamiennej statystycznie różnicy pomiędzy badanymi grupami co do przyrostu masy ciała w 1 dobie leczenia, czasu stosowania nawadniania parenteralnego, liczby stolców w ciągu kolejnych dni choroby oraz epizodów biegunki trwającej powyżej 7 dni. Wyniki przedstawiono w tabeli 7.

**Tabela 7. Charakterystyka przebiegu biegunki w grupie badanej i kontrolnej.**

|  | <b>Lakcid L</b>            | <b>placebo</b>             | <b>p</b>   |
|--|----------------------------|----------------------------|--|
| <b>Czas trwania biegunki</b><br>(godziny)  | <b>83,6 ± 55,6</b>         | <b>96,1 ± 71,5</b>         | <b>p= 0,36</b><br>test t-Studenta                              |
| <b>Czas trwania biegunki w zależności od wieku pacjentów</b> (godziny)               |                            |                            | test t-Studenta  |
| < 12 m.ż. (n=20)   | (n=12) <b>116,2 ± 82,7</b> | (n=8) <b>158,1 ± 90,1</b>  | <b>p=0,30</b>  |
| < 24 m.ż. (n=57)   | (n=30) <b>88,7 ± 64,6</b>  | (n=27) <b>108 ± 72,8</b>   | <b>p=0,29</b>  |
| < 36 m.ż. (n=66)   | (n=33) <b>86,3 ± 62,1</b>  | (n=33) <b>109,7 ± 71,5</b> | <b>p=0,16</b>  |
| <b>Czas trwania biegunki w zależności od czasu rozpoczęcia interwencji</b> (godziny) |                            |                            | test t-Studenta  |
| < 72 godzin  | (n=36) <b>88,8 ± 59</b>    | (n=37) <b>101,8 ± 72,8</b> | <b>p=0,40</b>  |
| > 72 godzin  | (n=10) <b>64,8 ± 37,8</b>  | (n=4) <b>42,5 ± 17,5</b>   | <b>p=0,29</b>  |
| <b>Przyrost masy ciała w 1 dobie leczenia</b> (w gramach)                            | (n=26) <b>60 ± 170</b>     | (n=25) <b>120 ± 280</b>    | <b>p=0,33</b><br>test t-Studenta                               |
| <b>Czas nawadniania parenteralnego</b> (godziny)                                     | <b>16 ± 19,3</b>           | <b>24,3 ± 29,1</b>         | <b>p=0,08</b><br>test t-Studenta                               |
| <b>Biegunka trwająca powyżej 7 dni</b><br>(liczba pacjentów)                         | <b>3</b>                   | <b>7</b>                   | <b>p=0,13</b> test $\chi^2$<br>RR 0,38; 95%CI :<br>0,11 – 1,26 |
| <b>Średnia liczba nieprawidłowych stolców w kolejnych dniach choroby:</b>            |                            |                            | test t-Studenta  |
| 1 doba   | <b>5,2 ± 3,8</b>           | <b>4,5 ± 3,9</b>           | <b>p=0,44</b>  |
| 2 doba   | <b>3 ± 2,8</b>             | <b>2,9 ± 2,9</b>           | <b>p=0,90</b>  |
| 3 doba   | <b>1,9 ± 2</b>             | <b>1,9 ± 2,1</b>           | <b>p=0,90</b>  |
| 4 doba   | <b>1 ± 1,8</b>             | <b>1,6 ± 2,3</b>           | <b>p=0,20</b>  |
| 5 doba   | <b>0,5 ± 1,2</b>           | <b>1,1 ± 2,4</b>           | <b>p=0,12</b>  |

U pacjentów z infekcją rotawirusową obserwowano istotne statystycznie skrócenie czasu trwania biegunki w grupie otrzymującej Lakcid L w porównaniu z grupą otrzymującą placebo a także skrócenie czasu nawadniania parenteralnego.

Nie wykazano znamiennej statystycznie różnicy pomiędzy badanymi grupami co do przyrostu masy ciała w 1 dobie leczenia, liczby stolców w ciągu kolejnych dni choroby oraz epizodów biegunki trwającej powyżej 7 dni. Wyniki przedstawiono w tabeli 8.

**Tabela 8. Charakterystyka przebiegu biegunki u dzieci z biegunką rotawirusową w grupie badanej i kontrolnej.**

|  | <b>Lakcid L</b>           | <b>placebo</b>             | <b>p</b>   |
|--|---------------------------|----------------------------|--|
| <b>Czas trwania biegunki</b><br>(godziny)  | <b>77,5 ± 35,4</b>        | <b>115 ± 66,9</b>          | <b>p= 0,03</b><br>test t-Studenta                          |
| <b>Czas trwania biegunki w zależności od wieku pacjentów</b> (godziny)               |                           |                            | test t-Studenta  |
| <b>&lt; 12 m.ż.</b>  | (n=8) <b>91 ± 40,7</b>    | (n=4) <b>193,3 ± 28,4</b>  | <b>p=0,001</b>   |
| <b>&lt; 24 m.ż.</b>  | (n=17) <b>79,9 ± 39,6</b> | (n=15) <b>122 ± 66,6</b>   | <b>p=0,03</b>  |
| <b>&lt; 36 m.ż.</b>  | (n=19) <b>78,7 ± 37,5</b> | (n=16) <b>120,8 ± 64,6</b> | <b>p=0,02</b>  |
| <b>Czas trwania biegunki w zależności od czasu rozpoczęcia interwencji</b> (godziny) |                           |                            | test t-Studenta  |
| <b>&lt; 72 godzin</b>  | (n=15) <b>85,3 ± 30,4</b> | (n=15) <b>124,9 ± 64,6</b> | <b>p=0,04</b>  |
| <b>&gt; 72 godzin</b>  | (n=7) <b>60,7 ± 41,9</b>  | (n=2) <b>40,5 ± 26,2</b>   | <b>p=0,55</b>  |
| <b>Przyrost masy ciała w 1 dobie leczenia</b> (w gramach)                            | (n=16) <b>40 ± 160</b>    | (n=15) <b>90 ± 320</b>     | <b>p=0,56</b><br>test t-Studenta                           |
| <b>Czas nawadniania parenteralnego</b><br>(godziny)                                  | <b>14,9 ± 13,7</b>        | <b>37,7 ± 32,9</b>         | <b>p=0,006</b><br>test t-Studenta                          |
| <b>Biegunka trwająca powyżej 7 dni</b><br>(liczba pacjentów)                         | <b>1</b>                  | <b>1</b>                   | <b>p=0,13</b> test $\chi^2$<br>RR 0,19;95%CI : 0,03 – 1,15 |
| <b>Średnia liczba nieprawidłowych stolców w kolejnych dniach choroby:</b>            |                           |                            | test t-Studenta  |
| <b>1 doba</b>  | <b>4,4 ± 3,1</b>          | <b>4,9 ± 2,8</b>           | <b>p=0,58</b>  |
| <b>2 doba</b>  | <b>2,8 ± 2,7</b>          | <b>4,1 ± 3,6</b>           | <b>p=0,19</b>  |
| <b>3 doba</b>  | <b>2,1 ± 2,2</b>          | <b>2,7 ± 2,1</b>           | <b>p=0,39</b>  |
| <b>4 doba</b>  | <b>1 ± 1,7</b>            | <b>2,5 ± 3,4</b>           | <b>p=0,08</b>  |
| <b>5 doba</b>  | <b>0,2 ± 0,5</b>          | <b>1,1 ± 2,4</b>           | <b>p=0,08</b>  |

### 9.3. Analiza czynników nie objętych protokołem.

Przeanalizowano czas trwania biegunki w poszczególnych grupach wiekowych (poniżej 12, 24 i 36 miesiąca życia). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy badanymi grupami (tab.7). Natomiast w grupie pacjentów z infekcją rotawirusową obserwowano istotniejsze skrócenie biegunki u dzieci młodszych (tab.8).

W całej badanej grupie nie wykazano istotnie statystycznych zależności pomiędzy czasem trwania biegunki przed rozpoczęciem leczenia a czasem trwania biegunki od momentu rozpoczęcia interwencji. (tab.7)

U dzieci z infekcją rotawirusową, w grupie otrzymującej Lakcid L wykazano zależność czasu trwania biegunki przed rozpoczęciem leczenia od czasu trwania biegunki po rozpoczęciu leczenia. Interwencja rozpoczęta w ciągu 72 godzin od momentu rozpoczęcia biegunki w sposób istotny statystycznie skracła czas trwania biegunki. (tab.8).

W grupie pacjentów z infekcją bakteryjną w grupie otrzymującej Lakcid L (n=4) średni czas trwania biegunki wynosił  $82,6 \pm 46,1$  godziny a w grupie otrzymującej placebo (n=3)  $156 \pm 124,2$  godziny ( $p=0,25$ ; t-Studenta) Różnica pomiędzy badanymi grupami nie była istotna statystycznie.

#### **9.4. Kolonizacja przewodu pokarmowego przez badane szczepy**

##### ***Lactobacillus rhamnosus***

W wyniku randomizacji do grupy otrzymującej badany preparat zakwalifikowano 46 dzieci. Obecność badanych szczepów *Lactobacillus rhamnosus* stwierdzono w próbkach kału pobranych po zakończeniu podawania leku u 37/46 (80,4%) dzieci oraz w próbkach kału pobranych ok. 14 dnia od rozpoczęcia leczenia u 19/46 (41,3%). W grupie kontrolnej obecność badanych szczepów stwierdzono tylko w 1 dziecku.

W obrębie grupy otrzymującej badany preparat analizowano wpływ czynników klinicznych na kolonizację. Pod uwagę brano czas karmienia piersią, liczę wymiotów i czas trwania biegunki przed rozpoczęciem leczenia oraz liczbę nieprawidłowych stolców w trakcie interwencji. W przeprowadzonej analizie wariancji nie stwierdzono różnic znamienych statystycznie pomiędzy grupą dzieci u której nie potwierdzono kolonizacji, grupą u której kolonizację stwierdzono tylko w próbce kału pobranej po

zakończeniu podawania leku oraz grupą w której badane szczepy *Lactobacillus rhamnosus* stwierdzono w próbkach pobranych w 6 i 14 dobie interwencji. (tab.9).

**Tabela 9. Analiza wariancji wpływu czynników klinicznych na kolonizację przewodu pokarmowego badanymi szczepami *Lactobacillus rhamnosus* 572/1, 573/2, 573/3**

| Zmienna   | Grupa pobrań | Średnia | Odchylenie standardowe | Analiza wariancji p |
|---|--------------|---------|------------------------|---------------------|
| Czas karmienia piersią                            | 1            | 8,0     | 8,2                    | 0,60                |
|   | 2            | 6,5     | 5,9                    |                     |
|   | 3            | 8,8     | 7,1                    |                     |
| Liczba wymiotów przed rozpoczęciem leczenia       | 1            | 1,6     | 1,9                    | 0,20                |
|   | 2            | 3,6     | 2,9                    |                     |
|   | 3            | 3,2     | 3                      |                     |
| Czas trwania biegunki przed rozpoczęciem leczenia | 1            | 43,7    | 20,5                   | 0,88                |
|   | 2            | 48,7    | 27,4                   |                     |
|   | 3            | 45,3    | 30,5                   |                     |
| Liczba stolców w ciągu 5 dni leczenia             | 1            | 14,9    | 7,8                    | 0,41                |
|   | 2            | 10,6    | 8,8                    |                     |
|   | 3            | 10,7    | 8,7                    |                     |

**Grupy pobrań:**

1. (n=9) Pacjenci otrzymujący Lakcid L, u których nie potwierdzono kolonizacji przewodu pokarmowego.
2. (n=18) Pacjenci otrzymujący Lakcid L, u których kolonizację przewodu pokarmowego stwierdzono w próbce kału pobranej po 5 dobie leczenia.
3. (n=19) Pacjenci otrzymujący Lakcid L, u których kolonizację przewodu pokarmowego stwierdzono w próbce kału pobranej po 5 i 14 dobie leczenia.

**9.5. Bezpieczeństwo badanego preparatu**

W trakcie badania nie obserwowano działań niepożądanych związanych z podawaniem badanego preparatu lub placebo.

**10. Dyskusja**

W badaniu z randomizacją, przeprowadzonym metodą podwójnej ślepej próby wykazano, że podawanie mieszaniny trzech szczepów *Lactobacillus rhamnosus* 573L/1, 573L/2, 573L/3 (Lakcid L) w dawce  $1,2 \times 10^{10}$  CFU podawanej 2 x dziennie przez 5 kolejnych dni nie skraca czas trwania ostrej biegunki u dzieci od 2. miesiąca życia do 6. roku życia w całej badanej grupie. Wykazano natomiast, że podawanie badanego preparatu istotnie statystycznie w porównaniu z placebo skraca czas trwania biegunki rotawirusowej w tej grupie wiekowej. W czasie leczenia biegunki rotawirusowej wykazano lepszy efekt kliniczny w przypadku rozpoczęcia podawania leku w ciągu pierwszych 72 godzin choroby oraz w grupie niemowląt. Nie stwierdzono wpływu badanego preparatu na nasilenie biegunki w kolejnych dobach choroby. Stwierdzono natomiast skrócenie czasu nawadniania parenteralnego w trakcie biegunki rotawirusowej u dzieci hospitalizowanych otrzymujących badany preparat. Potwierdzono również zdolność szczepów *Lactobacillus rhamnosus* (573L/1 573L/2, 573L/3) do kolonizacji przewodu pokarmowego.

Badanie zostało zaplanowane i przeprowadzone zgodnie z obowiązującymi zasadami Dobrej Praktyki Klinicznej jako badanie z randomizacją metodą podwójnie ślepej próby z użyciem placebo. W trakcie trwania badania zrealizowano założenia protokołu co do liczebności badanych grup. Badanie ukończyło 87/93 dzieci. W 14 z 23 badań objętych metaanalizą przez Allena <sup>4</sup> dotyczących zastosowania probiotyków w leczeniu biegunki <sup>141,142,143,144,146,149,152,155,156,158,159,160,161,162</sup> liczba pacjentów była mniejsza lub równa. W przypadku biegunki rotawirusowej analizą objęto 39 dzieci. W 7 z 23 analizowanych badań liczba pacjentów którzy ukończyli badanie wynosiła od 21 do 43 <sup>144,149,152,155,156,160,162</sup>. Pomimo tego, że zrealizowano założenia protokołu co do liczebności grup, nie udało się w czasie prowadzenia badania włączyć większej liczby dzieci z infekcją rotawirusową, co sprawia, że mała liczebność tej grupy pacjentów jest słabszą stroną badania.

Badanie zostało przeprowadzone w jednym ośrodku podobnie jak większość badań (14 z 23) ujętych w metaanalizie Allena<sup>141,142,143,144,146,147,151,152,154,155,156,157,160,162</sup>.

Do badania włączono zarówno dzieci hospitalizowane jak i dzieci leczone w warunkach ambulatoryjnych. Pomimo tego, że w trzech innych badaniach<sup>145,146, 150</sup> również włączano dzieci zarówno leczone ambulatoryjnie, jak i hospitalizowane, to aktualnie wydaje się, że dla powyższych grup powinny być inne wtórne punkty końcowe. O ile czas trwania biegunki przedstawia taką samą wartość kliniczną, to w przypadku dzieci leczonych ambulatoryjnie wśród wtórnych punktów końcowych powinna się znaleźć ocena niepowodzenia nawadniania doustnego i konieczność hospitalizacji, a w przypadku dzieci leczonych w warunkach szpitalnych ważna jest odpowiedź na pytanie czy badana interwencja skraca czas hospitalizacji.

Autorzy wielu przeprowadzonych dotychczas badań dotyczących zastosowania probiotyków w leczeniu ostrej biegunki stosowali podobne kryteria wiekowe, jak również czas trwania biegunki przed włączeniem dziecka do badania był podobny<sup>4,6</sup>. Wyniki analizy czynników nie objętych protokołem, sugerujące znaczniejsze skrócenie czasu trwania biegunki rotawirusowej u dzieci młodszych oraz w przypadku rozpoczęcia interwencji w ciągu pierwszych 72 godzin skłaniają do rozważenia w trakcie planowania kolejnych badań zastosowania bardziej precyzyjnych kryteriów włączenia (młodszy wiek dzieci i krótszy czas trwania biegunki przed włączeniem do badania) co prawdopodobnie umożliwiłoby uzyskanie wyniku o większej wiarygodności.

Wynik uzyskany w leczeniu biegunki rotawirusowej - skrócenie czasu jej trwania o średnio 37,5 godziny jest prawie identyczny z wynikami uzyskanymi przez innych autorów którzy stosowali *Lactobacillus GG*<sup>150,151,152</sup> i *Lactobacillus casei*<sup>162</sup>. Średni czas skrócenia biegunki rotawirusowej w cytowanych powyżej badaniach wynosił 38,1 godziny (95% CI 8,1 do 68,1)<sup>4</sup>.

Nieistotne statystycznie skrócenie czasu trwania biegunki w całej badanej grupie o średnio 12,4 godziny trudno odnieść do danych z literatury, ponieważ jak dotychczas liczba opublikowanych badań, w których wykazano brak skuteczności badanego probiotyku w leczeniu biegunki u dzieci jest niewielka<sup>169,170</sup>. Przyczyn braku efektu

klinicznego może być kilka. Po pierwsze preparat jest nieskuteczny i tak należy w chwili obecnej założyć. Jednak uważam, że warto wynik ten rozważyć w kontekście zidentyfikowanych patogenów. Czynnikiem etiologicznym biegunki ustalono u 60,1 % dzieci. Jednak po zakończeniu badania próbki kału pobrane od dzieci, u których nie ustalono wstępnie czynnika etiologicznego, zostały poddane dalszym badaniom (poza protokołem badania). W próbkach tych wykazano obecność norowirusów i astrowirusów (w druku). Jak wiadomo z literatury czas trwania biegunki w przebiegu infekcji norowirusowej wynosi średnio 2 dni, a w przypadku zakażenia astrowirusami od 1 do 5 dni <sup>15,16</sup>. Gdy porównamy go ze średnim czasem trwania infekcji rotawirusowej (4-8 dni) <sup>15,16,17,18,19,20</sup>, można przypuszczać, że osiągnięcie założenia protokołu (skrócenia biegunki o 24 godziny) jest mało prawdopodobne w przypadku biegunki o etiologii innej niż rotawirusowej. Skrócenie biegunki o 24 godziny jest wprawdzie powszechnie uznane za czas istotny klinicznie, jednak dopiero przeprowadzenie badań klinicznych z dokładną analizą czynników etiologicznych i różnymi punktami końcowymi dla poszczególnych wirusów odpowiedziałoby na pytanie czy stosowanie probiotyków w biegunkach o etiologii innej niż rotawirusowa jest uzasadnione. Jak dotychczas nie przeprowadzono badań klinicznych oceniających skuteczności probiotyków w ostrej biegunce o ustalonej etiologii wirusowej innej niż rotawirusowa. Zapewne jednym z głównych powodów jest brak tanich testów do oznaczania norowirusów, astrowirusów czy sapowirusów.

W badaniu nie oceniano wpływu Lakcidu L na objętość stolca. Uważa się, że jest to ważne i miarodajne kryterium oceniające skuteczność interwencji w leczeniu biegunki <sup>3</sup>. Ze względów praktycznych odstąpiono od oceny tego parametru.

Ciekawa wydaje się obserwacja, że czas trwania biegunki o etiologii bakteryjnej w grupie otrzymującej badane szczepy *Lactobacillus rhamnosus* 573L/1, 573L/2, 573L/3 jest prawie dwukrotnie krótszy niż w grupie otrzymującej placebo. Mała liczebność grup uniemożliwia jednak ocenę statystyczną. Zaledwie w dwóch opublikowanych badaniach przedstawiono wyniki leczenia dzieci z biegunką o potwierdzonej etiologii bakteryjnej <sup>150,157</sup>. W obu badaniach nie wykazano skrócenia czasu trwania biegunki w grupie otrzymującej probiotyki w porównaniu z grupą kontrolną. W obu opublikowanych pracach w leczeniu stosowano szczepy *Lactobacillus rhamnosus* GG. Biorąc pod uwagę fakt, że patomechanizm biegunek bakteryjnych jest związany głównie z działaniem bakterii enteropatogennych w świetle jelita grubego <sup>12,14</sup> idealnym kandydatem do leczenia tych biegunek wydają



się być *Bifidobacterium*, które w tej części jelita w warunkach fizjologicznych występują w większej ilości niż *Lactobacillus* <sup>134</sup>. Interesującym połączeniem byłby preparat złożony zawierający *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, szczególnie, że autorzy jednego z ostatnio opublikowanych przeglądów wykazali przewagę probiotycznych preparatów wieloszczepowych i wielogatunkowych nad preparatami zawierającymi tylko jeden szczep bakterii <sup>171</sup>.

W ocenie skuteczności interwencji zastosowano analizę wyników w grupach wyodrębnionych zgodnie z zaplanowanym leczeniem uwzględniając tylko osoby, u których dokonano oceny punktów końcowych (*ang. available case analysis*). Brak danych pacjentów, którzy nie ukończyli badania uniemożliwił analizę zgodnie z zaplanowanym leczeniem (*ang. intention-to-treat*).

Zastosowana w przeprowadzonym badaniu dawka szczepów *Lactobacillus rhamnosus* 573L/1, 573L/2, 573L/3 - 2 x dziennie  $1,2 \times 10^{10}$  CFU umożliwiła skuteczną kolonizację przewodu pokarmowego. Przesłanki teoretyczne wskazują, że prawdopodobnie pół godzinny okres inkubacji leku rozpuszczonego w 10% glukozie zwiększył o co najmniej jedną wartość logarymiczną zawartość bakterii w preparacie. Potwierdzenie kolonizacji metodami biochemicznym i molekularnymi umożliwiło spełnienie wymagań stawianych szczepom probiotycznym <sup>81,102, 103,104</sup>. Potwierdzono w ten sposób oporność badanych szczepów *Lactobacillus rhamnosus* 573L/1, 573L/2, 573L/3 na działanie kwasu solnego i żółci, ich zdolność do adhezji do komórek nabłonkowych jelita człowieka, zdolność do kolonizacji przewodu pokarmowego, dobre właściwości wzrostowe, korzystne oddziaływanie na zdrowie człowieka oraz bezpieczeństwo stosowania. W żadnym z dotychczas opublikowanych badań dotyczących zastosowania bakterii probiotycznych w leczeniu ostrej biegunki nie potwierdzono kolonizacji przewodu pokarmowego przez badane szczepy tak dokładnymi metodami.

Van Niel w opublikowanej w 2002 roku metaanalizie dotyczącej oceny skuteczności *Lactobacillus* w leczeniu ostrej biegunki u dzieci wykazał zależność efektu leczniczego od zastosowanej dawki leku <sup>7</sup>. Stosowanie większych dawek preparatów zawierających szczepy *Lactobacillus* istotniej skracало czas trwania biegunki. Potwierdziło to wcześniejsze doniesienia z badania przeprowadzonego na ochotnikach, w którym wykazano zależność kolonizacji przewodu pokarmowego przez szczepy *Lactobacillus GG* od spożytej dawki <sup>172</sup>.

Przeprowadzone badanie ma również swój wymiar praktyczny. Jest jednym z nielicznych badań oceniających skuteczność dostępnych na polskim rynku probiotyków. W pewien sposób wypełniło ono lukę jaka powstała pomiędzy szeroko omawianym przez specjalistów, na zjazdach i konferencjach, szczepem *Lactobacillus* GG a zapotrzebowaniem pediatrów, którzy w badaniu ankietowym deklarowali powszechne stosowanie probiotyków w leczeniu ostrej biegunki u dzieci, pomimo braku na rynku preparatów o potwierdzonej skuteczności klinicznej<sup>173,174</sup>.

Praktyczny wymiar ma również informacja, że można preparat przed podaniem inkubować w roztworze 10% glukozy oraz, że 5 – dniowy okres leczenia, zwłaszcza w przypadku biegunki rotawirusowej jest wystarczający. Fakt ten jest szczególnie ważny w aspekcie ekonomicznym, gdyż powszechnym zjawiskiem jest traktowanie preparatów probiotycznych jako „panaceum” na różne dolegliwości przewodu pokarmowego i stosowanie ich bez określonych ram czasowych, co niejednokrotnie stanowi duże obciążenie finansowe dla pacjentów, a nie ma aktualnie żadnego uzasadnienia.

Ostrożnie należy interpretować obserwowane w badaniu skrócenie czasu nawadniania parenteralnego u pacjentów z biegunką rotawirusową otrzymujących Lakcid L, ponieważ w tej grupie odnotowano istotnie mniejszą liczbę wymiotów przed rozpoczęciem interwencji. Niewątpliwie był to czynnik, który umożliwił wcześniejsze wprowadzenie nawadniania doustnego.

Pomimo publikowania w ostatnich latach licznych badań dotyczących stosowania probiotyków w leczeniu ostrej biegunki<sup>4,6,7,143,144,146,147,149,148,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,161,162,163</sup> nadal nierozwiązana pozostaje kwestia dawkowania probiotyków i czasu trwania leczenia. W przeprowadzonym badaniu zastosowano dawkę zgodnie z obowiązującą w badaniach klinicznych tendencją, a jednocześnie znacznie wyższą niż dawki dostępnych na polskim rynku preparatów. Jak dotychczas bez odpowiedzi pozostaje pytanie czy dalsze zwiększanie dawki będzie się wiązało z lepszym efektem klinicznym czy też zostanie przekroczona granica bezpieczeństwa. Interesujące byłoby badanie w których porównywano by dwie różne dawki tego samego probiotyku z placebo. Również wyjaśnienia wymaga sposób przygotowania i podawania leku. W badaniu wykazano, że korzystny jest 30 minutowy okres inkubacji w roztworze 10 % glukozy. Nie wiemy jednak czy podanie probiotyku bezpośrednio po rozpuszczeniu, bądź też wydłużenie okresu inkubacji a także zastosowanie innego rozpuszczalnika będzie miało wpływ na skuteczność leku.

Oprócz zdefiniowanych w protokole punktów końcowych przeprowadzone badanie miało odpowiedzieć również na pytanie, czy potwierdzone w licznych badaniach klinicznych<sup>150,151,152,153,156,157,175,176</sup> i metaanalizach<sup>4,5,6,7</sup> właściwości, prawie mitycznego już szczepu *Lactobacillus GG* są związane z konkretnym szczepem, czy też z całym gatunkiem *Lactobacillus rhamnosus*. Pytanie wprowadzie nadal pozostało bez jednoznacznej odpowiedzi, ale uzyskane wyniki pośrednio przemawiają na korzyść całego gatunku *Lactobacillus rhamnosus*.

Aby uzyskać odpowiedź na nierozwiązane jak dotąd kwestie dotyczące czasu stosowania i dawkowania preparatów probiotycznych oraz żeby ocenić skuteczność preparatu konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań klinicznych. Uzyskanie dowodów o wysokim poziomie wiarygodności wymaga przeprowadzenia badań, najlepiej wieloośrodkowych, na większej grupie pacjentów, z uwzględnieniem innych punktów końcowych dla pacjentów hospitalizowanych i innych dla pacjentów leczonych ambulatoryjnie. Szczególnie ważne wydaje się w planowaniu nowego badania wczesne rozpoczęcie interwencji, najlepiej w ciągu pierwszych 72 godzin choroby, objęcie badaniem dzieci młodszych, poniżej 3. roku życia, u których biegunka jest częstą przyczyną hospitalizacji oraz ocenienie różnych dawek i różnych sposobów przygotowania preparatu co stanowi ważny problem praktyczny.

Podsumowując, zidentyfikowano liczne wirusy, które są przyczyną biegunki u dzieci oraz poznano mechanizmy ich działania. Dysponujemy dokładnymi danymi epidemiologicznymi oraz zbliżamy się do kolejnego historycznego przełomu w zapobieganiu biegunkom – wprowadzenia szczepionki przeciwko rotawirusom.

Czy w takim razie od czasów Hipokratesa coś się zmieniło? Z jednej strony leczymy chore dzieci z sukcesem, a ogromny spadek śmiertelności z powodu biegunki nie podlega dyskusji. Z drugiej strony postęp biologii molekularnej umożliwia nam tworzenie większej liczby hipotez i teorii niż starożytnym, jednak tak jak i oni nadal nie do końca wiemy dziś jaki jest mechanizm działania probiotyków ani dlaczego bakterie probiotyczne skracają czas trwania biegunki rotawirusowej.

Mleko fermentowało od milionów lat i tak jest nadal, dzisiejszy sukces polega na tym, że po imieniu możemy nazwać „sprawcę” psucia się mleka i „za karę” wykorzystać go do leczenia biegunki (trudno o bardziej obrzydliwą karę).

## 11. Wnioski

Na podstawie wyników przeprowadzonych badań wyciągnięto następujące wnioski:

1. Stosowanie preparatu Lakcid L w dawce  $1,2 \times 10^{10}$  CFU 2 x dziennie przez 5 dni nie skraca czasu trwania ostrej biegunki w grupie dzieci od 2. miesiąca życia do 6. roku życia.
2. Stosowanie preparatu Lakcid L w dawce  $1,2 \times 10^{10}$  CFU 2 x dziennie przez 5 dni skraca czas trwania biegunki rotawirusowej o ponad 24 godziny w grupie dzieci od 2 miesiąca życia do 6 roku życia.
3. Preparat Lakcid L skraca czas nawadniania parenteralnego u dzieci hospitalizowanych z powodu biegunki rotawirusowej. Działania tego nie obserwowano u dzieci z ostrą biegunką o innej lub nieustalonej etiologii.
4. Szczepy *Lactobacillus rhamnosus* 573L/1, 573L/2, 573L/3 zawarte w preparacie Lakcid L skutecznie kolonizują przewód pokarmowy w trakcie trwania ostrej biegunki.

## 12. Streszczenie

Celem pracy była ocena skuteczności szczepów *Lactobacillus rhamnosus* 573L/1, 573L/2, 573L/3 (Lakcid L) w leczeniu ostrej biegunki u dzieci od 2 m.ż. do 6 r.ż. Przeprowadzono badanie z randomizacją metodą podwójnie ślepej próby z użyciem placebo. Za pierwotny punkt końcowy przyjęto czas trwania biegunki. Za wtórne punkty końcowe uznano: przyrost masy ciała, liczbę stolców w kolejnych dniach choroby, przedłużanie się biegunki powyżej 7 dni od momentu rozpoczęcia leczenia, działania niepożądane oraz kolonizację przewodu pokarmowego. Badaniem objęto 93 dzieci. Stosowano leczenie zgodnie z zaleceniami ESPGHAN oraz podawano badany preparat/placebo w dawce  $2 \times 1,2 \times 10^{10}$  CFU przez okres pięciu kolejnych dni.

Wyniki: Analizą objęto 87/93 (93,5%) dzieci. Badany preparat otrzymało 46/87 (52,9%) a placebo 41/87 (47,1%) dzieci. U 39/87 (44,8%) dzieci rozpoznano zakażenie rotawirusowe (22 otrzymało lek, 17 placebo). Czas trwania biegunki w grupie otrzymującej lek wynosił  $83,6 \pm 55,6$  h vs placebo  $96,1 \pm 71,5$  h ( $p=0,36$ ). W grupie z infekcją rotawirusową wynosił  $77,5 \pm 35,4$ h w grupie otrzymującej lek vs placebo  $115 \pm 67$  h ( $p=0,03$ ). W grupie z infekcją rotawirusową czas trwania biegunki w przypadku rozpoczęcia interwencji w ciągu 72h od momentu rozpoczęcia choroby u otrzymujących lek wynosił  $85,8 \pm 30,4$ h vs placebo  $124,9 \pm 64,6$ h ( $p=0,04$ ). W grupie pacjentów z infekcją rotawirusową czas nawadniania parenteralnego w grupie otrzymującej lek wynosił  $14,9 \pm 13,7$ h vs placebo  $37,7 \pm 32,9$ h ( $p=0,006$ ). Badane szczepy *Lactobacillus rhamnosus* stwierdzono w 5 dobie leczenia u 37/46 (80,4%) dzieci oraz w 14 dobie u 19/46 (41,3%) dzieci.

Wnioski: 1. Lakcid L w dawce  $2 \times 1,2 \times 10^{10}$  CFU podawany przez 5 dni nie skraca czasu trwania biegunki bez względu na jej etiologię. 2. Lakcid L w dawce  $2 \times 1,2 \times 10^{10}$  CFU podawany przez 5 dni istotnie statystycznie skraca czas trwania biegunki rotawirusowej. 3. Lakcid L skraca czas nawadniania parenteralnego u dzieci hospitalizowanych z powodu biegunki rotawirusowej. 4. Badane szczepy *Lactobacillus rhamnosus* 573L/1, 573L/2, 573L/3 skutecznie kolonizują przewód pokarmowy w trakcie ostrej biegunki.

### 13. Summary

Objective of the study was to determine whether *L.rhamnosus* strains (573L/1; 573L/2; 573L/3) enclosed in the preparation Lakcid L, have an influence on acute diarrhea in children from 2 m. to 6 y. old. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial was performed. Primary outcome measure was the diarrhea duration. Secondary\_outcome measures were: weight gain, no. of stools in consecutive days, duration of parenteral rehydration, diarrhea lasting over 7 days and GI tract colonization by administered strains. 93 patients were enrolled to the study. Children were treated according to ESPGHAN recommendation and additionally , they received either  $1.2 \times 10^{10}$  CFU mixture of *L. rhamnosus* strains or placebo twice daily for 5 consecutive days.

#### Results:

87/93 (93,5%) patients were analyzed. 46/87 (52,9%) children were in probiotic group and 41/87 (47,1%) were in placebo group. 39/87 (44,8%) had rotaviral infection (22 recived Lakcid L, 17 recived placebo). Mean duration of diarrhea in the treated group:  $83.6 \pm 55.6$  h; in placebo group:  $96 \pm 71.5$  h ( $p=0,36$ ). In rotavirus infection:  $77.5 \pm 35.4$  h vs  $115 \pm 66.9$  h ( $p=0,03$ ), respectively. Duration of parenteral rehydration  $14.9 \pm 13.7$  h vs  $37.6 \pm 32.9$  h; ( $p=0,006$ ). The applied probiotic strains were detected in stool samples of 37/46 (80.4%) children in 5 days and in 19/46 (41.3%) samples in 14 days after initiating the treatment.

#### Conclusions:

1. Lakcid L administered orally in dose  $1,2 \times 10^{10}$  CFU twice daily for 5 consecutive days has no influence on diarrhea of any etiology. 2. Lakcid L administered orally in dose  $1,2 \times 10^{10}$  CFU twice daily for 5 consecutive days significantly shortens duration of rotaviral diarrhea. 3. Lakcid L shortens time of parenteral rehydration in patients hospitalized because of rotaviral diarrhea. 4. The applied *Lactobacillus rhamnosus* strains 573L/1, 573L/2, 573L/3 were able to colonize the gut of the treated children.

#### 14. SPIS RYCIN I ZAŁĄCZNIKÓW

|  |         |
|--|---------|
| <b><u>Rycina 1.</u></b> Zdjęcie z adherencji szczepu <i>Lactobacillus rhamnosus</i> do linii komórkowej HT-29.   | str. 32 |
| <b><u>Rycina 2.</u></b> Zahamowanie wzrostu pałeczek <i>Salmonella</i> na podłożu przez szczepy <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 573L/1, 573L/2, 573L/3.   | str. 33 |
| <b><u>Rycina 3.</u></b> Zdjęcie przedstawiające preparat przygotowany do potrzeb badania.  | str. 34 |
| <b><u>Rycina 4.</u></b> Płytką z podłożem MRS i rosnącymi na niej koloniami <i>Lactobacillus</i> .   | str. 43 |
| <b><u>Rycina 5.</u></b> Preparat <i>Lactobacillus</i> barwiony metodą Grama.   | str. 43 |
| <b><u>Rycina 6.</u></b> Próbką kału inkubowana z sondami EUB i sondą do rodzaju <i>Lactobacillus</i> .   | str. 44 |
| <b><u>Rycina 7.</u></b> Przykładowe zdjęcie produktów reakcji PCR z izolatów <i>Lactobacillus</i> z próbek kału. Ścieżka 1- marker wielkości, ścieżki 2-10 szczepy <i>Lactobacillus</i> izolowane od pacjentów, ścieżka 11- kontrola negatywna, ścieżka 12 - kontrola pozytywna (szczep <i>L.rhamnosus GG</i> ). | str. 44 |
| <b><u>Rycina 8.</u></b> Diagram przebiegu badania.   | str. 46 |
| <b><u>Załącznik 1.</u></b> Karta codziennej obserwacji w trakcie podawania preparatu.  | str. 65 |
| <b><u>Załącznik 2.</u></b> Karta codziennej obserwacji po zakończeniu podawania preparatu.   | str. 66 |

## 15. SPIS TABEL

|  |         |
|--|---------|
| <b><u>Tabela 1.</u></b> Porównanie częstości występowania czynników etiologicznych ostrej biegunki w Stanach Zjednoczonych i w krajach rozwijających się.                            | str. 10 |
| <b><u>Tabela 2.</u></b> Dostępne w Polsce preparaty probiotyczne.  | str. 30 |
| <b><u>Tabela 3.</u></b> Plan przebiegu badania.  | str. 40 |
| <b><u>Tabela 4.</u></b> Charakterystyka badanych grup pacjentów przed rozpoczęciem interwencji.  | str. 47 |
| <b><u>Tabela 5.</u></b> Czynniki etiologiczne biegunki.  | str. 48 |
| <b><u>Tabela 6.</u></b> Charakterystyka badanych grup pacjentów z biegunką rotawirusową przed rozpoczęciem interwencji.  | str. 49 |
| <b><u>Tabela 7.</u></b> Charakterystyka przebiegu biegunki w grupie badanej i kontrolnej.  | str. 50 |
| <b><u>Tabela 8.</u></b> Charakterystyka przebiegu biegunki u dzieci z biegunką rotawirusową w grupie badanej i kontrolnej.   | str. 51 |
| <b><u>Tabela 9.</u></b> Analiza wariancji wpływu czynników klinicznych na kolonizację przewodu pokarmowego badanymi szczepami <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 573L/1, 573L/2, 573L/3. | str. 53 |



## 16. Załączniki

**Załącznik 1. Karta codziennej obserwacji trakcie podawania preparatu.**

Badanie nr 01/2001 NR PACJENTA Y Y Y

**Karta codziennej obserwacji obserwacji** (w ramach badania 01/2001)

**Imię i nazwisko**

**Data** rr-rr-rrrr

| godzina | IŁOŚĆ STOLCÓW | TEMP. | WYMIOTY | RODZAJ PŁYNU | IŁOŚĆ |
|---------|---------------|-------|---------|--------------|-------|
| 0       |               |       |         |              |       |
| 1       |               |       |         |              |       |
| 2       |               |       |         |              |       |
| 3       |               |       |         |              |       |
| 4       |               |       |         |              |       |
| 5       |               |       |         |              |       |
| 6       |               |       |         |              |       |
| 7       |               |       |         |              |       |
| 8       |               |       |         |              |       |
| 9       |               |       |         |              |       |
| 10      |               |       |         |              |       |
| 11      |               |       |         |              |       |
| 12      |               |       |         |              |       |
| 13      |               |       |         |              |       |
| 14      |               |       |         |              |       |
| 15      |               |       |         |              |       |
| 16      |               |       |         |              |       |
| 17      |               |       |         |              |       |
| 18      |               |       |         |              |       |
| 19      |               |       |         |              |       |
| 20      |               |       |         |              |       |
| 21      |               |       |         |              |       |
| 22      |               |       |         |              |       |
| 23      |               |       |         |              |       |

## LEGENDA

# I stolec prawidłowy

/ stolec półpłynny data i godz. podania pierwszej dawki leku / /

— stolec płynny

godz. 17:17

ζ stolec ze śluzem

# I stolec z krwią

**X**      wymioty

## **Załącznik 2. Karta obserwacji po zakończeniu podawania preparatu.**

Badanie nr 01/2001 NR PACJENTA Y Y Y

| Data    /    / |        |      |        | Data    /    / |        |      |        | Data    /    / |        |      |        |
|----------------|--------|------|--------|----------------|--------|------|--------|----------------|--------|------|--------|
| godz           | stolec | godz | stolec | godz           | stolec | godz | stolec | godz           | stolec | godz | stolec |
| 0              |        | 12   |        | 0              |        | 12   |        | 0              |        | 12   |        |
| 1              |        | 13   |        | 1              |        | 13   |        | 1              |        | 13   |        |
| 2              |        | 14   |        | 2              |        | 14   |        | 2              |        | 14   |        |
| 3              |        | 15   |        | 3              |        | 15   |        | 3              |        | 15   |        |
| 4              |        | 16   |        | 4              |        | 16   |        | 4              |        | 16   |        |
| 5              |        | 17   |        | 5              |        | 17   |        | 5              |        | 17   |        |
| 6              |        | 18   |        | 6              |        | 18   |        | 6              |        | 18   |        |
| 7              |        | 19   |        | 7              |        | 19   |        | 7              |        | 19   |        |
| 8              |        | 20   |        | 8              |        | 20   |        | 8              |        | 20   |        |
| 9              |        | 21   |        | 9              |        | 21   |        | 9              |        | 21   |        |
| 10             |        | 22   |        | 10             |        | 22   |        | 10             |        | 22   |        |
| 11             |        | 23   |        | 11             |        | 23   |        | 11             |        | 23   |        |

| Data    /    / |        |      |        | Data    /    / |        |      |        | Data    /    / |        |      |        |
|----------------|--------|------|--------|----------------|--------|------|--------|----------------|--------|------|--------|
| godz           | stolec | godz | stolec | godz           | stolec | godz | stolec | godz           | stolec | godz | stolec |
| 0              |        | 12   |        | 0              |        | 12   |        | 0              |        | 12   |        |
| 1              |        | 13   |        | 1              |        | 13   |        | 1              |        | 13   |        |
| 2              |        | 14   |        | 2              |        | 14   |        | 2              |        | 14   |        |
| 3              |        | 15   |        | 3              |        | 15   |        | 3              |        | 15   |        |
| 4              |        | 16   |        | 4              |        | 16   |        | 4              |        | 16   |        |
| 5              |        | 17   |        | 5              |        | 17   |        | 5              |        | 17   |        |
| 6              |        | 18   |        | 6              |        | 18   |        | 6              |        | 18   |        |
| 7              |        | 19   |        | 7              |        | 19   |        | 7              |        | 19   |        |
| 8              |        | 20   |        | 8              |        | 20   |        | 8              |        | 20   |        |
| 9              |        | 21   |        | 9              |        | 21   |        | 9              |        | 21   |        |
| 10             |        | 22   |        | 10             |        | 22   |        | 10             |        | 22   |        |
| 11             |        | 23   |        | 11             |        | 23   |        | 11             |        | 23   |        |

Data pobrania III próbki kału    /    /

Data i podpis rodzica    /    /

**I**    stolec prawidłowy

/    stolec półpłynny

—    stolec płynny

ζ    stolec ze śluzem

**I**    stolec z krwią

## 17. Piśmiennictwo

---

1. Kosek M, Bern C, Guerrant RL. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bull. World Health Organ.* 2003; 81: 197-204.
2. Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg. Infect. Dis.* 2003; 9: 565-572.
3. Thapar N., Sanderson IR. Diarrhoea in children: an interface between developing and developed countries. *Lancet* 2004; 363: 641-53.
4. Allen S, Okoko B, Martinez E, Gregorio G, Dans L. Probiotics for treating infectious diarrhoea. *Cochrane Database Syst Rev.* 2004;2:CD003048.
5. Huang JS, Bousvaros A, Lee JW, Diaz A, Davidson EJ. Efficacy of probiotic use in acute diarrhea in children: a meta-analysis. *Dig Dis Sci.* 2002;47: 2625-34.
6. Szajewska H, Mrukowicz JZ. Probiotics in the treatment and prevention of acute infectious diarrhea in infants and children: a systematic review of published randomized, double-blind, placebo-controlled trials. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2001; 33 Suppl 2: S17-25.
7. Van Niel CW, Feudtner C, Garrison M, Christakis D. Lactobacillus therapy for acute infectious diarrhea in children: a meta-analysis. *Pediatrics* 2002; 109: 678-684.
8. WHO: The treatment of diarrhoea: manual for physicians and other senior health workers, WHO/CDR/95.3. Geneva: World Health Organization, 1995.
9. Baqui AH, Black RE, Yunus M, Hoque AR, Chowdhury HR, Sack RB. Methodological issues in diarrhoeal disease epidemiology: definition of diarrhoeal episodes. *International Journal of Epidemiology* 1991; 20: 1057-1063.
10. Armona K, Stephenson T, MacFaulb R, Ecclestona P, Wernekec U. An evidence and consensus based guideline for acute diarrhoea management *Arch Dis Child* 2001; 85:132-142.
11. Ghishan FK. Chronic diarrhea. W: Behrman RE. red.: Nelson Textbook of Pediatrics. 17th Edition Saunders 2003: 1276-81.
12. Pickering LK, Snyder JD. Gastroenteritis. W: Behrman RE. red.: Nelson Textbook of Pediatrics. 17th Edition Saunders 2003: 1272-76.
13. Szajewska H, Mrukowicz JZ, Albrecht P. Ostra biegunka - diagnostyka i leczenie. *Standardy Medyczne* 2000; 3: 6-14.
14. Frye ER, Tamer MA. Diarrhoea. <http://www.emedicine.com/ped/topic583.htm>.
15. Red book 2003. Report of the Committee of Infectious Diseases. AAP. 26th Edition.

- 
16. Goodgame RW. Gastroenteritis <http://www.emedicine.com/ped/topic856.htm>.
17. Mehta DI, Lebenthal E. New developments in acute diarrhea. *Curr Probl Pediatr*. 1994; 24: 95-107.
18. Mądry E, Krawczyński M. Rotawirusy. Zagadnienia genetyczno-immunologiczne oraz epidemiologia i diagnostyka zakażeń. *Pediatr. Pol.* 1999; 74: 1147-1152.
19. Mądry E, Krawczyński M. Rotawirusy Część II. Patofizjologia i klinika zakażenia, leczenie i zapobieganie. *Pediatr. Pol.* 2000; 75: 259-265.
20. Raebel MA. Rotavirus Disease and Its Prevention in Infants and Children *Pharmacotherapy* 1999; 19:1279-1295.
21. Mrukowicz J, Kowalska-Duplaga K, Krobicka B, Szajewska H, Iwańczak F, Karczewska K, Korzon M. The epidemiology and disease burden of rotavirus gastroenteritis in Poland: prospective, sentinel surveillance at 6 pediatric hospitals. The 36th Annual Meeting of ESPGHAN Praga Jun 4-7, abstract P028.
22. Mrukowicz JZ, Krobicka B, Duplaga M, Kowalska-Duplaga K, Domanski J, Szajewska H, Kantecki M, Iwanczak F, Pytrus T. Epidemiology and impact of rotavirus diarrhoea in Poland. *Acta Paediatr Suppl.* 1999; 88:53-60.
23. Rivest P, Proulx M, Lonergan G, Lebel MH, Bedard L. Hospitalizations for gastroenteritis: the role of rotavirus. *Vaccine* 2004; 22: 2013-17.
24. Child and Adolescent Health and Development. Child health epidemiology: current estimates for children under five years of age. [www.who.int/child-adolescent/health/OVERVIEW/Child\\_Health/child\\_epidemiology.htm](http://www.who.int/child-adolescent/health/OVERVIEW/Child_Health/child_epidemiology.htm).
25. WHO. World Health Report 1998: global health situation and trends 1955 – 2025. World Health Organization: Geneva, 1998.
26. King CK, Glas RL, Brese JS, Duggan C. Managing acute gastroenteritis among children: oral rehydration, maintenance, and nutritional therapy. *MMWR* 2003; 52: 1-16.
27. Snyder JD, Merson MH. The magnitude of global problem of acute diarrhoeal disease: a review of active surveillance data. *Bull. World Health Organ.*, 1982; 60: 605-613.
28. Bern C, Martines J, de Zoysa I, Glass RI. The magnitude of global problem of acute diarrhoeal disease: a ten year update. *Bull. World Health Organ.* 1992;70: 705-714.
29. Glass RL, Lew JF, Gangrenosa RE, LeBaron CW, HO M-S. Estimates of morbidity and mortality rates for diarrhoeal diseases in American children. *J Pediatr.* 1991; 118(suppl):S27-S33.

- 
- 30.** Santosham M, Keenan EM, Tulloch J, Broun D, Glass RL. Oral rehydration therapy for diarrhoea: an example of reverse transfer of technology. *Pediatrics*, 1997; 100: E10.
- 31.** Fruhwirth M, Heininger U, Ehlken B, Petersen G, Laubereau B, Moll-Schuler I, Mutz I, Forster J. International variation in disease burden of rotavirus gastroenteritis in children with community- and nosocomially acquired infection. *Pediatr Infect Dis J*. 2001; 20:784-91.
- 32.** Zimmerman CM, Bresee JS, Parashar UD, Riggs TL, Holman RC, Glass RI. Cost of diarrhea-associated hospitalizations and outpatient visits in an insured population of young children in the United States. *Pediatr Infect Dis J* 2001; 20:14-19.
- 33.** Ożarowski A, Jaroniewski W. Rośliny lecznicze i ich praktyczne zastosowanie. Instytut Wydawniczy Związków Zawodowych, Warszawa 1987.
- 34.** Różański H. Dawne i współczesne środki przeciwbiegunkowe - antidiarrhoica <http://www.rozanski.gawer.pl/diarrhoe.html>.
- 35.** Subbotina MD, Timchenko VN, Vorobyov MM, Konunova YS, Aleksandrovih YS, Shushunov S. Effect of oral administration of tormentil root extract (*Potentilla tormentilla*) on rotavirus diarrhea in children: a randomized, double blind, controlled trial. *Pediatr Infect Dis J*. 2003; 22: 706-710.
- 36.** Schott H. Kronika medycyny Grupa Wydawnicza Bertelsmann Media 2002.
- 37.** Raspail F.V. Lekarz domowy i domowa apteka. Warszawa 1850; 206-8; <http://www.pfm.pl/u235/navi/184003/back/0>.
- 38.** O'Shaughnessy W. Experiments on blood in cholera. *Lancet* 1831;1:490. (Cytowane za <sup>26</sup>).
- 39.** Latta T. Malignant cholera: documents communicated by the Central Board of Health London, relative to the treatment of cholera by copious injection of aqueous and saline fluids into the veins. *Lancet* 1832;2:274. (Cytowane za <sup>26</sup>).
- 40.** Ruxin JN. Magic bullet: the history of oral rehydration therapy. *Medical History* 1994; 38:363-397.
- 41.** Guerrant RL, Carneiro-Filho B, Dillingham RA. Cholera, diarrhea and oral rehydration therapy: triumph and indictment. *CID* 2003; 37: 398-405.
- 42.** Warren T. Nutrition as therapy for diarrhoea: ancient and modern practices contrasted. 13th Annual History of Medicine Days WA whitelaw March 2004; [www.hom.ucalgary.ca/Proceedings-2004.pdf](http://www.hom.ucalgary.ca/Proceedings-2004.pdf).
- 43.** American Academy of Pediatrics Managing Acute Gastroenteritis Among Children: Oral Rehydration, Maintenance, and Nutritional Therapy. *Pediatrics* 2004; 114: 507.

- 
- 44.** Walker-Smith JA, Sandhu BK, Isolauri E, Banchini G, van Caillie-Bertrand M, Dias JA, Fasano A, Guandalini S, Hoekstra JH, Juntunen M, Kolacek S, Marx D, Micetic-Turk D, Razenberg MC, Szajewska H, Taminiau J, Weizman Z, Zannacca C, Zetterstrom R. Guidelines prepared by the ESPGAN Working Group on Acute Diarrhoea. Recommendations for feeding in childhood gastroenteritis. European Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1997; 24:619-20.
- 45.** Szajewska H, Mrukowicz J.Z. Postępowanie w ostrej bieguncie u dzieci. Nawadnianie doustne i leczenie żywieniowe. *MP Pediatria* 2005; 1: 29-48 – komentarz.
- 46.** Guandalini S. Treatment of acute diarrhea in the new millennium. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2000; 30: 486-9.
- 47.** Szajewska H, Dziechciarz P, Mrukowicz J. Smektyn dwuoktanościenny w leczeniu ostrej biegunki u dzieci: metaanaliza badań z randomizacją przeprowadzonych metodą podwójnej ślepej próby z placebo. Materiały XXVII Ogólnopolskiego Zjazdu Pediatrów. Bydgoszcz, 12-15 czerwca 2003.
- 48.** Guarino A, Bisceglia M, Castellucci G, Iacono G, Casali LG, Bruzzese E, Musetta A, Greco L; Italian Society of Pediatric Gastroenterology and Hepatology Study Group for Smectite in Acute Diarrhea. Smectite in the treatment of acute diarrhea: a nationwide randomized controlled study of the Italian Society of Pediatric Gastroenterology and Hepatology (SIGEP) in collaboration with primary care pediatricians. SIGEP Study Group for Smectite in Acute Diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2001; 32: 71-5.
- 49.** Salazar-Lindo E, Santisteban-Ponce J, Chea-Woo E, Gutierrez M. Racecadotril in the treatment of acute diarrhea in children. *N.Eng.J.Med.* 2000; 343: 463-467.
- 50.** Cezard JP, Duhamel JF, Meyer M. Efficacy and tolerability of racecadotril in acute diarrhea in children. *Gastroenterology.* 2001; 120: 799-805.
- 51.** Bhutta TI, Tahir KI. Loperamide poisoning in children. *Lancet* 1990; 335: 363.
- 52.** Bahl R, Bhandari N, Saksena M, Strand T, Kumar GT, Bhan MK, Sommerfelt H. Efficacy of zinc-fortified oral rehydration solution in 6- to 35-month-old children with acute diarrhea. *J Pediatr* 2002; 141: 677–82.
- 53.** Baqui AH, Black RE, El Arifeen S, Yunus M, Chakraborty J, Ahmed S, Vaughan JP. Effect of zinc supplementation started during diarrhoea on morbidity and mortality in Bangladeshi children: community randomised trial. *BMJ* 2002; 9:325:1059.
- 54.** Bhandari N, Bahl R, Taneja S, Strand T, Molbak K, Ulvik RJ, Sommerfelt H, Bhan MK. Substantial reduction in severe diarrheal morbidity by daily zinc supplementation in young north Indian children. *Pediatrics* 2002;109:e86.

- 
- 55.** Bhutta ZA, Bird SM, Black RE, Brown KH, Gardner JM, Hidayat A, Khatun F, Martorell R, Ninh NX, Penny ME, Rosado JL, Roy SK, Ruel M, Sazawal S, Shankar A. Therapeutic effects of oral zinc in acute and persistent diarrhea in children in developing countries: pooled analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* 2000;72:1516–22.
- 56.** Castillo-Duran C, Vial P, Uauy R. Trace mineral balance during acute diarrhea in infants. *J Pediatr* 1988; 113: 452–7.
- 57.** Hambidge K. Zinc and diarrhea. *Acta Pediatr Suppl* 1992;381:82–6.
- 58.** Roy SK, Behrens RH, Haider R, Akramuzzaman SM, Mahalanabis D, Wahed MA, Tomkins AM. Impact of zinc supplementation on intestinal permeability in Bangladeshi children with acute diarrhoea and persistent diarrhoea syndrome. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1992;15: 289–96.
- 59.** Roy SK, Tomkins AM, Akramuzzaman SM, Behrens RH, Haider R, Mahalanabis D, Fuchs G. Randomised controlled trial of zinc supplementation in malnourished Bangladeshi children with acute diarrhoea. *Arch Dis Child*. 1997; 77: 196-200.
- 60.** Sachdev HP, Mittal NK, Mittal SK, Yadav H. A controlled trial on utility of oral zinc supplementation in acute dehydrating diarrhea in infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1988; 7: 877–81.
- 61.** Sazawal S, Black RE, Bhan MK, Bhandari N, Sinha A, Jalla S. Zinc supplementation in young children with acute diarrhea in India. *N Engl J Med* 1995; 333: 839–44.
- 62.** Strand TA, Chandyo RK, Bahl R, Sharma PR, Adhikari RK, Bhandari N, Ulvik RJ, Molbak K, Bhan MK, Sommerfelt H. Effectiveness and efficacy of zinc for the treatment of acute diarrhea in young children. *Pediatrics* 2002;109: 898–903.
- 63.** D'Souza AL, Rajkumar C, Cooke J, Bulpitt CJ. Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhoea: meta-analysis. *BMJ*. 2002;324(7350):1361.
- 64.** Isolauri E, Kirjavainen PV, Salminen S. Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation. *Gut*. 2002;50 Suppl 3:III54-9.
- 65.** Isolauri E. Probiotics in human disease. *Am J Clin Nutr*. 200; 73:1142S-1146S.
- 66.** Isolauri E. Probiotics for infectious diarrhoea. *Gut*. 2003; 52: 436-7.
- 67.** Marteau PR, de Vrese M, Cellier C, Schrezenmeir J. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am J Clin Nutr* 2001;73(suppl): 403S-406S.
- 68.** Pedone CA, Bernabeu AO, Postaire ER, Bouley CF, Reinert P. The effect of supplementation with milk fermented by *Lactobacillus casei* (strain DN-114 001) on acute diarrhoea in children attending day care centres. *Int J Clin Pract*. 1999; 53:179-84.

- 
- 69.** Reid G, Jass J, Sebulsky MT, McCormick JK. Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin Microbiol Rev.* 2003; 16: 658-72.
- 70.** Saavedra JM, Abi-Hanna A, Moore N, Yolken RH. Long-term consumption of infant formulas containing live probiotic bacteria: tolerance and safety. *Am J Clin Nutr.* 2004; 79: 261-7.
- 71.** Saavedra JM, Tschernia A. Human studies with probiotics and prebiotics: clinical implications. *Br J Nutr.* 2002; 87 Suppl 2: S241-6.
- 72.** Salminen SJ, Gueimonde M, Isolauri E. Probiotics that modify disease risk. *J Nutr.* 2005;135:1294-8.
- 73.** Sullivan A, Nord CE. The place of probiotics in human intestinal infections. *Int J Antimicrob Agents.* 2002; 20: 313-9.
- 74.** Sullivan A, Nord CE. Probiotics in human infections. *J Antimicrob Chemother.* 2002; 50: 625-7.
- 75.** Schrezenmeir J, de Vrese M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics-approaching a definition. *Am J Clin Nutr.* 2001; 73(2 Suppl): 361S-364S.
- 76.** Brown F, Driver SR, Briggs C. The Abridged Brown-Driver-Briggs Hebrew-English Lexicon of the Old Testament. Text provided by Princeton Theological Seminary 1906 Houghton, Mifflin and Company: 326.
- 77.** Wenham GJ. World Biblical Commentary Volume 2 Genesis 16-50. Dallas, Texas: Word Books, Publisher, 1998.
- 78.** Carre C. Über Antagonisten unter den Bacterien. *Correspondenz-Blatt für Schweizer Aerzte* 1887; 17:385-92. (Cytowane za <sup>75</sup>).
- 79.** Tissier H. Traitement des infections intestinales par la methode de la flore bacterienne de l'intestin. *CR.Soc Biol.*1906; 60:359-361. (Cytowane za <sup>75</sup>).
- 80.** Metchnikoff E. Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction. W: The prolongation of life: Optimistic studies. W.Heinemann, London. 1907:161-183. (Cytowane za <sup>75</sup>).
- 81.** Morelli L. In vitro selection of probiotic Lactobacilli: a critical appraisal. *Curr.Issues Intest.Microbiol.* 2000; 1: 59-67.
- 82.** Nissle A. Über die Grundlagen einer neuen ursaechl Bekaempfung der pathologischen Darmflora. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 1916; 42:1181-4. (Cytowane za <sup>75</sup>).
- 83.** Rettger LF, Cheplin HA. A treatise on the transformation of the intestinal flora with special reference to the implantation of bacillus acidophilus and its therapeutic application. London: Yale University Press, 1935. (Cytowane za <sup>75</sup>).



- 
- 84.** Kopeloff N. *Lactobacillus acidophilus*. Baltimore: Williams&Wilkins, 1926. (Cytowane za <sup>75</sup>).
- 85.** Bohnhoff N, Drake BL, Muller CP. Effect of streptomycin on susceptibility of the intestinal tract to experimental salmonella infection. *Proc Soc Exp Biol Med* 1954; 86:132-7. (Cytowane za <sup>75</sup>).
- 86.** Freter R. The fatal enteric cholera infection in the guinea pig. *Bacteriol Proc* 1954:56. (Cytowane za <sup>75</sup>).
- 87.** Freter R. Experimental enteric *Shigella* and *Vibrio* infections in mice and guinea pigs. *J Exp Med* 1956; 104:411-8. (Cytowane za <sup>75</sup>).
- 88.** Collins FM, Carter PB. Growth of salmonellae in orally infected germ free mice. *Infect Immun* 1978; 21:41-7. (Cytowane za <sup>75</sup>).
- 89.** Lilly DM, Stillwell RH. Probiotics: growth promoting factors produced by micro-exorganisms. *Science* 1965; 147: 747-8. (Cytowane za <sup>75</sup>).
- 90.** Sperti GS. Probiotics. West Point, CT: Avi Publishing Co, 1971. (Cytowane za <sup>75</sup>).
- 91.** Parker RB. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim Nutr Health* 1974; 29:4-8. (Cytowane za <sup>75</sup>).
- 92.** Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 1989; 66: 365-78.
- 93.** Havenaar R, Huis In't Veld MJH. Probiotics: a general view. W: *Lactic acid bacteria in health and disease*. Vol 1. Amsterdam: Elsevier Applied Science Publishers, 1992. (Cytowane za <sup>75</sup>).
- 94.** Salminen S. Uniqueness of probiotic strains. *IDF Nutr News Lett* 1996; 5:16-8. (Cytowane za <sup>75</sup>).
- 95.** Schaafsma G. State of art concerning probiotic strains in milk products. *IDF Nutr News Lett* 1996; 5: 23-4. (Cytowane za <sup>75</sup>).
- 96.** Bernardeau M, Vernoux JP, Gueguen M. Safety and efficacy of probiotic lactobacilli in promoting growth in post-weaning Swiss mice. *Int J Food Microbiol*. 2002; 77: 19-27.
- 97.** Jijon H, Backer J, Diaz H, Yeung H, Thiel D, McKaigney C, De Simone C, Madsen K. DNA from probiotic bacteria modulates murine and human epithelial and immune function. *Gastroenterology*. 2004;126:1358-73.
- 98.** Rachmilewitz D, Katakura K, Karmeli F, Hayashi T, Reinus C, Rudensky B, Akira S, Takeda K, Lee J, Takabayashi K, Raz E. Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology*. 2004; 126: 520-8.

- 
- 99.** Szajewska H. Probiotyki w chorobach biegunkowych. Probiotyki - znaczenie w terapii chorób przewodu pokarmowego; Med.-Media 2004: 13-21.
- 100.** Heyman M, Menard S. Probiotic microorganisms: how they affect intestinal pathophysiology. *Cell Mol Life Sci.* 2002; 59:1151-65.
- 101.** Holzapfel WH, Haberer P, Geisen R, Bjorkroth J, Schillinger U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am J Clin Nutr.* 2001; 73(Suppl):365S-373S.
- 102.** Fuller R. Probiotics in human medicine. *Gut* 1991; 32: 439-42.
- 103.** Salminen S. Functional dairy foods with *Lactobacillus* strain GG. *Nutr Rev.* 1996; 54:S99-101.
- 104.** Tuomola E, Crittenden R, Playne M, Isolauri E, Salminen S. Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *Am J Clin Nutr.* 2001; 73(2 Suppl): 393S-398S.
- 105.** Marteau P, Shanahan F. Basic aspects and pharmacology of probiotics: an overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2003; 17: 725-740.
- 106.** Teitelbaum JE. Probiotics and the treatment of infectious diarrhea. *Pediatr Infect Dis J.* 2005; 24: 267-268.
- 107.** Ericson KL, Hubbard NE. Probiotic immunomodulation in health and disease. *J. Nutr.* 2000; 130:403S-409S.
- 108.** Heyman M. Effect of lactic acid bacteria on diarrheal diseases. *J Am Coll Nutr.* 2000; 19(2 Suppl):137S-146S.
- 109.** Clancy R. Immunobiotics and the probiotic evolution. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2003; 38: 9-12.
- 110.** Sarem-Damerdjii LO, Sarem F, Marchal L, Nicolas JP. In vitro colonization ability of colon mucosa by exogenous *Lactobacillus* strains. *FEMS Microbiol Lett.* 1995; 131:133-7.
- 111.** Silva M, Jacobus NV, Deneke C, Gorbach SL. Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31: 1231-3.
- 112.** Wilson KH, Perini I. Role of competition for nutrients in suppression of *Clostridium difficile* by the colonic microflora. *Infect Immun* 1988; 56: 2610-4.
- 113.** Vanderberg PA. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiol Rev* 1993; 12: 221-38.

- 
- 114.** Czrucka D, Roux I, Rampal P. *Saccharomyces boulardii* inhibits secretagogue-mediated adenosine 3',5'-cyclic monophosphate induction in intestinal cells. *Gastroenterology* 1994; 106: 65-72.
- 115.** Pothoulakis C, Kelly CP, Joshi MA, Gao N, O'Keane CJ, Castagliuolo I, Lamont JT. *Saccharomyces boulardii* inhibits *Clostridium difficile* toxin A binding and enterotoxigenicity in rat ileum. *Gastroenterology* 1993; 104: 1108-15.
- 116.** De Simone C, Ciardi A, Grassi A, Lambert Gardini S, Tzantzoglou S, Trinchieri V, Moretti S, Jirillo E. Effect of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* on gut mucosa and peripheral blood B lymphocytes. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1992; 14: 331-40.
- 117.** Perdigon G, de Macias ME, Alvarez S, Oliver G, de Ruiz Holgado AA. Effect of perorally administered lactobacilli on macrophage activation in mice. *Infect Immun.* 1986; 53: 404-10.
- 118.** De Simone C The role of probiotics in modulation of the immune system in man and in animals. *Int J Immunother* 1993; 9: 23-8.
- 119.** Pessi T, Sutas Y, Hurme M, Isolauri E. Interleukin-10 generation in atopic children following oral *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Clin Exp Allergy.* 2000; 30:1804-8.
- 120.** Isolauri E, Sutas Y, Kankaanpää P, Arvilommi H, Salminen S. Probiotics: effects on immunity. *Am J Clin Nutr* 2001; 73(suppl):444S-50S.
- 121.** Mack DR, Michail S, Wei S, McDougall L, Hollingsworth MA. Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *Am J Physiol.* 1999; 276:G941-50.
- 122.** Isolauri E, Salminen S, Ouwehand AC. Probiotics. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2004; 18: 299-313.
- 123.** Gronlund MM, Arvilommi H, Kero P, Lehtonen OP, Isolauri E. Importance of intestinal colonisation in the maturation of humoral immunity in early infancy: a prospective follow up study of healthy infants aged 0-6 months. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2000;83:F186-F192.
- 124.** Gronlund MM, Lehtonen OP, Eerola E, Kero P. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1999; 28:19-25.
- 125.** Edwards CA, Parrett AM. Intestinal flora during the first months of life: new perspectives. *Br J Nutr.* 2002; 88 Suppl 1, S11-S18.
- 126.** Mountzouris KC, McCartney AL., Gibson GR. Intestinal microflora of human infants and current trends for its nutritional modulation. *Br J Nutr.* 2002; 87: 405-420.

- 
- 127.** Collins DM, Gibson GR. Probiotics, prebiotics, and synbiotics - approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am J Clin Nutr.* 1999; 69(suppl): 1052S-10574S.
- 128.** Mändar R, Mikelsaar M. Transmission of Mother's Microflora to the Newborn at Birth. *Biol Neonate.* 1996; 69:30-35.
- 129.** Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr.* 1998; 69(suppl):1035S-45S.
- 130.** Sghir A, Dore J, Mackie RI. Molecular diversity and phylogeny of human colonic bacteria. 8-th International Symposium on Microbial Ecology Halifax, Canada 1999; [plato.acadiau.ca/isme/Symposium14/sghir.PDF](http://plato.acadiau.ca/isme/Symposium14/sghir.PDF).
- 131.** Cooperstock MS, Zedd AJ. Intestinal flora of infants. W: Hentges DJ, ed. *Human intestinal microflora in health and disease.* New York: Academic Press, 1983:79–99. (Cytowane za <sup>129</sup>)
- 132.** Tannock GW. A Special Fondness for Lactobacilli - Minireviews Appl. Environ. Microbiol. 2004; 70: 3189-94.
- 133.** Ouwehand A, Isolauri E, Salminen S. The role of the intestinal microflora for the development of the immune system in early childhood. *Eur J Nutr.* 2002; 41 Suppl 1:132-7.
- 134.** Ouwehand AC, Salminen S, Arvola T, Ruuska T, Isolauri E. Microbiota Composition of the Intestinal Mucosa: Association with Fecal Microbiota? *Microbiol Immunol.* 2004; 48: 497-500.
- 135.** Tannock GW. Molecular assessment of intestinal microflora. *Am J Clin Nutr.* 2001;73(suppl):410S-4S.
- 136.** Zoetendal EG, Wright A, Veilpponen-Salmela T, Ben-Amor K, Akkermans AD, Vos WM. Mucosa-Associated Bacteria in the Human Gastrointestinal Tract Are Uniformly Distributed along the Colon and Differ from the Community Recovered from Feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002; 68: 3401-3407.
- 137.** Lammers KM, Brigidi P, Vitali B, Gionchetti P, Rizzello F, Caramelli E, Matteuzzi D, Campieri M. Immunomodulatory effects of probiotic bacteria DNA: IL-1 and IL-10 response in human peripheral blood mononuclear cells. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2003; 38:165-72.
- 138.** Macfarlane GT, Cummings JH. Probiotics, infection and immunity. *Curr Opin Infect Dis.* 2002;15: 501-6.

- 
- 139.** Strus M, Pakosz K, Gosciniak H, Przondo-Mordarska A, Rozynek E, Pituch H, Meisel-Mikolajczyk F, Heczko PB. Antagonistyczne działanie bakterii z rodzaju *Lactobacillus* wobec beztlenowych i mikroaerofilnych czynników zakażeń przewodu pokarmowego (*Helicobacter pylori*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium difficile*). *Med Dosw Mikrobiol.* 2001;53:133-42.
- 140.** Bhatnagar S, Singh KD, Sazawal S, Saxena SK, Bhan MK. Efficacy of milk versus yogurt offered as part of a mixed diet in acute noncholera diarrhea among malnourished children. *J Pediatr.* 1998; 132: 999-1003.
- 141.** Boulloche J, Miuterde O, Millet E. Management of acute diarrhoea In infants and young children. Controlled study of the anti-diarrheal efficacy of killed *L.acidophilus* (LB strain) versus a placebo and a reference drug (loperamide). *Annales de Pediatrie* 1994; 41:457-63. (Cytowane za <sup>4</sup>).
- 142.** Simakachorn N, Pichaipat V, Rithipornpaisarn P, Kongkaew C, Tongpradit P, Varavithya W. Clinical evaluation of the addition of lyophilized, heat-killed *Lactobacillus acidophilus* LB to oral rehydration therapy in the treatment of acute diarrhea in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2000; 30: 68-72.
- 143.** Bruno F, Frigerio G. Eine neuartige möglichkeit zur behandlung der enteritis – kontrollierte Hoppel-blindversuche mit dem Stamm SF 68. *Schweizerische Rundschau für Medizin Praxis.* 1981; 70:1717-20. (Cytowane za <sup>4</sup>).
- 144.** Bruno F, Nastasi A, Bruno M. Double-blind controlled study of the effect of the lactogenic enterococcus SF68 strain on various enterocolitis associated manifestations and on salmonella infections] *Clin Ter.* 1983; 105:203-7. (Cytowane za <sup>4</sup>).
- 145.** Buydens P, Debeuckelaere S. Efficacy of SF 68 in the treatment of acute diarrhea. A placebo-controlled trial. *Scand J Gastroenterol.* 1996; 31: 887-91. (Cytowane za <sup>4</sup>).
- 146.** Carague-Orendain A. Randomised, double blind placebo-controlled trial on the efficacy and safety of *lactobacillus* (Infloran Berna capsules) In treatment of acute non-bloody diarrhoea In children two to five years of age. (Cytowane za <sup>4</sup>)
- 147.** Cetina-Sauri G, Sierra Basto G. Evaluation therapeutique de *Saccharomyces boulardii* chez des enfants souffrant de diarrhee aigue. *Annales de Pediatrie* 1994; 41:397-400. (Cytowane za <sup>4</sup>)
- 148.** Höchter W, Chale D, Hagenhoff G. *Saccharomyces boulardii* bei acuter Erwachsenenendiarrhoea. *Münchener medizinische Wochenschrift.* 1990; 132:188-92. (Cytowane za <sup>4</sup>).
- 149.** D'Apuzzo V, Salzburg R. Die Behandlung der akuten Diarrhoea In der Pediatrie mit *Streptococcus faecium*: Resultae einer doppelblindstudie. *Therapeutische Umschau* 1982; 39:1033-5. (Cytowane za <sup>4</sup>)

- 
- 150.** Guandalini S, Pensabene L, Zikri MA, Dias JA, Casali LG, Hoekstra H, Kolacek S, Massar K, Micetic-Turk D, Papadopoulou A, de Sousa JS, Sandhu B, Szajewska H, Weizman Z. Lactobacillus GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: a multicenter European trial. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2000; 30:54-60.
- 151.** Guarino A, Canani RB, Spagnuolo MI, Albano F, Di Benedetto L. Oral bacterial therapy reduces the duration of symptoms and of viral excretion in children with mild diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1997; 25: 516-9.
- 152.** Isolauri E, Kaila M, Mykkanen H, Ling WH, Salminen S. Oral bacteriotherapy for viral gastroenteritis. *Dig Dis Sci.* 1994; 39: 2595-600.
- 153.** Isolauri E, Juntunen M, Rautanen T, Sillanauke P, Koivula T. A human Lactobacillus strain (Lactobacillus casei sp strain GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. *Pediatrics.* 1991; 88: 90-7.
- 154.** Oandasani M, Gatcheco F, Kapahmngan S. Randomized, double blind placebo-controlled clinical trial on the efficacy and safety of Infloran berna capsules in the treatment of acute non-bloody diarrhea in infants. *Niepublikowane (Cytowane za <sup>4</sup>).*
- 155.** Pant AR, Graham SM, Allen SJ, Harikul S, Sabchareon A, Cuevas L. Lactobacillus GG and acute diarrhoea in young children in the tropics. *Journal of Tropical Pediatrics* 1996; 42(3):162-5. (Cytowane za <sup>4</sup>).
- 156.** Raza S, Graham SM, Allen SJ, Sultana S, Cuevas L, Hart CA. Lactobacillus GG promotes recovery from acute nonbloody diarrhea in Pakistan. *Pediatr Infect Dis J.* 1995;14: 107-11.
- 157.** Shornikova AV, Isolauri E, Burkanova L, Lukovnikova S, Vesikari T. A trial in the Karelian Republic of oral rehydration and Lactobacillus GG for treatment of acute diarrhoea. *Acta Paediatr.* 1997; 86: 460-5.
- 158.** Rosenfeldt V, Michaelsen KF, Jakobsen M, Larsen CN, Moller PL, Pedersen P, Tvede M, Weyrehter H, Valerius NH, Paerregaard A. Effect of probiotic Lactobacillus strains in young children hospitalized with acute diarrhea. *Pediatr Infect Dis J.* 2002; 21: 411-6.
- 159.** Rosenfeldt V, Michaelsen KF, Jakobsen M, Larsen CN, Moller PL, Tvede M, Weyrehter H, Valerius NH, Paerregaard A. Effect of probiotic Lactobacillus strains on acute diarrhea in a cohort of nonhospitalized children attending day-care centers. *Pediatr Infect Dis J.* 2002; 21: 417-9.
- 160.** Shornikova AV, Casas IA, Mykkanen H, Salo E, Vesikari T. Bacteriotherapy with Lactobacillus reuteri in rotavirus gastroenteritis. *Pediatr Infect Dis J.* 1997;16:1103-7.
- 161.** Shornikova AV, Casas IA, Isolauri E, Mykkanen H, Vesikari T. Lactobacillus reuteri as a therapeutic agent in acute diarrhea in young children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1997; 24: 399-404.

- 
- 162.** Sugita T, Togawa M. Efficacy of Lactobacillus preparation biooactis powder in children with rotavirus enteritis. Japan Journal of Pediatrics 1994; 47:2755-62. (cytowane za <sup>4</sup>)
- 163.** Kurugol Z, Koturoglu G. Effects of Saccharomyces boulardii in children with acute diarrhoea. Acta Paediatr. 2005; 94: 44-7.
- 164.** Kowalska-Duplaga K, Fyderek K, Szajewska H, Janiak R. Ocena skuteczności preparatu Trilac® w leczeniu ostrej biegunki u niemowląt i małych dzieci – wieloośrodkowe badanie z randomizacją metodą podwójnie ślepej próby z placebo. PW 2004; 6: 295-299.
- 165.** Indeks Leków Medycyny Praktycznej 2005.
- 166.** Strus M, Kukla G, Rurańska-Smutnicka D, Przondo-Mordarska A, Heczko P. Właściwości powierzchniowe bakterii z rodzaju Lactobacillus. I. Właściwości hemaglutynacyjne i hydrofobowe. Med Dosw Mikrobiol. 2001; 53: 245-51.
- 167.** Strus M, Kukla G, Rurańska-Smutnicka D, Przondo-Mordarska A, Heczko P. Właściwości powierzchniowe bakterii z rodzaju Lactobacillus. II. Adherencja do linii komórkowych. Med Dosw Mikrobiol. 2001;53(3):253-8.
- 168.** The Cochrane Library, Issue 4, 2003. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd
- 169.** Kowalska-Duplaga K. Ocena działania preparatu Lactobif (*Bifodobacterium ruminatum*) w ostrej biegunce rotawirusowej oraz wpływ na odpowiedź immunologiczną przeciwko rotawirusom. Praca doktorska CMUJ Kraków 2002.
- 170.** Salazar-Lindo E, Miranda-Langschwager P, Campos-Sanchez M, Chea-Woo E, Sack RB. Lactobacillus casei strain GG in the treatment of infants with acute watery diarrhea: a randomized, double-blind, placebo controlled clinical trial [ISRCTN67363048]. BMC Pediatrics 2004; 2; 4:18.
- 171.** Timmerman HM, Koning CJ, Mulder L, Rombouts FM, Beynen AC. Monostrain, multistain and multispecies probiotics - a comparison of functionality and efficacy. Int J Food Microbiol. 2004; 96: 219-233.
- 172.** Saxelin M, Elo S, Salminen S, Vapaatalo M. Dose response colonization of faeces after oral administration of Lactobacillus casei strain GG. Microb Ecol Health Dis. 1991; 4: 1-8.
- 173.** Szajewska H, Albrecht P, Hoekstra H, Mrukowicz JZ, Albrecht K. Praktyka lecznicza w ostrej biegunce u dzieci w Polsce a zalecenia Europejskiego Towarzystwa Gastroenterologii, Hepatologii i Żywienia Dzieci. Pediatr. Pol. 2000; 6: 465-473.
- 174.** Szajewska H, Mrukowicz JZ. Analiza dowodów skuteczności klinicznej preparatów probiotycznych zarejestrowanych w Polsce w leczeniu i zapobieganiu ostrej biegunce infekcyjnej u niemowląt i małych dzieci. Pediatr. Pol. 2002; 77: 495-500.

---

**175.** Oberhelman RA, Gilman RH, Sheen P, Taylor DN, Black RE, Cabrera L, Lescano AG, Meza R, Madico G. A placebo-controlled trial of *Lactobacillus* GG to prevent diarrhea in undernourished Peruvian children. *J Pediatr.* 1999;134:15-20.

**176.** Rautanen T, Isolauri E, Salo E, Vesikari T. Management of acute diarrhoea with low osmolarity oral rehydration solutions and *Lactobacillus* strain GG. *Arch Dis Child.* 1998; 79:157-60.