



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **313685**

(13) B1

(51) Int Cl⁷ A 61 K 31/702, A 61 P 1/12

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19974490	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	1996.04.04, PCT/US96/04665
(22) Inng. dag	1997.09.29	(85) Videreføringsdag	1997.09.29
(24) Løpedag	1996.04.04	(30) Prioritet	1995.04.05, US. 417411
(41) Alm. tilgj.	1997.09.29		1995.04.05, US. 417413
(45) Meddelt dato	2002.11.18		

(71) Patenthaver	Abbott Laboratories, D377 AP6D, 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064-3500, US
(72) Oppfinner	Keith Allen Garleb, Powell, OH 43065, US Brian Warren Wolf, Newark, OH 43055, US Jonathan Allan Meulbroek, Grayslake, IL 60030, US Keith Brian Wheeler, Dublin, OH 43017, US Shelia Martinson Campbell, Worthington, OH 43085, US Joseph Edward Walton, Westerville, OH 43081, US
(74) Fullmektig	Oslo Patentkontor AS, 0306 Oslo

(54) **Benevnelse** **Oral rehydreringsløsning**

(56) **Anførte publikasjoner** Databasen MEDLINE, an=95141025
Databasen MEDLINE, an=94253588
US 5164192
Databasen CA (STN), an=116:20148

(57) **Sammendrag** Den primære etiologi til antibiotika-assosiert diaré (også kjent som pseudomembranøs kolitt) er kjent å være *Clostridium difficile*. Det er antatt at den iboende mikroflora i et friskt individ undertrykker den normalt foreliggende *C. difficile*. Når det iboende flora imidlertid forstyrres (f. eks. under antibiotika behandling), kan overvekst av *C. difficile* inntreffe, hvilket forårsaker diaré og kolitt. Behandling av *C. difficile* med antibiotika har vist seg å være effektiv, men ofte inntrer tilbakefall; og dehydrering som følge av diaré er et forverrende problem. Det har blitt foreslått at normalisering av mikrofloraen vil inhibere *C. difficile*-tilbakefall. Ufordøyelige oligosakkarider har vist seg å inhibere *C. difficile*-infeksjon. En oral rehydreringsløsning inneholdende slike ufordøyelige oligosakkarider tilveiebringer fluid- og elektrolytterstatning.

Den foreliggende oppfinnelse vedrører en oral rehydrering-sløsning inneholdende et ufordøyelige oligosakkarid.

Vellykket behandling av diaré er fortsatt en stor utfordring. Akutt diaré medfører både fluid- og elektrolytt-deplesjon. Gjennom lang tid er det empirisk utviklet fremgangsmåter ved forebygging og behandling av akutt diaré. Umiddelbar administrasjon av en oral løsning kan forebygge utviklingen av dehydrering og elektrolyttubalanser. Kun i det siste har leger fått tilgang til kunnskap om diarés etiologi og patofysiologi, hvilken kunnskap gjør de mulig å få en mer rasjonell behandlingsbasis. *Clostridium difficile* (*C. difficile*) er ofte involvert i diaré. Risikoen for diaré er økt under overbefolkede leve- og arbeidsforhold, spesielt når sannsynligheten for fekal-oral transmisjon av enteriske patogener er høy.

C. difficile er kjent som den ledende årsak til nosokomiale infeksjoner. Greenough et al., "Diarrhea in the elderly", PRINCIPLES OF GERIATRIC MEDICINE AND GERONTOLOGY, Hazzard, et al., (red.), New York, McGraw-Hill, s. 1168-1176 (1990); Mc Farland et al., "A Randomized Placebo-Controlled Trial of *Saccharomyces boulardii* in Combination with Standard Antibiotics for *Clostridium difficile* Disease", JOURNAL OF THE AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION, 271(24):1913-1918 (1994). Den største risiko for å få *C. difficile*-infeksjon involverer normalt et kirurgisk inngrep (normalt av den gastrointestinale type) kombinert med antibiotisk terapi. Ofte bidrar ikke diettene slike pasienter konsumerer verken til etablering eller opprettholdelse av de normale intestinale bakterier. Videre kan *C. difficile* være endemisk i langtids-behandlingsfasiliteter for eldre hvor diaréutbrudd er vanlig. Bender et al., "Is *Clostridium difficile* endemic on chronic-care facilities?", THE LANCET, 2:11-13 (1986).

Det er også økonomiske konsekvenser ved infeksjon av dette patogen da pasienter som erverver sykdommer forårsaket av

C. difficile trenger lengre sykehusopphold, hvilket resulterer i ytterligere helsemessige behandlingsomkostninger. Kofsky et al., "*Clostridium difficile* - a common and costly colitis", DISEASES OF THE COLON AND RECTUM, 34:244-248 (1991) oppga at *C. difficile*-infeksjoner resulterte i ekstra helsemessige behandlingsomkostninger på \$ 2.000-5.000 per episode. Ytterligere var kostnaden til Medicare ved hospitalisering med en primær diagnose på dehydrering 446 millioner dollar i 1991. Warren et al., "The Burden and Outcome Associated with Dehydration among U.S. Elderly, 1991", AMERICAN JOURNAL OF PUBLIC HEALTH, 84(8):1265-1269 (1994). Videre har det vist seg at pasienter som er blitt infisert under et sykehusopphold, sprer infeksjonen til fasiliteter for forlenget behandling og sitt miljø. Bender et al., "Is *Clostridium difficile* endemic in chronic-care facilities?", THE LANCET, 2:11-13 (1986); Bennet et al., "*C. difficile* diarrhea: A common-and overlooked-nursing home infection", GERIATRICS, 45:77-87 (1990); Kofsky et al., "*Clostridium difficile* - a common and costly colitis", DISEASES OF THE COLON AND RECTUM, 34:244-248 (1991); Mulligan et al., "Contamination of a Hospital Environment by *Clostridium difficile*", CURRENT MICROBIOLOGY, 3:173-175(1979). Thomas et al., "Postantibiotic colonization with *Clostridium difficile* in nursing home patients", JOURNAL OF THE AMERICAN GERIATRICS SOCIETY, 38:415-420 (1990) oppga at "...postantibiotisk *C. difficile*-infeksjon tjener som en markør på død hos pleiehjemspasienter, en som kan skilles fra risikoen ved antibiotisk behandling alene."

C. difficile er en sporedannende, obligat anaerob basill. Den er en komponent i den normale intestinale flora hos om lag 3-5 % friske voksne, men kan finnes i avføringen på opptil 15-20 % voksne som er pasienter på sykehus og så mange som 50 % asymptomatiske spedbarn. Fekety, "Antibiotic-Associated Diarrhea", DIARRHEAL DISEASES, red. Field, s. 293-317 (1991).

Når patogene stammer av *C. difficile* er etablert i kolonen, produserer de toksiner som forårsaker diaré og kolitt.

Banno et al., "Two toxins (D-1 and D-2) of *Clostridium difficile* causing antibiotic-associated colitis:

- 5 Purification and some characterization", BIOCHEMISTRY INTERNATIONAL, 2:625-635 (1981); Taylor et al., "Comparison of two toxins produced by *Clostridium difficile*", INFECTION AND IMMUNITY, 34:1036-1043 (1981). *C. difficile* produserer to store proteineksotoksiner kjent som toksin A og toksin
- 10 B. Toksin A forårsaker fluidsekresjon, mukosal skade og intestinal inflammasjon når det injiseres til gnager-innvoller. Triadafilopoulos et al., "Differential effects of *Clostridium difficile* toxins A and B on rabbit ileum", GASTROENTEROLOGY, 93:273-279 (1987). Toksin B er et mer
- 15 potent toksin enn toksin A som et cytotoxin i vevskultur, men er ikke enterotoksisk i dyr. Kelly et al., "*Clostridium difficile* Colitis", THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, 330(4):257-262 (1994). En *C. difficile*-infeksjon etterfølges ofte av dehydrering som følge av diaré.
- 20 Toksin A (kjent som toksin D-2 i japansk litteratur) er et enterotoksin og er antatt å være den primære mediator av *C. difficile*-assosiert sykdom. Det har en molekylvekt (MW) på om lag 308.000. Toksin B (kjent som toksin D-1 i japansk litteratur) er et cytotoxin og har en molekylvekt på om
- 25 lag 270.000. Det er antatt at toksin A forårsaker vevsskade i den gastrointestinale trakt, og denne skade forverres av toksin B som gir diaré og kolitt.

Infeksjon med *C. difficile* manifesterer seg klinisk som ikke-komplisert diaré, ikke-spesifikk kolitt eller mest

- 30 alvorlig som pseudomembranøs kolitt (PMC). Død kan inntreffe som følge av komplikasjoner så som dehydrering, toksisk megakolon eller intestinal perforasjon. McFarland et al., "Nocosomial Acquisition of *Clostridium difficile* Infection", THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, 320:204-
- 35 210 (1989); Brown et al., "Risk Factors for *Clostridium difficile* Toxin-Associated Diarrhea", INFECTION CONTROL

HOSPITAL EPIDEMIOLOGY, 11(6):283-290 (1990). *C. difficile* kolitt kan inntreffe i alle aldre, men den er mest vanlig i eldre og svekkede pasienter. Den er relativt sjelden i spedbarn selv om organismen ofte finnes i deres avføring, og følger normalt kun bruk av antibiotika. Fekety, "Antibiotic-Associated Diarrhea", DIARRHEAL DISEASES, Field (red.), utgitt av Elsevier, s. 293-317 (1991). Infeksjon av *C. difficile* er ansvarlig for alle tilfeller av pseudomembranøs kolitt og for opptil 20 % av tilfellene av antiobiotika-assosiert diaré med kolitt. Kelly et al., "Clostridium difficile Colitis", THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, 330(4):257-262 (1994); McFarland et al., "Risk factors for Clostridium difficile carriage and C. difficile-associated diarrhea in a cohort of hospital patients", JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, 162:678-684 (1990).

C. difficile standhaftighet som et nosokomialt patogen forenkles med den letthet hvorved den overføres i sykehusmiljøet og ved den utbredte anvendelse av antibiotika. Antibiotika gitt ved behandling av sågar små infeksjoner og administrert via enhver rute kan presipitere PMC. Praktisk talt ethvert antimikrobielt middel som anvendes ved behandling av humane infeksjoner, innbefattende de som hyppigst anvendes ved behandling av sykdom, er kjent for å tilskynde PMC. Fekety, "Antibiotic-Associated Diarrhea", DIARRHEAL DISEASES, Field (red.), utgitt av Elsevier, s. 293-317 (1991). PMC kan inntreffe i perioden umiddelbart (nesten alltid innen 6 uker) etter at bruken av antibiotika har blitt avsluttet, i løpet av denne perioden har enda ikke den normale intestinale flora nådd normale nivåer, og dette fravær av normal flora gir *C. difficile* mulighet til å vokse til skadelige populasjonsnivå. Fekety, "Antibiotic-Associated Diarrhea", DIARRHEAL DISEASES, Field (red.), utgitt av Elsevier, s. 293-317 (1991). Standardbehandlingen av *C. difficile*-assosiert sykdom er administrasjon av antibiotikaen vancomycin eller metronidazol. Ingen nye antibiotika-behandlinger har vist

seg effektive i kliniske forsøk. Fekety et al., "Diagnosis and Treatment of *Clostridium difficile* colitis", JOURNAL OF THE AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION, 269:71-75 (1993); Kelly et al., "Clostridium difficile Colitis", THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, 330(4):257-262 (1994). Standard antibiotisk behandling er effektiv for 80 % av pasientene med *C. difficile*-assosiert sykdom (CDD), men de gjenværende 20 % gjennomgår ytterligere episoder med diaré eller kolitt i den utsatte periode rett etter at antibiotika har blitt avsluttet. Fekety et al., "Treatment of Antibiotic-Associated *Clostridium difficile* Colitis with Oral Vancomycin: Comparison of Two Dosage Regimens", AMERICAN JOURNAL OF MEDICINE, 86:15-19 (1989); Walters et al., "Relapse of antibiotic associated colitis: endogeneous persistence of *Clostridium difficile* during vancomycin therapy", GUT, 24:206-212 (1983); Bartlett et al., "Symptomatic Relapse After Oral Vancomycin Therapy of Antibiotic-Associated Pseudomembranous Colitis", GASTROENTEROLOGY, 78:431-434 (1980). Straks en pasient har hatt et tilbakefall, kan han/hun oppleve gjentatte sykdomsepisoder over flere år. Fekety et al., "Diagnosis and Treatment of *Clostridium difficile* colitis", JOURNAL OF THE AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION, 269:71-75 (1993); Kimmey et al., "Prevention of Further Recurrences of *Clostridium difficile* colitis", JOURNAL OF THE AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION, 269:71-75 (1993); Kimmey et al., "Prevention of Further Recurrences of *Clostridium difficile* Colitis with *Saccharomyces boulardii*", DIGESTIVE DISEASES AND SCIENCES, 35(7):897-901 (1990). I et randomisert, placebo-kontrollert forsøk sammenlignet Johnson et al., "Treatment of asymptomatic *Clostridium difficile* carriers (fecal excretors) with vancomycin or metronidazole", ANNALS OF INTERNAL MEDICINE, 117:297-302 (1990), effektiviteten av vancomycin og metronidazol med hensyn på utrydding av asymptomatiske *C. difficile* fekale ekskretorer som et middel ved kontroll av nosokomiale utbrudd av *C. difficile*-diaré. Det ble funnet at metronidazol ikke var effektiv, og selv om vancomycin var virksom en kort tid, var den

assosiert med en vesentlig større mengde av båret *C. difficile* 2 måneder etter behandling. I konklusjonene ble følgelig ikke antibiotikabehandling anbefalt for asymptomatiske pasienter som utskiller *C. difficile*.

- 5 Gitt det årsaksforhold antibiotika spiller i CDD, kan imidlertid undersøkende alternativer til antibiotika være en mer effektiv strategi ved utvikling av nye behandlinger for disse svekkede tilstander. CDDs vesentlige kliniske byrde og den rolle antibiotika spiller ved å forårsake
10 disse sykdommer, understreker hvor viktig det er å utvikler alternative fremgangsmåter ved forebygging eller behandling.

Oppsummering av oppfinnelsen

- Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en oral
15 rehydreringsløsning omfattende natrium, kalium, klorid, en bikarbonatkilde og et ufordøyelig oligosakkarid som er resistent ovenfor fordøyelse i den humane øvre fordøyelseskanal.

- Disse kan anvendes for å hemme infeksjon av et pattedyr med
20 *Clostridium difficile* ved enterisk administrasjon av en terapeutisk effektiv mengde av løsningen.

- Fortrinnsvis er oligosakkaridet et fruktoologisakkarid så som l-ketose, nystose eller 1^F - β -fruktofuranosylnystose, eller et xylooligosakkarid så som xylobiose, xylotriose
25 eller xylo-tetrose.

Løsningen kan også anvendes ved inhibering av toksin A fra *Clostridium difficile* ved enterisk administrasjon av en terapeutisk effektiv mengde av løsningen.

- Et viktig aspekt ved behandling av akutt diaré er fluid og
30 elektrolytisk erstatning. Fluidterapi kan enten være oral eller intravenøs, avhengig av grad av dehydrering. Orale rehydreringsløsninger er mindre kostbare enn intravenøs

terapi. Når dette har blitt oppnådd, kan andre terapeutiske anliggender adresseres.

Løsningen kan videre anvendes ved behandling av dehydrering assosiert med diaré forårsaket av *Clostridium difficile*-
5 infeksjon ved enterisk administrasjon av rehydreringsløsningen.

Kort beskrivelse av tegningene

Fig. 1A, 1B og 1C er fremstillinger av de kjemiske strukturer av fruktooligosakkarider med anvendelse ifølge den
10 foreliggende oppfinnelse.

Fig. 2A, 2B og 2C er fremstillinger av de kjemiske strukturer av xylooligosakkarider med anvendelse ifølge den foreliggende oppfinnelse.

Fig. 3 og 4 er grafiske fremstillinger av resultatene fra
15 eksempel 1.

Fig. 5 og 6 er grafiske fremstillinger av resultatene fra eksperiment 2.

Fig. 7 og 8 er grafiske fremstillinger av resultatene fra eksempel 3.

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

Som anvendt heri og i kravene, refererer "ufordøyelig oligosakkarid" til en liten karbohydratgruppe (polymerisasjonsgrad mindre enn 20 og/eller en molekylvekt mindre enn 3600) som er resistent ovenfor endogen fordøyelse i den humane øvre fordøyelseskanal. Ufordøyelige
25 oligosakkarider som kan anvendes i foretrukne utførelsesformer ifølge oppfinnelsen, er fruktooligosakkarider og xylooligosakkarider. Ufordøyelige oligosakkarider som kan anvendes i de mest foretrukne
30 utførelsesformer ifølge oppfinnelsen er fruktooligosakkarider valgt fra gruppen omfattende 1-

ketose, nystose og 1^F - β -fruktofuranosyl-nystose- og xylooligosakkarider valgt fra gruppen omfattende xylobiose, xylotriose og xylostetose.

Som anvendt heri, skal "inhiberende" referere både til
5 reduksjon i antall *C. difficile* og forebygging av en økning i antall *C. difficile*.

Fruktooligosakkarider ("FOS") er karbohydratpolymere omfattende en kjede fruktoseresiduer forbundet ved (2 $\rightarrow$ 1)- β -glukosidiske bindinger og normalt bærende en enkelt D-
10 glukosylresidue ved den ikke-reduserende ende av kjeden forbundet (1 $\rightarrow$ 2)-a- så som i sukrose.

FOS opptrer i naturen i mange typer planter innbefattende bananer, tomater, løk, hvete, bygg, honning, asparges og artisjokker. De kan også syntetiseres fra sukrose gjennom
15 anvendelsen av transfruktosylerende enzymer så som enzymet erholdt fra soppen *Aspergillus niger*. Hidaka et al., "Fructooligosaccharides: Enzymatic Preparations and Biofunctions", JOURNAL OF CARBOHYDRATE CHEMISTRY, 10(4):509-522 (1991). Behandling av sukrose med dette enzym
20 resulterer i en blanding av fruktooligosakkarider inneholdende 2-, 3- eller 4-fruktoseresiduer. De resulterende fruktooligosakkarider designeres henholdsvis 1-ketose (GF_2), nystose (GF_3) og 1^F - β -fruktofuranosylnystose (GF_4), hvis kjemiske strukturer er gitt i Fig.1. En fremgangsmåte
25 ved industriell fremstilling av FOS er gitt i U.S. Patent nr. 4.681.771 til Adachi et al..

FOS hydrolyseres ikke av rotte- eller menneskelige fordøyelsesenzymer i tynntarmen og når således tykktarmen intakt. Der anvender mange intestinale mikroorganismer dem.
30 FOS kan anvendes i størst grad av bifidobakterier som er antatt å være svært fordelaktige organismer (Hidaka et al.). De kan ikke nyttiggjøres *in vitro* av visse, uønskede, forråtnelsesbakterier så som *C. perfringens*, *C. difficile* eller *E. coli*.

Karbohydrater som ikke fordøyes i tynntarmen, kan fermenteres til kortkjedete fettsyrer av mikroorganismer funnet i tykktarmen. De kortkjedete fettsyrene anvendes som energikilde for kolonytter og andre organer så som leveren.

5 Det er også vist at FOS reduserer totalt serumkolesterol, sannsynligvis ved å redusere nivå av LDL-kolesterol, og letter konstipasjon ved å akselerere peristaltisk bevegelse (Hidaka et al.).

Xylooligosakkarider ("XOS") fremstilles ved enzymatisk
10 hydrolyse av xylan fra mais, sukkerroe og bomullsfrø. Xylaner hydrolyseres av et *Trichoderma*-avledet enzym-xylanase for å lage XOS. Xylooligosakkarider omfatter i hovedsak to, tre eller fire xylose-enheter med en β -1 $\rightarrow$ 4-binding, xylobiose, xylotriose og xylotetrose, hvis
15 respektive strukturer er gitt i Fig. 2. Xylobiose, hovedkomponenten i XOS, er relativt i overskudd i bambusskudd.

Imaizumi et al., "Effects of xylooligosaccharides on blood glucose, serum and liver lipids and cecum short-chain fatty
20 acids in diabetic rats", AGRICULTURAL AND BIOLOGICAL CHEMISTRY, 55(1):199-205 (1991) sitert fra Fujikawa og Okazaki, Food Chemicals (på japansk) 1:63 (1989).

XOS, har på samme måte som FOS, vist seg å kunne anvendes selektivt av Bifidobakterier *in vitro*, Okazaki et al.,
25 "Effects of xylooligosaccharides on the growth of bifidobacteria", BIFIDOBACTERIA MICROFLORA, 9(2):77-86 (1990). Videre har kliniske studier vist at XOS øker nivået av bifidobakterier gjenvunnet fra fekalier når de suppleres til humane dietter (Okazaki et al.). Ytterligere har
30 *in vitro*-studier vist at potensielle patogen så som *Staphylococcus*, *E.coli*, *C. perfringens* og *C. difficile* ikke evner å nyttiggjøre XOS som en energikilde (Okazaki et al.).

Det er blitt mer og mer åpenbart at mange av de fordelaktige effekter ved fermenterbart karbohydrat medieres av kortkjedede fettsyrer (SCFA) så som acetat, propionat og butyrat, som produseres under anaerob fermentering i kolonen. Kortkjedete fettsyrer spiller en viktig rolle i tarmfunksjonen. Absorpsjonen av 100 mmol SCFA er assosiert med absorpsjonen av 360 ml vann. Casparey et al., "Bacterial fermentation of carbohydrates within the gastrointestinal tract", CLINICAL RESEARCH REVIEW, 1:107-177 (1981). Følgelig vil fraværet av reduksjon av SCFA i kolonen kunne resultere i diaré. Ramakrishna et al., "Colonic dysfunction in acute diarrhea: the role of luminal short chain fatty acids", GUT, 34:1215 (1994) viste at mengden kortkjedede fettsyrer i fekalie fra pasienter med akutt diaré var lav på sykdommens første dag, men økte i løpet av de neste fem dagene etter som pasientens tilstand bedret seg. Ytterligere viste Ramakrishna et al., "Colonic dysfunction in acute diarrhoea: the role of luminal short chain fatty acids", GUT, 34:1215 (1993), ved en in vivo rektal dialyseteknikk at det lumenale SCFA kunne gjenvinne netto vann og natriumreabsorpsjon i rektum hos pasienter med akutt diaré. In vivo perfusjons-studier i friske individer har vist sekresjon av salt og vann i den stigende kolon som respons på enteral føding. Bowling et al., "Colonic secretory effect in response to enteral feeding in man", GUT, 34 (suppl. 1):A54 (1993); Bowling et al., "The colonic secretory response to enteral feeding: influence of high strength diet", CLINICAL NUTRITION, 12 (suppl. 2):23 (1993). Bowling et al., "Reversal by short-chain fatty acids of colonic fluid secretion induced by enteral feeding", LANCET, 342:1266 (1993), undersøkte effekten av kortkjedede fettsyrer på kolonisk fluidsekresjon induisert ved enteral føde. Det ble funnet at SCFA-infusjonen direkte til cøkum i friske individer reverserte fluidsekresjonen som ble observert i den stigende kolon under enteral føde og teoretiserte at disse funnene kunne ha implikasjoner for behandling av diaré relatert til enterale føding.

De ikke-fordøyelige og fordøyelige oligosakkarider, så som
XOS og FOS, og deres selektive nyttegjørelse av fordel-
aktige intestinale bakterier medfører en økning i nærvær av
bifidobakterier og resulterer i produksjon av kortkjedede
5 fettsyrer, som kan senke pH i tykktarmen, og undertrykke
uønskede mikroorganismer og substansene (f. eks. toksinene)
de produserer. Disse aktiviteter ville være gunstige både
for human helse og dyrs helse.

Sammensetninger: *C. difficile*-assosiert diaré kan behandles
10 ved å inhibere nivå av toksin A, og også behandle den
assosierte dehydrering, ved enterisk å administrere
ufordøyelige oligosakkarider i ernæringsmessig
sammensetning. Mens andre ernæringsmessige sammensetninger
selvsagt er innen oppfinnelsens ramme, er slike
15 sammensetninger ideelt orale rehydreringsløsninger for å
lette dehydreringen som er assosiert med diaré. The World
Health Organizations Oral Rehydration Solution (WHO-ORS) er
en modell-ORS utviklet kun for å behandle dehydrering
assosiert med diaré. Den har en spesifikk sammensetning
20 som, i motsetning til vann eller andre alminnelige
husholdningsdrikker, letter rehydrering. Det ideelle
natriuminnhold i ORS er ikke bestemt. WHO-ORS inneholder 90
nEq natrium per liter, men andre ORS inneholdende mindre
mengder har vist seg å være effektive. To typiske,
25 kommersielt tilgjengelige orale rehydreringsløsninger er
beskrevet under.

En meget anvendt, kommersielt tilgjengelig oral
rehydreringsløsning for voksne er Equalyte™ som
distribueres av the Ross Products Division of Abbott
30 Laboratories, Columbus, Ohio, U.S.A.

I 1000 ml tilveiebringer Equalyte™:

Natrium (mEq)	78,2
Kalium (mEq)	22,3

Natrium (mEq)	78,2
Klorid (mEq)	67,6
Citrat (mEq) (en kilde for bikarbonat)	30,1
Dekstrose (g)	25
Kalorier	100

En meget anvendt, kommersiell tilgjengelig oral rehydreringsløsning for spedbarn og barn er Pedialyte® som distribueres av the Ross Products Division of Abbott Laboratories, Columbus, Ohio, U.S.A.

I 1000 ml tilveiebringer Pedialyte®:

Natrium (mEq)	75
Kalium (mEq)	20
Klorid (mEq)	65
Citrat (mEq) (en kilde for bikarbonat)	30
Dekstrose (g)	25
Kalorier	100

Den foreliggende oppfinnelse vedrører tilsats av én eller flere ufordøyerlige oligosakkarider til en oral rehydreringsløsning så som de beskrevet over. Mer spesifikt kan den foreliggende oppfinnelse utøves ved å sette 3-30 g/l (fortrinnsvis 3-18 g/l fruktooligosakkarid til en oral rehydreringsløsning så som Equalyte™ eller Pedialyte® som er beskrevet i den forutgående tekst). For eksempel en oral rehydreringsløsning omfattende natrium, kalium, klorid, en kilde for bikarbonat og en terapeutisk effektiv mengde ufordøyerlig oligosakkarid. Det ufordøyerlige oligosakkarid

kan velges fra fruktooligosakkarider (f. eks. 1-ketose, nystose og 1^F-β-fruktofuranosylnystose) eller xylooligosakkarid (så som xylobiose, xylotriose og xylotetrose).

5 To eksperimenter ble utført for å bestemme effekten av fruktooligosakkarider (FOS) som et diettsupplement på mortalitet i en syrisk hamstermodell for *C. difficile*-kolitt.

Dyremodell for eksperiment 1 og 2

Anvendelsen av den syriske hamster som en modell for *C. difficile*-kolitt er velkjent. Lust et al., "Clindamycin-Induced Enterocolitis in Hamsters", THE JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, 137, 464-475 (1978), foreslo at enterokolitten som ble indusert av antibiotika i hamsterene er en god modell for undersøkelse av syndromet i mennesker.

15 Price et al., "Morphology of experimental antibiotic-associated enterocolitis in the hamster: a model for human pseudomembranous colitis and antibiotic-associated diarrhoea", GUT, 20:467-475 (1979) ønsket å studere morfologi for eksperimentell antibiotikaassosiert pseudomembranous kolitt (PMC). Det ble funnet at hamstermodellen viser noen morfologiske forskjeller, imidlertid er bakteriologi og toksikologi identisk med menneskenes. Det ble konkludert at hamsteren er en god modell for undersøkelse av patogenese av PMC og

25 antibiotikaassosiert enteropati generelt. Faktisk oppga Wilson et al., "Suppression of *Clostridium difficile* by Normal Hamster Cecal Flora and prevention of Antibiotic-Associated Cecitis", INFECTION AND IMMUNITY, 34:626-628 (1981), at studier med hamstermodellen for

30 antibiotikaassosiert kolitt medførte oppdagelsen av *C. difficile* som en viktig etiologi til antibiotisk-assosiert kolitt i mennesker og effektiv behandling med oral vancomycin. Wilson et al., "Population Dynamics of Ingested *Clostridium difficile* in the Gastrointestinal Tract of the

35 Syrian Hamster", THE JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES,

151:355-361 (1985) oppga at den best studerte dyremodell for antibiotikaassosiert kolitt var den syriske hamster.

Materialer og metoder for eksperiment 1 og 2

Dyr: Gyldne, syriske hunnhamstere (6-8 uker gamle, 80-120 g) ble kjøpt fra Harlan Sprague Dawley, Inc., Indianapolis, IN. Dyrene ble tilfeldig fordelt i behandlingsgrupper og holdt i grupper ved $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$. De ble erholdt patogenfrie og huset i henhold til standarder ifølge the Institutional Animal Care Use Committee (IACUC) og the American Association for the Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC). Dyrene ble føret med en standard laboratorie-faststoffdiett (PROLAB®, Agway Country Fods, Inc., Syracuse, NY).

Antibiotika: Hamstere ble medisinerert ved daglig gavage med ciprofloxacin (Miles, Inc., West Haven, CT; 250 mg/kg kroppsvekt/dag) på dag 0-6. Denne medisinerer resulterer i en "antibiotisk sterilisering" av den gastrointestinale system, hvilket tillater naturlig infeksjon (overvekst) av *C. difficile*. Denne "naturlige" infeksjon kan være upålitelig under laboratoriebetingelser, og for å oppnå en konsekvent infiseringsgrad blant dyrene, ble derfor ytterligere behandlinger lagt til eksperimentene for å innbefatte inokulering (tilførsel) av hamstere med *C. difficile* på dag 3 og dag 7.

Inokulum: Et humant isolat av *C. difficile* (stamme VPI 10463) som har vist seg å produsere høye mengder toksin A og toksin B, ble anvendt i studiene. Wilson *et al.*. "Gnotobiotic models for study of microbial ecology of *Clostridium difficile* and *Escherichia coli*", THE JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, 153(3):547-551 (1986); Sullivan *et al.*, "Purification and characterization of toxins A and B of *Clostridium difficile*", INFECTION AND IMMUNITY, 35(3):1032-1040 (1982). *C. difficile* VPI 10463 ble dyrket i BHI (hjerne-hjerte-infusjon, Difco Laboratories, Detroit, MI)-medium på en roterende plattform under anaerobe

betingelser. En over-natten kultur (ONC) har en konsentrasjon på omtrent 10^9 CFU/ml. Hamstere ble inokulert med deres respektive volum av ONC via gavage på dag 3 og dag 7.

5 Eksperimentell utforming

Eksperiment 1

I det første eksperiment ble 41 gylne hunnhamstere tilfeldig fordelt blant 1 av 6 behandlingsgrupper.

Behandlingene ble arrangert i en 2×3 matrise, med 2 nivå av FOS (0 eller 30 g/l i drikkevann) og 3 nivå av *C. difficile* (omtrent 10^9 CFU/ml) inokulasjon (0, 0,05 eller 2,0 ml). Hamstere ble oralt behandlet med ciprofloxacin (250 mg/kg kroppsvekt/dag) fra dag 0 til dag 6 og inokulert med deres egnede volum av en over-natten kultur av *C. difficile* på dag 3 og dag 7.

Eksperiment 2

I det andre eksperiment ble 63 hamstere tilfeldig fordelt i 1 av 8 behandlingsgrupper. Behandlingene ble arrangert i en $2 \times 2 \times 2$ matrise med 2 nivå av FOS (0 eller 30 g/l drikkevann), 2 nivå av *C. difficile*-inokulum (0 eller 2,0 ml) og 2 nivå vancomycin (Eli Lilly, Indianapolis, IN)-medisinering (0 eller 50 mg/kg kroppsvekt/dag). FOS-nivå, ciprofloxacin-dose og inokulasjonsprotokoll var identisk med Eksperiment 1. Hamsterene på vancomycinbehandlingen ble gitt 50 mg/kg kroppsvekt/dag på dagene 7 til 13.

Datainnsamling og statistikker

Eksperiment 1 og 2

Ved død ble overlevelsestid (i dager) notert (målt fra den første dag av ciprofloxacin-medisinering). Dyrene ble fulgt gjennom dag 24 hvoretter eksperimentet ble avsluttet. Overlevelsestidene ble oppsummert som Kaplan-Meier-kurver (Pocock, CLINICAL TRIALS: A PRACTICAL APPROACH, John Wiley & Sons Ltd., New York, New York, USA (1983). Dyr som ikke utåndet ved studiets avslutning fikk sin overlevelsestid

satt til 24 dager. FOS minus kontrollgruppeforskjeller ble undersøkt ved "log rank"-statistikk, og supplementert med den generaliserte Wilcoxon-test. I tillegg til den globale analyse som sammenligner FOS-fôrete dyr med kontroll (dyr
5 som ikke ble fôret med FOS), ble marginale tester for behandlingseffekt utført for flere undergrupper; f. eks. ved mengde tilført *C. difficile*. Testresultater ble gitt som tosidige, med statistisk signifikans vurdert ved P'en mindre enn 0,05. Generelt var resultatene fra de to
10 statistiske forsøkene like. Wilcoxon-testen (Rosner, FUNDAMENTALS OF BIOSTATISTICS, PWS publishers, Boston, Massachusetts, U.S.A. (1986) er utformet for å undersøke forskjellen mellom behandlinger ved tidligere tidspunkt, mens "log rank"-testen (Neter and Wassermann, APPLIED
15 LINEAR STATISTICAL MODELS, 1974, Richard D. Irwin, Inc., Homewood, Illinois, USA (1974) er utformet for å undersøke forskjellen mellom behandlingene ved senere tidspunkt.

Resultater og diskusjon

Eksperiment 1

20 Midlere overlevelsestid (MST) for behandlingsgruppene er gitt i tabell 1. Totalt hadde diettsupplement med FOS (39 g/l i drikkevann) en tendens til å øke MST ($P = 0,09$; "log rank"-statistikk) (Tabell 2). Ved anvendelse av Wilcoxon-testen var den totale effekt av FOS svært signifikant (P
25 mindre enn 0,01). Dersom sammenligningen gjøres kun på de hamstere som ikke ble inokulert (ved å la naturlig infeksjon inntreffe), bedret ikke FOS MST (P større enn 0,20). Som nevnt tidligere, kan det være inkonsekvent å sette sin lit til naturlig infeksjon, og følgelig ble
30 inokulerte dyr innbefattet i eksperimentene. Når sammenligningen gjøres blant de hamstere som får *C. difficile*-inokulasjon (0,5 og 2,0 ml), hadde FOS en svært signifikant effekt (P mindre enn 0,1) på MST. Ytterligere resulterte separasjon av inokulasjonsnivå (0,5 og 2,0 ml) i
35 en høyere MST for hamstere som fikk supplementær FOS (P mindre enn 0,01). Overlevelseskurver for hamstere inokulert med 0,5 og 2,0 ml *C. difficile* er gitt i henholdsvis figur

3 og 4. Disse figurer viser forbedret overlevelsestid for hamstere som ble føret med supplementær FOS. Totalt hadde FOS en tendens til å øke (P mindre enn 0,10) midlere overlevelsestid (MST). Ytterligere ble MST økt (P mindre enn 0,01) for hamstere som konsumerer FOS og som ble
 5 inokulert med 0,5 eller 2,0 ml *C. difficile*.

Tabell 1

Midlere overlevelsestid (MST) for hamstere føret med (+/-) 30 g/l fruktooligosakkarider (FOS) i drikkevann og tilført
 10 ulike mengder *Clostridium difficile* (2,0; 0,5 eller 0 ml).

Gruppe #	n	Inokulasjons- protokoll	FOS i H ₂ O ¹	MST (dager)
1	7	2,0 ml ONC ²	nei	13,0
2	7	0,5 ml ONC ²	nei	14,0
3	7	ingen inokulasjon	nei	15,0
4	7	2,0 ml ONC	ja	14,0
5	7	0,5 ml ONC	ja	16,0
6	6	ingen inokulasjon	ja	16,5

¹FOS ble tilveiebrakt ved 30 g/l i drikkevannet, ad libitum. Tilnærmet vannforbruk var 8 ml/hamster/dag.

²ONC = over-natten kultur av *Clostridium difficile*.

Tabell 2

Midlere overlevelsestid (MST) for hamstere føret med (+/-) 30 g/l fruktooligosakkarider (FOS) i drikkevann og tilført ulike mengder *Clostridium difficile* (2,0; 0,5 eller 0 ml)

Gruppe	30 g FOS/1		Kontroll (Ingen FOS)		Wilcoxon p-verdi	"log rank" p-verdi
	n	MST ¹	n	MST ¹		
Total	20	15,0	21	14,0	0,007	0,09
Ingen inokulasjon	6	16,5	7	15,0	0,51	0,97
Inokulert ²	14	15,0	14	13,5	<0,001	<0,001
0,5 ml ONC ³	7	16,0	7	14,0	0,005	0,005
2,0 ml ONC	7	14,0	7	13,0	<0,001	<0,001

¹MST i dager

² 0,5 ml ONC + 2,0 ml ONC.

³ ONC = over-natten kultur av *C. difficile*

5 Eksperiment 2

Midlere overlevelsestid for behandlingsgruppene er gitt i tabell 3. Som i de tidligere eksperimenter, var den totale effekt av FOS økning av hamsterenes MST (P mindre enn 0,05). I dette eksperiment så det ut til å være en

10 interaksjon mellom vancomycinbehandlingen og inokulasjonsnivå (Tabell 4). Hamstere supplementert med FOS og inokulert med *C. difficile*, men ikke behandlet med vancomycin, tenderte til å ha forbedret MST (P mindre enn 0,10). Imidlertid hadde ikke FOS noen effekt (P større enn

15 0,20) på inokulerte hamstere behandlet med vancomycin. På den annen side økte FOS-supplementeringen MST på ikke-inokulerte hamstere behandlet eller ikke behandlet med vancomycin (henholdsvis P mindre enn 0,05 og P mindre enn 0,01; overlevelseskurver i henholdsvis fig. 5 og 6). Igjen

20 viste overlevelseskurvene fordelene ved tilsats av FOS. Totalt hadde hamstere føret med FOS økt (P mindre enn 0,05) MST. Disse data foreslår at diettssupplement med FOS øker den midlere overlevelsestid i en hamstermodell for *Clostridium difficile*-kolitt.

Tabell 3

Midlere overlevelsestid (MST) for hamstere føret med (+/-) 30 g/l fruktooligosakkarider (FOS) i drikkevann og tilført ulike mengder av *Clostridium difficile* og behandlet med (+/-) med vancomycin

Gruppe #	n	Inokulasjon ¹	FOS i H ₂ O ²	Vancomycin	MST (dager)
1	8	ja	nei	nei	13,0
2	8	ja	nei	ja	20,0
3	8	nei	nei	ja	17,5
4	8	nei	nei	nei	13,5
5	8	ja	ja	nei	14,5
6	8	ja	ja	ja	19,0
7	7	nei	ja	ja	19,0
8	8	nei	ja	nei	16,5

¹Inokulert med en over-natten kultur av *Clostridium difficile* (2,0 ml).

²FOS ble tilveiebrakt ved 30 g/l i drikkevann, ad libitum. Tilnærmet vannforbruk var 8 ml/hamster/dag.

Tabell 4

Midlere overlevelsestid (MST) for hamstere føret med (+/-) 30 g/l fruktooligosakkarider (FOS) i drikkevann, tilført (+/-) *Clostridium difficile* og behandlet (+/-) med vancomycin

Gruppe ¹	30 g/l FOS		Kontroll		Wilcoxon	"log rank"
	n	MST ²	n	MST ²	p-verdi	p-verdi
Totalt	31	18,0	32	16,0	0,027	0,020
N, ingen vanco	8	16,5	8	13,5	0,003	0,001
N, vanco	7	19,0	8	17,5	0,021	0,026
I, ingen vanco	8	14,5	8	13,0	0,07	0,054
I, vanco	8	19,0	8	20,0	0,66	0,95
N	15	19,0	16	15,5	0,007	0,005
I	16	16,5	16	16,5	0,43	0,41
Ingen vanco	16	15,5	16	13,5	0,001	<0,001
Vanco	15	19,0	16	19,0	0,49	0,37

¹I = inokulasjon med en over-natten kultur av *C. difficile*,
N = ingen inokulasjon, vanco = vancomycin

²MST i dager

- 10 Generelt viser resultatene fra eksperiment 1 og 2 at enterisk administrasjon av en terapeutisk effektiv mengde av et ufordøydlig oligosakkarid (FOS) inhiberer infeksjon av et pattedyr med *C. difficile* som vist ved forbedret overlevelsestid i en hamstermodell av *C. difficile*-kolitt.
- 15 Dette har blitt vist ved en økning av overlevelse (i visse behandlingsgrupper) og en konsekvent økning i midlere

overlevelsestid. Imponerende var den forbedrede overlevelsestid på grunn av FOS-supplement høyere enn effekten av fiber inneholdt i faststoffdietten.

Eksperiment 3

- 5 Formål ved eksperiment 3 var å bestemme effekten av å tilføre svært fermenterbart karbohydrat på *C. difficile*-infeksjon i en murin modell som innbefattet antibiotisk administrasjon før patogen(*C. difficile*)-tilførsel. Modellen innbefattet forstyrrelse av tarmflora med det
10 antibiotiske cefotoxin etterfulgt av tilførsel av *C. difficile* (VPI 10463).

Materialer og metoder

- Dyr: Sekstifire BALB/c hannmus (midlere kroppsvekt $19,3 \pm 1,6$ g) ble individuelt holdt i bur av rustfritt stål.
15 Miljø-betingelser ble kontrollert slik at det ble tilveiebrakt en 12 t's lyssyklus og en konstant temperatur på 24°C.

- Dietter: Vann og et ernæringsmessig, balansert, lavresidue, diettpulver (Ensure™) ble gitt *ad libitum*. Kontrollmus ©
20 mottok intet fibersupplement. Tre fermenterbare karbohydratkilder ble gitt til de gjenværende grupper. Gummi arabicum (GA; et pulver) og fruktooligosakkarider (FOS, et pulver) ble blandet med Ensure™-dietten (44 mg fiber/g diettpulver). Xylooligosakkarider (XOS; et sirup)
25 ble blandet med drikkevannet (30 g/l).

- Bakterielle stammer og betingelser: En kjent toksigen stamme av *Clostridium difficile* ble anvendt i studien. Wilson et al., "Gnotobiotic models for study of microbial ecology of *Clostridium difficile* and *Escherichia coli*", THE
30 JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, 153(3):547-551 (1986); Sullivan et al., "Purification and characterization of toxins A and B of *Clostridium difficile*", INFECTION AND IMMUNITY, 35(3):1032-1040 (1982). Organismene ble holdt og dyrket i forsterket clostridialt medium (RCM; Difco,

Detroit, Michigan, U.S.A.) og standard cellesuspensjoner
anvendt som inokula. Alle diluenter og media ble fremstilt
ved anvendelse av rutinemessige anaerobe teknikker. Mackie
et al., "Enumeration of anaerobic bacterial microflora of
5 the equine gastrointestinal tract", APPLIED AND ENVIRON-
MENTAL MICROBIOLOGY, 54:2155-2160 (1988); Meyer et al.,
"Microbiological evaluation of the intraluminal insacculus
digestion technique", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICRO-
BIOLOGY, 51:622-629 (1986).

10 Eksperimentell utførelse

Alle 64 mus konsumerte Ensure™ i tre dager. På dag fire
fikk alle mus 100 µg cefoxitin/g kroppsvekt orogastrisk.
Cefoxitin (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, U.S.A.)
ble løst i vann, og den passende dose ble levert til magen
15 via en gavagenål (22 ga, 2,5 cm). Den følgende dag ble mus
tilfeldig tildelt enten til kontrollen eller ulike
fermenterbare karbohydratbehandlinger og ble føret med
deres respektive dietter i fem dager. Ved dette tidspunkt
ble åtte mus per diett inokulert som beskrevet over med 200
20 µl av en *C. difficile*-suspensjon inneholdende $2,8 \times 10^8$
kolonidannende enheter (CFU)/ml. RCM ble anvendt for å
inokulere de gjenværende mus på hver diett. Avlivning ved
CO₂-kvelning inntraff seks dager etter inokulasjon. Hele
dyreprotokollen var fullført på 15 dager.

25 Datainnsamling og statistikker

Fem fekale prøver ble samlet opp i løpet av eksperimentet
(dagene 2, 5, 8, 12 og 15). Som forklaring er disse
prøvetakingsdager gitt relativt til *C. difficile*-
inokulasjon (dag 0) og er således dagene -7, -4, -1, 3 og
30 6. Ett hundre mg fekalier ble samlet opp fra hvert dyr og
umiddelbart suspendert i 9,9 ml anaerob diluent. Bryan et
al., "Culture methods and some characteristic of some of
the more numerous groups of bacteria in the bovine rumen",
JOURNAL OF DAIRY SCIENCE, 36:205-217 (1953). Fekale prøver
35 ble evaluert ved anvendelse av de følgende respons-
kriterier: antall *C. difficile* på sykloserin-cefoxitin-

fruktose-selektiv agar. George et al., "Selective and differential medium for isolation of *Clostridium difficile*", JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 9:214-219 (1979); toksin A titer ved anvendelse av et enzym-forbundet immunosorbent assay (Tox-A-Test, TECHLAB; Blacksburg, Virginia, U.S.A.).

Behandlingene ble anordnet som en randomisert fullstendig blokk-utforming inne i et "split-plot". Gill et al., "Analysis of repeated measurements of animals", JOURNAL OF ANIMAL SCIENCES, 33:331-336 (1971). Data ble underkastet variansanalyse i henhold til General Linear Models (GLM) prosedyre fra SAS (SAS Institute, "SAS User's Guide: Statistics", SAS Institute Inc., Cary, North Carolina (1988). Behandlingseffekter ble undersøkt ved anvendelse av F-statistikk, og en P-verdi på 0,5 ble valgt som signifikansnivå.

Resultater og diskusjon

Fekale tellinger av *C. difficile* (Tabell 5) ble påvirket av en diett x prøvetakingsdag-interaksjon ($P < 0,01$). Ved starten på eksperimentet (dag - 7) fantes ingen detekterbare tellinger av *C. difficile* ($<10^4$ CFU/g fekalier). Det var interessant å merke seg at etter cefotoxin-dosering (dag -6) og tre dager etter patogen-inokulasjon, var alle mus, innbefattende de ikke-inokulerte mus, blitt infisert med *C. difficile* til en viss grad. For mus som ble føret med kontrolldietten fortsatte *C. difficile* å øke i løpet av eksperimentet. Ved dag seks etter *C. difficile*-inokulasjon, hadde kontrollmusene de høyeste *C. difficile*-tellinger ($127,5 \times 10^5$ CFU/g fekalier), og mus føret med FOS hadde de laveste tellinger (0).

Under den eksperimentelle periode ble toksin A-assayene utført på fekale prøver, og hyppighet (prosent av mus med detekterbart toksin A) og toksin A er gitt i (Tabell 6). Før *C. difficile*-inokulasjon, ble intet toksin A detektert

i fekalier fra noen av musene. Ved dag tre etter inokulasjon ble *C. difficile* og toksin A detektert i praktisk talt hver eneste mus, og musene inokulert med *C. difficile* hadde de høyeste titre (10^4). Seks dager etter inokulasjon hadde mus som konsumerte C- og GA-diettene mer en 50% hyppighet av toksin A mens mus som konsumerte FOS og XOS hadde mindre enn 50% hyppighet av toksin A. Kun mus som konsumerte C- eller GA-dietter og som var inokulert med *C. difficile*, utviklet alvorlig diaré (henholdsvis 37 og 75 %) eller døde (henholdsvis 12,5 og 50 %).

Tabell 5

Effekt av diett, prøvetakingsdag og inokulasjon på <i>Clostridium difficile</i> ¹ i fekalier					
	Prøvetakingsdag ²				
Behandlinger ³	-7	-4	-1	3	6
C+	<10 ⁴	0,1 ^b	5,8 ^c	44,4 ^a	127,5 ^a
C-	<10 ⁴	0,1 ^b	53,9 ^a	22,0 ^{ab}	147,6 ^a
GA+	<10 ⁴	0,1 ^b	32,9 ^b	31,6 ^b	4,3 ^c
GA-	<10 ⁴	1,2 ^a	10,3 ^c	21,6 ^{ab}	30,9 ^b
FOS+	<10 ⁴	1,1 ^a	12,8 ^c	24,5 ^{ab}	0,0 ^c
FOS-	<10 ⁴	0,9 ^a	8,8 ^c	11,9 ^b	36,3 ^b
XOS+	<10 ⁴	0,0 ^b	13,7 ^c	18,1 ^b	2,5 ^c
XOS-	<10 ⁴	0,1 ^b	8,3 ^c	1,9 ^c	0,0 ^c

¹ *C. difficile*-telling (× 10⁵ CFU/g fekalier) bestemt på sykloserin-cefoxitin-eggeplomme-agar. Data viste en diett × prøvetakingsdag-interaksjon; data i en kolonne med ulike superskript er ulike (P<0,01).

² Fekal prøvetakingsdag relativ til patogen-inokulasjonsdag (dag 0).

³ Kontroll (C); gummi arabicum (GA); fruktooligo-sakkarider (FOS); xylooligosakkarider (XOS) med (+) eller uten (-) 200 µl inokulasjon v *Clostridium difficile* VPI 10463 (2×10^8 CFU/ml).

5

Tabell 6

Hyppighet og toksintiter for <i>Clostridium difficile</i> -toksin A			
	Prøvetakingsdag ²		
Behandlinger ³	-1	3	6
C+	0	62,5	75,0
C-	0	62,5	87,5
GA+	0	12,5	50,0
GA-	0	87,5	100,0
FOS+	0	62,5	37,5
FOS-	0	50,0	50,0
XOS+	0	87,5	37,5
XOS-	0	25,0	37,5
Titer ⁴ +	id	10^4	10^4
Titer-	id	10^3	10^3

¹ Prosent av mus med detekterbare titer av toksin A i fekalie.

² Fekal prøvetakingsdag relativ til patogen-inokulasjonsdag.

10 ³ Kontroll (C); gummi arabicum (GA); fruktooligo-sakkarider (FOS), xylooligosakkarider (XOS) med (+) eller uten (-) 200 µl inokulasjon av *Clostridium difficile* VPI 10463 (2×10^8 CFU/ml).

⁴ Titer av toksin A uttrykt som den resiproke av den høysete fortynning hvori toksin A ble detektert i fekale prøver, id = ikke detektert. Titre ble slått sammen på tvers av dietter.

5 Konklusjon

Eksperiment 3

Selv om mus ikke utvikler de samme lesjoner som mennesker (PMC), kan en murin modell likevel tilveiebringe meningsfylte data. Studier av mikrobielle interaksjoner koplet med
10 ernæringsmessige manipulasjoner kan bidra til forståelsen av årsaksfaktorer i *C. difficile* kolonisering og infeksjon. Ytterligere tilveiebringer informasjonen en bedre forståelse av gastrointestinal mikrobiell økologi. I dette studiet undertrykte oligosakkaridene vekst av *C.*
15 *difficile* og så ut til å tilveiebringe beskyttelse for det intestinale epitellev.

P a t e n t k r a v

1. Oral rehydreringsløsning omfattende natrium, kalium, klorid, en bikarbonatkilde og et ufordøyelig oligosakkarid som er resistent ovenfor endogen fordøyelse i den humane
5 øvre fordøyelseskanal.
2. Oral rehydreringsløsning, ifølge krav 1, hvor oligosakkaridet er et fruktooligosakkarid.
3. Oral rehydreringsløsning, ifølge krav 1, hvor oligosakkaridet er et xylooligosakkarid.
- 10 4. Løsning ifølge krav 2, hvor fruktooligosakkaridet er valgt fra gruppen omfattende 1-kestose, nystose og 1^F- β -fruktofuransylnystose.
5. Løsning ifølge krav 2, hvor det ufordøyelige frukto-oligosakkarid er tilstede ved en konsentrasjon på 3-30 g
15 pr. liter løsning.
6. Løsning ifølge krav 2, hvor det ufordøyelige frukto-oligosakkarid er tilstede ved en konsentrasjon på 3-18 g pr. liter løsning.
7. Løsning ifølge krav 3, hvor xylooligosakkaridet er
20 valgt fra gruppen omfattende xylobiose, xylotriose og xylotetrose.
8. Løsning ifølge krav 3, hvor xylooligosakkaridet er tilstede ved en konsentrasjon på 3-30 g pr. liter løsning.
9. Løsning ifølge krav 3, hvor xylooligosakkaridet er
25 tilstede ved en konsentrasjon på 3-18 g pr. liter løsning.

Fig. 1A

Struktur av 1-ketose

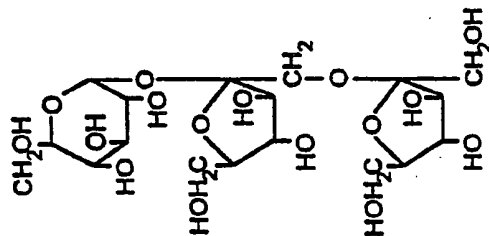


Fig. 1B

Struktur av nystose

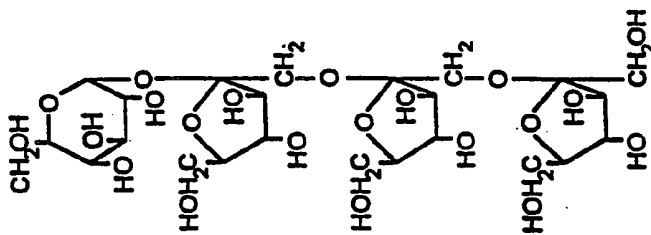
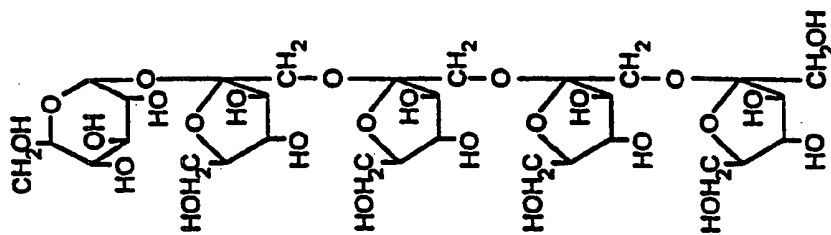


Fig. 1C

¹F- β -fruktofuranosyl nystose

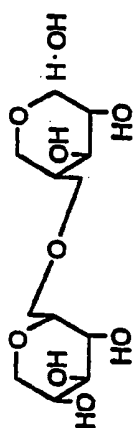


Fig. 2A
Struktur av xylobiose

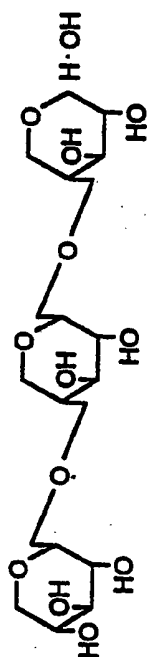


Fig. 2B
Struktur av xylotriose

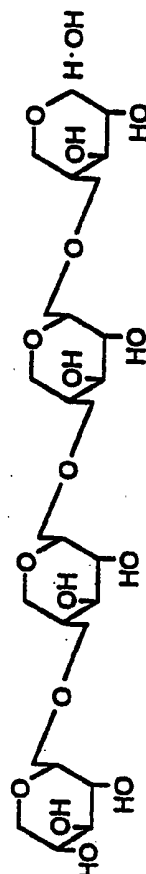


Fig. 2C
Struktur av xylotetrose

Fig. 3

Overlevelseskurve for hamstere tilført
en 0,5 ml dose Clostridium difficile.

Eksperiment 1

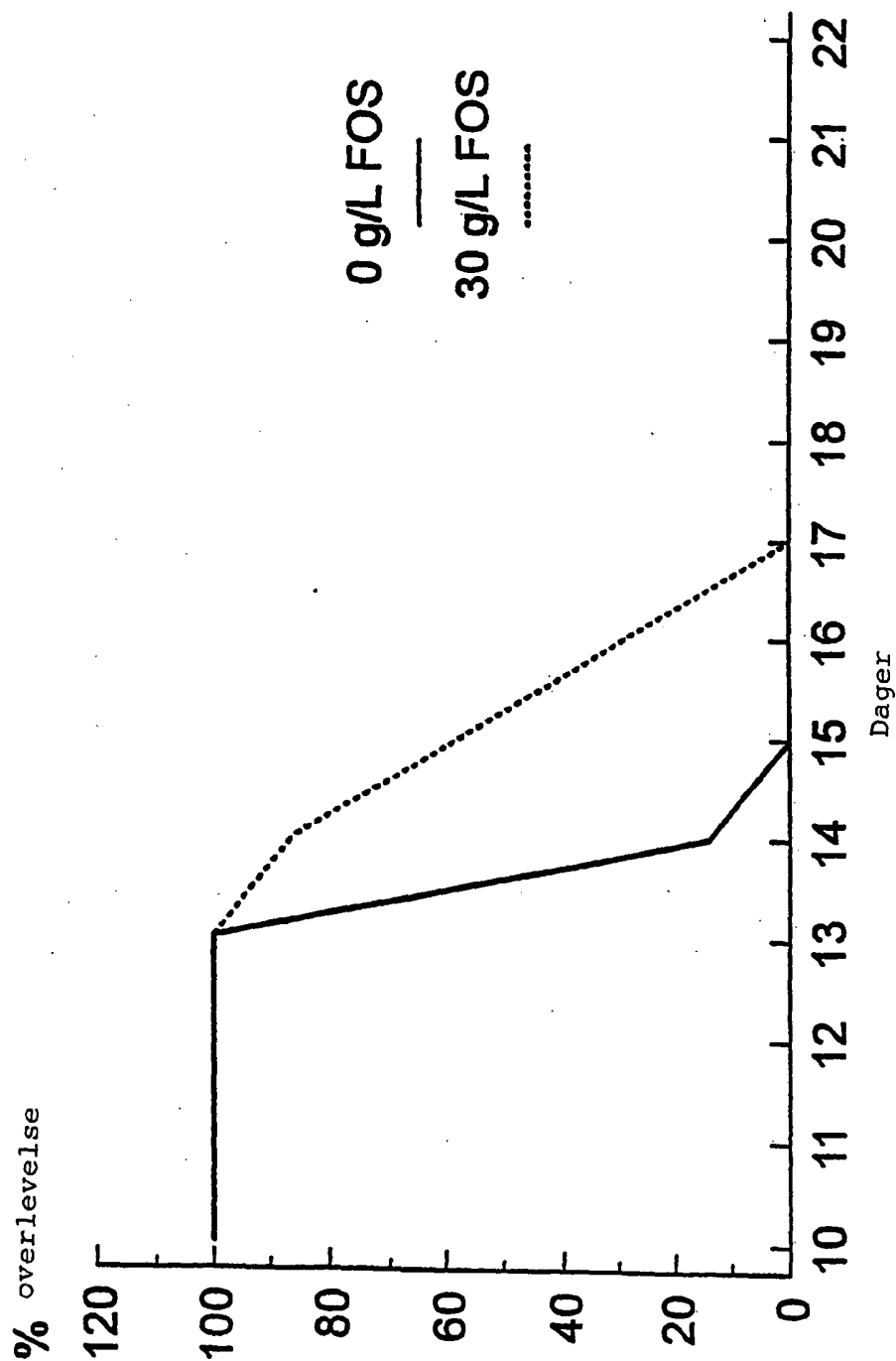


Fig. 4

Overlevelseskurve for hamstere tilført
en 2,0 ml dose av Clostridium difficile.

Eksperiment 1

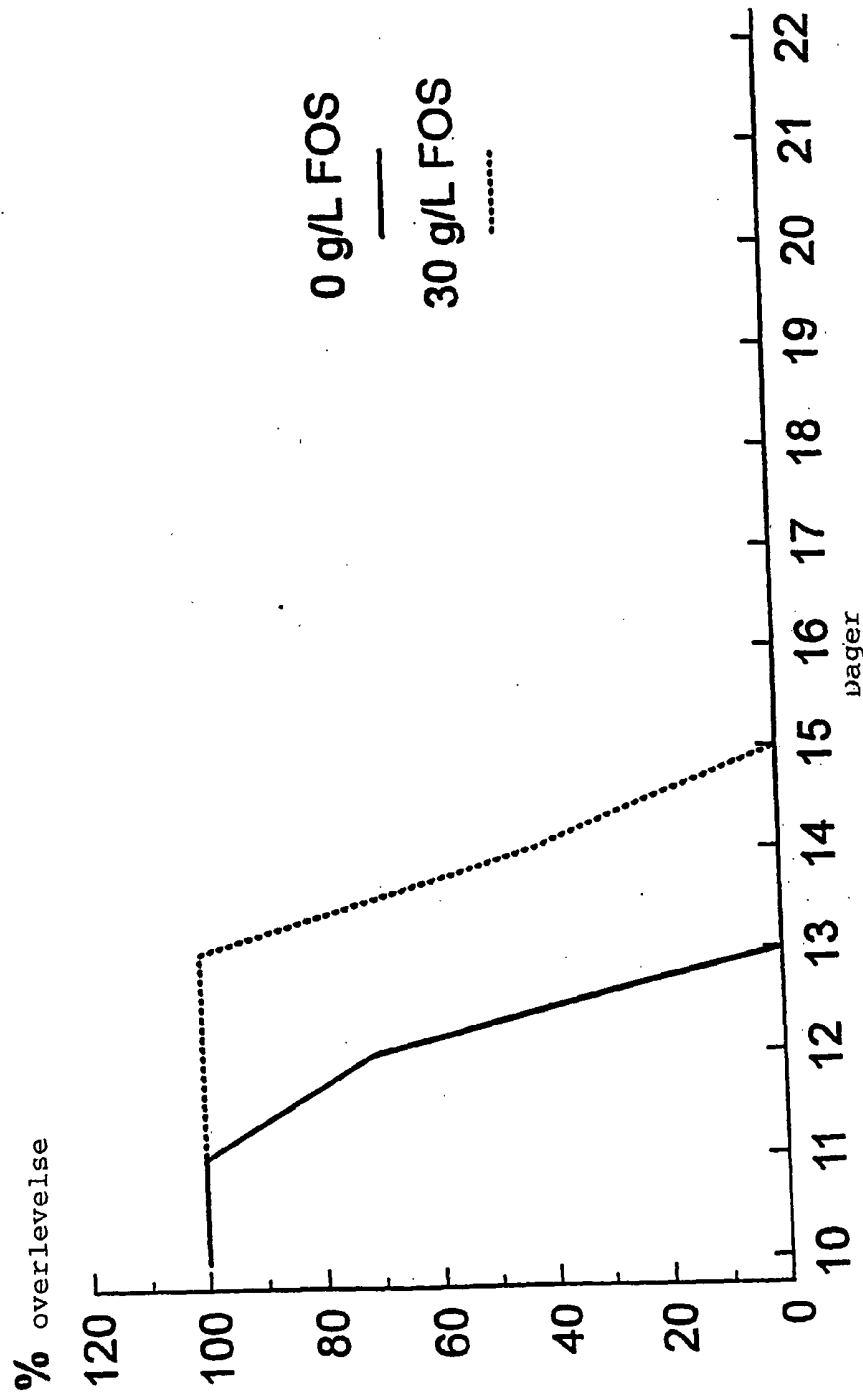


Fig. 5

Overlevelseskurve for ikke-tilførte hamstere
(naturlig Clostridium difficile-infeksjon)-
behandling med Vancomycin.

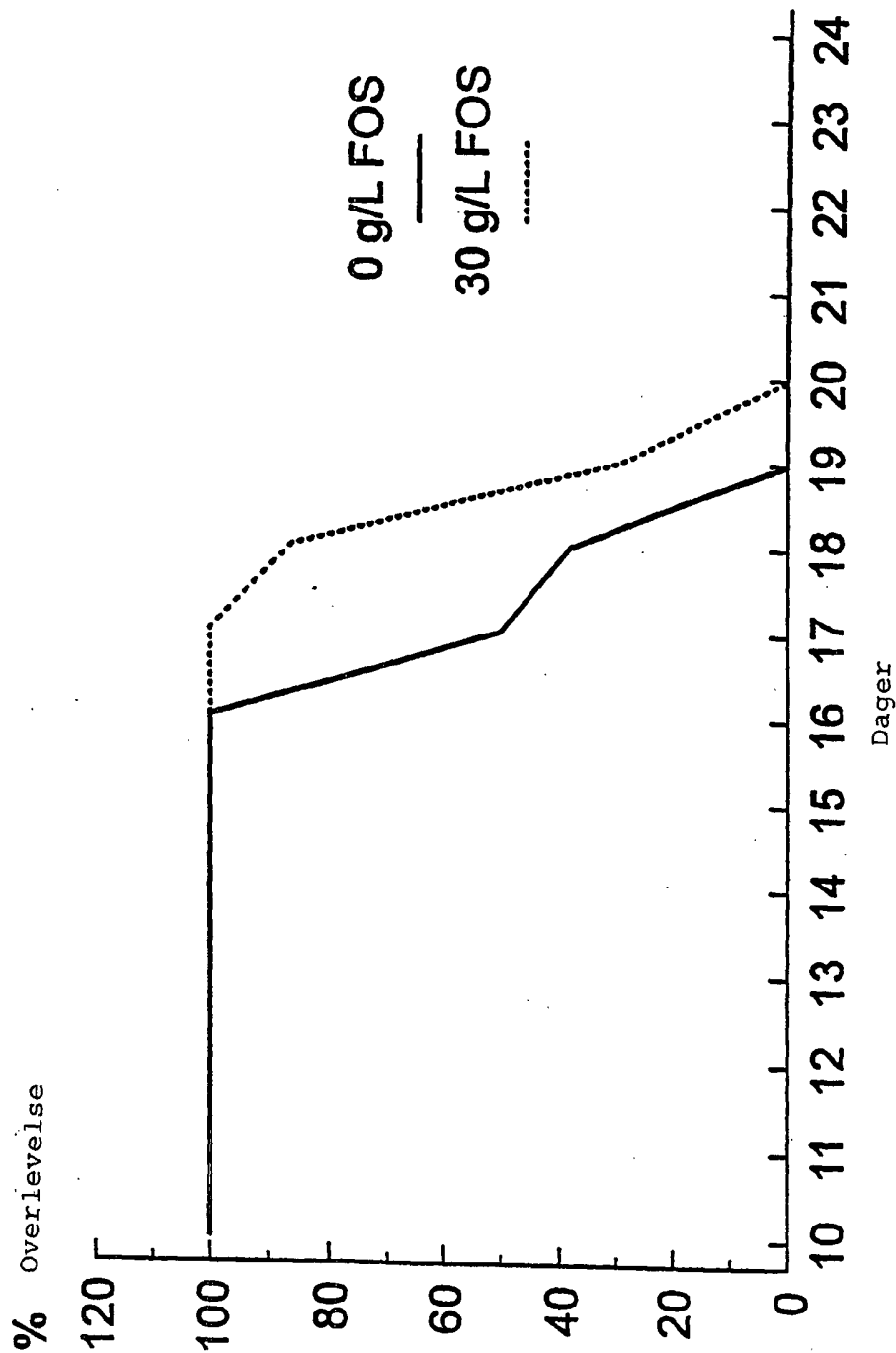
Eksperiment 2

Fig. 6

Overlevelseskurve for ikke-tilførte hamstere
(naturlig Clostridium difficile-infeksjon)

Eksperiment 2

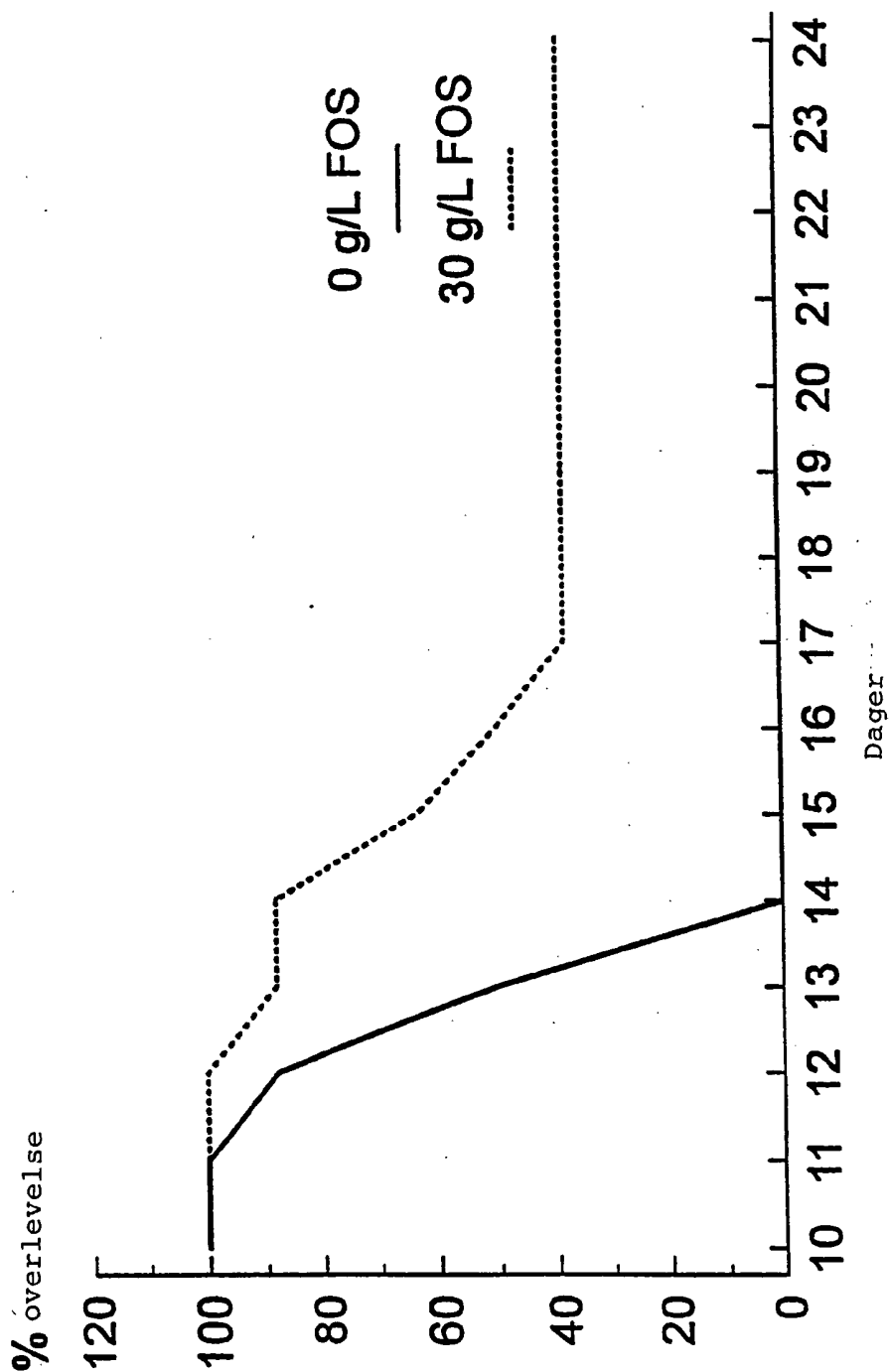


Fig. 7

Fekalt utslipp av *Clostridium difficile* i mus
tilført *C. difficile*.

Eksperiment 3

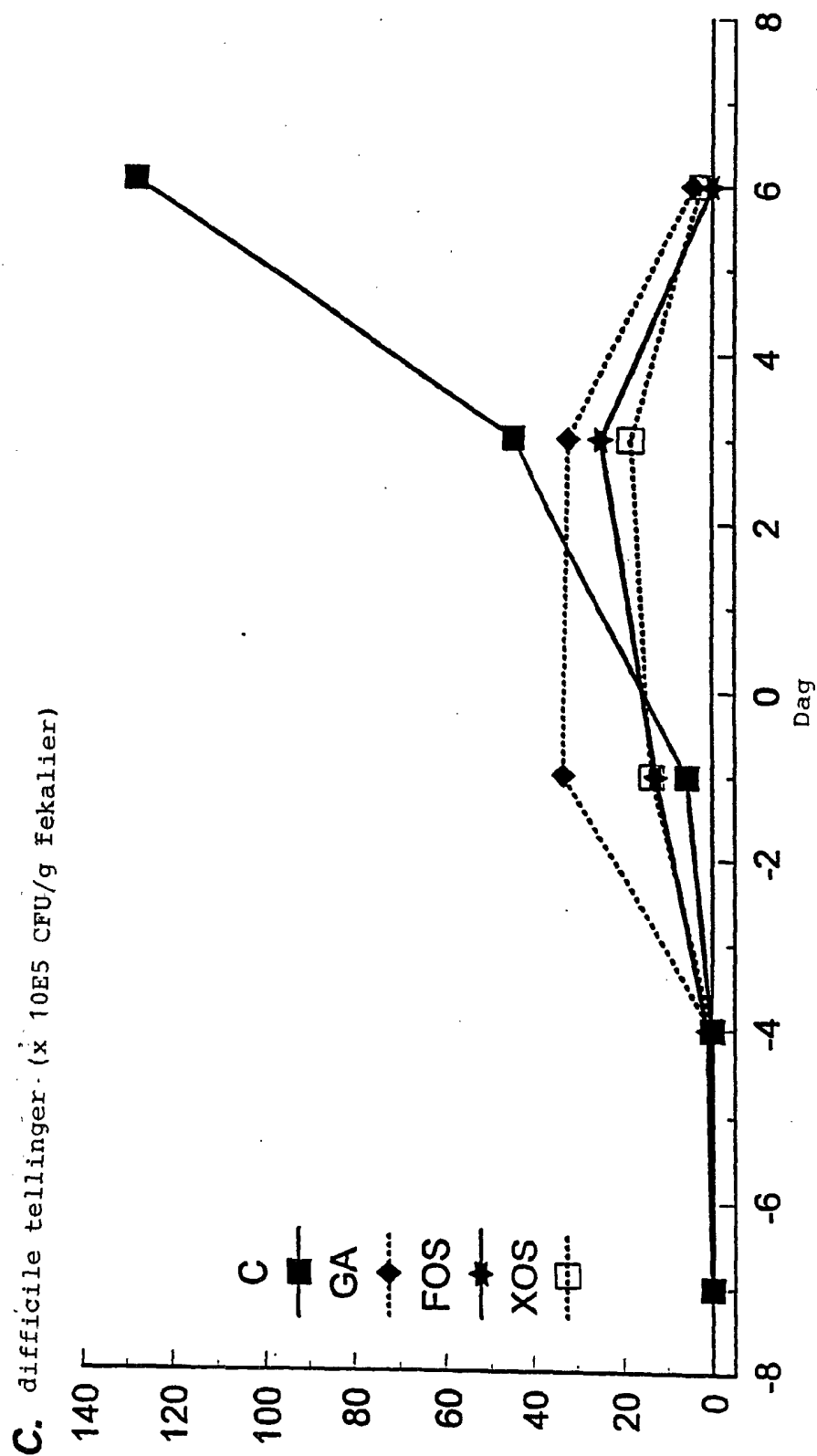


Fig. 8

Fekalt utslipp av *Clostridium difficile* i ikke-tilførte mus.

Eksperiment 3