

**ÖZET****MASTİTİN TEDAVİSİNE YÖNELİK LACTOBACILLUS SALIVARIUS**

Buluş, *Lactobacillus salivarius*'un bir yeni suşu, yeni suşu içeren ürünler, memedeki  
5 veya meme dokusundaki, özel olarak bir dişi insanın bir mamari bezdeki,  
enflamasyonun ve/veya enfeksiyonun tedavisinde ve/veya önlenmesinde bunların  
kullanımı ve memedeki veya meme dokusundaki, özel olarak bir dişi insanın bir mamari  
bezdeki, enflamasyonun ve/veya enfeksiyonun tedavisi ve/veya önlenmesi için  
yöntemler ile ilgilidir.

**İSTEMLER**

1. LMG P-27027 erişim numarasına sahip olan *Lactobacillus salivarius* suşudur.
- 5 2. LMG P-27027 erişim numarasına sahip olan *Lactobacillus salivarius* suşu olup, bir memelide memenin veya meme dokusunun enflamasyonunun ve/veya enfeksiyonunun tedavisinde ve/veya önlenmesinde kullanım içindir.
- 10 3. İstem 2'ye göre kullanım için *Lactobacillus salivarius* suşu olup, özelliği söz konusu kullanımın bir dişi insanda mastitin tedavisi ve/veya önlenmesi olmasıdır.
- 15 4. İstemler 2 veya 3'e göre kullanım için *Lactobacillus salivarius* suşu olup, özelliği *Lactobacillus salivarius* suşunun her bir doz için  $10^8$  ila  $10^{10}$  koloni oluşturma birimi (cfu) olan bir dozda her gün birden fazla uygulanmasıdır.
- 20 5. İstem 4'e göre kullanım için *Lactobacillus salivarius* suşu olup, özelliği *Lactobacillus salivarius* suşunun her bir doz için  $10^8$  ila  $10^{10}$  koloni oluşturma birimi (cfu) olan bir dozda her gün üç kere uygulanmasıdır.
- 25 6. Bir bileşim olup, özelliği LMG P-27027 erişim numarasına sahip olan bir *Lactobacillus salivarius* suşunu ve bir fizyolojik olarak kabul edilebilir taşıyıcı veya ekşi piyanı içermesidir.
- 30 7. İstem 6'ya göre bileşim olup, özelliği kuru ağırlığın her bir gramı için  $10^8$  ila  $10^{10}$  cfu *Lactobacillus salivarius* içermesidir.
8. İstem 6 veya 7'ye göre bileşim olup, özelliği ilaveten sindirilemeyen oligosakkaritlerden, LC-PUFA'lardan, diğer probiyotiklerden ve mikro-besinlerden oluşan gruptan seçilen en az birini içermesidir.
9. İstem 1'e göre *Lactobacillus salivarius* suşu veya istem 6 veya 7'ye göre bileşim olup, bir ilaç olarak kullanım içindir.

10. İstemler 6-8'den herhangi birine göre bir bileşim olup, bir memelide memenin veya meme dokusunun enflamasyonunun ve/veya enfeksiyonunun tedavisinde ve/veya önlenmesinde kullanım içindir.
- 5 11. İstem 10'a göre kullanım için bir bileşim olup, bir dişi insanda mastitin tedavisi ve/veya önlenmesi içindir.

## TARİFNAME

### MASTITİN TEDAVİSİNE YÖNELİK LACTOBACILLUS SALIVARIUS

#### **BULUŞUN SAHASI**

5

Mevcut buluş, özellikle probiyotiklere dayanan mastit terapisi alanındadır.

#### **BULUŞUN ALT YAPISI**

10 Mastit, memenin veya meme dokusunun enflamasyonudur veya enfeksiyonudur ve puerperal ve puerperal-olmayan mastit olarak sınıflandırılabilir. Puerperal mastit, gebelik, emzirme veya süten kesme ile ilişkilendirilir ve hem hayvanlarda hem de insanlarda, emziren memelilere sıklıkla gerçekleşir. Puerperal-olmayan mastit laktasyon ile herhangi bir ilgiye sahip değildir ancak çok benzer semptomlara sahiptir

15 ve örneğin, meme ucu deldirmeden sonra, gerçekleşebilir. Emziren kadınların en fazla %33'ünün mastitten muzdarip olduğu tahmin edilir. Mastitin laktasyon sırasında herhangi bir zamanda gerçekleşebilmesine rağmen, meydana gelişler postpartum ikinci ve üçüncü hafta sırasında pik yapar. Mastitin büyük çoğunluğu, *Staphylococcus*, ağırlıklı olarak *S. aureus* ve *S. epidermidis*, enfeksiyonundan kaynaklanır. Tedavi

20 sıklıkla antibiyotiklerin uygulanmasını içerir. Meme sütünün bileşimi mastit sırasında değiştiğinden, mastit hayli istenmeyen bir durumdur, örneğin, optimal nütrisyonlu meme sütüne müdahale edebilen sodyumun ve enflamatuvar mediyatörlerin bir arttırılmış içeriğini bebeklere sağlar. İlaveten, mastit sırasında, anne tarafından emzirmeye devam etme mümkün olmayabilir veya arzu edilmeyebilir. Arroyo et al., (2010, CID

25 50(12), p1551-1558), mastiti tedavi etmede bir bakteriyel suş *Lactobacillus salivarius* CECT5713'ün kullanımını tarif eder.

#### **BULUŞUN KISA AÇIKLAMASI**

30 Şimdi, PS2 olarak gösterilen bir *Lactobacillus salivarius* suşunun veya *Lactobacillus salivarius* PS2'yi içeren bir bileşimin mastiti ve/veya mastit ile ilişkilendirilmiş semptomları etkili bir şekilde azalttığı şaşırtıcı bir şekilde bulunmuştur. *Lactobacillus salivarius* suşu PS2 depolanmıştır ve buna LMG P-27027 erişim numarası verilmiştir.

35 **BULUŞUN DETAYLI AÇIKLAMASI**

Buluş, *Lactobacillus salivarius*'un bir yeni sulu, bu yeni suşu içeren bileşimler ile ve memede veya meme dokusunda enflamasyonun ve/veya enfeksiyonun, özel olarak mastitin, tedavisi ve/veya önlenmesi için bir kullanım ile ilgilidir.

- 5 Bir birinci yönünde, buluş, LMG P-27027 erişim numarasına sahip olan, bir *Lactobacillus salivarius* suşu ile ilgilidir.

Bir ikinci yönünde, buluş, buluşa göre *Lactobacillus salivarius* suşunu ve bir fizyolojik olarak kabul edilebilir taşıyıcı veya eksojen içeren bir bileşim ile ilgilidir. Tercihen, 10 bileşim kuru ağırlığın her bir gramı için  $10^8$  ila  $10^{10}$  cfu *Lactobacillus salivarius* içerir. Tercihen, bileşim ilaveten sindirilemeyen oligosakkaritlerin, LC-PUFA'ların, ilave prebiyotiklerin ve mikro-besinlerin grubundan seçilen en az birini içerir. Tercihen, bileşim bir tozdur.

- 15 Bir üçüncü yönünde, mevcut buluş bir ilaç olarak kullanım için buluşa göre *Lactobacillus salivarius* suşu ile ilgilidir.

Bir dördüncü yönünde, mevcut buluş bir ilaç olarak kullanım için buluşa göre bileşim ile ilgilidir.

20

Bir beşinci yönünde, mevcut buluş bir memelide memenin veya meme dokusunun enflamasyonunun ve/veya enfeksiyonunun tedavisinde ve/veya önlenmesinde kullanım için buluşa göre *Lactobacillus salivarius* suşu ile ilgilidir. Tercihen, memenin veya meme dokusunun enflamasyonu ve/veya enfeksiyonu mastittir. Tercihen, memeli bir 25 dişi insandır. Tercihen, buluşa göre *Lactobacillus salivarius* suşu her bir doz için  $10^8$  ila  $10^{10}$  koloni stimulan faktör (cfu) olan bir dozda, her gün birden fazla kere, daha tercihen her gün iki veya üç kere, en tercihen her gün üç kere uygulanır.

Bir altıncı yönünde, mevcut buluş bir memelide memenin veya meme dokusunun 30 enflamasyonunun ve/veya enfeksiyonunun tedavisinde ve/veya önlenmesinde kullanım için buluşa göre bir bileşim ile ilgilidir. Tercihen, memenin veya meme dokusunun enflamasyonu ve/veya enfeksiyonu mastittir. Tercihen, memeli bir dişi insandır. Bir uygulamada, dişi insan mastit geliştirme riski altındadır, özellik yüksek riski altındadır ve buluşa göre bileşim mastit geliştirme riski altında olan, özel olarak yüksek riski 35 altında olan, bir dişi insanda mastitin önlenmesi içindir. Uygun bir şekilde, dişi insan

önceden, memede veya meme dokusunda enflamasyondan ve/veya enfeksiyondan, özel olarak mastitten, muzdarip olmuştur. Tercihen, buluşa göre bileşim her bir doz için  $10^8$  ila  $10^{10}$  koloni stimulan faktör (cfu) olan bir dozda, her gün birden fazla kere, daha tercihen her gün iki veya üç kere, en tercihen her gün üç kere uygulanır. Tercihen, bileşim ilaveten sindirilemeyen oligosakkaritlerin, LC-PUFA'ların, ilave prebiyotiklerin ve mikro-besinlerin grubundan seçilen en az birini içerir.

### ***Lactobacillus salivarius***

10 Buluşa göre *Lactobacillus salivarius* suşu *Lactobacillus salivarius* PS2 veya *L. salivarius* PS2 olarak ifade edilir. *L. salivarius* PS2, 23 Mayıs 2012'de BCCM/LMG'de (Belgian Coordinated Collections of Microorganisms, Laboratorium voor Microbiologie - Bacteriënverzameling (LMG), University of Gent, K.L. Ledeganckstraat 35, B-9000 Gent, Belçika) Patent Prosedürü Amacıyla Mikroorganizmaların Depolanması Ulusal Farkındalığı konusunda Budapeşte Antlaşması'na uygun şekilde, Danone Research BV, Bosrandweg 20, 6704 PH Wageningen, Hollanda tarafından depolanmıştır. *L. salivarius* PS2'ye LMG P-27027 BCCM/LMG erişim numarası verilmiştir. Depolayıcı, Danone Research BV, uygulayıcıya bu patent başvurusunda depolanmış biyolojik malzemeye atıf yapma yetkisi vermiştir. Bundan sonra, *L. salivarius* PS2 aynı zamanda, *Lactobacillus salivarius* LMG P-27027 veya *L. salivarius* LMG P-27027 olarak da ifade edilir.

### ***Bileşim***

25 Tercihen, *L. salivarius*'un mevcut suşu, bir bileşime, örneğin, bir besinsel bileşime, bir besinsel takviyeye, bir farmasötik bileşime veya bir nutrasötik bileşime, tercihen bir besinsel bileşime veya bir besinsel takviyeye dâhil edilir. Tercihen, mevcut bileşim *L. salivarius* suşunu ve bir fizyolojik olarak kabul edilebilir taşıyıcı veya eksipiyen ve/veya aşağıda ilaveten tarif edildiği üzere ilave içerik maddeleri içerir. Tercihen, buluşa göre *L. salivarius* suşu dondurarak-kurutulmuş formda bulunur.

Buluşa göre bileşim tercihen, bileşimin kuru ağırlığının her bir gramı için *L. salivarius*'un mevcut suşunun  $10^2$  ila  $10^{13}$  koloni oluşturma birimini (cfu), bileşimin kuru ağırlığının her bir gramı için  $10^4$  ila  $10^{12}$ , daha tercihen  $10^5$  ila  $10^{11}$ , en tercihen  $10^5$  ila  $10^{10}$  cfu *L. salivarius* içerir. Buluşa göre tercihen, suşu  $10^2$  ila  $10^{13}$ , daha tercihen  $10^5$  ila  $10^{12}$ , daha

tercihen  $10^8$  ila  $5 \times 10^{10}$ , en tercihen  $10^8$  ila  $10^{10}$  koloni oluşturma birimi (cfu) olan bir günlük dozda uygulanır. Buluşa göre bileşim, buluşa göre canlı ve/veya canlı-olmayan *L. salivarius*, tercihen buluşa göre canlı *L. salivarius* içerebilir.

- 5 *L. salivarius* suşunu içeren mevcut bileşim teknikte bilinen herhangi bir formda, örneğin, katı formda, yarı-katı formda veya sıvı formda, olabilir. Tercihen, bileşim bir besinsel bileşimdir veya bir besinsel takviyedir, tercihen, bir toz, kapsül veya tablet formundadır, en tercihen bir besinsel takviyedir. Uygun besinsel bileşimler, herhangi bir meşrubatı veya gıda ürününü, örneğin, bir içeceği, bir süt-bazlı meşrubatı, bir yoğurdu,
- 10 bir süt ürününü, bir tahıl ürününü, bir soya ürününü, bir meyve ürününü, bir sebze ürününü, bir et ürününü veya bunların kombinasyonlarını, örneğin, bir komplet eti, içerir. Bir tercih edilen uygulamada, bileşim toz, kapsül veya tablet formunda, en tercihen toz formunda, bir besinsel takviyedir. Tercihen, bileşim, özellikle bileşim toz, kapsül veya tablet formunda olduğunda uygun olan, dondurarak-kurutulmuş formda *L.*
- 15 *salivarius* suşunu içerir. Mevcut suş veya mevcut bileşim bir kaba, tercihen bir çubuğa veya çubuk paketine veya bir saşeye dâhil edilebilir. Tercihen, toz, kapsül veya tablet formunda olduğunda, özellikle toz formunda olduğunda, mevcut bileşimin ağızdan alınmadan önce bir meşrubata veya gıda ürününe eklenmesi amaçlanır. Tercihen, toz, kapsül veya tablet formunda olduğunda, özellikle toz formunda olduğunda, mevcut
- 20 bileşime bileşimi ağızdan alınmadan önce bir meşrubata veya gıda ürününe eklemek için talimatlar ile eşlik edilir. Mevcut bileşimin buna ekleneceği meşrubat veya gıda ürünü herhangi bir meşrubat veya gıda ürünü, örneğin, bir içecek, bir süt-bazlı meşrubat, bir yoğurt, bir süt ürünü, bir tahıl ürünü, bir soya ürünü, bir meyve ürünü, bir sebze ürünü, bir et ürünü veya bunların kombinasyonları, örneğin, bir komplet et,
- 25 olabilir.

### ***İlave bileşenler***

- Buluşa göre *L. salivarius* suşu tercihen, bir fizyolojik olarak kabul edilebilir taşıyıcı veya
- 30 ekspiyan ve/veya ilave içerik maddeleri içerebilen bir bileşimde mevcuttur. Teknikte bilindiği üzere herhangi bir fizyolojik olarak kabul edilebilir ekspiyan veya taşıyıcı kullanılabilir. Uygun ekspiyanlar veya taşıyıcılar, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, suyu, glikozu, laktozu, sükrözu, manitolü, maltodekstrini, (direnci) nişastayı, selülozu veya selüloz türevlerini, örneğin, metilselülozu, magnezyum stearatı, stearik asidi,
- 35 sodyum sakarini, talkumu, magnezyum karbonatı ve benzerlerini, içerir.

Tercihen, emziren kadınlar için yararlı olan ilave içerik maddeleri, daha tercihen immün sistem için yararlı olan ve/veya immün sistemi destekleyen içerik maddeleri dâhil edilir. Bu içerik maddeleri genel olarak teknikte bilinir ve bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla, diyetsetel lifi ve sindirilemeyen oligosakkaritleri, LC-PUFA'ları ve mikro-besinleri (örneğin, 5 vitaminleri ve mineralleri), içerir. Ayrıca, makro-besinler (örneğin, lipidler, protein, sindirilebilen karbonhidratlar) da buluşa göre bileşime dâhil edilebilir.

### ***Sindirilemeyen oligosakkarit***

10 Mevcut suş tercihen, ilaveten sindirilemeyen oligosakkaritler içeren, bir bileşim içinde mevcuttur. Mevcut buluşta kullanıldığı üzere, "sindirilemeyen" terimi, insan üst sindirim yolunda (ince bağırsakta ve midede) bulunan asitlerin veya sindirim enzimlerinin etkisi ile bağırsakta sindirilmeyen ancak insan intestinal florası tarafından fermente edilen sakkaritleri ifade eder. Mono- ve disakkaritler, örneğin, glikoz, galaktoz, fruktoz, sükröz 15 ve laktöz, sindirilebilir.

Tercihen, mevcut bileşim 2 ila 250, daha tercihen 3 ila 60, olan bir polimerizasyon derecesi (DP'si) olan sindirilemeyen oligosakkaritleri içerir. Tercihen, sindirilemeyen oligosakkaritler, frukto-oligosakkaritlerin (örneğin, inülin), galakto-oligosakkaritlerin 20 (örneğin, transgalakto-oligosakkaritler veya beta-galakto-oligosakkaritler), glukoligosakkaritlerin (örneğin, gentio-, nigero- veya siklodekstrin-oligosakkaritler), arabino-oligosakkaritlerin, mannan-oligosakkaritlerin, ksilo-oligosakkaritlerin, fuko-oligosakkaritlerin, arabinogalakto-oligosakkaritlerin, glukomanno-oligosakkaritlerin, galaktomanno-oligosakkaritlerin, siyalik asit oligosakkaritlerinin ve üronik asit 25 oligosakkaritlerinin grubundan seçilen, daha tercihen frukto-oligosakkaritlerin, galakto-oligosakkaritlerin ve üronik asit oligosakkaritlerinin grubundan seçilen, en tercihen frukto-oligosakkaritlerin ve galakto-oligosakkaritlerin grubundan seçilen, en az bir oligosakkaridi içerir. Tercihen, bileşim galakto-oligosakkaritleri, daha tercihen transgalakto-oligosakkaritleri, içerir. Bir tercih edilen uygulamada, bileşim galakto- 30 oligosakkaritlerin ve frukto-oligosakkaritlerin bir karışımını içerir.

Galakto-oligosakkaritler, tercihen 2 ila 10 olan bir DP'ye sahiptir. Tercihen, galakto-oligosakkaritler 6'nın altında bir ortalama DP'ye sahiptir. Galakto-oligosakkaritler tercihen, transgalakto-oligosakkaritlerden, lacto-N-tetraozdan (LNT'den), lakto-N- 35 neotetraozdan (neo-LNT'den), fukosil-laktözdan, fukosillenmiş LNT'den ve

fukosillenmiş neo-LNT'den oluşan gruptan seçilir. Transgalakto-oligosakkaritler (TOS), örneğin, Vivinal™ (Borculo Domo Ingredients, Netherlands) ticari adı altında, satılır. Tercihen, transgalakto-oligosakkaritlerin sakkaritleri  $\beta$ -bağlıdır. Frukto-oligosakkaritler tercihen 2 ila 250 olan, daha tercihen 1 ila 100 olan, en tercihen 5 ila 60 olan, bir DP'ye sahiptir. Tercihen, frukto-oligosakkaritler 10'un üstünde bir ortalama DP'ye sahiptir. Frukto-oligosakkaritler, inülini, levani ve/veya polifruktanın bir karma tipini içerir. Bir özel olarak tercih edilen frukto-oligosakkarit inülidir. Bileşimlerde kullanılan için uygun olan frukto-oligosakkaritler, örneğin, Raftiline®HP (Orafti) olarak, piyasada satılır. Tercihen, mevcut bileşim, galakto-oligosakkaritlerin frukto-oligosakkaritlere 99 : 1 ila 1 : 99 olan, daha tercihen 20 : 1 ila 1 : 1 olan, en tercihen 12 : 1 ila 7 : 1 olan, bir ağırlık oranında galakto-oligosakkaritler ve frukto-oligosakkaritler içerir.

Bir başka tercih edilen uygulamada, bileşim kısa zincirli ve uzun zincirli frukto-oligosakkaritlerin bir karışımını içerir. Tercihen, 10'un altında bir ortalama DP'si olan frukto-oligosakkaritlerin ve 10'un üstünde bir ortalama DP'si olan frukto-oligosakkaritlerin bir karışımı. Bileşimlerde kullanım için uygun olan 10'un altında bir ortalama DP'si olan frukto-oligosakkarit, örneğin, Raftilose® olarak, piyasada satılır. Bileşimlerde kullanım için uygun olan 10'un üstünde bir ortalama DP'si olan frukto-oligosakkarit, örneğin Raftiline®HP olarak, piyasada satılır. Tercihen, mevcut bileşim, 20 : 1 ila 1 : 20, daha tercihen 10 : 1 ila 1 : 10, en tercihen 5 : 1 ila 1 : 5 olan bir ağırlık oranında veya yaklaşık 1:1 olan bir oranda, 10'un altında bir ortalama DP'si olan frukto-oligosakkaritler ve 10'un üstünde bir ortalama DP'si olan frukto-oligosakkaritler içerir.

Tercihen, bileşim kuru ağırlığa göre ağ %0,25 ila ağ %50 sindirilemeyen oligosakkaritler, daha tercihen ağ %0,5 ila ağ %30, hatta daha tercihen ağ %1,0 ila ağ %20 sindirilemeyen oligosakkaritler içerir. Sıvı formda olduğunda, bileşim tercihen her bir 100 ml için 50 mg ila 5 g sindirilemeyen oligosakkarit, daha tercihen her bir 100 ml için 250 mg ila 2 g, hatta daha tercihen 500 mg ila 1 g, içerir. Dozaj terimleri cinsinden ifade edildiğinde, sindirilemeyen oligosakkarit içeriği tercihen her gün için 0,1 ila 50 g'dır, daha tercihen her gün için 1 ila 35 g'dır, hatta daha tercihen her gün için 5 ila 25 g'dır, en tercihen her gün için 10 ila 20 g'dır.

***Uzun zincirli poli-doymamış yağ asitleri (LC-PUFA)***

Tercihen, mevcut bileşim ek olarak, uzun zincirli poli-doymamış yan asitleri ve/veya uzun zincirli poli-doymamış yağlı açıl zincirleri (LC-PUFA'lar) içerir. Mevcut buluşta LC-PUFA terimi, 20 karbon atomluk veya daha uzun olan bir uzunluğu ve en az iki doymamış bağı olan bir yağ asidi veya yağlı açıl zinciri ile ilgilidir. Tercihen, bileşim

5 eikozapentaenoik asitlerden ve/veya açıl zincirinden (EPA'dan), dokozahekzaenoik asitten ve/veya açıl zincirinden (DHA'dan) ve araşidonik asitten ve/veya açıl zincirinden (AA'dan) oluşan gruptan seçilen bir LC-PUFA içerir. Bir uygulamada, bileşim DHA içerir. Bir başka uygulamada, bileşim EPA içerir. Daha tercihen, bileşim DHA ve EPA içerir. LC-PUFA avantajlı bir şekilde, immün sistemi güçlendirir. Dolayısıyla, hem

10 diyetsel lif hem de LC-PUFA içeren bir bileşimin bir emziren kadınlara uygulanması immün sistem üzerinde bir iyileştirilmiş etkiye sahip olacaktır.

Tercihen, bileşim, her bir günlük doz için 50 ila 3000 mg LC-PUFA, daha tercihen 100 ila 1500 mg, en tercihen 200 ila 700 mg, içerir.

15

### ***Mikro-besinler***

Tercihen, mevcut suş, ilaveten mikro-besinler, daha tercihen vitaminler ve mineraller, içeren bir bileşim içinde bulunur. Tercih edilen mikro-besinler, emziren kadınlar için

20 yararlı olanlardır, özel olarak immün sistemin yararına olanlardır ve/veya immün sistemi destekleyenlerdir. Bu içerik maddeleri genel olarak teknikte bilinir ve genel olarak emziren kadınlar veya genç anneler için amaçlanan takviyelere dâhil edilir. Vitaminlerin ve minerallerin mevcut bileşime dâhil edilmesi emziren kadınlar tarafından alınacak olan bileşimlerin veya takviyelerin miktarını uygun bir şekilde azaltır.

25

Tercih edilen vitaminler suda-çözünebilen vitaminlerdir; B1 vitamindir (tiyamindir), B2 vitamindir (riboflavindir), B3 vitamindir (niasindir), B5 vitamindir (pantotenik asittir), B6 vitamindir (piridoksindir), folik asittir, B12 vitamindir (siyanokobalamindir), biyotindir, kolindir ve C vitamindir ve yağda-çözünebilen vitaminlerdir; D3 vitamindir, E vitamindir

30 ve K vitamindir. En çok tercih edilen vitaminler folik asittir, B1 vitamindir, B2 vitamindir, B6 vitamindir, B12 vitamindir, kolindir ve C vitamindir.

Tercih edilen mineraller, kalsiyumdur, fosfordur, çinkodur, iyottur, demirdir, manganezdur, selenyumdur, bakırdır ve magnezyumdur. En çok tercih edilen mineraller

35 kalsiyumdur, iyottur, çinkodur ve demirdir.

### **İlave probiyotikler**

Buluşa göre bileşimler, yukarıda tarif edildiği üzere *L. salivarius*'un mevcut suşu dışında, ilave probiyotikler içerebilir.

5

Mevcut buluşta probiyotikler, uygulama üzerine, konak üzerinde bir yararlı etki uygulayan, mikro-organizmaları ifade eder. Probiyotikler emziren kadınların immün sistemi üzerinde yararlı etkilere sahiptir, bundan dolayı probiyotikler ile kombinasyon immün sistem üzerinde bir üstün etkiye sahip olacaktır. Tercihen, probiyotikler *Lactobacillus*'tan ve *Bifidobacterium*'dan oluşan gruptan seçilir. Daha tercihen, probiyotikler *Lactobacillus acidophilus* grubundan, *L. rhamnosus*'tan, *L. casei*'den, *L. paracasei*'den, *L. plantarum*'dan, *L. reuteri*'den, *L. fermentum*'dan, *Bifidobacterium infantis*'ten, *B. animalis subsp. lactis*'ten, *B. breve*'den, *B. longum*'dan ve *B. bifidum*'dan oluşan gruptan seçilir. Tercihen, probiyotikler her bir münferit probiyotığın  $1 \times 10^6$  koloni oluşturma birimi (cfu) ile  $1 \times 10^{13}$  cfu, daha tercihen  $1 \times 10^7$  ile  $1 \times 10^{11}$ , en tercihen  $1 \times 10^8$  ile  $1 \times 10^{10}$ , olan bir günlük dozu hâlinde bulunur.

10

15

20

Bir tercih edilen uygulamada, bileşim mastitin tedavisinde ve/veya önlenmesinde aktif olan yalnızca bir tek suş, yani, buluşa göre *L. salivarius* suşunu, içerir. Bir uygulamada, bileşim *Lactobacillus gasseri*'nin bir suşunu içermez.

### **Makro-besinler**

Mevcut bileşim ayrıca, protein, yağ ve sindirilebilen karbonhidrat arasından seçilen en az bir, tercihen en az iki, daha tercihen en az üç makro-besin de içerebilir. Bu özel olarak, buluşa göre suşun bir besinsel bileşime dâhil edildiği durumda tercih edilir. Bir avantajlı uygulamada, mevcut besinsel bileşimler, yukarıda tarif edildiği üzere, sindirilemeyen oligosakkaritlerin, LC-PUFA'ların, ilave prebiyotiklerin ve mikro-besinlerin grubundan seçilen en az birini içerir.

30

### **Uygulama**

Mevcut suş ve/veya bileşim, özellikle bir memelide memenin veya meme dokusunun enflamasyonunun ve/veya enfeksiyonunun tedavisi ve/veya önlenmesi için, daha özel olarak mastitin ve/veya mastit ile ilişkilendirilmiş semptomların tedavisi ve/veya

35

5 önlenmesi için, ilaç olarak uygundur. Tercihen, mevcut suş ve/veya bileşim özel olarak, bir memelide memenin veya meme dokusunun enflamasyonunun ve/veya enfeksiyonunun tedavisi için, özellikle mastitin ve/veya mastit ile ilişkilendirilmiş semptomların tedavisi için uygundur. Bir uygulamada, tercihen mevcut suş ve/veya

10 bileşim özel olarak bir memelide memenin veya meme dokusunun enflamasyonunun ve/veya enfeksiyonunun önlenmesi için, özellikle mastitin ve/veya mastit ile ilişkilendirilmiş semptomların önlenmesi için, uygundur. Mevcut buluş bağlamında, "önlenme" ayrıca, "meydana gelme riski azaltma" olarak da yazılabilir. Burada kullanıldığı şekliyle, "mastitin ve/veya meme ağrısının ve mastit ile ilişkilendirilmiş

15 başka semptomların tedavisi ve/veya önlenmesi" ve (benzer) ifadeler, bir kişinin mastitten muzdarip olduğu sürenin uzunluğunu azaltmayı, mastitten muzdarip olan kişi tarafından yaşanan ağrı düzeyini azaltmayı, mastitten muzdarip olan kişinin toparlanma süresini azaltmayı, kişinin (eğer olduysa) mastitten dolayı bebeğini emzirmeyi bıraktığı sürenin uzunluğunu azaltmayı, kişinin mastitten dolayı emzirmeyi bırakmayı seçme

20 riskini azaltmayı, kişinin bebeğini emzirme süresinin uzunluğunu uzatmayı ve/veya kişinin mastitten dolayı bebeği emzirmeyi bırakma riskini azaltmayı içerir.

Tedavi edilecek ve/veya önlenecek olan mastit puerperaldir veya puerperal değildir, tercihen mastit puerperaldir. Mastit ile ilişkilendirilmiş semptomlar (lokal) meme

25 ağrısını, kızarıklığı, şişmeyi, meme angorjmanını ve memenin (memelerin) ısınmasını, süt stazını, ateşi, grip-benzeri semptomları ve meme apselerinin geliştirilmesini içerir. Mevcut suş ve/veya bileşim mastitten muzdarip olan bir kadına veya mastit geliştirme riski altında, tercihen yüksek riski altında, olan bir kadına uygulanabilir. Mastit geliştirme yüksek riski altında olan kadınlar, bunlarla sınırlı kalmamak kaydıyla,

30 emziren veya emzirmeye başlamayı planlayan ve yararlı veya çatlak meme ucuna sahip olan, önceden (örneğin, bir başka bebeği emzirirken) mastitten muzdarip olan, düzensiz aralıklar ile emziren, (bir başka enfeksiyon için) antibiyotik alan veya yakın tarihlerde almış olan, diyabetten, kronik hastalıktan, HIV enfeksiyonundan, AIDS'ten veya bir bozulmuş immün sistemden muzdarip olan kadınları, içerir. Bir uygulamada,

35 mevcut suş ve/veya bileşim önceden mastitten muzdarip olan kadınlara uygulanacaktır. Mevcut buluş bağlamında, "kadınlar" ve "dişi insanlar" birbiri ile değiştirilebilir bir şekilde kullanılır.

Mevcut suş ve/veya bileşim bir kaç hafta içinde emzirmeye başlamayı planlayan

35 (örneğin, planlanan laktasyon zamanından dört hafta önce), emziren veya yakın

tarihlerde emzirmeyi bırakmış olan bir kadına uygulanabilir. Mastitin semptomları uzadığı sürece daha tercihen laktasyon devam ettiği sürece, mevcut suşu ve/veya bileşimi uygulamak özellikle tercih edilir. Bazı uygulamalarda, mevcut suş ve/veya bileşim gebeliğin son trimesterinde olan (yani, bunlar bebeğini emzirmeye başlamadan önce), post-partum birinci haftalarında olan veya laktasyon devam ettiği sürece bir kadına uygulanabilir. Uygun bir şekilde mevcut suş ve/veya bileşim bir kadına gebeliğin hafta 29'undan ileriye doğru, hafta 30'dan, hafta 31'den, hafta 32'den, hafta 32'den, hafta 33'ten, hafta 34'ten, hafta 35'ten, hafta 36'dan, hafta 37'den, hafta 38'den, hafta 39'dan, hafta 40'tan, hafta 41'den, hafta 42'den, doğumdan veya mastitin herhangi bir semptomu aşikâr olmadan önce veya aşikâr olduktan sonra laktasyon devam ederken post-partum herhangi bir zamandan ileriye doğru, uygulanabilir.

### ***Uygulama şekli***

Mevcut yöntemde kullanılan bileşim tercihen enteral olarak, daha tercihen oral olarak, uygulanır. Buluşa göre bileşim her gün için bir tek günlük doz veya çok sayıda doz, örneğin, her gün için en az 2 doz, her gün için en az 3 doz, her gün için en az 4 gün, hâlinde uygulanabilir. Tercihen, buluşa göre bileşim her gün için birden fazla kere uygulanır. Bir özel olarak tercih edilen uygulamada, buluşa göre bileşim her gün için 2 veya 3 doz hâlinde, en tercihen her gün için 3 doz hâlinde, uygulanır. Bir tercih edilen uygulamada, buluşa göre bileşim bir besinsel bileşimdir veya bir besinsel takviyedir. Buluşa göre takviye bir toz, (çiğnenebilen tablet dâhil olmak üzere) bir tablet veya bir kapsül formunda olabilir. Buluşa göre besinsel bileşim herhangi bir gıda ürünü veya meşrubat olabilir. Tercihen, buluşa göre bileşim, özel olarak besinsel takviye, ilaveten bir fizyolojik olarak kabul edilebilir ekspiyan veya taşıyıcı içerir. Bir tercih edilen uygulamada, bileşim veya takviye 1 ila 10 g, daha tercihen 1,5 ila 7 g, en tercihen 2 ila 5 g, içeren bir kap (tercihen bir saşe) içinde paketlenmiş bir tozdur. Tercihen, her bir kap bir tek doz içerir.

Tercihen, besinsel bileşim, yağlar, proteinler ve sindirilebilen karbonhidratlar içeren, bir süt-bazlı sıvıdır. Tercihen, bu süt-bazlı sıvı 50 ila 1000 ml, daha tercihen 60 ila 500, en tercihen 75 ila 125 ml, olan bir hacim ile bir şişe veya tetrapack içinde paketlenir.

Tercihen, bileşim 1 ila 10 g, daha tercihen 1,5 ila 7 g, en tercihen 2 ila 5 g, içeren, bir kap, tercihen bir saşe içinde paketlenmiş bir tozdur.

Bu belgede ve bunun istemlerinde, "içermek" fiili ve bunun fiil çekimleri, sözcüğü takip eden maddelerin dâhil edildiği ancak spesifik olarak bahsedilmeyen maddelerin dışlanmadığı anlamına gelecek şekilde bunun sınırlayıcı olmayan anlamında kullanılır.

5 Buna ek olarak, "bir" veya "biri" belgisiz tanımlığı tarafından bir elemana atıf, bağlam burada elemanların birinin ve yalnızca birinin olmasını açık bir şekilde gerektirmedikçe, elemanın birden fazlasının mevcut olması olasılığını dışlamaz. Dolayısıyla, "bir" veya "biri" belgisiz tanımlığı genel olarak "en az bir" anlamına gelir.

## 10 **ŞEKİLLERİN AÇIKLAMASI**

Şekil 1, *Lactobacillus salivarius*'un 18 farklı suşunun RAPD analizini gösterir. Satırlar aşağıdakilere karşılık gelir: (1) ZH17-05; (2) CELA-2; (3) PS2; (4) CECT 5713; (5) CTC 2197; (6) FI 9810; (7) FI 9789; (8) CECT 4062; (9) CECT 4063; (10) V3-III-1; (11) V4-II-90; (12) V7-II-1; (13) V7-II-62; (14) V7-IV-1; (15) V7-IV-60; (16) V8-III-62; (17) V11-1-60; (18) V11-III-60; (L) HyperLadder™ II (50bp - 2000pb) (Bioline).

Şekil 2, gün 0'da, gün 7'de ve gün 14'te, örnek 2'nin klinik çalışmasında elde edilen, meme sütü örneklerinin toplam bakteriyel sayımlarının kutu grafiklerini gösterir; şekil 2a = tedavi grubu 1, şekil 2b = tedavi grubu 2, şekil 2c = tedavi grubu 3, şekil 2d = tedavi grubu.

Şekil 3, gün 0'da (şekil 3a) ve gün 14'te (şekil 3b), örnek 2'nin klinik çalışmasında elde edilen, ağır skorlarının kutu grafiklerini gösterir.

25

## **ÖRNEKLER**

### ***Örnek 1: Rastgele Bir Şekilde Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD) analizi***

30 Bir toplam 28 *Lactobacillus salivarius* suşu Rastgele Bir Şekilde Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD) analizine gönderilmiştir. RAPD profilleri OPL5 primeri (5'-ACGCAGGCAC-3') kullanılarak elde edilmiştir (Veyrat, A., Miralles, M. C. and Perez-Martinez, G. A. in J. Appl. Microbiol. 1999, 87:49-61). Bilgisayar destekli analiz InfoQuest FP yazılımı (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) ile gerçekleştirilmiştir.

35

Analiz edilmiş 28 suş, insan sütünden izole edilmiş on bir suş (PS2; HN6; FN 74 M1; LA 105 Te-1; WN 70 M1; AP 141 Me-2; AP 141 Me-11; TM 142 M1; TA 143 Ma-1; TA 143 Te-1; MV 144 M1), bebek feçesinden izole edilmiş bir suş (ZH17-05), domuz sütünden izole edilmiş bir suş (CELA-2), kümes hayvanından izole edilmiş bir suş (CTC 2197), insan vajinal eksüdasından elde edilmiş on suş (V3-III-1; V4-II-90; V7-II-1; V7-II-62; V7-IV-1; V7-IV-60; V8-III-62; V11-I-60; V11-III-60; V11-IV-60), bilinen koleksiyonlardan beş suş (FI 9810; FI 9789; CECT 4062; CECT 4063; CECT 5713) içermiştir.

10 Analiz, *Lactobacillus salivarius* PS2'nin RAPD profilinin (sütun 3) burada çalışılan başka suşlarınkilerden farklı olduğunu ortaya çıkarmıştır, bir seçilmiş karşılaştırma için bakınız şekil 1 (başka RPAD profilleri gösterilmemiştir).

Arroyo et al., in Clin. Infect. Dis. 2010, 50(12), 1551-1558, mastiti tedavi etmede bir bakteriyel suş *Lactobacillus salivarius* CECT5713'ün kullanımını tarif eder. Mevcut buluşun konusu olan *Lactobacillus salivarius* PS2 suşunun burada CECT5713 suşu için bir farklı RAPD profiline sahip olduğu ve aynı zamanda CECT5713 suşuna kıyasla iyileştirilmiş özelliklere, örneğin, bunun genomunda artırılmış kararlılığına ve profajların yokluğuna, sahip olduğu da gösterilmiştir (Langa et al., in Appl. Microbiol. Biotechnol. 2012, 94, 1279-87).

### **Örnek 2: Klinik çalışma I - Mastitin tedavisi**

*Yöntemler.* Bir açık-etiketli çalışma, mastit semptomları olan bir toplam 108 emziren kadın ile gerçekleştirilmiştir. Tümü aşağıdaki kriterleri karşılamıştır: meme enflamasyonu, ağrılı emzirme,  $> 1 \times 10^4$  cfu/mL olan süt bakteriyel sayımı. Emziren kadınlar 14 gün boyunca her gün için her bir g için  $1 \times 10^9$  cfu *L. salivarius* PS2 içeren bir dondurarak-kurutulmuş probiyotik takviye içeren 1 (tedavi grubu 1, n = 25), 2 (tedavi grubu 2, n = 25) veya 3 (tedavi grubu 3, n = 25) kapsül almıştır. Referans grup (n = 33), bunların primer bakım merkezlerinde reçete edildiği üzere 14 gün boyunca antibiyotik tedavisi almıştır. Süjelerin hiç biri çalışma boyunca ticari probiyotik gıdaları veya takviyeleri ağızdan almamıştır. Mamari apseleri, Raynaud sendromu veya herhangi bir başka mamari patolojisi olan kadınlar dâhil edilmemiştir.

Meme sütü örnekleri takviye veya tedavi başlatılmadan önce (gün 0'da) ve çalışmanın sonuna kadar her hafta (gün 7'de ve gün 14'te) alınmıştır. Semptomların evrilmesi bunların primer bakım merkezlerindeki ebeler tarafından aynı zaman noktalarında değerlendirilmiştir; gönüllülerden bunların meme ağrısını 0'dan (aşırı derecede ağrılı) 5 10'a (herhangi bir ağrı yok) skorlaması istenmiştir.

Bakteriyel sayım aşağıda olduğu şekilde süt örneklerinde ölçülmüştür. Örnekler enfeksiyöz mastite dâhil edilen ana ajanların selektif izolasyonu ve kantifikasyonu için Baird-Parker, Columbia, Mac-Conkey ve Sabouraud dekstroz kloramfenikol agar plakalarına ve paralel olarak laktobasillerin izolasyonu için L-sistein (0,5 g/L) takviye edilmiş MRS (MRS-Cys) agar plakalarına (Oxoid) yayılmıştır. Plakalar, anaerobik olarak inkübe edilmiş olan, MRS-Cys plakaları dışında, aerobik koşullarda 37°C'de 48 saat boyunca inkübe edilmiştir.

Sütten izole edilmiş bakteriler başlangıçta klasik morfolojik ve biyokimyasal testler ile tür düzeyinde tanımlanmıştır. *S. epidermidis* veya *S. aureus* türüne ait olan bakterilerin tanımlanması *dnaJ* genleri temelli bir multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile konfirme edilmiştir. Streptokokların tanımlanması, parsiyel amplifikasyon ve *tuf* geninin dizilenmesi ile gerçekleştirilmiştir. Geri kalan izolatlar 16S rRNA dizilemesi ile tanımlanmıştır. Bunların kimliği, Avrupa Moleküler Biyoloji veri tabanında depolanan diziler arasında en yüksek skora (>%99) göre belirlenmiştir.

Süt rneklerinde *L. salivarius* PS2'nin tanımlanması bir DNA-DNA koloni hibridizasyon analizi ile yapılmıştır. Bu amaç için, 2 tür-spesifik prob eşsiz 16S rRNA dizilerine göre tasarlanmıştır. Süt örneklerinden (gün 14) MRS-Cys plakaları üzerinde elde edilen koloniler MRS-Cys replika plakaların 2 setinde bir düzenli dizilim hâlinde lekelenmiştir. Akabinde, naylon Hybond-N+ diskleri (GE Healthcare) doğrudan kültür yüzeylerine serilmiştir ve orada 1 dakika boyunca tutulmuştur. Hem hibridizasyon hem de saptama önceden tarif edildiği şekilde (Jimenez et al., in Appl. Environ. Microbiol. 2008, 74: 25 4650-4655) gerçekleştirilmiştir. Koloni hibridizasyonundan sonra bir pozitif sinyal veren izolatların kimliği yukarıda tarif edildiği üzere 16S rRNA dizileme ile konfirme edilmiştir ve önceden tarif edildiği üzere değişken alanlı jel elektroforezi (PFGE) genotiplemesine gönderilmiştir (Jimenez et al., 2008). Bunların profilleri *L. salivarius* CECT4062'ninkiler, *L. salivarius* CECT4063'nkiler, *L. salivarius* DSM 20492'ninkiler ve *L. salivarius* 30 CECT5713'nkiler ile karşılaştırılmıştır.

İstatistiksel analiz: Sütün her bir mL'si için cfu sayısı olarak kaydedilen mikrobiyal veriler, istatistiksel analizden önce logaritmik değerlere dönüştürülmüştür. Bakteriyel sayımların bildirilen değerleri iki kopya hâlindeki veya üç kopya hâlindeki belirlemelerin ortalama değerleridir. Sürekli değişkenler "bakteriyel sayımlar" ve "meme ağrısı skoru" normal dağılımlı değildir. Mann Whitney testleri bakteriyel sayımlar (toplam ve ana bakteriyel suşlar) arasındaki ve çalışmanın farklı zaman noktalarında meme ağrısı skorları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları belirlemek için gerçekleştirilmiştir.

Süt örnekleri içinde bakteriyel sayımlar: Gün 0'da, süt içinde toplam bakteriyel sayımın ortalama değerleri 4 grupta çok benzerdir ve 8,5 ila  $1,2 \times 10^4$  cfu/mL aralığındadır (Tablo 1). Gün 7'de, her gün için 2 veya 3 doz alan, tedavi grupları 2'deki ve 3'teki toplam bakteriyel sayımların ortalama değerleri, her gün için bir doz alan, tedavi grubu 1'deki karşılık gelen değere kıyasla anlamlı olarak daha düşüktür ( $p < 0,001$ ). Bu parametre, 7 günde referans grupta analiz edilmemiştir. Gün 14'te, referans gruptaki toplam bakteriyel sayımların ortalama değerleri tedavi grubu 1'e kıyasla anlamlı olarak daha düşük olma eğilimindedir. Bununla birlikte, tedavi grupları 2 ve 3, referans gruba kıyasla toplam bakteriyel sayımın anlamlı olarak daha düşük ortalama değerlerine sahiptir, bakınız, Tablo 1 ve Şekil 2.

20

*Tablo 1: Tedavi ve referans gruplarında ortalama toplam bakteriyel sayımlar (TBC).*

	10 <sup>3</sup> cfu/mL içindeki TBC (standart sapma)		
	gün 0	gün 7	gün 14
tedavi grubu 1	97.5 (8.0)	74.3 (11.5)	49.8 (16.1)
tedavi grubu 2	99.0 (4.1)	38.4 (12.8)	15.9 (7.7)
tedavi grubu 3	97.7 (4.8)	8.2 (7.5)	2.1 (2.3)
referans grup	98.6 (8.0)	n.d.	40.1 (34.0)

n.d. = belirlenmemiştir

Klinik semptomların evrilmesi: Kadınlar tarafından bildirilen meme ağrısının ortalama skoru 4 gruptan gün 0'da, 0 ila 3 aralığında olarak, benzerdir, bakınız, Tablo 2 ve Şekil 3a. Gün 14'te, meme ağrısı skoru katılımcıların çoğunda iyileşmiştir. Gün 14'te, her gün için 2 ve 3 doz alan, tedavi grubu 2'deki ve 3'teki meme ağrısı skorları (sırasıyla, 6,5 ve

25

8,2 olan ortalama skor) ve tedavi grubu 1'deki meme ağrısı skoru (sırasıyla, 4,08 ve 5,03 olan ortalama skor) arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar vardır ( $p<0,001$ ), bakınız, Tablo 2 ve Şekil 3b.

5 **Tablo 2: Tedavi ve referans gruplarında ortalama meme ağrısı skorları (BPS).**

	BPS (standart sapma)		
	gün 0	gün 7	gün 14
tedavi grubu 1	1.2 (0.8)	2.9 (0.9)	4.8 (1.1)
tedavi grubu 2	1.1 (0.7)	4.8 (1.1)	6.5 (0.9)
tedavi grubu 3	1.0 (0.8)	6.8 (1.4)	8.2 (1.2)
referans grup	1.1 (0.8)	n.d.	5.0 (2.5)

n.d. = belirlenmemiştir

**Sonuç:** Bu bulgular, *L. salivarius* PS2 ile takviyenin, mastitten muzdarip olan kadınların meme sütünde bir azaltılmış bakteriyel sayım ve klinik semptomlarının (ağrı skorunun) bir iyileştirilmesi ile sonuçlanmıştır.  $10^9$  cfu/mL *L. salivarius* PS2 olan bir günlük doz ile elde edilen sonuçlar, antibiyotikler ile elde edilenler ile karşılaştırılabilirken,  $10^9$  cfu/mL *L. salivarius* PS2 olan iki veya üç günlük doz antibiyotikler ile düzenli tedaviye kıyasla açık bir şekilde daha iyi performans gösterir. Her gün için bu suşun iki veya üç doz ile, özel olarak üç doz ile, takviyesi standart antibiyotik tedavisine kıyasla bakteriyel sayımın anlamlı olarak daha büyük azalması ile sonuçlanmıştır.

15

### **Örnek 3: Klinik çalışma II - Yüksek-riskli süljelerde mastitin önlenmesi**

**Yöntemler:** Bir randomize edilmiş, çift kör, plasebo-kontrollü müdahale çalışması, bebeklerini emzirmeye niyetlenen, 25 - 35 yaşındaki, bir toplam 108 sağlıklı gebe kadın ile gerçekleştirilmiştir. Tümü aşağıdaki kriterleri karşılamıştır: normal gebelik, sağlıklı durum ve en az, bir önceki gebelikten, sonra bir laktasyonel mastit öyküsü. Süljeler bir test grubuna ( $n = 55$ ) ve bir plasebo grubuna ( $n = 53$ ) randomize edilmiştir. Gebeliğin 30. haftasından doğumdan 12 hafta sonraya kadar, test grubu her gün için her bir g için  $1 \times 10^9$  cfu *L. salivarius* PS2 içeren dondurarak-kurutulmuş probiyotik toz formunda takviye içeren 1 saşeyi ağızdan almıştır ve plasebo grubu bir plasebo takviye içeren 1 saşeyi ağızdan almıştır. Süljelerin hiç biri gebeliğin üçüncü trimesteri sırasında ve

25

5 çalışma sırasında ticari probiyotik gıdaları veya takviyeleri ağızdan almamıştır. Önceki 30 gün içinde ticari probiyotik gıdaları veya takviyeleri ağızdan alan veya bir antibiyotik tedavisi alan kadınlar ve inek sütü proteinine alerjisi veya laktoza intoleransı olan kadınlar ve mamari apseleri, Raynaud sendromu veya herhangi bir başka mamari patolojisi olan kadınlar dâhil edilmez.

10 Mastit semptomları doğumdan sonraki ilk 3 ay boyunca Primer Sağlık Merkezleri'nin ebeleri tarafından değerlendirilmiştir. Enfeksiyöz mastitin sınıflandırılması için aşağıdaki güncel kriterler [Fernández et al., *Benef. Microbes.* 2014, 5(2), 169-83], "akut mastit", lokal (tıkanma, ağrı, kızarıklık, azaltılmış salgılama) ve sistemik (grip-benzeri) semptomları olan memenin bir akut enflamasyonu olarak tanımlanmış iken, "subakut mastit", lokal semptomların (tıkanma, iğne-benzeri ve/veya yanmalı ağrı, azaltılmış salgılama) varlığı ve sistemik semptomların yokluğu ile karakterize edilen bir meme enflamasyonu olarak tanımlanmıştır. Her iki tanım da yalnızca, aşağıda tanımlandığı şekilde belirlenmiş bir yüksek süt bakteriyel sayımı ( $>10^3$  CFU/mL) ve bir yüksek süt lökosit sayımı ( $>10^4$  hücre/mL) ile ilişkilendirilmiş olguları içerir. Lökosit kantifikasyonu May-Grünwald-Giemsa diferansiyel boyamasından sonra optik mikropkopi ile gerçekleştirilmiştir.

20 Mastit gerçekleştiğinde, gönüllülerden, bir standart ağrı skorlama prosedürü [Jensen and Karoly, *Handbook of Pain Assessment*, 2nd edition, New York: Guilford Press, 2001, pp 15-34; Jensen, *Pain assessment in clinical trials*. In H. Wittink and D. Carr (eds.), *Pain Management: Evidence, Outcomes, and Quality of life*. Amsterdam: Elsevier, 2008] izlenerek, bunların meme ağrısı hissini 0'dan (aşırı derecede ağrılı) 10'a 25 (herhangi bir ağrı yok) skorlaması istenmiştir.

30 Meme sütü örnekleri (10 mL), 3-aylık takip periyodu sırasında mastitten muzdarip olmayan kadınlar durumunda doğumdan sonraki 91. ve 100. günler arasında toplanmıştır. Bu tarz bir rahatsızlıktan muzdarip olan kadınlar durumunda, bir süt örneği tanıdan hemen sonra toplanmıştır. Bakteriyel sayım aşağıda olduğu şekilde süt örneklerinde ölçülür. Örnekler enfeksiyöz mastite dâhil edilen ana ajanların selektif izolasyonu ve kantifikasyonu için Baird-Parker, Columbia, Mac-Conkey ve Sabouraud dekstroz kloramfenikol agar plakalarına ve paralel olarak laktobasillerin izolasyonu için L-sistein (0,5 g/L) takviye edilmiş MRS (MRS-Cys) agar plakalarına (Oxoid) yayılır. 35 Plakalar, anaerobik olarak inkübe edilen, MRS-Cys plakaları dışında, aerobik

koşullarda 37°C'de 48 saat boyunca inkübe edilir. Sütten izole edilmiş bakteriler başlangıçta klasik morfolojik ve biyokimyasal testler ile tür düzeyinde tanımlanır. Bakteriyel sayımdan sonra, her bir koloni morfoloji tipinin temsilleri bir bakteriyel koloninin bir kısmını (~1 µL) bir MALDI örnek plakasına lekeleme ile MALDI-TOF ile tanımlanmıştır. Akabinde, asetonitril (%28) içindeki bir doymuş α-siyano-4-hidroksisinnamik asidin 1 µL'si bunun üstüne sürülmüştür ve bunun oda sıcaklığında kurumasına izin verilmiştir. Her bir izolat için, bir ortalama spektrum en az 50 m/z'lik spektrumlar profilleri ile yapılmıştır ve Myla veri tabanına (Biomerieux) dâhil edilen spektrumlar ile karşılaştırma ile tanımlama için kullanılmıştır. Tanımlama veri tabanındaki tür-spesifik m/z değerleri ile bir %99-100'lük eşleşme olarak tanımlanmıştır.

İstatistiksel analiz: ün her bir mL'si için cfu sayısı olarak kaydedilen mikrobiyal veriler, istatistiksel analizden önce logaritmik değerlere dönüştürülmüştür. Sürekli değişkenler ortalamalar olarak ve normalite için kontrol edildikten sonra ortalamaların %95'lik güven aralığı (CI) olarak ifade edilmiştir. Bir tek-yönlü ANOVA analizi akabinde bir Bonferroni post-testi probiyotik ve plasebo grupları arasında çalışmanın yaşının ve gebelik zamanının (gebelik haftasının) karşılaştırılması için ve meme ağrısı skorlarında probiyotik müdahalesinin ve mastit tipinin (subakut ve akut) etkisini kontrol etmek için kullanılmıştır. Bir iki-yönlü ANOVA analizi, tedavinin ve mamari bez sağlık durumunun stafilokoksal/streptokoksal sayımlar üzerinde etkisini aynı zamanda tedavinin ve mastit tipinin meme ağrısı skoru üzerindeki etkisini araştırmak için ve iki araştırılan değişkenin olası etkileşimini çalışmak için kullanılmıştır. Oranlar gerektiğinde  $\chi^2$  veya Fisher kesin olasılık testleri kullanılarak karşılaştırılmıştır. Meme sütündeki stafilokoksal/streptokoksal sayımlar ve meme ağrısı skoru arasındaki ilişkiyi test etmek için bir korelasyon analizi gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel anlamlılık,  $P < ,05$ 'e ayarlanmıştır.

Bulgular: Çalışmanın başlangıcında probiyotik ve plasebo grubu arasında yaşa (probiyotik grup için ortalama: 31,18 yaş, %95 CI: 30,70 - 31,66 ve plasebo grubu için ortalama: 30,51 yaş, %95 CI: 30,02 - 31,00;  $P = ,1699$ , tek-yönlü ANOVA) ve gebelik haftasına (probiyotik grup için ortalama: 29,82 hafta, %95 CI: 29,49 - 30,15 ve plasebo grubu için ortalama: 30,06 hafta, %95 CI: 29,74 - 30,37;  $P = ,2953$ , tek-yönlü ANOVA) ilişkin herhangi bir anlamlı farklılık yoktur. Probiyotiğin ağızdan alımı ile ilgili herhangi bir advers veya yan etki/olay çalışma boyunca bildirilmemiştir.

Mastitin meydana gelmesi doğrudan sonraki ilk 3 ay sırasında değerlendirilmiştir. Global olarak, mastitten muzdarip olan 108 kadından 44'ü (%59,26); olguların %77,27'si subakut olarak sınırlandırılmış iken, akut olgular geri kalan %22,73'e tekabül etmiştir. Doğumdan sonraki ilk üç ay içinde mastit (subakut veya akut) insidansının sonuçları aynı zamanda meme sütündeki ortalama toplam bakteriye sayımlar (TBC) ve meme ağrısı skorları (BPS) Tablo 3'te sunulur. Probiyotik ve kontrol grubu arasında mastit sıklığına ilişkin istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunmuştur. Probiyotik grubunda mastitten muzdarip olan kadınların yüzdesi kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak daha düşüktür ( $P = ,0010$ ,  $\chi^2$  testi). Gebelikleri sırasında *L. salivarius* PS2 almış olan kadınların grubu ve bir plasebo almış olan kontrol grubu arasında mastitin tipine ilişkin herhangi bir anlamlı farklılık bulunmamıştır. Probiyotik grubunda, subakut ve akut mastitin sıklıkları, sırasıyla, %79 ve %21 iken, kontrol grubunda, bu yüzdeler sırasıyla %77'dir ve %23'tür ( $P = 1,000$ ; Fisher kesin olasılık testi).

Tüm katılımcılar tarafından sağlanan süt örneklerindeki ortalama bakteriyel sayım,  $2,63 \times 10^3$  CFU/mL'dir (%95 CI:  $1,74 \times 10^3 - 3,98 \times 10^3$ ). Hem probiyotik veya plasebo tüketimi hem de mamari bezin sağlıklı hâli (sağlıklı, subakut mastit veya akut mastit) meme sütünde saptanan bakteriyel sayımlar üzerinde bir anlamlı etkiye sahiptir (her iki ana faktör için de  $P = ,000$ , iki-yönlü ANOVA). İlâveten, bu iki faktör arasındaki etkileşim de hayli anlamlıdır ( $P = ,000$ , iki-yönlü ANOVA); bu, sağlıklı kadınlardan ve mastiti olan kadınlardan elde edilen meme sütünde bulunan ortalama bakteriyel sayımların güçlü bir şekilde probiyotik tedavisine bağlı olduğunu göstermiştir.

Probiyotik almış olan sağlıklı kadınlardan ( $n = 41$ ) elde edilen süt örneklerinde kaydedilen bakteriyel sayımlar plasebo alan kontrol grubuna dâhil edilen sağlıklı kadınlarınkiler ( $n = 23$ ) ile karşılaştırıldığında, bir küçük ancak anlamlı farklılık gözlemlenmiştir ( $P = ,0005$ ,  $t$ -testi). Subakut ve akut mastiti olan kadınlardan elde edilen sütün bakteriyel sayımlarında her iki grup arasında gözlemlenen farklılıklar daha yüksektir: probiyotik subakut ( $n = 11$ ) ve akut ( $n = 3$ ) gruplarındaki ortalama bakteriyel sayımlar, sırasıyla,  $6,76 \times 10^3$  CFU/mL ve  $6,17 \times 10^3$  CFU/mL iken, plasebo subakut ( $n = 23$ ) ve akut ( $n = 7$ ) gruplarındaki ortalama bakteriyel sayımlar, sırasıyla,  $4,07 \times 10^4$  CFU/mL subakut ( $n = 11$ ) ve  $1,05 \times 10^5$  CFU/mL miktarındadır (sırasıyla,  $P = ,0001$  ve  $,0064$ ,  $t$ -testi) (Tablo 3). Hem probiyotik ( $P = ,770$ ,  $t$ -testi) hem de plasebo ( $P = ,0939$ ,  $t$ -testi) gruplarında subakut olgulardan elde edilen meme sütü örneklerinin bakteriyel

sayımları akut olgulardan elde edilenler ile karşılaştırıldığında herhangi bir anlamlı farklılık bulunmamıştır.

Tablo 3: Klinik çalışma II'nin Sonuçları

	test grubu (n = 55)	plasebo grubu (n = 53)	P
herhangi bir mastit olmaması insidansı	n = 41 (75 %)	n = 23 (43 %)	
mastit insidansı (toplam)	n = 14 (25 %)	n = 30 (57 %)	.0010 [b]
subakut mastit insidansı	n = 11 (79 %)	n = 23 (77 %)	1.000 [c]
akut mastit insidansı	n = 3 (21 %)	n = 7 (23 %)	1.000 [c]
TBC [a] (herhangi bir mastit yok)	0.50	0.69	.0005 [d]
TBC [a] (subakut mastit)	6.76 (5.01-9.33)	40.7 (24.0-70.8)	.0001 [d]
TBC [a] (akut mastit)	6.17 (1.95-19.5)	105 (32.4-339)	.0064 [d]
BPS (subakut + akut mastit)	2.77 (2.16-3.38)	1.40 (0.93-1.87)	.0012 [e]

[a]  $10^3$  cfu/mL içinde ortalama ve %95'lik güven aralığı in; [b]  $\chi^2$  testi; [c] Fisher kesin olasılık testi; [d] *t*-testi; [e] tek-yönlü ANOVA.

5

Mastitten muzdarip olan katılımcıların çoğu (44'ünün 43'ü), 0 (aşırı derecede ağrılı) ile 10 (herhangi bir ağrı yok) aralığındaki bir ölçekte bunların meme ağrısını 0 ile 4 arasında skorlamıştır. Bildirilen BPS ve sütte bulunan bakteriyel sayımlar arasında bir güçlü korelasyon vardır ( $r = -.814$ ,  $P = .000$ , Pearson momentler çarpımı korelasyonu).

10

Mastiti olan katılımcı kadınlar tarafından bildirilen meme ağrısı için kaydedilen tüm gözlemleri karşılaştıran bir iki-yönlü ANOVA testi, *L. salivarius* PS2 tüketiminin, mastit tipi aksine, ağrının yoğunluğu üzerinde bir anlamlı etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Tablo 8). Daha az yoğun ağrı gösteren daha yüksek BPS değerleri, plasebo grubundakilere (n = 30) kıyasla probiyotik grubundaki kadınlar (n = 13) tarafından

15

bildirilmiştir. Genel olarak, mastit tipi meme ağrısı skorunda anlamlı farklılıklara neden olmamıştır (akut mastiti olan 10 kadındaki ortalama BPS = 1,30'a; %95 CI: ,40 - 2,20, kıyasla subakut mastiti olan 33 kadındaki ortalama BPS = 1,97; %95 CI: 1,50 - 2,44;  $P = ,1663$ , tek-yönlü ANOVA). Mastiti olan tüm kadınlar arasında, daha yoğun meme ağrısından muzdarip olduğunu (daha düşük BPS) bildirenler probiyotik grubuna kıyasla

daha sıklıkla plaseboda bulunmuştur ( $P = ,0327$ ,  $\chi^2$  testi). Gerçekte, memesini aşırı bir şekilde ağrılı (BPS = 0) hissettiğini gösteren hiç bir kadın kadınlar ( $n = 9$ ) *L. salivarius* PS2 almamıştır ve plasebo grubuna dâhil edilmiştir.

- 5 **Sonuç:** *L. salivarius* PS2 uygulaması, mastitin meydana gelmesinde, maternal sütün toplam bakteriyel sayımlarında (sağlıklı kadınlar, subakut ve akut mastitten muzdarip olan kadınlar için) ve mastitten muzdarip olan kadınların meme ağrısı skorlarında, mastit geliştirme yüksek riski altında olan kadınların hedef grubu için bile, anlamlı azalmaya neden olur. Dolayısıyla, buluşa göre suş mastiti önleyebilir.

10

#### **Örnek 4: Klinik çalışma III - mastitin tedavisi**

**Yöntemler:** Mastit semptomları olan bir toplam 23 kadın çalışmaya katılmıştır. Tümü aşağıdaki kriterleri karşılamıştır: meme enflamasyonu, ağrılı emzirme,  $> 3 \log_{10}$  koloni oluşturma birimi (CFU)/mL olan süt stafilokoksal/streptokoksal sayım,  $> 4 \log_{10}$  hücre/mL olan süt lökosit sayımı. Tüm süjeler, 21 gün boyunca, günlük olarak  $\sim 9,5 \log_{10}$  CFU *Lactobacillus salivarius* PS2 tüketmiştir. Süjelerin hiç biri çalışma sırasında ticari probiyotik gıdaları veya takviyeleri ağızdan almamıştır. Mamari apseleri, Raynaud sendromu veya herhangi bir başka mamari patolojisi olan kadınlar dâhil edilmemiştir.

20

Mastit semptomları günler 0'da ve 21'de Primer Sağlık Merkezleri'nin ebeleri tarafından değerlendirilmiştir. Meme sütü, kan ve idrar örnekleri çalışmanın başlangıcında ve sonunda elde edilmiştir. Süt örnekleri (30 mL) 07.00-09.00 arasında ve son beslemeden en az 2 saat sonra toplanmıştır. İlk 2 mL mikrobiyal analizin ve somatik hücre sayımının manüel ifadesi için toplanmış iken sütün geri kalanı biyokimyasal ve immünolojik analizler için bir meme pompası kullanılarak elde edilmiştir. Kan örneklerinin ilk 22 mL'lik-fraksiyonu hücresel fraksiyonun yağ asidi (FA) bileşimini ve plazma içindeki oksidatif stres (OS) ile ilgili parametreleri analiz etmek için bir Na-heparin tüpüne toplanmıştır. 8 mL'lik bir ikinci fraksiyon standart hematoloji ve immünolojik analiz için EDTA tüplerine toplanmıştır. Son 4 mL, standart biyokimya yüksek duyarlı C-reaktif proteinin (hs-CRP) kantifikasyonu için serum elde etmek amacıyla kullanılmıştır. İlk sabah idrarı standart idrar analizi (yoğunluk, pH, proteinler, glikoz, keton cisimcikleri, Nitritler, ürobilinojen, kırmızı kan hücreleri ve lökositler) için toplanmıştır.

35

Bakteriyel sayım aşağıda olduğu şekilde süt örneklerinde ölçülmüştür. Örnekler enfeksiyöz mastite dâhil edilen ana ajanların selektif izolasyonu ve kantifikasyonu için Baird-Parker, Columbia, Mac-Conkey ve Sabouraud dekstroz kloramfenikol agar plakalarına yayılmıştır ve aerobik koşullarda 37°C'de 48 saat boyunca inkübe edilmiştir.

5 Bakteriyel sayımdan sonra, her bir koloni morfoloji tipinin temsilcileri MALDI-TOF ile tanımlanmıştır. Taze süt örnekleri bir otomatik hücre sayıcı kullanılarak somatik hücre sayımı (SCC) için kullanılmıştır. Somatik hücrelerin alt-kümelerinin analizi taze sütün May-Grünwald-Giemsa diferansiyel boyamasından sonra optik mikroskopi ile gerçekleştirilmiştir. Analiz iki farklı gözlemci tarafından iki kopya hâlinde

10 gerçekleştirilmiştir ve her bir örnek için bir minimum 100 hücre sayılmıştır. Süt örneklerinin yağ, protein, laktoz, toplam katı maddeler ve yağ-olmayan katı maddeler (NFS) konsantrasyonları, insan sütü analizi için önceden kalibre edilmiş ve doğrulanmış bir MilkoScan Minor aygıtı kullanılarak belirlenmiştir. Sodyum, potasyum ve klorür konsantrasyonları bir Spotlyte analizör üzerinde iyon-selektif elektrotlar

15 kullanılarak yağından-arındırılmış süt örneklerinde belirlenmiştir. Buzu çözüldükten sonra, her bir süt örneğinin 0,5 mL'si 0,5 mL 40 mM NaCl çözeltisi ile spayklanmıştır. Her bir ölçüm üç kere tekrar edilmiştir.

Süt örneklerinde ve kan hücresi fraksiyonunda bulunan yağ asitleri (FA) doğrudan FA metil esterlere (FAME'ye) türevlendirilmiştir ve önceden tarif edildiği şekilde

20 [Rodríguez-Alcalá et al., Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 2009, 10, 32-36] analiz edilmiştir. Analizler en az iki kopya hâlinde gerçekleştirilmiştir. Süt ve kan örneklerinde sitokinlerin, kemokinlerin, büyüme faktörlerinin ve immünoglobülinlerin bir geniş spektrumunun konsantrasyonları bir Bioplex 200 system aygıtı kullanılarak veya

25 önceden tarif edildiği üzere [Espinosa-Martos et al., J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 2013, 56, 560-8] ELISA ile iki kopya hâlinde belirlenmiştir. Plazma örneklerindeki Lewis kan antijenleri de analiz edilmiştir. Kandaki ozmotik stres ile ilgili metabolitler ve nitrik oksit metabolizması nihai ürünleri (NOx) önceden tarif edildiği üzere [Codoñer-Franch et al., Atherosclerosis 2011, 215, 475-480 ve Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.

30 2012, 22, 237-243] iki kopya hâlinde ölçülmüştür

İstatistiksel analiz: Sütün her bir mL'si için cfu sayısı olarak kaydedilen mikrobiyal veriler, istatistiksel analizden önce logaritmik değerlere dönüştürülmüştür. Shapiro-Wilk testleri normalite kontrolü için kullanılmıştır. Konsantrasyonlar normal dağılımlı

35 verilerde ortalamalar ve %95'lik güven aralığı (CI) olarak ve bunlar olmadığında

medyanlar ve inter-kuartil aralık (IQR) olarak ifade edilmiştir. Probiyotik müdahalesinin etkisi eşli Student t-testleri veya Wilcoxon işaretli-sıra-testleri ile analiz edilmiştir. Analitik parametrelerin saptanma sıklıklarındaki farklılıklar gerekli olduğunda Yates düzeltmesi ile  $\chi^2$  testleri kullanılarak analiz edilmiştir. Farklılıkların  $P<.05$ 'te anlamlı olduğu düşünülmüştür.

Süt analizleri: Süt örneklerinin analizleri Tablolar 4'te ve 5'te özetlenir. Gün 0'da, süt örneklerindeki ortalama toplam bakteriyel sayım  $4,08 \log_{10}$  CFU/mL'dir; bu değer çalışmanın sonunda anlamlı bir şekilde azalmıştır ( $3,09 \log_{10}$  CFU/mL;  $P<.000$ ) (Tablo 4). Önemli olan, mastite dâhil edilen tüm mikroorganizmaların sayımları (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *viridans streptococci* ve korinebakteriler) gün 21'de anlamlı bir şekilde azalmış iken (Tablo 4), gün 0'da toplanan süt örneklerinde saptanamayabilen Laktobasiller gün 21'de kadınların yarısından fazlasında izole edilmiştir (veriler gösterilmemiştir). Klinik semptomlar çalışmanın sonunda tüm kadınlar arasında kaybolmuştur veya göze çarpan bir şekilde iyileşmiştir (veriler gösterilmemiştir). Global olarak, probiyotik tedavisinden sonra polimorfonükleer (PMN) lökositlerin yüzdesinde bir anlamlı azalmanın ( $P=.018$ ) ve epitelyal hücrelerin yüzdesinde bir aşağıya doğru eğilimin gözlemlenmiş olmasına rağmen, SCC değerleri değişmemiştir (Tablo 4). Yağın, laktozun, toplam katı maddelerin ve yağ-olmayan katı maddelerin meme sütü konsantrasyonları çalışma periyodu boyunca değişmemiştir ve protein içeriğinin gün 21'de düşürülmüş olmasına rağmen, bu hâlâ normal fizyolojik değerler içindedir (veriler gösterilmemiştir). Probiyotik müdahalesinden sonra süt potasyum düzeyleri azaltılmış ( $P=.000$ ) ve klorürünkiler artırılmış ( $P=.002$ ) iken, süt sodyum konsantrasyonları aynı zamanda Na/K oranı modifiye edilmemiştir (Tablo 4). Meme sütü örneklerinde bulunan ana yağ asidi oleik asittir (C18:1 c9, ~%40), bunu palmitik (C16, ~%15-17), linoleik (C18:2 c9, c12, ~%13-14) ve laurik (C12, ~%10) asitler izlemiştir (veriler gösterilmemiştir). Palmitik asitte gözlemlenen bir küçük artış dışında (%1,9,  $P=.018$ ), tedaviden sonra sütün FA bileşiminde herhangi bir değişim bulunmamıştır.

IgA, IgG1, IgG3, IgG4 ve IgM süt örneklerinde en sık olarak saptanan immünoglobülinlerdir. IgA, tüm örneklerde ve en yüksek konsantrasyonlarda saptanmıştır (Tablo 5). Probiyotik tedavisinden sonra, IgE ve IgG3 düzeyleri anlamlı bir şekilde artmıştır (sırasıyla,  $P=.041$  ve  $.020$ ) (Tablo 5). Sitokinler, kemokinler ve büyüme faktörleri meme sütü örneklerinde büyük ölçüde farklı sıklıklarda bulunmuştur: IL-1 $\beta$ ,

TGF- $\beta_2$ , GRO- $\alpha$ , IL-8, MCP-1, MIP-1 $\beta$  ve EGF örneklerin %90'undan fazlasında, IL-6, IL-7 ve GM-CSF %57,87'sinde ve bu bileşimlerin geri kazanı bunların %50'sinden daha azında saptanabilir (Tablo 5). Probiyotik alımı, anlamlı bir şekilde artan IL-7 ve EGF dışında (sırasıyla,  $P=,070$  ve  $,061$ ), ne saptamanın bunların gözlemlenen sıklıklarını ne de bunların konsantrasyonlarını modifiye etmemiştir (Tablo 5). İlginç bir şekilde, bu değişimlerin istatistiksel anlamlılığa ulaşmamış olmasına rağmen, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12(p70) ve TNF- $\alpha$  sitokinlerinin ve IL-8, MCP-1 ve MIP-1 $\beta$  kemokinlerinin ortalama konsantrasyonu müdahaleden sonra daha düşüktür ve bunların güven aralığı değerleri daha dardır (Tablo 5).

10

Tablo 4. Süt içindeki bakteri, somatik hücre ve elektrolit içerikleri

	Başlangıç (gün 0)		Nihai (gün 21)		$P^{[a]}$
	n	ortalama (%95 CI <sup>[b]</sup> )	n	ortalama (%95 CI <sup>[b]</sup> )	
<i>Bakteri sayımı (<math>\log_{10}</math> CFU/mL)</i>					
<i>S. epidermidis</i>	23	3.59 (3.33-3.85)	23	2.83 (2.59-3.06)	.000
<i>S. aureus</i>	10	0.87 (0.33-1.41)	6	0.22 (-0.13-0.56)	.002
<i>Streptococcus</i> sp.	21	2.99 (2.53-3.46)	20	1.97 (1.61-2.33)	.000
<i>Corynebacterium</i> sp.	11	0.45 (0.08-0.82)	5	0.03 (-0.23-0.28)	.001
Toplam bakteri sayımı	23	4.08 (3.89-4.28)	23	3.09 (2.90-3.28)	.000
<i>Somatik hücre sayımı (<math>\log_{10}</math> hücre/mL)</i>					
Toplam hücre sayımı		7.94 (7.77-8.11)		8.04 (7.92-8.16)	.689
Canlı hücre sayımı		7.30 (7.14-7.46)		7.30 (7.17-7.43)	.648
Canlılık (%)		21.32 (18.74-23.91)		19.65 (17.17-22.12)	.600

	Başlangıç (gün 0)		Nihai (gün 21)		P <sup>[a]</sup>
	n	ortalama (%95 CI <sup>[b]</sup> )	n	ortalama (%95 CI <sup>[b]</sup> )	
<i>Bakteri sayımı (log<sub>10</sub> CFU/mL)</i>					
<i>Somatik hücre alt-tipi (%)</i>					
Monos./Makrof. <sup>[c]</sup>		13.84 (9.90-17.77)		17.49 (11.98-23.00)	.163
Lenfositler		77.36 (72.11-82.61)		77.98 (72.77-83.20)	.346
PMN lökositleri		6.11 (4.93-7.28)		2.62 (0.78-4.46)	.018
Epitelyal hücreler		2.63 (0.87-4.29)		1.83 (0.63-3.03)	.102
<i>Elektrolit konsantrasyonu (mM)</i>					
Sodyum (Na)		14.54 (12.34-16.75)		14.16 (12.40-15.93)	.665
Potasyum (K)		13.77 (13.14-14.41)		12.70 (12.19-13.21)	.000
Klorür		21.94 (18.14-25.73)		28.40 (23.44-33.36)	.002
Na/K oranı		1.08 (0.90-1.25)		1.13 (0.98-1.28)	.447

[a] eşli t-testi; [b] %95'lik güven aralığı; [c] Monositler/Makrofajlar.

Tablo 5. Süt içindeki immüoglobülinlerin ve sitokinlerin konsantrasyonu

	Başlangıç (gün 0)		Nihai (gün 21)		P <sup>[a]</sup>
	n	ortalama (%95 CI <sup>[b]</sup> )	n	ortalama (%95 CI <sup>[b]</sup> )	
<i>İmmüoglobülinler (mg/L)<sup>[c]</sup></i>					
IgA ( $\times 10^3$ )	23	3.90 (3.31-4.49)	23	3.77 (3.32-4.20)	.543
IgE	11	0.29 (0.12-0.45)	12	0.50 (0.27-0.73)	.041
IgG1	21	52.24 (41.42-63.06)	21	50.10 (36.66-63.54)	.788
IgG2	9	282.85 (83.89-481.82)	10	285.93 (109.87-461.98)	.441

	Başlangıç (gün 0)		Nihai (gün 21)		P <sup>[a]</sup>
	n	ortalama (%95 CI <sup>[b]</sup> )	n	ortalama (%95 CI <sup>[b]</sup> )	
<i>İmmüoglobülinler (mg/L)<sup>[c]</sup></i>					
IgG3	17	17.54 (11.39-23.68)	17	25.50 (17.61-33.39)	.020
IgG4	17	427.57 (295.82-559.32)	19	426.80 (323.42-530.18)	.261
IgM	22	14.97 (9.49-20.45)	22	14.30 (9.99-18.61)	.654
<i>Doğuştan immünite (ng/L)<sup>[c]</sup></i>					
IFN- $\gamma$	4	56.06 (-98.47-210.58)	3	14.52 (-1.59-30.63)	.475
IL-1 $\beta$	23	40.70 (-38.51-119.90)	21	14.10 (-10.77-38.98)	.499
IL-6	16	3.42 (0.82- 6.01)	15	1.64 (0.19- 3.10)	.572
IL-12(p70)	4	2.43 (-2.97-7.84)	5	0.70 (0.07-1.33)	.500
TNF- $\alpha$	8	14.25 (-11.44-39.93)	13	4.03 (2.18-5.89)	.899
<i>Edinilmiş immünite (ng/L)<sup>[c]</sup></i>					
IL-2	1	2.24	1	0.20	
IL-4	6	0.76 (-0.47-2.00)	4	0.49 (-0.05-1.03)	.210
IL-10	5	2.39 (-1.24-6.02)	8	0.90 (0.29-1.51)	.298
IL-13	3	2.90 (-5.49-11.29)	8	3.72 (-0.49-7.93)	.166
IL-17	2	53.17 (-590.08-696.43)	2	7.01 (-26.79-40.81)	
TGF- $\beta_2(\times 10^3)$	21	7.86(4.60-11.13)	22	8.23 (4.42-12.04)	.646
<i>Kemokinler (ng/L)<sup>[c]</sup></i>					
GRO- $\alpha$	21	899.78 (419.07-1380.49)	21	1936.48 (398.10-3473.98)	.185
IL-8	23	134.40 (46.94-221.86)	23	56.73 (31.66-81.81)	.067
MCP-1	22	165.41 (45.78-285.05)	22	98.97 (38.39-159.55)	.288

*Edinilmiş immünite (ng/L) [c]*

MIP-1 $\beta$	23	54.49 (-16.49-125.48)	22	25.61 (13.90-37.31)	.405
---------------	----	-----------------------	----	---------------------	------

*Büyüme faktörleri (ng/L) [c]*

EGF ( $\times 10^3$ )	23	24.14 (21.15-27.13)	23	26.86 (23.57-30.15)	.061
G-CSF	3	10.14 (-8.14-28.42)	5	12.85 (-1.89-27.60)	1.000
GM-CSF	15	22.73 (8.55-36.91)	13	26.58 (6.92-46.23)	.347
IL-5	3	3.57 (-4.35-11.49)	0	-	
IL-7	20	1.23 (0.79-1.68)	16	12.61 (0.10-25.12)	.070

[a] eşli *t*-testi; [b] %95'lik güven aralığı; [c] Kısaltmalar: EGF = epitelyal büyüme faktörleri; G-CSF = granülosit koloni stimulan faktör; GM-CSF = granülosit-makrofaj koloni stimulan faktör; GRO- $\alpha$  = büyüme ile ilgili onkojen- $\alpha$ ; Ig = immünoglobülin; IL = interlökin; IFN- $\gamma$  = interferon- $\gamma$ ; MCP-1 = monosit kemoatraktan protein; MIP-1 $\beta$  = makrofaj enflamatuvar protein-1 $\beta$ ; TGF- $\beta_2$  = transforme edici büyüme faktörü- $\beta_2$ ; TNF- $\alpha$  = tümör nekroz faktörü- $\alpha$ .

Kan analizleri: Kan örneklerinin analizleri Tablolar 6'da ve 7'de özetlenir. Dört Lewis antijeni A/B fenotipinin üçü katılımcılar arasında saptanmıştır ancak bunların hiç biri A+/B+ fenotipi göstermemiştir (veriler gösterilmemiştir). Genel olarak, test edilen hematolojik ve biyokimyasal parametreler için elde edilen değerler her iki örnekleme zamanında da fizyolojik aralıklar içindedir. Probiyotik tedavisinden sonra lenfosit oranında bir anlamlı azalma ( $P=,004$ ) ve PMN hücrelerinininde bir artış ( $P=,011$ ) bildirilmiştir (Tablo 6). İlginç bir şekilde, kan örneklerindeki trigliseritler ( $P=,012$ ) aynı zamanda toplam ( $P =,003$ ), LDL ( $P=,006$ ) ve VLDL ( $P=,010$ ) kolesterol düzeyleri probiyotik tedavisinden sonra anlamlı bir şekilde daha düşük olmadığından (veriler gösterilmemiştir), katılımcıların kan lipid profilinde majör değişimler saptanmıştır. Hafif bir derecede daha düşük olan adrenik asit (C22:4 n6) ( $P=,047$ ) dışında (veriler gösterilmemiştir), kanın hücresel fraksiyonunda saptanan FA'larda herhangi bir kayda değer değişim gözlemlenmemiştir.

Hem mutlak konsantrasyon açısından hem de protein içeriği için normalizasyondan sonra ifade edildiğinde, yalnızca ilerlemiş oksidasyon proteini ürünlerindeki (AOPP'lerdeki) azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmasına rağmen (sırasıyla,  $P=,008$  ve  $P=,003$ ; Tablo 6), oksidatif stres belirteçlerinin analizi probiyotik

müdahalesinden sonra bunların çoğunun bir hafif derecede azalmasını göstermiştir. Oksidatif stres parametreleri arasındaki korelasyon analizi, probiyotik müdahalesinden sonra, AOPP'lerin tiyobarbitürik asit-reaktif malzeme (TBARM,  $r=,346$ ,  $P=,004$ ) ve nitrit düzeyleri ( $r=,400$ ;  $P=,001$ ) ile pozitif bir şekilde ve izoprostanlar ( $r=-,254$ ;  $P=,035$ ) ile 5 negatif bir şekilde korele edildiğini göstermiştir. SH grupları ve TBARM ( $r=-,427$ ;  $P=,000$ ) arasındaki ve izoprostanlar ve nitrit ( $r=-,318$ ;  $P=,008$ ) arasındaki negatif korelasyonlar da bildirilmiştir.

Farklı immünolojik bileşiklerinin kan düzeyleri de bunların fizyolojik aralıkları içindedir 10 (Tablo 7). Gün 21'de toplanan iki örnekte saptanmamış olan IgE dışında, tüm Ig'ler tüm kan örneklerinde mevcuttur. IL-4, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  ve tüm kemokinler örneklerin %87'sinden fazlasında saptanmıştır; IL-6, IL-12(p70), IL-7 ve G-CSF %52-74'ünde saptanmıştır ve bu bileşiklerin geri kalanı bunların %50'sinden daha azında ölçülebilir. IgA'nın ( $P=,047$ ), IgG1'in ( $P=,066$ ), IL-2'nin ( $P=,098$ ) ve MCP-1'in ( $P=,062$ ) azaltılmış 15 konsantrasyonları probiyotik tedavisinden sonra kan örneklerinde bildirilmiştir (Tablo 7).

Tablo 6. Kan hematolojik ve biyokimyasal parametreler

	Başlangıç (gün 0) ortalama (%95 CI <sup>[b]</sup> )	Nihai (gün 21) ortalama (%95 CI <sup>[b]</sup> )	<i>P</i> <sup>[a]</sup>
<i>Hematolojik parametreler</i> <sup>[c]</sup>			
Lökositler ( $10^3$ hücre/ $\mu$ L)	6.33 (5.74-6.92)	6.63 (5.93-7.33)	.293
Kırmızı hücreler ( $10^6$ hücre/ $\mu$ L)	4.61 (4.45-4.76)	4.62 (4.51-4.72)	.883
Hemoglobin (g/dL)	13.00 (12.56-13.44)	13.05 (12.69-13.41)	.730
Hematokrit (%)	40.16 (38.94-41.38)	40.10 (39.08-41.13)	.901
MCV (fL)	87.35 (84.77-89.93)	87.03 (84.46-89.60)	.548
MCH (pg)	28.29 (27.25-29.33)	28.32 (27.45-29.18)	.883
MCHC (g/dL)	32.38 (31.78-32.97)	32.56 (31.93-33.18)	.606
RDW (%)	14.43 (13.85-15.01)	14.55 (14.01-15.09)	.419
Plateletler ( $10^5$ hücre/ $\mu$ L)	2.69 (2.42-2.96)	2.57 (2.34-2.80)	.260
MPV (fL)	8.32 (7.82-8.81)	8.28 (7.79-8.76)	.863
Lenfositler (%)	34.45 (31.51-37.38)	31.06 (28.23-33.89)	.004

	Başlangıç (gün 0) ortalama (%95 CI <sup>[b]</sup> )	Nihai (gün 21) ortalama (%95 CI <sup>[b]</sup> )	P <sup>[a]</sup>
<i>Hematolojik parametreler<sup>[c]</sup></i>			
Monositler (%)	5.22 (4.64-5.80)	5.04 (4.49-5.59)	.367
PMN (%)	55.64 (52.20-59.08)	58.85 (55.37-62.32)	.011
Eozinofiller (%)	4.11 (2.47-5.76)	4.06 (1.76-6.35)	.923
Bazofiller (%)	0.57 (0.45-0.69)	0.53 (0.42-0.64)	.297
<i>Oksidatif stres ve nitrik oksit metabolizması parametreleri <sup>[c]</sup></i>			
AOPP'ler (µmol/L)	60.81 (55.85-65.77)	52.52 (47.39-57.66)	.003
AOPP'ler (nmol/mg pr.)	0.78 (0.72-0.84)	0.68 (0.61-0.75)	.008
SH grupları (µmol/L)	428.00 (412.00-444.00)	422.00 (405.00-440.00)	.430
SH grupları (nmol/mg pr.)	5.60 (5.19-6.00)	5.48 (5.10-5.85)	.499
TBARM (µmol/L) <sup>[d]</sup>	24.40 (22.80-29.60)	23.80 (22.40-30.80)	.697
MDA (µmol/L)	2.02 (1.76-2.28)	2.02 (1.69-2.35)	.983
8-izo PG F <sub>2α</sub> (pg/mL)	180.00 (155.00-206.00)	166.00 (142.00-190.00)	.175
NOx (µmol/L) <sup>[d]</sup>	22.14 (18.88-28.65)	26.04 (17.58-34.51)	.438
Nitrit (µmol/L)	2.00 (1.72-2.27)	1.99 (1.70-2.28)	.970
Nitrat (µmol/L) <sup>[d]</sup>	19.71 (15.89-27.11)	23.21 (15.40-33.21)	.386

[a] Eşli *t*-testi [b] normal dağılımlı veriler ve 1 olmadığında Wilcoxon işaretli sıra testi için %95'lik güven aralığı; [c] Kısaltmalar: MCH = ortalama korpüsküler hemoglobin; MCHC = ortalama korpüsküler hemoglobin konsantrasyonu; MCV = ortalama korpüsküler hacim; MPV = ortalama platelet hacmi; PMN = polimorfonükleer hücreler; RDW = kırmızı kan hücresi dağılım genişliği; AOPP'ler = ilerlemiş oksidasyon protein ürünleri; TBARM = tiyobarbitürik asit-reaktif malzeme; MDA = malondialdehit; NOx = nitrik oksit metabolizması son ürünleri; PG = prostaglandin; pr. = protein; SH = sülfhidril; [d] normal dağılım yok.

*Tablo 7. Kan içindeki immünoglobülinlerin ve sitokinlerin konsantrasyonları*

	Başlangıç (gün 0)	Nihai (gün 21)	P <sup>[a]</sup>
--	-------------------	----------------	------------------

	n	ortalama (%95 CI <sup>[b]</sup> )	n	ortalama (%95 CI <sup>[b]</sup> )	
<i>İmmüoglobülinler (g/L) <sup>[c]</sup></i>					
IgA	23	2.51 (1.83-3.19)	23	1.96 (1.72-2.20)	.047
IgE ( $\times 10^3$ )	23	0.82 (0.58-1.07)	21	0.88 (0.58-1.18)	.486
IgG1	23	10.18 (8.70-11.67)	23	9.15 (8.11-10.19)	.066
IgG2	23	5.12 (3.83-6.41)	23	4.63 (3.77-5.48)	.259
IgG3	23	1.12 (0.87-1.38)	23	1.03 (0.79-1.27)	.191
IgG4	23	0.44 (0.24-0.65)	23	0.41 (0.23-0.59)	.353
IgM	23	0.90 (0.40-1.39)	23	0.70 (0.46-0.94)	.144
<i>Doğuştan immünite (ng/L) <sup>[c]</sup></i>					
IFN- $\gamma$	21	125.99 (79.50-172.47)	20	127.08 (92.18-161.97)	.588
IL-1 $\beta$	11	6.44 (-5.46-18.34)	10 <sup>3</sup>	6.36 (-5.27-17.99)	.411
IL-6	13	7.75 (5.08-10.42)	15	7.65 (4.91-10.38)	.292
IL-12(p70)	14	586.52 (-661.38-1834.43)	13	370.19 (-416.88-1157.26)	.336
TNF- $\alpha$	22	21.06 (12.54-29.58)	22	20.09 (13.13-27.06)	.799
<i>Edinilmiş immünite (ng/L) <sup>[c]</sup></i>					
IL-2	7	4.48 (2.26-6.70)	8	2.59 (0.59-4.59)	.098
IL-4	20	2.93 (1.78-4.08)	20	3.35 (2.31-4.39)	.196
IL-10	4	20.10 (-35.19-75.39)	3	23.63 (-67.56-114.81)	.685
IL-13	2	317.00 (-3640.47-4274.47)	2	287.09 (-3280.43-3854.61)	.508
IL-17	9	37.73 (5.69-69.77)	13	29.40 (4.59-54.21)	.906
<i>Kemokinler (ng/L) <sup>[c]</sup></i>					
IL-8	21	9.09 (5.96-12.21)	19	10.35 (7.07-13.62)	.818
MCP-1	23	57.36 (45.19-69.53)	23	52.52 (39.88-65.16)	.062

*Edinilmiş immünite (ng/L) [c]*

MIP-1 $\beta$	23	75.24 (65.57-84.90)	23	74.12 (64.55-83.69)	.691
---------------	----	---------------------	----	---------------------	------

*Büyüme faktörleri (ng/L) [c]*

G-CSF	17	49.85 (32.25-67.46)	15	45.43 (35.42-55.44)	.650
GM-CSF	6	2.86 (-32.66-38.37)	5	190.10 (-321.27-701.47)	.344
IL-5	7	6.50 (1.54-11.46)	7	5.90 (-2.53-14.34)	.752
IL-7	12	30.73 (22.57-38.89)	13	30.95 (22.18-39.73)	.424

[a] eşli *t*-testi; [b] %95'lik güven aralığı; [c] Kısaltmalar: G-CSF = granüosit koloni stimulan faktör; GM-CSF = granüosit-makrofaj koloni stimulan faktör; Ig = immünoglobülin; IL = interlökin; IFN- $\gamma$  = interferon- $\gamma$ ; MCP-1 = monosit kemoatraktan protein; MIP-1 $\beta$  = makrofaj enflamatuvar protein-1 $\beta$ ; TNF- $\alpha$  = tümör nekroz faktörü- $\alpha$ .

İdrar analizleri: İdrar parametreleri için elde edilen değerler fizyolojik aralıklar içindedir ve probiyotik tedavisi ile ilişkilendirilmiş herhangi bir farklılık gözlemlenmemiştir (veriler 5 gösterilmemiştir).

Sonuçlar: *L. salivarius* PS2'nin insan sütünde toplam bakteriyel sayımı iyileştirmede etkili olduğu bulunmuştur ve stafilokoksal ve streptokoksal sayımlarda azalma ve klinik sonuç arasında bir doğrudan ilişki gözlemlenmiştir. Bu çalışmaya geri çağrılan kadınlar 10 tedaviden sonra bir tam veya göze çarpan iyileşme bildirmiştir. Bu sonuçlar *L. salivarius* PS2'nin mastiti tedavi etme kabiliyetinin göstergesidir.

Probiyotik uygulanması, çalışma boyunca normal aralıklar içinde olan, meme sütünün 15 makro-besin içeriğini etkilememiştir. Süt içinde bulunan elektrolitler, sıkı birleşme yerlerinin kapanması yoluyla parturasyondan sonra kademeli olarak sağlanan, mamari epitelyal bütünlüğünü yansıtır ve taşıma mekanizmaları tarafından kontrol edilir [Neville et al., Am. J. Clin. Nutr. 1991, 54, 81-92]. *L. salivarius* PS2 tedavisinden sonra 20 azaltılmış potasyum düzeyleri ve artırılmış IgG3 düzeyleri mamari bezin epitelyal bütünlüğü için bir yarar öne sürer. IgG1 ve IgG3 taşınması, süt içinde IgG3 alt-sınıfını kayıran, daha yüksek efektör kabiliyetlere sahip olan bir reseptör tarafından aracılık edilen bir kompetitif mekanizmadır [Stapleton et al., Nature Commun. 2011, 2, 599] ve

immün-kusurlu bireylerde enfeksiyon oranını azaltır [Shapiro, Immunotherapy 2012, 4, 1835-9].

5 IL-8'in ve başka sitokinlerin ve kemokinlerin (örneğin, IFN- $\gamma$ 'nın, IL-1 $\beta$ 'nin, IL-6'nın, IL-12'nin (p70'in), TNF- $\alpha$ 'nın, MCP-1'in ve MIP-1 $\beta$ 'nin) düzeyleri probiyotik tedavisinin bir sonucu olarak sütte azaltılmıştır, bu mastit ile ilişkilendirilmiş enflamasyon hâlinin iyileştirilmesinden sorumlu olabilir. Farklı parametrelerin %95'lik güven aralıkları probiyotik tedavisinden sonra göze çarpan şekilde daraltılmıştır, bu verilerin daha az dağılımı gösterir ve daha normalize düzeyler öne sürer. EGF ve TGF- $\beta_2$  trofik

10 faktörlerindeki artış, aynı zamanda bebeğe de yarar sağlayabilen, mamari epitelyumunda immünomodülasyona katkı sağlamış olabilir. TGF- $\beta_2$ , bebeklerde lokal IgA üretimini teşvik eden ve oral tolerans mekanizmalarını indükleyen, bir kilit mamari immüno-regülatör faktördür [Stavnezer, J. Immunol. 1995, 155, 1647-1651; Oddy and Rosales, Pediatr. Allergy Immunol. 2010, 21, 47-59]. Aksine, gebe kadınlara bir *L. reuteri* suşu ile oral takviye kolostrumda TGF- $\beta_2$  düzeylerini azaltmıştır [Böttcher et al.,

15 Pediatr. Allergy Immunol. 2008, 19, 497-504]. Bu görünür çelişkili sonuç, farklı bakteriyel suşlar tarafından uygulanan diferansiyel immün yanıtların göstergesidir ve farklı probiyotik suşlarının neden farklı uygulamalara sahip olduğunu açıklayabilir.

#### 20 **Örnek 5: Sıvı bileşim**

8,1 g transgalakto-oligosakkarit, 0,9 g fruktopolisakkarit, 750  $\mu$ L balık yağı ve  $10^8$  ila  $10^{10}$  kolon oluşturma birimi (cfu) mevcut buluşun *Lactobacillus salivarius* suşunu içeren, opsiyonel olarak ayrıca laktasyon için tavsiye edilen mikro-besinler (örneğin,

25 folik asit, B1 vitamini, B2 vitamini, B6 vitamini, B12 vitamini, kolin, C vitamini, kalsiyum, iyot, çinko ve demir) de içeren bir 100 mL'lik şişede paketlenmiş bir sıvı süt-bazlı bileşimin 100 mL'si, mastiti veya mastit semptomlarını önlemek ve/veya tedavi etmek amacıyla günde bir kere veya iki kere tüketilecektir, burada bileşim, saşenin çubuk veya çubuk paketinin içeriklerini bir meşrubata veya gıdaya eklemek için talimatları

30 içerir.

#### **Örnek 6: Takviye**

Çubuk veya çubuk paketi veya saşe, mastiti veya mastit semptomlarını önlemek

35 ve/veya tedavi etmek amacıyla günde bir kere veya iki kere tüketilecek olan meşrubat

veya gıda içerisinde saşenin çubuk veya çubuk paketi içeriklerini eklemeye yönelik talimatlar ile birlikte mevcut buluşun *Lactobacillus salivarius* suşunun  $10^8$  ila  $10^{10}$  koloni oluşturma birimini (cfu) içerir. Uygun bir şekilde, meşrubat bir soğuk meşrubattır veya bir sıcak meşrubattır.

5

### **Örnek 7: Tahıl çubuğu**

Uygun bir şekilde gevrekler, ekstrüde edilmiş tahıllar, vb. formunda tahıllar dâhil olmak üzere, tahıllar (örneğin, yulaflar, buğday, mısır, pirinç) ve  $10^8$  -  $10^{10}$  koloni oluşturma birimi (cfu) aralığında mevcut buluşa göre *Lactobacillus salivarius* suşunu içeren ve opsiyonel olarak aşağıdakileri de içeren bir tahıl çubuğudur:

- uygun bir şekilde kurutulmuş veya dondurarak kurutulmuş meyveler dâhil olmak üzere, meyveler (örneğin, yaban mersini, kuru üzüm, böğürtlen, frenk üzümü, kiraz, ahududu, çilek, vb.);
- tohumlar ve/veya sert kabuklu yemişler;
- şuruplar ve/veya sıvı yağlar;
- prebiyotikler (örneğin, transgalakto-oligosakkarit, fruktopolisakkarit);
- laktasyon için takviye edilen mikro-besinler (örneğin, folik asit, B1 vitamini, B2 vitamini, B6 vitamini, B12 vitamini, kolin, C vitamini, kalsiyum, iyot, çinko ve demir).

15

20

Tahıl çubuğu, tahıl çubuğunun mastit veya mastit semptomlarını önlemek ve/veya tedavi etmek amacıyla günde bir kere veya iki kere tüketilmesi talimatlarını içerebilir.

25

### **DİZİ LİSTESİ**

<110> N.V. Nutricia

<120> Mastitin tedavisine yönelik *Lactobacillus salivarius*

30

<130> P6044464PCT1/EP

<140> EP14828344.3

<141> 2014-12-19

<150> PCT/NL2013/050924

<151> 2013-12-19

35

<160> 1

<170> PatentIn versiyonu 3.3

<210> 1

<211> 10

<212> RNA

5 <213> Yapay

<220>

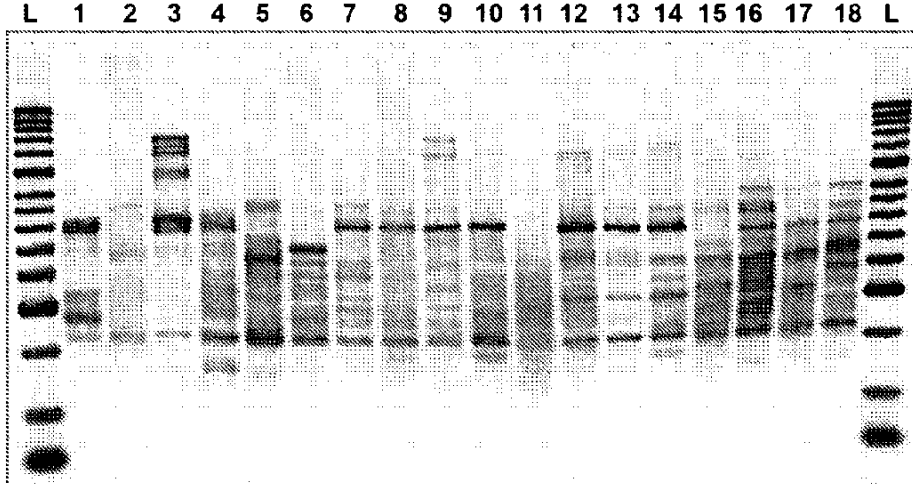
<223> primer

<400> 1

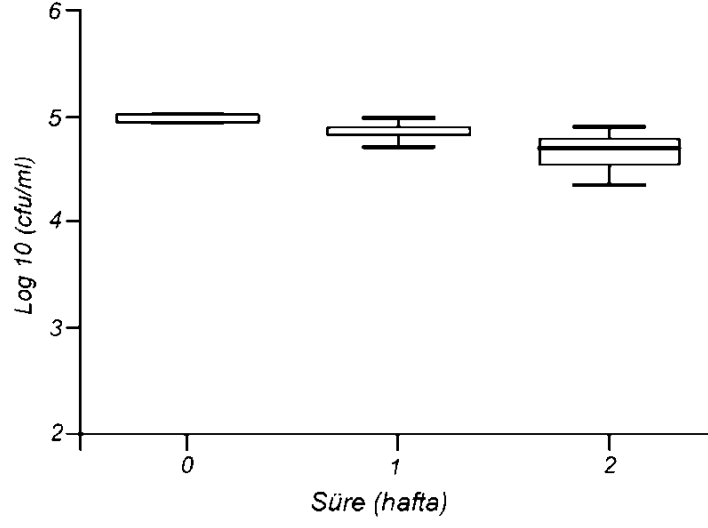
acgcaggcac 10

10

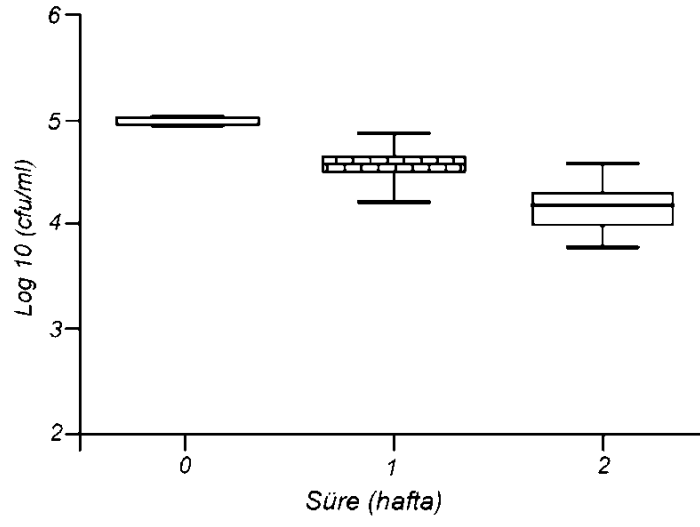
# Şekil 1



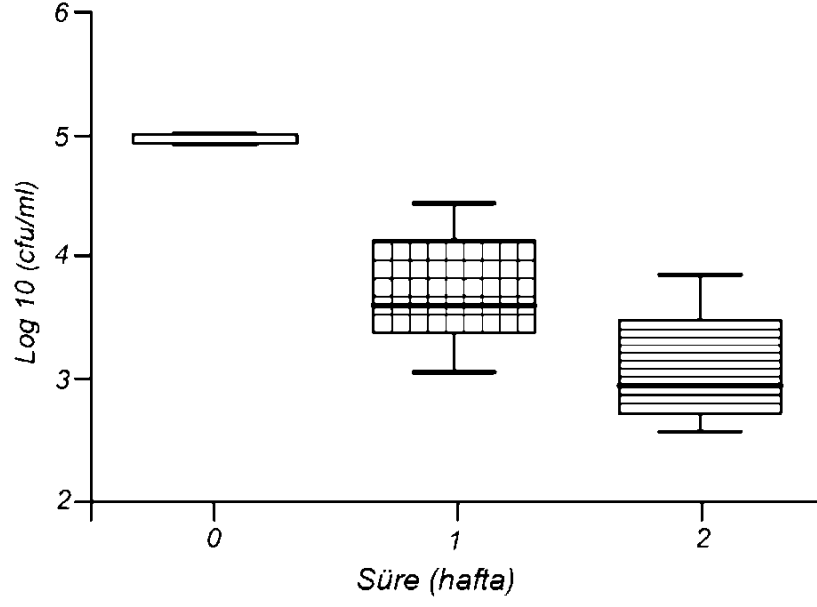
Şekil 2a



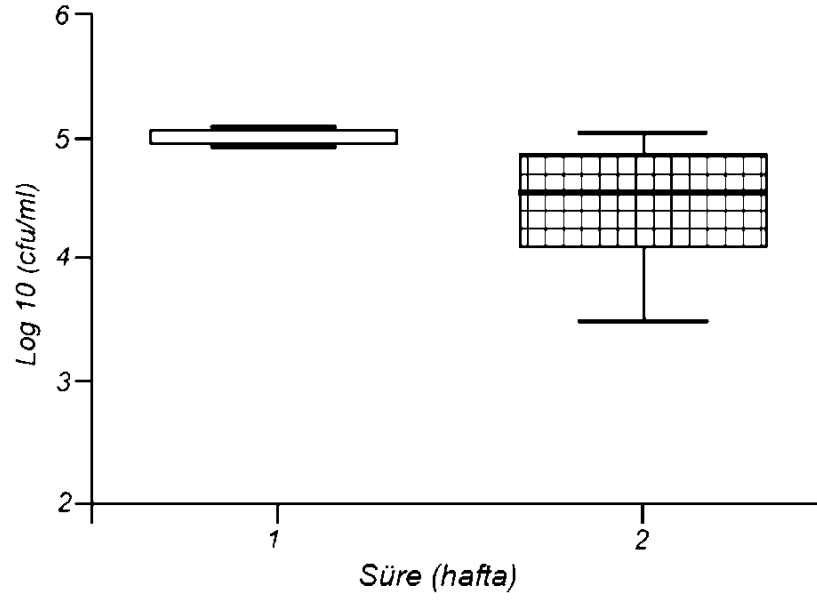
Şekil 2b



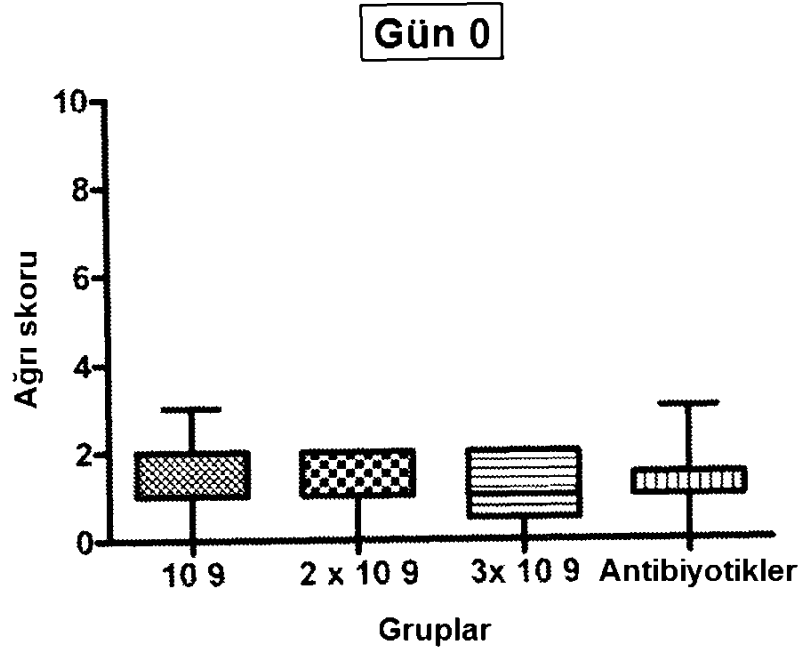
Şekil 2c



Şekil 2d



ŞEKİL 3a



Şekil 3b

