

Het effect van de bevallingswijze op de intestinale microbiota van kinderen tijdens de eerste levensmaanden

Emmy VAN DAELE

Masterproef voorgedragen tot het behalen van de graad van
Master of Science in de Biochemie en de Biotechnologie
Major Microbiële Biotechnologie
Academiejaar 2013-2014

Promotor: prof. dr. ir. Tom Van de Wiele
Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen
Vakgroep Biochemische & microbiële technologie
Laboratorium voor Microbiële Ecologie en Technologie (LabMET)



Het effect van de bevallingswijze op de intestinale microbiota van kinderen tijdens de eerste levensmaanden

Emmy VAN DAELE

Masterproef voorgedragen tot het behalen van de graad van
Master of Science in de Biochemie en de Biotechnologie
Major Microbiële Biotechnologie
Academiejaar 2013-2014

Promotor: prof. dr. ir. Tom Van de Wiele
Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen
Vakgroep Biochemische & microbiële technologie
Laboratorium voor Microbiële Ecologie en Technologie (LabMET)



Voorwoord

Al sinds ik me kan herinneren ben ik gepassioneerd geweest door gezonde voeding en levensstijl. Dankzij de boeiende wetenschapslessen in het middelbaar werd mijn nieuwsgierigheid aangewakkerd naar de wetenschappelijke achtergrond van die gezondheidseffecten. De keuze voor een wetenschappelijke opleiding, vijf jaar geleden, was dan ook snel gemaakt. De passie voor het kennis vergaren werd dan ook snel uitgebreid naar zelf onderzoek uitvoeren. In dat opzicht was deze thesis de kers op de taart en heeft het mijn passie voor onderzoek alleen maar doen toenemen.

Deze thesis, maar ook de studies de afgelopen vijf jaar, waren niet mogelijk geweest door de hulp van een aantal mensen.

Eerst en vooral wil ik graag prof. Van de Wiele bedanken voor de kans die ik kreeg om bij LabMET een thesis uit te voeren. Ik ben niet alleen dankbaar voor de wetenschappelijke ondersteuning maar evenzeer voor de leuke werkomgeving en collega's die ik via deze weg heb leren kennen.

Naast een algemene bedanking voor de mensen binnen LabMET verdienen Kim en Frederiek-Maarten toch wel een eervolle vermelding. Niet alleen kwam hun hulp uit onverwachte hoek, maar ik kon bovendien ook steeds op hun rekenen voor eender welk probleem. In het labo had ik het dan weer niet kunnen redden zonder de tips en trics van Tim, Emma en Jana, waarvoor dank.

Deze thesis strekte echter verder dan het laboratorium van LabMET en daarom zou ik ook graag Siele Ceuppens en Nathalie Michels bedanken voor hun hulp. Maar de allergrootste bedanking dient toch nog verder te strekken, namelijk verspreid over volledig Vlaanderen en Brussel. Zonder de enthousiaste medewerkers van de Kraamkaravaan, Reddie Teddy en de hulp van andere lactatiedeskundigen en vroedvrouwen was het niet mogelijk geweest om alle kandidates te rekruteren. Niet enkel de moeders maar ook de kinderen die deelnamen aan de studie wil ik van harte bedanken omdat zij dit onderzoek hebben mogelijk gemaakt.

Ten slotte wil ik ook graag mijn kotgenoten, vrienden en familie bedanken voor alle hulp, goede raad en steun de afgelopen jaren.

Inhoud

I.	Voorwoord	i
II.	Inhoud	ii
III.	Lijst met afkortingen	iv
IV.	Samenvatting.....	vi
V.	Abstract	vii
VI.	Hoofdstuk 1: Inleiding	1
VI.1.	Situering van het onderzoek	1
VI.2.	Kolonisatie door de darmmicrobiota	1
VI.2.1.	Kolonisatiefases tijdens de levensloop.....	2
VI.2.2.	Dysbiose, een verstoord evenwicht in de darm	5
VI.3.	Factoren die de ontwikkeling van het gastro-intestinaal stelsel beïnvloeden	7
VI.3.1.	Bronnen van microbiota die bijdragen aan de neonatale kolonisatie	8
VI.3.2.	De bevallingswijze	9
VI.3.3.	Borstvoeding - het microbiële aspect van moedermelk	12
VII.	Hoofdstuk 2: Doelstelling	20
VIII.	Hoofdstuk 3: Resultaten.....	22
VIII.1.	De klinische data van de <i>in vivo</i> studie	22
VIII.2.	Karakterisatie van de microbiële gemeenschap in moedermelk en fecale stalen op basis van DGGE.....	23
VIII.2.1.	Optimalisatie staalvoorbereiding, DNA extractie en PCR-reactie	23
VIII.2.2.	Visualisatie van de microbiële gemeenschap via DGGE.....	24
VIII.2.3.	Diversiteits indices berekend aan de hand van de DGGE	27
VIII.3.	Karakterisatie op basis van Illumina sequencer en taxonomische eigenschappen van de microbiële gemeenschap in moedermelk en fecale stalen.....	29
VIII.3.1.	Kwaliteit van de sequencer	29
VIII.3.2.	Diversiteitsindices.....	30
VIII.3.3.	Clustering van de sequenceringsdata	34
VIII.3.4.	Relevante taxonomische families.....	34
VIII.4.	Vergelijking tussen de microbiota van moeder en kind	36
IX.	Hoofdstuk 4: Discussie	37
IX.1.	Effect van de bevallingswijze	37
IX.1.1.	Effect van de bevallingswijze op de moedermelk.....	38
IX.1.2.	Onderscheid tussen een geplande en niet geplande keizersnede	39

IX.1.3.	Compensatie door moedermelk	40
IX.1.4.	De link tussen moeder en kind.....	40
IX.2.	De relatieve abundantie op familieniveau.....	42
IX.3.	<i>Bifidobacterium breve</i> domineert de darmmicrobiota bij baby's	42
X.	Hoofdstuk 5: Materiaal en Methoden	43
X.1.	<i>In vivo</i> studie - Verzameling van de kandidaten en stalen	43
X.2.	DNA extractie.....	43
X.2.1.	FastPrep DNA extractie	45
X.2.2.	QIAamp® DNA Stool mini kit DNA extractie.....	45
X.2.3.	NucliSENS® easyMAG®DNA extractie	45
X.3.	Nanodrop.....	45
X.4.	DNA-opzuivering.....	46
X.5.	Agarose gelelektroforese.....	46
X.6.	Polymerase Chain Reaction (PCR)	47
X.7.	Denaturerende Gradiënt Gel Elektroforese (DGGE)	49
X.7.1.	Bionumerics: Clustering van de DGGE profielen.....	50
X.7.2.	Populatie Indices: <i>evenness</i> en rijkdom	50
X.7.3.	Identificatie van een DGGE bandje via Sanger sequencer.....	51
X.8.	Illumina sequencer	51
X.9.	Statistische analyses	52
XI.	Referenties	53
XII.	Bijlage	63

Lijst met afkortingen

ABI	(Eng.: Applied Biosystems)
AZ	algemeen ziekenhuis
BLAST	(Eng.: Basic Local Alignment Search Tool)
BLASTn	Nucleotide BLAST
BMI	(Eng.: <i>Body Mass Index</i> = <i>index</i> qua verhouding gewicht/lengte)
bp	basenparen
CB	(Eng.:Caesarean Birth= keizersnede)
cfu	(Eng.: colony-forming unit)
CoNS	coagulase negatieve staphilococci
c-section	(Eng.: Caesarean section)
DC	Dendritische cel
DGGE	(Eng.: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)
DNA	Desoxyribonucleïnezuur
e.g.	(Lat.: <i>exempli gratia</i> = bijvoorbeeld)
EDTA	Ethyleendiaminetetra-azijnzuur
FFQ	(Eng. : Food Frequency Questionnaire)
HMO	humane melk oligosacchariden
IEC	Intestinale Epitheel Cellen
IgA	Immunoglobuline A = antilichaam isotype
LabMET	(Eng.: Laboratory of Microbial Ecology and Technology)
M cells	(Eng.: Microfold cells)
OD	Optische Densiteit
OTU	(Eng.: Operational Taxonomic Unit)
PC	Principale Component
PCR	(Eng.: Polymerase Chain Reaction)
p-waarde	maat voor waarschijnlijkheid
Qiime	(Eng. Quantitive Insights into Microbial Ecology)
QPCR	(Eng.: Quantitive Polymerase Chain Reaction)
Q-Q plot	(Eng.: Quantile-Quantile)
RDP	(Eng.: Ribosomal Database Project)

RIZIV	Rijksinstituut voor Ziekte en Invaliditeitsverzekering
rRNA	ribosomaal Ribonucleïne zuur
SCFA	(Eng.: Short-chain fatty acids) = Korteketenvetzuren
SDS	Natriumdodecylsulfaat
SHIME	(Eng.: Simultor of Human Intestinal Microbial Ecosystem)
slgA	secretorisch Immunoglobuline A
SOP	(Eng.: Standard Operating Procedure)
sp.	(Lat.: species)
spp.	(Lat.: <i>species pluralis</i> , multiple species)
SPSS	(Eng.: Statistical Package for the Social Sciences)
SYBR	(Eng.: asymmetrical cyanine dye)
T3	3de trimester van de zwangerschap
TAE	Een buffer gebaseerd op Tromethamine (Tris), Azijnzuur en EDTA
Taq	Lat.: Thermus Aquaticus: thermophilic bacterium)
UC	(Lat.: <i>Ulcerative Colitis</i> = ontstekingsziekte van de dikke darm)
UPGMA	(Eng.: Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean)
UV	ultraviolet
VB	(Eng.: Vaginal Birth= vaginale geboorte)
vgl.	vergelijk
W.H.O.	(Eng.: World Health Organisation)
wk	weken

Omschrijving van de stalen

		Staaltype		
		Moeder	Baby	Moeder melk
Bevallingswijze	tweeling	M_	B_	Milk_
	Oudste (eerstgeborene)		B_A_	
	Jongste		B_B_	
	2 staalnames		B_1_ B_2_	Milk_2_
	.Vaginal	M_VB	B_VB	Milk_VB
	.C-section	M_CB	B_CB	Milk_CB

Samenvatting

Onze stoelgang bevat een schat aan informatie over de microbiële populatie in ons gastro-intestinaal stelsel, een onzichtbare gemeenschap die de gezondheid mee bepaalt. Het belang van een goede opbouw en evenwichtige darmsamenstelling wordt ondersteund door het toenemend aantal associaties tussen de darmmicrobiota en bepaalde ziektebeelden. De initiële kolonisatie van de darm is hierbij cruciaal voor de inductie van de immuniteit en vormt tevens de eerste stap naar een vrij stabiele microbiële samenstelling bij volwassenen. Een verstoorde kolonisatie kan onomkeerbare gezondheidseffecten veroorzaken op lange termijn.

In deze masterthesis ligt de focus op de darm- en moedermelkmicrobiota tijdens de eerste levensfase, meer bepaald vóór de introductie van vaste voeding. Ondanks de fluctuaties van de microbiota in de eerste levensjaren, is het belangrijk om te weten welke factoren deze initiële kolonisatie beïnvloeden en hoe de samenstelling verder evolueert.

Om de darmmicrobiota te onderzoeken werden stoelgangsstalen onderzocht van baby's, die minstens drie maanden ononderbroken borstvoeding kregen. Exclusief borstvoeding genoot de voorkeur aangezien dat de wereldwijde aanbeveling is en een gezondere darmmicrobiota veroorzaakt ten opzichte van flesvoeding. Moedermelk bevat bovendien zelf microbiota die afhankelijk kunnen zijn van de bevallingswijze en vervolgens een impact hebben op de darmsamenstelling. Daarom werd ook de moedermelk geanalyseerd. Om de invloed van bevallingswijze na te gaan werden moedermelk en fecale stalen na keizersnede vergeleken met deze na vaginale geboorte aan de hand van Illumina sequencer en DGGE.

Het onderzoeken van de effecten veroorzaakt door keizersnede kadert in de vaststelling van het stijgend aantal keizersneden op Europees en globaal niveau. In bijvoorbeeld Turkije en Brazilië wordt dit toegepast bij ongeveer de helft van alle bevallingen. Hierdoor dient het effect van de bevallingswijze dus beter begrepen te worden voordat deze ingreep steeds meer en vaak overbodig uitgevoerd wordt. Het effect van een keizersnede, minstens drie maanden na de geboorte, bij kinderen die exclusief borstvoeding krijgen, werd nog niet onderzocht.

Een effect van de bevallingswijze wordt nagegaan door de samenstelling van de darmmicrobiota te karakteriseren bij de baby's en te vergelijken met hun moeder. Ook de moedermelkmicrobiota wordt onderzocht aangezien moedermelk de schakel vormt tussen moeder en kind.

Abstract

Our stool contains a wealth of information on the microbial population in our gastrointestinal system. This is an invisible community which influences our health. The importance of a good structured and balanced intestinal composition is supported by the increasing number of associations between the gut microbiota and certain diseases. The initial colonization of the intestine is crucial for the induction of immunity and is also the first step towards a relatively stable microbial composition in adults. Disturbances in the colonization may eventually cause irreversible health hazards.

This thesis focuses on the intestinal and breast milk microbiota during the first stage of life, especially before the introduction of solid foods. Despite the fluctuations of the microbiota in the first years of life, it is important to know what factors affect the initial colonization and how this composition evolves.

To investigate the intestinal microbiota, stool samples were examined from infants who were continuously breastfed for at least three months. Exclusive breastfeeding was preferred as this is a global recommendation and causes a healthier gut microbiota compared to bottle-feeding. Breast milk also contains microbiota that may depend on the mode of delivery. Therefore, the breast milk was analyzed as well. To study the influence of the delivery mode, breast milk and fecal samples from babies born with a caesarean section were compared with those of babies born through vaginal birth. Illumina sequencing and DGGE were used to study these differences.

Examining the effects caused by caesarean section is enormously important due to the increasing amount of caesarean sections in Europe and worldwide. For example, in Turkey and Brazil, 50 percent of all deliveries are caesarian sections. Researching the probable effects is therefore necessary before this surgery is applied unnecessarily. The effect of caesarean section on the microbiota of children, at least three months old and exclusively breastfed, has not been investigated.

The effect of the delivery mode will be investigated by characterizing the composition of the infants' intestinal microbiota and compared to their mothers'. The breast milk microbiota is examined as well because it is the microbiotic link between mother and child.

Hoofdstuk 1: Inleiding

VI.1. Situering van het onderzoek

Tot op de dag van vandaag heerst er een taboe omtrent de menselijke stoelgang. Nochtans bevat het een schat aan informatie over de microbiële populatie in ons gastro-intestinaal stelsel, een onzichtbare gemeenschap die onze gezondheid mee bepaalt (Clemente et al., 2012). Het belang van deze gemeenschap wordt ondersteund door het toenemend aantal associaties tussen een verstoorde darmmicrobiota en bepaalde ziektebeelden (zie VI.2.2 en Tabel VI.1). De details zijn nog vaag aangezien het een nieuw en groeiend onderzoeksveld betreft waarbij 90 procent van de wetenschappelijke artikels over het humaan microbiom op PubMed verschenen tijdens de afgelopen vijf jaar (Khanna & Tosh, 2014).

Niet enkel over de impact van het microbiom op de gezondheid maar ook over het tot stand komen van het gastro-intestinaal ecosysteem is nog relatief weinig bekend (Eckburg et al., 2005; Zoetendal et al., 1998). Een beter inzicht hierin is belangrijk aangezien de eerste kolonisatie de daaropvolgende ontwikkelingen van het ecosysteem stuurt en zo de gezondheid beïnvloedt. De allereerste kolonisatie vindt plaats tijdens de geboorte en verschilt afhankelijk van de bevallingswijze. Aan de hand van een *in vivo* studie vergelijkt deze thesis de microbiota bij Belgische baby's (drie tot zes maanden oud) die vaginaal of via keizersnede geboren werden.

VI.2. Kolonisatie door de darmmicrobiota

Aangezien een volwassen menselijk lichaam naast menselijke cellen ook tien keer meer microbiële cellen met zich meedraagt, kan de microbiële invloed op de gastheer niet onderschat worden (Whitman et al., 1998; Xu & Gordon, 2003). De microbiota zijn de microbiële metgezellen die zich in en op het menselijke lichaam bevinden. Het genoom van deze microbiële gemeenschap, het humaan microbiom, bevat ongeveer 100 keer meer genen dan het menselijke genoom (Gill et al., 2006). Deze complexe gemeenschap, met een biomassa van meer dan een kilogram, is talrijk aanwezig in het gastro-intestinaal stelsel (Kovatcheva Datchary, 2013). De darmmicrobiota vervullen er enkele belangrijke functies (zie

Figuur VI.2):

- Ondersteuning van de vertering via de fermentatie van onverteerbare koolhydraten tot gezondheidsbevorderende korte keten vetzuren (SCFA) (Gill et al., 2006; Hamer et al., 2012; Hamer et al., 2008)
- vrijstellen van energie en essentiële nutriënten (Gill et al., 2006)
- modulatie van het immuun systeem (Chow et al., 2010)
- bescherming tegen pathogenen (Clemente et al., 2012)

VI.2.1. Kolonisatiefases tijdens de levensloop

Een pasgeborene wordt gekoloniseerd door de micro-organismen waaraan het blootgesteld wordt en die er vervolgens in slagen om een gemeenschap te vormen in het gastro-intestinaal stelsel. De baarmoeder werd steeds als een steriele omgeving gezien waardoor het eerste microbiële contact dus pas zou plaatsvinden tijdens de bevalling. Dit werd echter weerlegd door recente onderzoeken, waarbij enkele bacteriën in het vruchtwater gedetecteerd werden – weliswaar in een laag aantal en met een lage diversiteit (DiGiulio, 2012). Ook het meconium, de allereerste stoelgang, bevat een zeer lage bacteriële diversiteit (Koenig et al., 2011; Langhendries, 2006; Mshvildadze et al., 2010). Desondanks is de kolonisatie van het vruchtwater niet te verwaarlozen aangezien het een indicatieve, mogelijk zelfs causale, pathologische parameter vormt voor vroeggeboorte (Romero et al., 2006; Romero et al., 2014)

Kinderen

Voornamelijk facultatief anaëroben zoals *Streptococcus* spp, *Staphylococcus* en *Escherichia coli* koloniseren de darmomgeving na geboorte (zie Figuur VI.1). In eerste instantie is er immers nog zuurstof aanwezig en bovendien vormen de maag en dunne darm nog geen selectieve druk uit (Kovatcheva Datchary, 2013; Langhendries, 2006). Vervolgens neemt de concentratie aan micro-organismen gradueel toe, evenals het zuurstofverbruik. Na 2 maanden ontstaat hierdoor een hoofdzakelijk anaërobe omgeving. Tijdens deze tweede kolonisatiefase domineren hoofdzakelijk *Bifidobacterium* en *E. coli* maar daarnaast zijn ook *Lactobacillus* spp. en *Bacteroidetes* bacteriën aanwezig. Het aantal *Bacteroides* spp., *E. coli* en Clostridia zijn toegenomen ten opzichte van de eerste kolonisatie. Het aantal Staphylococci daarentegen is gedaald. De meest voorkomende *Bifidobacterium* species zijn *B. breve* en *B. longum subsp. infantis* (Biasucci et al., 2010; Roger et al., 2010). De samenstelling is in deze fase vrij eenvoudig maar niet stabiel en evolueert dus in de tijd. Ook tussen kinderen onderling zijn er verschillen (Palmer et al., 2007; Roger & McCartney, 2010). De introductie van vaste voeding zorgt voor een shift in de samenstelling, de derde fase, waarbij het aantal bifidobacteria en *E. coli* verminderen terwijl *Bacteroides* spp., clostridia, streptococci en lactobacilli toenemen. De fylogenetische diversiteit neemt toe over de jaren en evolueert uiteindelijk naar een vrij stabiele samenstelling, fase vier. Deze samenstelling, rond driejarige leeftijd, is vergelijkbaar met deze bij volwassenen (Koenig et al., 2011; Mitsuoka, 1992).

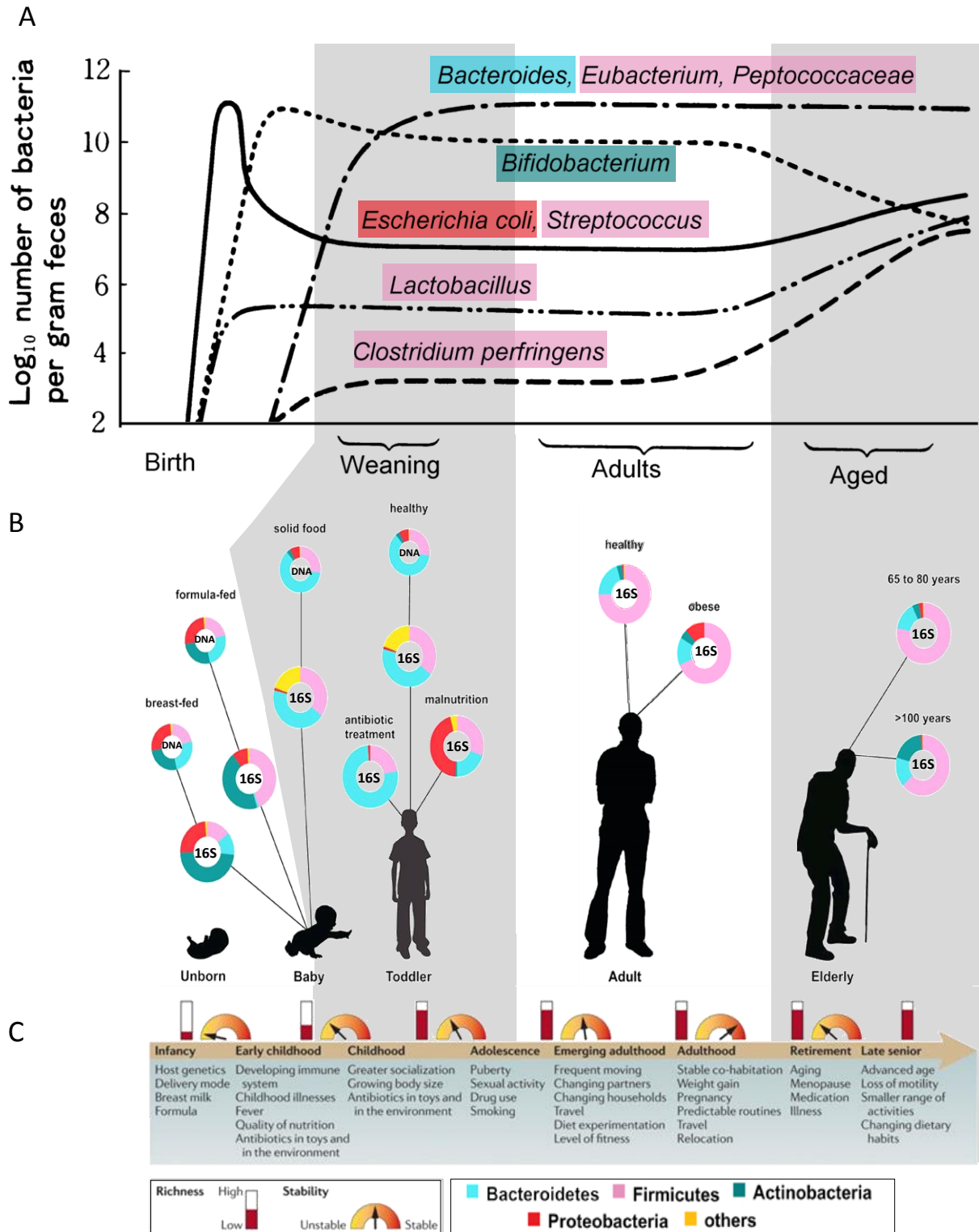
Volwassenen

Darmmicrobiota bij volwassenen blijven op phylum niveau vrij stabiel gedomineerd door *Bacteroidetes* en *Firmicutes* phyla (zie Figuur VI.1)(Kovatcheva Datchary, 2013). Naast *Bacteroides* en *Clostridium* clusters XIVa en IV, die het grootste aandeel vormen in deze phyla, zijn er ook nog Bifidobacteria aanwezig (Eckburg et al., 2005; Langhendries, 2006). Ondanks de sterke stabiliteit kan deze samenstelling toch verstoord worden door bijvoorbeeld ziekte of antibioticumgebruik (Jernberg et al., 2007). Humane darmmicrobiota bevatten interindividuele variatie, vooral bij lagere taxonomische niveaus zoals het species niveau (Adlerberth & Wold, 2009). De diverse parameters die de darmsamenstelling beïnvloeden, zoals het voedingspatroon, de levensstijl en genetische factoren verklaren de grote variatie tussen individuen (Zie VI.2.2). Functionele redundantie kan echter zorgen voor een vergelijkbare werking ondanks een taxonomisch verschil in de gemeenschap (Gill et al., 2006;

Turnbaugh et al., 2009). Zo wordt het darmmicrobioom bij volwassenen gedomineerd door genen voor het koolhydraat en eiwit metabolisme (Vaishampayan et al., 2010).

Ouderen

De microbiota behouden hun stabiliteit tot de leeftijd van ongeveer 65 jaar (Claesson et al., 2012). Deze laatste kolonisatiefase, bij ouderen, verschilt substantieel van die bij jongere volwassenen op phylum- en genusniveaus (zie Figuur VI.1)(Claesson et al., 2011). Algemeen gezien verminderd de diversiteit bij ouderen maar ook het aantal anaëroben zou verminderen terwijl opportunistische facultatieve aeroben toenemen (Biagi et al., 2012; Kolling et al., 2012). Er is echter geen consensus over de exacte verschuivingen die gebeuren bij veroudering: zo wordt er zowel *Clostridium* verhoging als verlaging beschreven (Biagi et al., 2012; Claesson et al., 2011). Contradictorische waarnemingen kunnen verklaard worden door de verlaagde stabiliteit bij deze microbiota waarbij de hoeveelheid Clostridia, boterzuurproduceerders, Actinobacteria, Proteobacteria, Faecalibacteria en verhouding *Bacteroides:Firmicutes* erg variabel is (Claesson et al., 2011; O'Toole, 2012). De impact hiervan wordt duidelijk door de variatie in het aandeel *Bacteroidetes* (3-92%) en *Firmicutes* (7-94%) dit in tegenstelling tot jongere volwassenen met respectievelijk (0,1-60%) en (20-60%) (Arumugam et al., 2011; Claesson et al., 2011).



Figuur VI.1. De humane darmmicrobiota tijdens de levensloop. (A) Het effect van veroudering op enkele darmmicrobiota op basis van cultuur gebaseerde methodes (Mitsuoka, 1978). (B) De evolutie van de compositie van de belangrijkste phyla van de humane darmmicrobiota gedurende de levensloop op basis van 16S rRNA (16S) of metagenomische (DNA) studies. Ook enkele belangrijke perturbaties worden weergegeven (Ottman et al., 2012). (C) De stabiliteit en rijkdom tijdens de verschillende levensfasen met de bijbehorende invloedrijke parameters. Afkortingen: 16S ribosomale ribonucleïne acid (16S rRNA), Desoxyribonucleïnezuur (DNA). (Spor et al., 2011)

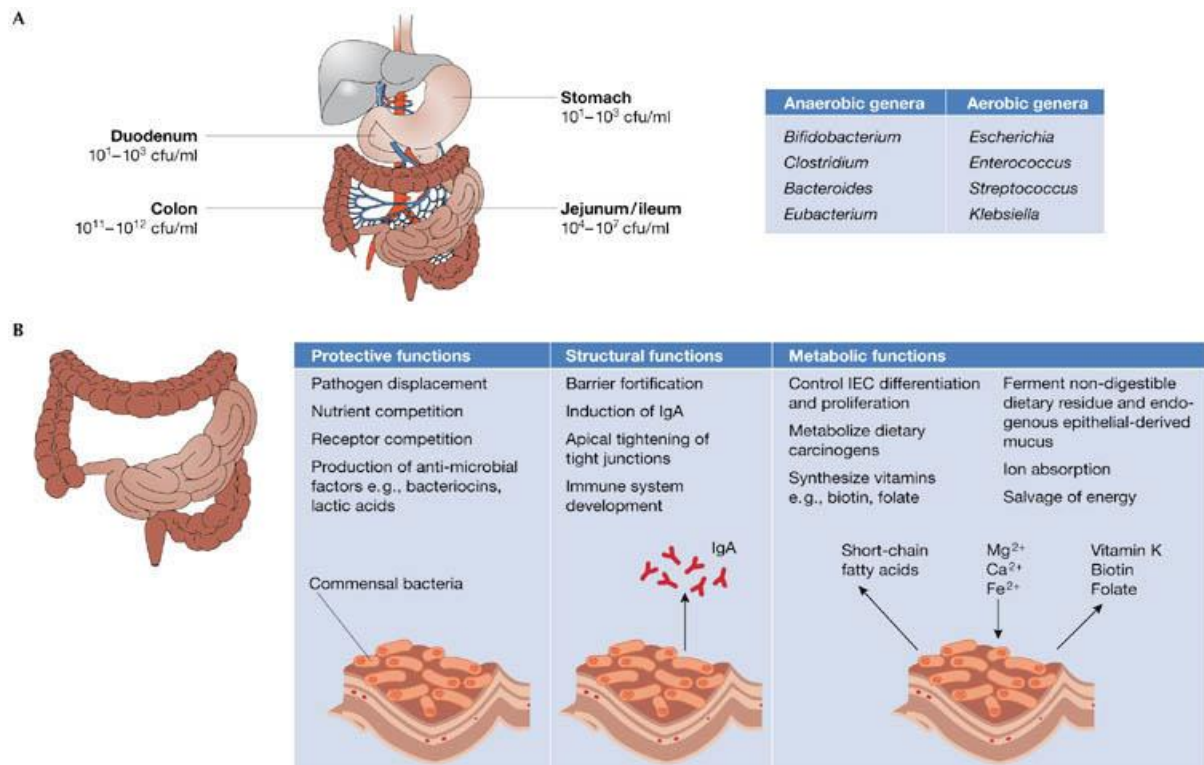
VI.2.2. Dysbiose, een verstoord evenwicht in de darm

Naast het koolhydraat en eiwit metabolisme voeren de darmmicrobiota nog een breed spectrum aan levensnoodzakelijke functies uit. Hierdoor heeft een verstoring van de gemeenschap vanzelfsprekend gevolgen voor de gezondheid van de gastheer (Clemente et al, 2012). Een gewijzigde microbiële gemeenschap - dysbiose - leidt tot een aangepaste taxonomische samenstelling en een afwijkend metabolisch profiel. Diverse ziektebeelden worden geassocieerd met een intestinale dysbiose (zie Tabel VI.1). Kleine verstoringen van het microbieel evenwicht leiden niet tot dysbiose aangezien de gemeenschap zich daarna normaliter snel herstelt. Slechts in uitzonderlijke gevallen treedt er een chronische verstoring op waarbij bijvoorbeeld *species* verdwijnen of de verscheidenheid erg werd ingeperkt en dus resulteert in dysbiose.

Tabel VI.1. Een overzicht van de ziektebeelden waarmee een verstoorde darmmicrobiota (dysbiose) geassocieerd wordt. De prevalentie in België wordt weergegeven door het absoluut of procentueel aantal inwoners met dat ziektebeeld. Afkortingen : Ulceratieve colitis : ontstekingsziekte van de dikke darm (UC), 1 = (Clemente et al., 2012), 2 = (Raes, 2014), 3 = (Belga, 2014; Dinan & Cryan, 2013; W.H.O., 2014b), 4 = (RIZIV, 2010), 5 = (Le Chatelier et al., 2013; W.H.O., 2013b)

ZIEKTE	VOORKOMEN IN BELGIË	BRON
Associaties met		
Ziekte van Crohn	+/-15.000	1,2
Ulceratieve colitis (UC)	+/-15.000	2
Atherosclerose	200.000	2
Autisme	50.000	1,2
Chronisch vermoeidheid syndroom	10.000	2
Rheumatoïde arthritis	105.000	2
Astma	500.000	2
Depressie	1.300.000	3
Type 2 diabetes	800.000 geschat waarvan 405.000 gediagnostiseerd	1-2, 4
Aangetoond causaal verband (in dierenmodellen) met		
Overgewicht	♀: 49.9% ♂: 63.4%	1-2, 5
Obesitas	♀: 21% ♂: 23.3%	

Hoofdstuk 1: Inleiding



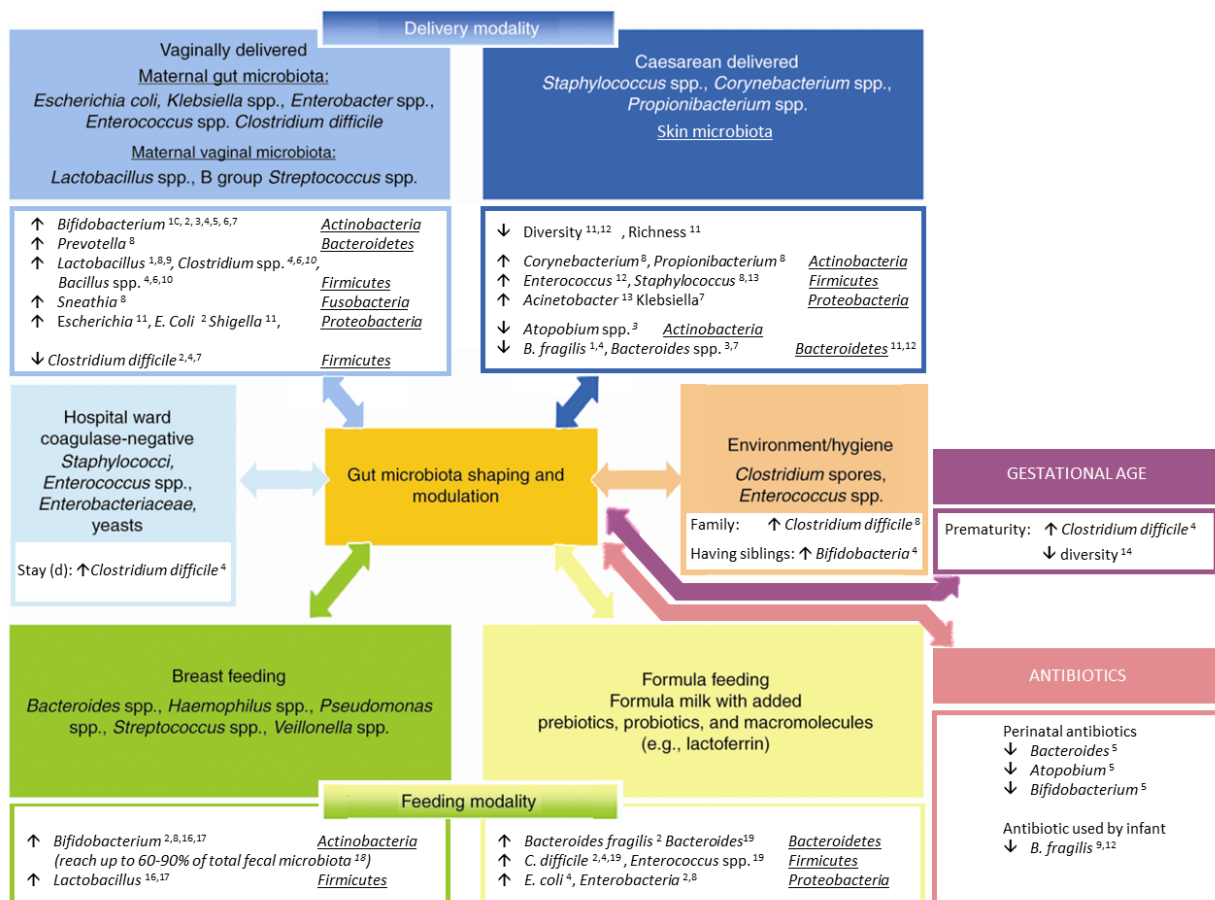
Figuur VI.2. De verschillende functies die kunnen uitgevoerd worden door de menselijke intestinale microbiota. (A) Het gastro-intestinaal stelsel omvat een toenemende bacteriële dichtheid vanaf het jejunum/ileum tot aan het colon. De meest voorkomende aerobe en anaërobe genera in het gastro-intestinaal stelsel worden opgelijst. (B) De commensale bacteriën in de darm hebben allerlei beschermende, structurele en metabolische functies. Afkorting: Immunoglobuline A (IgA). ,exempli gratia (e.g.), colony forming unit(cfu), Intestinale Epitheel Cellen(IEC) (O'Hara & Shanahan, 2006)

Deze associaties suggereren dat een beter inzicht in de relatie tussen mens en microbiota cruciaal zal zijn bij de preventie, diagnose en behandeling van verschillende ziektes. Onderzoek naar de factoren die de darmsamenstelling beïnvloeden, is belangrijk bij zowel de causaliteit van ziektes als het vermijden of compenseren van een verstoring.

VI.3. Factoren die de ontwikkeling van het gastro-intestinaal stelsel beïnvloeden

De samenstelling van de microbiota varieert niet enkel met de leeftijd (zie VI.2.1) maar ook door andere fysiologische factoren zoals de genetische achtergrond en het gewicht. Externe invloed factoren zijn het dieet, anti-, pre- en probioticumgebruik en infecties.

Bij de geboorte vormen de zwangerschapsduur, de locatie van de bevalling (hospitalisatie versus thuisbevalling) en de bevallingswijze de invloedrijkste parameters. Tenslotte heeft ook het type voeding, borstvoeding ten opzichte van flesvoeding, een grote impact op de ontwikkeling van de darmmicrobiota (zie **Figuur VI.3**).



Figuur VI.3. Externe beïnvloeding op de ontwikkeling van de humane darmmicrobiota en de taxonomische effecten ervan. De factoren bevallingswijze en type voeding worden onderverdeeld. De bevallingswijze bepaalt of de pasgeborene in contact komt met huid bacteriën of met bacteriën uit de maternale vaginale en intestinale omgeving, respectievelijk keizersnede en vaginale bevalling. Bijgevolg zorgt dit verschil aan blootstelling voor een verschillende darmmicrobiota samenstelling nadien. Ook het type voeding heeft een dergelijke opsplitsing namelijk het krijgen van borstvoeding of flesvoeding. Zo bestaat de moedermelkmicrobiota o.a. uit *Bacteroides* spp. terwijl deze samenstelling bij flesvoeding wordt nagebootst door pre- en probiotica toe te voegen. Afhankelijk van de voeding verschillen de effecten op de darmmicrobiota, aangegeven met de pijlen. Afkortingen: multiple species (spp.), (d) = per dag

1 = (Gronlund et al., 1999), 2 = (Marques et al., 2010), 3 = (Fallani et al., 2010), 4 = (Penders et al., 2006), 5 = (Biasucci et al., 2010), 6 = (Huurre et al., 2008), 7 = (Adlerberth et al., 2007), 8 = (Matamoros et al., 2013), 9 = (Dominguez-Bello et al., 2010), 10 = (Holgerson et al., 2011), 11 = (Azad et al., 2013), 12 = (Jakobsson et al., 2014), 13 = (Fallani et al., 2010), 14 = (Jacquot et al., 2011), 15 = (Penders et al., 2006), 16 = (Fanaro et al., 2003), 17 = (Rinne et al., 2005), 18 = (Salminen et al., 2009), 19 = (Roger et al., 2010) (Putignani et al., 2014).

VI.3.1. Bronnen van microbiota die bijdragen aan de neonatale kolonisatie

Een belangrijk aspect van de eerder vernoemde parameters (zie VI.3) is dat deze bepalen met welke micro-organismen de baby's in contact komen (zie **Figuur VI.3**). Zo zal bij een thuisbevalling, het kind niet in contact komen met de micro-organismen uit de ziekenhuisomgeving. Na blootstelling aan micro-organismen kunnen deze immers de pasgeborene koloniseren. De bronnen van deze micro-organismen zijn zeer divers en kunnen opgedeeld worden in horizontale en verticale transmissie (zie **Tabel VI.2**). Bij verticale transmissie is er een overdracht van darmmicrobiota van moeder naar kind. Bij een horizontale transmissie daarentegen vormen voeding en omgeving de bronnen. Identificatie van exact dezelfde stam in zowel de bron als de darmmicrobiota van het kind is het sterkste bewijs voor een verticale of horizontale transfer (Adlerberth & Wold, 2009).

Tabel VI.2. De mogelijke bronnen die de darm bij kinderen kunnen koloniseren. Afkorting: Coagulase Negatieve Staphylococci (CoNS) (Adlerberth & Wold, 2009)

Source	Bacterial group or species	Transfer proven ^a	Transfer suggested ^b	Transfer possible ^c	References
Maternal gut	<i>E. coli</i>	x			(43)
	Bifidobacteria	x			(46)
	<i>Bacteroides</i>		x		(52)
	Enterococci			x	
	Various anaerobic bacteria		x		(52)
Maternal vagina	Lactobacilli	x			(47)
	Group B streptococci	x			(48)
Parental skin	<i>S. aureus</i>	x			(49)
	CoNS ^e			x	
Other neonates at maternity ward	<i>E. coli</i>	x			(43)
	Non <i>E. coli</i> enterobacteria	x			(41)
	<i>C. difficile</i>	x			(45)
	Enterococci	x			(44)
	Bifidobacteria		x		(29)
Breast milk	Lactobacilli	x			(50)
	Enterococci	x			(50)
	<i>S. aureus</i>	x			(51)
	CoNS		x		(55)
	Bifidobacteria			x	(68)
	Streptococci			x	(69)
	Enterobacteria, <i>Pseudomonas</i>			x	(69)
Foods and fluids	Non <i>E. coli</i> enterobacteria	x			(42)
	lactobacilli			x	(60)
Environment ^d	<i>C. difficile</i>	x			(45)
	Enterococci			x	
	Clostridia			x	

^a proven by demonstration of the same strain (identified by e.g. serotyping or DNA-based methods) in the infantile microbiota and the source.

^b suggested e.g. by demonstrating differences in colonization rate in relation to delivery mode or feeding mode or other circumstantial evidence.

^c possible since the indicated source has been shown to contain these bacteria.

^d non-living sources in indoor or outdoor environment.

Verticale transmissie

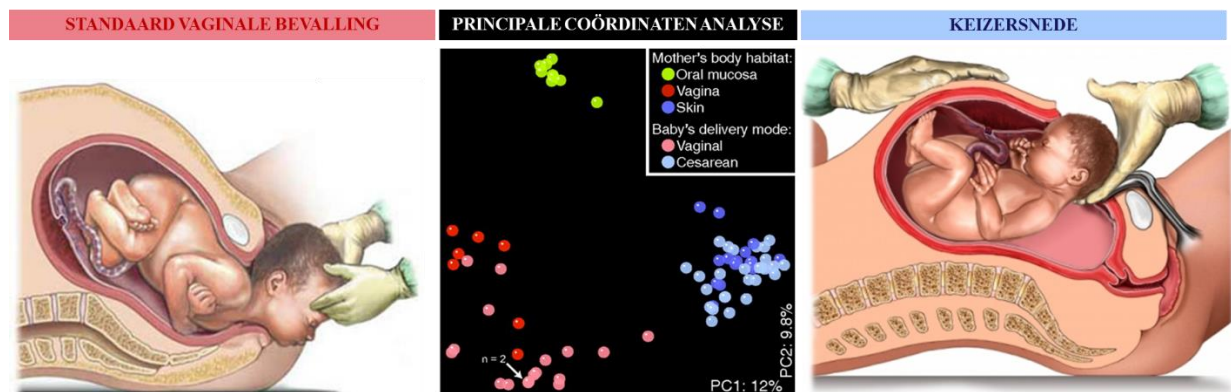
Er zijn twee types verticale transmissies die kunnen plaatsvinden namelijk tijdens een vaginale bevalling (zie VI.3.2) en door het geven van borstvoeding (zie VI.3.3). Deze transmissies ondersteunen de ontwikkeling van het intestinaal ecosysteem van het kind. Op de leeftijd van één maand reflecteert de darmmicrobiota van het kind dan ook de maternale afkomst (Vaishampayan et al., 2010).

Horizontale transmissie

De gelijkaardige phylotypes tussen moeder en haar één maand oude kind, na een vaginale bevalling, differentiëren na een jaar (zie VI.2.1)(Vaishampayan et al., 2010). Een phylotype is een microbiologische term die gebruikt wordt om een groep van organismen te classificeren. Dit suggereert een turnover op species niveau of een invloed van externe bronnen, een horizontale transmissie. Voedingsmiddelen, contact met andere mensen en allerlei andere omgevingsfactoren kunnen een dergelijke transmissie veroorzaken. Analyses van de algemene microbiota samenstelling op latere leeftijd hebben de lange termijn gevolgen van horizontale en verticale transmissie nog niet kunnen bevestigen (Palmer et al., 2007; Turnbaugh et al., 2009).

VI.3.2. De bevallingswijze

De partuswijze is één van de factoren die de samenstelling van de darmmicrobiota bij jonge kinderen beïnvloedt aangezien er al dan niet een verticale transmissie plaatsvindt. Vaginaal geboren kinderen worden initieel gekoloniseerd met de maternale vaginale- en darmmicro-organismen waarmee ze in contact komen tijdens de bevalling (zie Figuur VI.4). Bij een keizersnede ontbreekt dit moeder-kind contact waardoor het kind aan andere micro-organismen wordt blootgesteld en omgevingsfactoren een grotere impact uitoefenen (zie Figuur VI.4). De microbiota van deze pasgeborene vertonen gelijkenissen met de bacteriën van de huid van de moeder, het medisch personeel, de lucht en het medisch materiaal (Marques et al., 2010; Penders et al., 2006).



Figuur VI.4. Het verschil tussen een standaard vaginale bevalling en een keizersnede. Bij de principale coördinaten analyse clusteren de stalen van de maternale microbiota samen volgens de habitat (oraal, vaginaal, huid). De stalen van de baby's clusteren volgens de bevallingswijze. Na keizersnede clusteren de stalen samen met de huid microbiota van de moeder. Bij een vaginale bevalling clusteren de stalen eerder met de vaginale microbiota. Afkorting: principale component (PC). (Dominguez-Bello et al., 2010; Richardson, 2013)

Na vaginale geboorte

De samenstelling van het meconium vertoont gelijkenissen met de vaginale gemeenschap: *Lactobacillus* sp., *Prevotella*, *Sneathia*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* en *Atopobium* (Hyman et al., 2005; Tsolia et al., 2003). Niet enkel vlak na de geboorte is het verschil waarneembaar maar de samenstelling van de ontwikkelende microbiota verschilt ten opzichte van kinderen na keizersnede. De darmmicrobiota van kinderen die vaginaal geboren werden is opgebouwd uit *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Sneathia* sp., *Escherichia*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium* en *Streptococcus*. De correlatie tussen een moeder en haar eigen kind was bovendien sterker dan tussen baby's onderling (Dominguez-Bello et al., 2010). De verticale overdracht van moeder op kind tijdens een vaginale geboorte is hier een mogelijke verklaring voor (zie VI.3.1).

Na keizersnede geboorte

Bij kinderen die via keizersnede geboren werden, zijn *Bacteroides*, *E. Coli* en *Bifidobacterium* in mindere mate aanwezig in de darmmicrobiota en ook de totale bacteriële diversiteit ligt lager (Jakobsson et al., 2014; Johnson & Versalovic, 2012). In de plaats van fecale Enterobacteria worden voornamelijk huidbacteriën zoals *Corynebacterium*, *Propionibacterium* en *Staphylococcus* teruggevonden (Adlerberth & Wold, 2009; Dominguez-Bello et al., 2010; Morelli, 2008). Ondanks het feit dat de microbiële gemeenschappen op de huid persoonsgebonden zijn, is er geen verhoogde gelijkenis tussen de huid gemeenschap van de moeder en haar eigen kind (Dominguez-Bello et al., 2010). Dit suggereert dat andere (huid)bacteriën uit de (ziekenhuis)omgeving ook een significante bijdrage leveren (Jakobsson et al., 2014).

Naast de huidgerelateerde bacteriën zijn ook de *Enterobacteriaceae* prominent aanwezig in de darmmicrobiota. Dit geldt niet voor alle *Enterobacteriaceae*, zo is *E. coli* slechts in beperkte mate terug te vinden, zeker in vergelijking met de vaginale geboorte. *E. coli* komt enkel voor in het gastro-intestinaal stelsel van mensen en dieren waardoor de overdracht van moeder op kind tijdens een vaginale bevalling cruciaal kan zijn. Door de afwezigheid van *E. coli* daalt de competitie waardoor andere bacteriën zoals *Klebsiella* en *C. difficile* kunnen expanderen (Adlerberth et al., 2007). In het geval van *C. difficile* kan dit diarree veroorzaken, al lijken baby's zonder problemen vrij hoge populatie te verdragen. Er zijn wel associaties met negatieve gezondheidseffecten op langere termijn zoals het ontstaan van allergieën (Adlerberth & Wold, 2009).

De verticale overdracht vindt hier niet of in minder mate plaats want er is veel minder gelijkenis tussen de intestinale microbiota van het kind en de fecale gemeenschap van de moeder (Jakobsson et al., 2014; Penders et al., 2006). Dit is ook zichtbaar bij de vergelijking van beide bevallingswijzes aangezien bij een keizersnede het kind niet door het geboortekanaal passeert en dus ook niet in contact komt met de vaginale en fecale omgeving van de moeder (zie Figuur VI.4).

Twee types keizersnedes

Binnen de keizersnedegroep kan nog een verdere onderverdeling gemaakt worden tussen een geplande of een spoedkeizersnede. Bij een geplande keizersnede wordt tijdens de zwangerschap reeds beslist om via een keizersnede te bevallen bijvoorbeeld bij een stuitligging. Aan deze bevalling gaat dus geen arbeid vooraf waardoor de vliezen normaal niet gebroken zijn. Dit in tegenstelling tot een spoedkeizersnede waarbij pas tijdens de bevalling duidelijk wordt dat er een keizersnede nodig is. Deze operatie wordt bijvoorbeeld uitgevoerd als er na een lange arbeid onvoldoende ontsluiting bereikt is of het hoofdje onvoldoende indaalde in het bekken (AZ Sint-Lucas Brugge, 2012).

Effect op de diversiteit

De darmmicrobiota bij kinderen na keizersnede bevat een lagere *species richness*, aantal verschillende *species*. Dit zelfs nog op de leeftijd van vier maanden. Hetzelfde geldt voor de *species* diversiteit dat naast de *species richness* ook rekening houdt met *species evenness* (Azad et al., 2013; Jakobsson et al., 2014). De *evenness* refereert naar de abundantie van de *species* in een bepaalde gemeenschap. De onderverdeling op basis van het type keizersnede toont aan dat de laagste *richness* en *evenness* werd waargenomen na geplande keizersnedes. Dit in tegenstelling tot spoedkeizersnedes waarbij op de leeftijd van vier maand en één jaar zelfs hogere waarden werden geobserveerd dan na een vaginale bevalling (Azad & al., 2014; Azad et al., 2013). De verlaagde diversiteit beperkt zich niet enkel tot de darmomgeving maar ook bij de orale microbiota van deze kinderen is een gelijkaardige trend waarneembaar (Holgerson et al., 2011).

Langetermijneffecten

Het effect van de bevallingswijze en het bijbehorende effect op de darmmicrobiota valt niet te onderschatten aangezien er na één maand, vier maand, één jaar en tot op zevenjarige leeftijd nog steeds verschillen waarneembaar zijn (Adlerberth et al., 2006; Azad & al., 2014; Azad et al., 2013; Salminen et al., 2004). Zo hebben kinderen die via keizersnede geboren zijn, op dat moment, nog steeds een verschoven ratio aan anaëroben ten opzichte van facultatief anaëroben in vergelijking met hun leeftijdsgenoten (Adlerberth et al., 2007). Ook het afwijkende kolonisatiepatroon voor *E. coli*, *Bifidobacterium* en *Bacteroides* is bij Westerse kinderen na een jaar nog steeds waarneembaar (Adlerberth et al., 2006). In tegenstelling tot ontwikkelingslanden waar er wel een catch-up plaatsvindt, mogelijks door de circulatie van darmbacteriën in de omgeving (Adlerberth et al., 1991). Dit wijst op een verminderde bacteriële blootstelling in het Westen waardoor het bekomen van een stabiel en goed functionerend intestinaal ecosysteem wordt uitgesteld. De huidige hygiëne maatregelen moeten daarom niet allemaal over boord gegooid worden want teveel blootstelling aan de verkeerde micro-organismen verhogen dan weer de kans op een onstabiele kolonisatie in het voordeel van pathogene bacteriën. De aanbeveling voor exclusief borstvoeding kan daarentegen, door de unieke samenstelling, wel het gewenste effect bereiken. Het krijgen van exclusief borstvoeding lijkt de effecten op lange termijn immers te compenseren aangezien de taxonomische verschuivingen verminderen en de diversiteit terug toeneemt (Azad & al.,

2014). Desondanks blijkt duidelijk dat een geboorte via keizersnede drastische effecten heeft, ondanks een gedeeltelijke compensatie via moedermelk. Dit ondersteunt het belang om het aantal keizersnedes te beperken tot enkel de noodzakelijke ingrepen. Op Europees niveau stijgt het percentage keizersnedes immers nog elk jaar en in bijvoorbeeld Turkije en Brazilië wordt het reeds in de helft van de gevallen toegepast (W.H.O., 2013a).

Effect op het immuunsysteem

Door de belangrijke link tussen de darmmicrobiota en (de opbouw van) het immuunsysteem kan deze verschuiving dus bepaalde immuunfuncties beïnvloeden. Zo kan het ontbreken van de blootstelling van keizersnede baby's aan de gunstige micro-organismen, een verklaring zijn voor het vaker voorkomen van atopische ziektes (Biasucci et al., 2010; Negele et al., 2004). Zo is er een directe link met astma maar ook een hogere incidentie van obesitas, allergieën, gluten intolerantie en diabetes type 1 (Cardwell et al., 2008; Decker et al., 2010; Isolauri, 2012; Penders et al., 2006; Thavagnanam et al., 2008). Een mogelijke oorzaak hiervoor is onvoldoende stimulatie van het immuun systeem om een tolerante omgeving te creëren waardoor allergieën en auto-immuun ziektes in de hand worden gewerkt (Isolauri, 2014). Steeds meer onderzoek wijst immers op het belang van het gastro-intestinaal stelsel bij de postnatale ontwikkeling van het immuunsysteem (Bjorksten, 2004).

VI.3.3. Borstvoeding - het microbiële aspect van moedermelk

Na de bevalling vormt de voeding één van de belangrijkste invloeden bij de ontwikkeling van het intestinaal ecosysteem. Dit niet alleen vanwege het type voeding, flesvoeding ten opzichte van borstvoeding, maar ook door de microbiota die het aanlevert. Moedermelk zet als het ware de initiële inoculatie verder die plaatsvond tijdens de bevalling. Wat het type voeding betreft is 'exclusief borstvoeding, gedurende minstens de eerste zes levensmaanden', de wereldwijde aanbeveling door de Wereldgezondheidsorganisatie en dus de gouden standaard (Black et al., 2013; W.H.O., 2014a; Walker, 2010).

Gezondheidseffect

De aanbeveling vloeit voort uit onder andere de gezondheidsvoordelen die borstvoeding oplevert op lange termijn. Zo wordt een lagere incidentie van obesitas, diabetes, hypercholesterolemie en cardiovasculaire ziektes op latere leeftijd geassocieerd met het krijgen van borstvoeding als kind (Owen et al., 2005; Owen et al., 2006; Owen et al., 2011; Owen et al., 2008). Hoe moedermelk de gezondheidstoestand exact beïnvloedt is niet gekend. De impact vloeit waarschijnlijk voort uit een combinatie van aanwezige micro-organismen, bioactieve componenten en nutriënten die de moedermelk aanlevert.

Samenstelling van moedermelk

De componenten van moedermelk kunnen opgedeeld worden in twee categorieën. Zo zorgen de aanwezige vetten en suikers voor de hoge calorische waarde om de groei van het kind te ondersteunen. Ook de nodige enzymen zoals amylase en lipase worden geleverd om deze nutriënten te verteren. De overige componenten beschermen de gezondheid van het kind en helpen om een eigen afweer op te bouwen via het immuunsysteem. Hoe de link tussen moeder en kind hierin een rol speelt wordt omschreven door de entero-mammaire pathway (zie VI.3.3.2). De beschermende componenten oefenen onder andere een antimicrobiële en antivirale werking uit. Immunoglobulines, vooral IgA, zorgen voor de klassieke immuunbescherming door de ligandbinding met specifieke antigenen van pathogenen en virussen (Xanthou, 1998).

Naast de specifieke werking van de immunoglobulines levert moedermelk een breed spectrum aan niet-immuun gebaseerde bescherming. Een voorbeeld hiervan is het ijzerbindend eiwit lactoferrine (1-6mg/ml) dat ijzer, als essentiële groeifactor van voornamelijk pathogene bacteriën, capteert uit de omgeving (Hamosh, 1998; Picciano, 2001). Dit creëert een bacteriële homeostase. Daarnaast heeft lactoferrine, onder andere door het lactoferricine-gedeelte, ook een virus- en bacteriedodende werking (Tomita et al., 1994). De antimicrobiële werking is echter niet algemeen want de groei van de gewenste intestinale bacteriën zoals *Lactobacillus bifidus* wordt gestimuleerd. Dit wordt het bifidogeen effect genoemd (Coppa et al., 2006; Hamosh, 2001). Ook caseïne (4-6mg/ml) en nucleotides (2mg/ml) dragen hiertoe bij door respectievelijk de groei van *Bifidobacterium bifidum* en *Lactobacillus bifidus* te promoten (Hamosh, 1998; Hamosh, 2001; Janas & Picciano, 1982; Singhal et al., 2008). De grootste en best gedocumenteerde bijdrage aan het bifidogeen effect wordt geleverd door de humane melk oligosacchariden (HMO's) (12-24mg/ml) die onverteerd de darm bereiken en zo als voedingsbron dienen (Coppa et al., 2006; Picciano, 2001; Wall et al., 2009). In tegenstelling tot de mens kunnen micro-organismen zoals *Bifidobacterium* wel HMO's afbreken. Meer zelfs, de aanwezigheid van HMO's zorgt voor een opregulatie van koolhydraatdegraderende en celadhesie genen bij *Bifidobacterium*. Deze positieve interactie met HMO's verklaart waarom *Bifidobacterium* een ideale kolonisator is van het gastro-intestinaal stelsel bij baby's (Gonzalez et al., 2008; Koenig et al., 2011). Een stijging van voordelige bacteriën zorgt niet alleen voor competitie met mogelijke pathogenen maar *Bifidobacterium* en *Lactobacillus* kunnen bovendien antibacteriële componenten afscheiden die de groei van pathogenen inperken (Gibson, 1998).

In tegenstelling tot de meeste beschermende eiwitten neemt de concentratie van lysozyme, ongeveer 130 µg/ml, toe gedurende de lactatie tot zelfs 426 µg/ml anderhalf jaar na de bevalling (Hennart et al., 1991). Lysozyme lyseert voornamelijk gram-positieve bacteriën door het hydrolyseren van de bacteriële celwand (Hamosh, 2001). Deze specifieke toename in concentratie zou kunnen wijzen op een beschermende werking bij de introductie van vaste voeding en het bijbehorende risico op infectie (Riordan, 2005).

Moedermelkmicrobiota

Naast het stimuleren van de reeds aanwezige commensale bacteriën, brengt moedermelk zelf ook bacteriën aan. Moedermelk zorgt dus voor zowel een pre- als probiotisch effect. Ook al werd moedermelk voordien als steriel beschouwd toch valt het probiotische aspect niet te onderschatten want melk bevat tot ongeveer 10^9 micro-organismen per liter (Heikkilä & Saris, 2003; Jeurink et al., 2013). Bovendien werd moedermelk reeds bevestigd als bron voor de opbouw van de darmmicrobiota bij de baby (zie **Tabel VI.2**). Identieke *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* en *Staphylococcus* stammen werden gedetecteerd in moedermelk en de darmmicrobiota van het kind (Martin et al., 2012).

Reeds meer dan 200 *species* werden geïsoleerd uit moedermelk en deze behoren onder andere tot de taxonomische groep: *Bacteroides*, bifidobacteria, *Clostridium* cluster IV/XIVa/XIVb, enterococci, lactobacilli, *Micrococcia*, streptococci, *Veillonella*, corynebacteria, propionibacteria en staphylococci (Collado et al., 2009; Jeurink et al., 2013; Jost et al., 2013; Martin et al., 2007; Morelli, 2008). De laatste drie komen voornamelijk voor op de huid. *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus* en *Streptococcus* vormen de pre-dominante groepen die in zowat alle geanalyseerde stalen aanwezig zijn (Cabrera-Rubio et al., 2012; Collado et al., 2009; Martin et al., 2007). Van de Bifidobacteria is *Bifidobacterium breve* het talrijkst aanwezig (Martin et al., 2009). *Bacteroides* en *Clostridium* cluster IV daarentegen komen maar in een beperkt aantal stalen voor (Collado et al., 2009).

Het gedeelte van de melkmicrobiota dat alle vrouwen gemeenschappelijk hebben wordt het *core* melkmicrobiota genoemd. Zo werden er negen geconserveerde OTU's gedefinieerd die de helft van de geobserveerde microbiële gemeenschap uitmaken. De overige helft van de is dus niet algemeen terug te vinden in de melkstalen en bovendien zijn de relatieve abundanties van de OTU-genera variabel (in volgorde van relatieve abundantie in de volledige gemeenschap: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Ralstonia*, *Propionibacterium*, *Sphingomonas* en *Bradyrhizobiaceae*) (Hunt et al., 2011; Jost et al., 2013).

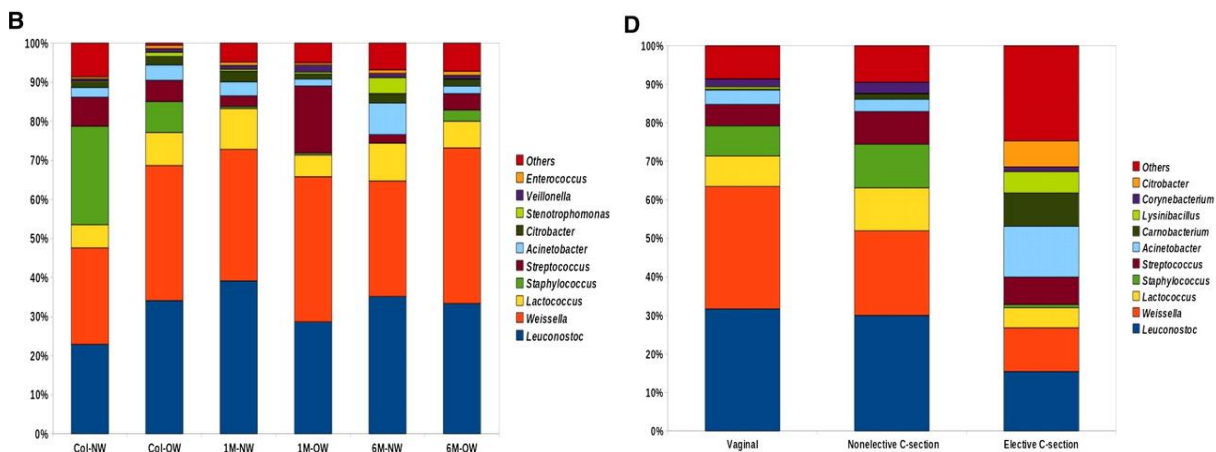
VI.3.3.1. Factoren die de melkmicrobiota beïnvloeden

Naast de interindividuele variabiliteit van de melkmicrobiota is er ook periodieke variabiliteit waarneembaar bij eenzelfde moeder. Op korte termijn clusteren de stalen van eenzelfde moeder wel samen (Hunt et al., 2011). Er is echter invloed van de lactatieduur waarbij de samenstelling gradueel verandert en de diversiteit daalt, zeker ten opzichte van het colostrum (zie Figuur VI.5)(Cabrera-Rubio et al., 2012).

Het voedingspatroon van de moeder kan ook een effect uitoefenen. Een dieetinterventie kan de vetzuursamenstelling en immunomodulerende factoren van de moedermelk modificeren (Hopppu et al., 2012).

Een factor die bijdraagt aan de inter-individuele variabiliteit van de melkmicrobiota is de zwangerschapsduur. Ook al werden alle bacteriële groepen terug gevonden in de moedermelk na een vroeggeboorte, toch was er een verschuiving waarneembaar, meer bepaald in de concentratie van *Bifidobacterium* (Jost et al., 2013).

Ook het gewicht van de moeder bleek een effect te hebben op de samenstelling. Zo bevatten de melkmicrobiota van obese moeders gemiddeld meer staphylococci en lactobacilli ten opzichte van moeders met een normaal gewicht. Het aantal bifidobacteria daarentegen ligt lager (zie Figuur VI.5). Deze trend was niet alleen zichtbaar op basis van BMI, maar ook als er een excessieve gewichtstoename heeft plaatsgevonden tijdens de zwangerschap. Het effect was niet langer waarneembaar in de stalen die zes maanden na de bevalling genomen werden (Cabrera-Rubio et al., 2012). Deze resultaten suggereren een mogelijke link die het verhoogde risico op obesitas bij kinderen van obese moeders zou kunnen verklaren.



Figuur VI.5. De samenstelling van de humane melkmicrobiota. De bacteriële samenstelling van humane melk, bepaald via PCR amplificatie en pyrosequencing van het 16S rRNA, op genus-niveau. (B) De evolutie van de genus samenstelling van de melkmicrobiota gedurende de lactatie periode, colostrum (Col) tot zes maanden na de bevalling (6M). Het effect van het lichaamsgewicht van de moeder werd nagegaan door stalen van moeders met een normaal gewicht (NW) te vergelijken met moeders met obesitas (OW). (D) De bacteriële samenstelling van humane moedermelk op genus-niveau, opgedeeld volgens de bevallingswijze. Afkortingen: Polymerase Chain Reaction (PCR), ribosomaal Ribonucleïne zuur (rRNA)(Cabrera-Rubio et al., 2012).

Invloed van de bevallingswijze op de melkmicrobiota

Een laatste parameter die de samenstelling zou beïnvloeden, is de partuswijze. In sommige analyses op basis van DGGE, clusteren de profielen niet samen op basis van de bevallingswijze (Martin et al., 2007). Via QPCR en pyrosequencing worden er echter wel verschillen vastgesteld (Cabrera-Rubio et al., 2012; Khodayar-Pardo et al., 2014). Er wordt bovendien ook een onderscheid gemaakt tussen de samenstelling na een geplande en spoedkeizersnede, dit in zowel het colostrum als 6 maanden na de bevalling (Cabrera-Rubio et al., 2012). Naast onder andere lagere aantallen *Leuconostocaceae* en bifidobacteria bevat melkmicrobiota na een geplande keizersnede ook een verhoogd aantal *Carnobacteriaceae* (zie Figuur VI.5) (Cabrera-Rubio et al., 2012; Khodayar-Pardo et al., 2014).

De melkmicrobiota na een spoedkeizersnede vertoont sterke gelijkenissen met die van moeders die vaginaal bevallen (Cabrera-Rubio et al., 2012). De effecten lijken gerelateerd aan de fysiologische gevolgen van (de stress van) de arbeid aangezien dit de enige vergelijkbare parameter is tussen de spoed keizersnede en de vaginaal bevallen groep.

Een keizersnede heeft niet alleen een effect op de moedermelkmicrobiota, maar het vertraagt ook de start van de lactatie waardoor er veel minder borstvoeding (3.5%) gegeven wordt in vergelijking met een vaginale geboorte (71.5%) (Dewey et al., 2003; Prior et al., 2012; Zanardo et al., 2010). Helaas zijn het net die microbiota, van de moedermelk, die het ontbreken van de blootstelling aan de fecale en vaginale microbiële gemeenschap kunnen compenseren (zie VI.3.3.2). Eén van de achterliggende redenen voor het ondersteund effect is moedermelk als onderdeel van de entero-mammaire pathway tussen moeder en kind (zie VI.3.3.2). De borstvoedingspercentages kunnen verhoogd worden door een borstvoedingscampagne met de nodige voorlichting en aanmoediging (Cho & Ahn, 2014).

VI.3.3.2. Oorsprong van de moedermelkmicrobiota

De huid en de mondholte

Initieel werd er gedacht dat de aanwezige bacteriën in moedermelk enkel een contaminatie waren door huid- en mondbacteriën. Moedermelk bevat inderdaad huidbacteriën zoals corynebacteria, propionibacteria en staphylococci (zie VI.3.3). Deze kunnen afkomstig zijn van de melkkanalen, de tepel of de omliggende huid (Collado et al., 2009; Morelli, 2008). De tepelhof vormt zeker een bron van melkmicrobiota, meer bepaald van *Lactobacillus gasseri* en *Enterococcus faecium*. Dezelfde *L. gasseri* en *E. faecium* stammen van het tepelhof en de moedermelk werden immers teruggevonden in de mondholte en feces van het kind (Martin et al., 2003).

Om na te gaan of de gedetecteerde micro-organismen louter een besmetting door bijvoorbeeld de huid zijn, wordt de samenstelling van de melkmicrobiota vergeleken met deze op verschillende lichaamssites. Enkel melkstalen na een geplande keizersnede clusteren samen met de orale en vaginale mucosa (Cabrera-Rubio et al., 2012). De overige melkstalen, na vaginale bevalling en spoedkeizersnede, clusteren losstaande van lichaamssites (Cabrera-Rubio et al., 2012). Dat moedermelkmicrobiota enkel na een geplande keizersnede samenclusteren met huidmicrobiota, ondersteunt dat de melkmicrobiota niet louter waarneembaar zijn door een besmetting.

Ook *Veillonella*, *Leptotrichia* en *Prevotella* sp., typische kolonisatoren van de mondholte, kunnen in significante hoeveelheid in de melk teruggevonden worden (Jost et al., 2013; Khodayar-Pardo et al., 2014). Door de terugstroom van niet doorgeslikte melk naar de kleinere kanalen is er een uitwisseling van orale bacteriën van de baby met de melkkanalen van de moeder mogelijk. Dit proces werd gevisualiseerd via echografie (Ramsay et al., 2004).

Deze specifieke niche die gecreëerd wordt tussen tepel en mondholte van de baby, is niet de enige bron van micro-organismen aangezien er reeds bacteriën aanwezig zijn in de moedermelk voordat het kind geboren wordt (Fernandez et al., 2013). De samenstelling van de moedermelkmicrobiota is bovendien gelijkaardig voor en na de bevalling (Martin et al., 2004).

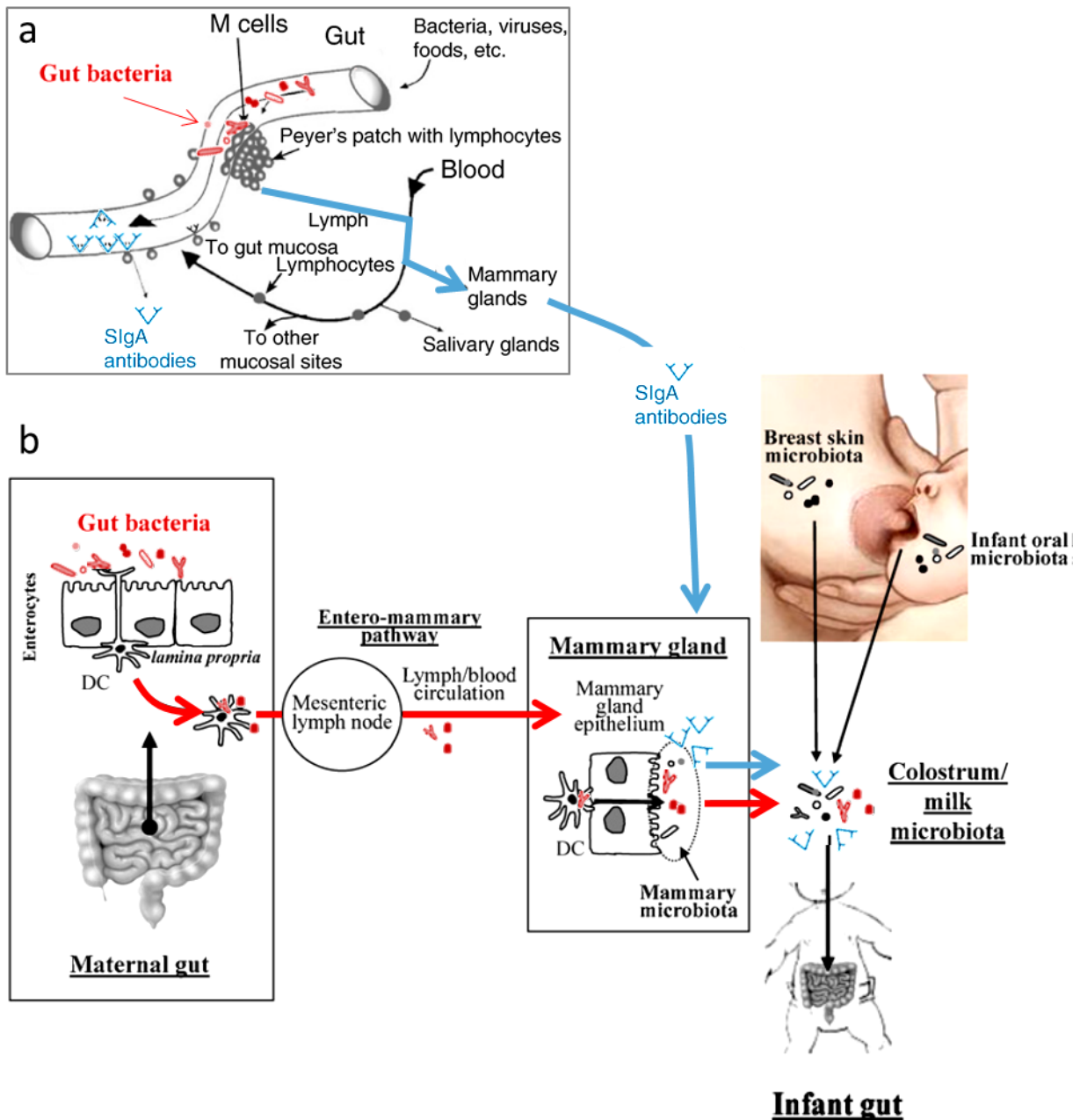
Tot slot zijn strikt anaërobe bacteriën zoals bifidobacteria talrijk aanwezig in moedermelk. Deze bacteriën kunnen niet aangeleverd worden door de te aerobe mond- of huid-omgeving. Een interne uitwisseling uit het gastro-intestinaal stelsel van de moeder vormt wel een mogelijke bron voor deze bacteriën.

De entero-mammaire pathway: transfer van maternale darmmicrobiota naar het kind

De maternale darmmicrobiota is in enkele gevallen al vastgesteld als bron door specifieke stammen van de anaerobe bacteriën die in zowel maternale als neonatale darmmicrobiota voorkomen. Bifidobacteria en *E. coli* zijn voorbeelden waarbij de maternale bron werd bevestigd (zie Tabel VI.2) (Makino et al., 2013; Tannock et al., 1990). Bij *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* zijn de stammen zelf zo familie-specifiek dat een preservatie van moeder op kind wordt waargenomen (Healthist et al., 2013; Martin et al., 2012). Naast het directe en eenmalige contact tijdens een vaginale bevalling, kan een transfermedium nadien ook nog een link maken tussen de darmmicrobiota van moeder en kind. Moedermelk lijkt een goede kandidaat als verticaal transmissiemedium. Een endogene transmissiestap van de maternale darmmicrobiota naar de melk is echter controversieel. Een mogelijke hypothese via het mucosa-geassocieerde lymfoïde systeem wordt de entero-mammaire pathway genoemd (zie Figuur VI.6) (Donnet-Hughes et al., 2010; Perez et al., 2007). De gedetailleerde werking ervan is nog onduidelijk. Zo zou er gebruik gemaakt worden van fagocyterende dendritische cellen die het intestinaal epitheel penetreren. Daarbij samplen ze dan commensale bacteriën uit de maternale darm omgeving (Rescigno et al., 2001). Opgenomen in deze cellen, kunnen de bacteriën tot enkele dagen overleven. Via systemische circulatie bereiken ze levensvatbaar de melkklieren om zo via de moedermelk de darm van het kind te koloniseren (Cabrera-Rubio et al., 2012). De hypothese van een entero-mammaire pathway wordt ondersteund door dezelfde bacteriële stammen die in zowel fecale stalen, melk cellen en bloed cellen van de moeders aanwezig zijn (Perez et al., 2007). Hoe het lichaam deze immuunreacties tegen de bacteriën kan omzeilen is nog onduidelijk.

Deze pathway ondersteunt bovendien ook het immuunsysteem van het kind door Immunoglobuline A (IgA) aan te leveren. De Peyerse platen in de darm nemen darmbacteriën op waarna de aanwezige gespecialiseerde lymfocyten als respons migreren naar verschillende mucosale membranen en exocriene klieren (zie Figuur VI.6). Het borstklierweefsel is één van die locaties waar dan, door de lymfocyten, secretorisch IgA (sIgA) wordt aangemaakt. Dit zijn anti-lichamen specifiek voor de gesamplede darmbacteriën. Dit sIgA, zorgt via de moedermelk, bijvoorbeeld 12g sIgA/l in colostrum, voor een bescherming van het kind tegen deze bacteriën (Hanson, 2007). Door de binding met de neonatale darmwand te verhinderen, beschermt sIgA tegen de pathogenen die in de maternale darm gezien zijn (zie III.1.4). Aangezien op deze manier via moedermelk een deel van de immuunwerking kan worden aangeleverd, kan het kind in de eerste levensmaanden zowat alle energie investeren in groei (Hanson, 2007). Deze bescherming wordt ondersteund door praktijkvoorbeelden waarbij specifieke sIgAs in de melk voorkomen, kort na orale blootstelling bij de lacterende moeder. Zo leidt *Shigella*, die aanwezig is bij moeder en kind, niet tot diarree bij het kind door specifieke sIgAs, die het via de moeder ontvangt. De binding van het pathogeen aan de darmwand wordt door sIgAs verhinderd (Goldblum et al., 1975; Roux et al., 1977).

Het verschil in microbiota die aangetroffen wordt tussen geplande en spoedkeizersnedes kan verklaard worden door de endocytose theorie. De stress die de arbeid en bevalling uitoefenen op het lichaam beïnvloedt de darmpermeabiliteit. Hierdoor ontstaat een selectief proces waarbij enkel specifieke taxa deel zullen uitmaken van de moedermelkmicrobiota (Cabrera-Rubio et al., 2012; Collado et al., 2014).



Figuur VI.6. Een weergave van de mogelijke bronnen van de humane melkmicrobiota en de productie van SIgA. (A) Secretorisch immunoglobuline A (SIgA) wordt gemaakt als respons op de opname van micro-organismen uit de maternale darm in de Peyserse platen. De productie vindt plaats in mucosale membranen zoals de darmwand en in exocriene klieren zoals de melkklieren. Door de entero-mammaire pathway bevat moedermelk antilichamen tegen de intestinale microbiota van de moeder (B) De mogelijke bronnen van de micro-organismen in moedermelk. Afkorting: Dendritische cel(DC), Microfold cells(M cells). (Fernandez et al., 2013; Hanson, 2007)

Hoofdstuk 2: Doelstelling

Het belang van een goede evenwichtige darmsamenstelling wordt ondersteund door het toenemend aantal associaties die worden blootgelegd tussen darmmicrobiota en bepaalde ziektebeelden. Hoe een evenwichtige darmgemeenschap tot stand komt of hoe een afwijkende samenstelling veroorzaakt wordt, is nog onduidelijk. De initiële kolonisatie is cruciaal voor de inductie van de immuniteit en vormt de eerste stap naar een vrij stabiele microbiële samenstelling bij volwassenen. Een verstoorde kolonisatie kan onomkeerbare gezondheidseffecten veroorzaken op lange termijn. Het is niet enkel van belang om te begrijpen hoe de microbiële gemeenschap evolueert maar evengoed welke factoren deze evolutie bepalen.

Deze thesis onderzocht de samenstelling van de darmmicrobiota tijdens de eerste levensfase, meer bepaald vóór de introductie van vaste voeding. Hierbij werd nagegaan of de bevallingswijze een impact heeft op deze samenstelling.

In een eerste fase werd een *in vivo* studie opgestart, bestaande uit een vragenlijst en eenmalige staalname. Er werd moedermelk geïncubeerd en een fecaal staal van moeder en kind. Enkel baby's die minstens drie maanden ononderbroken borstvoeding kregen werden gerekruteerd om beïnvloeding door het type voeding (borstvoeding/flesvoeding/vaste voeding) te vermijden (zie VI.2.2). De vragenlijst peilde naar andere invloedrijke factoren zoals ziekenhuisopname, bevallingswijze en anti-/probioticagebruik (zie VI.2.2). Het dieet van de moeder werd nagegaan via een voedselfrequentie-vragenlijst.

Tijdens het tweede luik werden de verzamelde stalen geanalyseerd aan de hand van Illumina sequencer en DGGE. Om de invloed van bevallingswijze na te gaan werden stalen geanalyseerd van baby's die via keizersnede of vaginaal geboren werden. De fecale stalen geven een beeld van de darmmicrobiota en maken een vergelijking tussen moeder en kind mogelijk. Tenslotte werden de moedermelk stalen onderzocht, deze vormen de effectieve microbiële link tussen beide.

Graag zou ik volgende mensen willen bedanken voor hun bijdrage tot het bekomen van volgende resultaten.

Ir Frederiek Maarten Kerckhof voor ondersteuning bij de statistische dataverwerking en bijstand in R (Laboratory of Microbial Ecology and Technology (LabMET), Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen, Universiteit Gent)

Dr Ramiro Vélchez Vargas voor de Illumina sequenering bij het Helmholtz Centre for Infection Research in Braunschweig, Duitsland

LGC Genomics voor de Sanger sequenering (Berlijn, Duitsland)

Dr. Nathalie Michels voor de instructies bij het inlezen van de voedingsfrequentie vragenlijst (FFQ) en het ter beschikking stellen van de scan apparatuur (Departement Volksgezondheid unit Voeding en voedselveiligheid, Faculteit geneeskunde en gezondheidswetenschappen, Universiteit Gent)

Dr. Selin Bolca voor het verschaffen van de voedingsfrequentie vragenlijst (FFQ) en bijbehorende synthaxen (Laboratory of Microbial Ecology and Technology (LabMET), Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen, Universiteit Gent)

Hoofdstuk 3: Resultaten

VIII.1. De klinische data van de *in vivo* studie

Stalen werden verzameld bij 30 moeder-kindparen waarvan 14 baby's vaginaal geboren werden en 16 via keizersnede (zie

Tabel VIII.1). De keizersnede groep omvat onder andere twee twee-eiige tweelingen. De keizersnede bevallingen kunnen opgedeeld worden in geplande en spoedkeizersneden.

Tabel VIII.1. Kenmerken van de moeders en baby's die deelnamen aan de studie

De gemiddelde zwangerschapsduur van de kandidates uit de studie is 38,73 weken en dit lijkt laag ten opzicht van de traditionele berekening van 40 weken, waarna de baby voldragen is. Als echter een onderscheid wordt gemaakt tussen de prematuriteit bij één- en meerlingbevallingen (resp. 7,7% en 50%) dan worden frequenties bekomen die gelijkaardig zijn aan de globale cijfers (resp. 6,7% en 59,4%)(Cammu et al., 2013). Bovendien is het voorkomen van een keizersnede omgekeerd gecorreleerd met de zwangerschapsduur en bijgevolg beïnvloedt dit de gemiddelde zwangerschapsduur binnen deze studie (Cammu et al., 2013). Tenslotte werd in een recente studie een gemiddelde eenling-zwangerschapsduur van 38 weken vastgesteld bij gezonde moeders (Jukic et al., 2013). De vier premature baby's hadden ook een geboortegewicht onder de 2,5kg en waren dus dysmatuur. De antibiotica inname lag vrij hoog, zowel voor de baby's als de moeders. Het innemen van antibiotica is geen belemmering voor het geven van borstvoeding al houdt de arts hier rekening mee zodat het antibioticum niet te sterk is (Kind&Gezin, 2014). ‡ De studie omvatte twee twee-eiige tweelingen. Vandaar dat de percentages betreffende de baby's 30 gegevens bevatten en bij de moeders slechts 28. Als een totaal aantal hiervan afwijkt wil dit zeggen dat er bij die vraag voor bepaalde kandidates geen informatie beschikbaar was.

Baby (n=30) [‡]		
Geboortegewicht (kg)	3,27	
Dysmatuur (<2,5kg) (%)	13,33	(4/30)
Ouderdom bij staalname (maanden)	4	
Geslacht (% jongens)	56,67	(17/30)
Probiotica inname (%)	10	(3/30)
Antibiotica inname (%)	16,67	(5/30)
Pariteit (%)	Geen	56,67
	Eén	26,67
	Twee	16,67
Zwangerschap		
Gemid. zwangerschapsduur (wk)	38,73	
Prematuur (<37wk) (%)	13,33	(4/30)
Bevallingswijze (% vaginaal)	46,67	(14/30)
Arbeid voor de bevalling (%)	60,71	(17/28)
Amnionmembraan gebroken (%)		
	Spontaan	30,00
	Doorprikt	36,67
	Nee	33,33
Plaats van bevalling (% ziekenhuis)	90,00	(27/30)
Gemid. verblijf op materniteit (d)	5,33	
Moeder (n=28) [‡]		
Probiotica inname* (%)	3,57	(1/28)
Antibiotica inname* (%)	39,29	(11/28)

VIII.2. Karakterisatie van de microbiële gemeenschap in moedermelk en fecale stalen op basis van DGGE

VIII.2.1. Optimalisatie staalvoorbereiding, DNA extractie en PCR-reactie

VIII.2.1.1. Fecale stalen

Uit alle fecale stalen werd DNA geëxtraheerd door middel van de FastPrep extractie (zie X.2.1). Door de slijmerige consistentie van de baby-stoelgangstalen in alle stappen van het protocol was extra alertheid nodig bij verwijderen van het supernatans. Ondanks dat de resulterende DNA-extracten volgens NanoDrop en agarose-gel voldoende DNA bevatten, werkte de standaard PCR-reactie met 338F-GC en 518R primers niet (zie X.3, X.5 en X.6). Om een PCR product te bekomen bij alle stalen werden verschillende PCR-reacties getest en geoptimaliseerd. In dit geval werd een *nested* PCR (zie Tabel X.4) gebruikt met 63F en 1378R primers in de eerste reactie en dit genereert een fragment van 1315 bp. Door dit als template te gebruiken voor de PCR-reactie met 338F-GC en 518R primers wordt de specificiteit verbeterd en leverde dit PCR-producten op voor een DGGE-profiel van alle stalen (zie X.7).

VIII.2.1.2. Moedermelkstalen

Ook voor de moedermelkstalen werd de DNA-extractie geoptimaliseerd. DNA die, via de standaard FastPrep procedure (zie X.2.1) geëxtraheerd werd uit twee ml moedermelk, leverde immers geen PCR-producten op. Bij de optimalisatie werden verschillende DNA-extractie kits, startvolumes en staalvoorbereidingen getest. Een opgeconcentreerde *pellet*, bekomen na 30min centrifugatie van 5 tot 10ml moedermelk bij minimum 21475g, bleek het beste startmateriaal voor de extractie. Moedermelk bevat niet alleen een vetrijke matrix maar ook de concentratie aan micro-organismen (10^9 /l) is lager dan bijvoorbeeld fecaal materiaal (10^{11} /g) (Franks et al., 1998; Heikkila & Saris, 2003; Jeurink et al., 2013). Door een additionele krachtige centrifugatiestap kan de vetlaag verwijderd worden en worden de micro-organismen opgeconcentreerd in de *pellet* (zie Figuur X.1). Op de bekomen *pellet* werden verschillende DNA extractie protocols getest gevolgd door een controle via NanoDrop ND-1000 en agarose gelelektroforese (zie Figuur VIII.1). Aan de hand van de DGGE profielen werd de meest geschikte DNA-extractie methode bepaald. Bij de bevroren bewaarde moedermelkstalen bleek de FastPrep DNA extractie op 5ml ongeconcentreerd startmateriaal de optimale techniek. Bijkomend voordeel is dat het DNA van de fecale stalen ook met FastPrep werd geëxtraheerd.

De FastPrep DNA extractie werd getest op alle moedermelkstalen, met *pellets* bekomen uit 5ml moedermelk. Aangezien de herhaling van dezelfde stalen uit de test extracties niet steeds een goed PCR product opleverden, werd de FastPrep extractie nog verder geoptimaliseerd. Fenol die in verschillende mate achterblijft na een extractie kan de resultaten verstoren. Door de laatste precipitatiestap met isopropyl alcohol en natrium acetaat te herhalen werd voor alle stalen een werkend PCR-product bekomen. De PCR-reactie werd uitgevoerd met de primers 338 F-GC en 518 R (zie Tabel X.4).

VIII.2.2. Visualisatie van de microbiële gemeenschap via DGGE

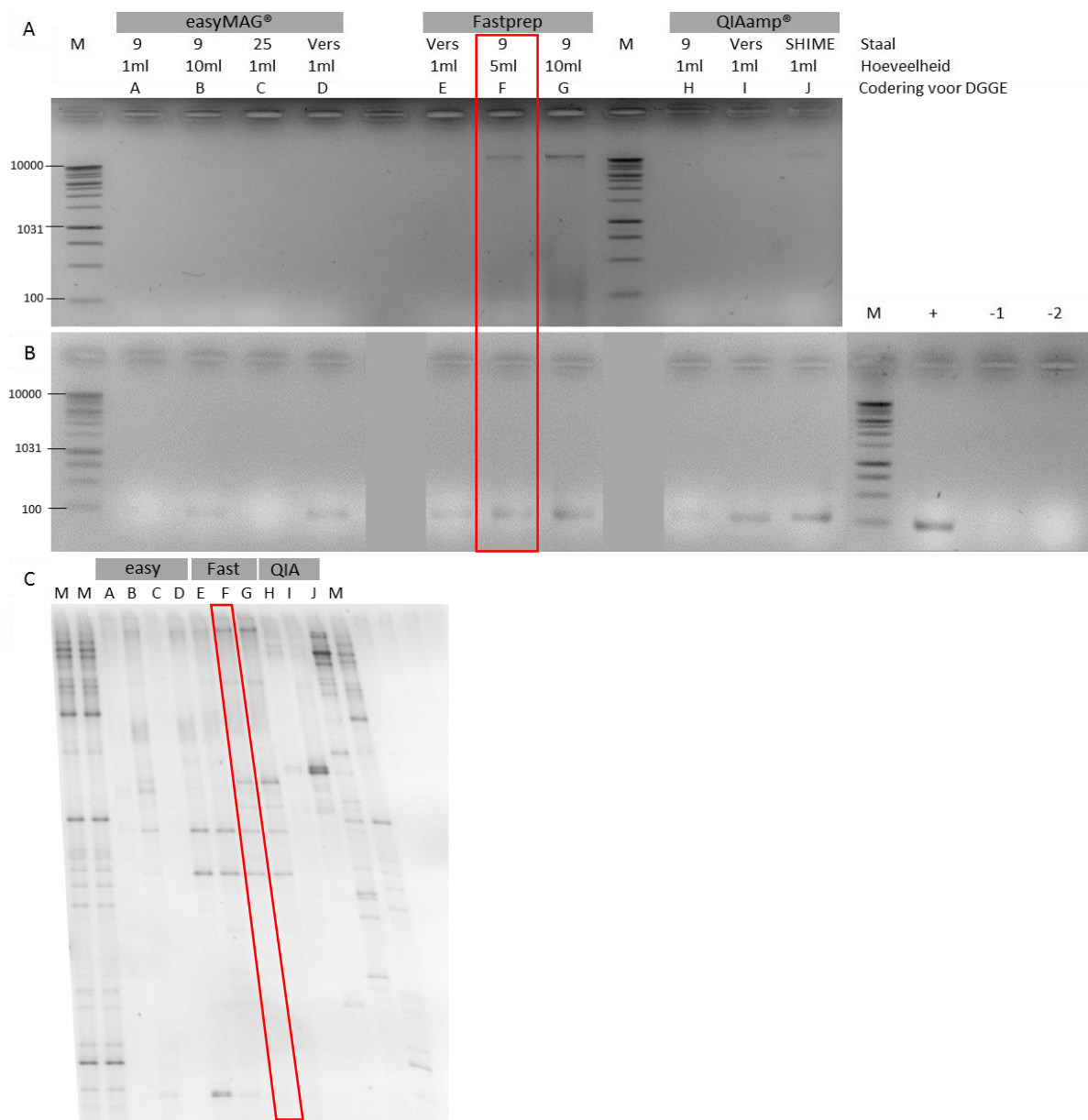
De resulterende PCR-producten van de DNA extracties op zowel de moedermelk als de fecale stalen, werden geanalyseerd met DGGE. De bekomen profielen werden hiërarchisch geclusterd op basis van de band-gebaseerde Jaccard index en Ward's linkage met *fuzzy logic* en *area sensitivity*. Hiervoor werd gebruik gemaakt van Bionumerics (Applied Maths NV, Sint-Martens-Latem, België)(zie Figuur VIII.2). Voor elke clustering werden de best passende tolerantie settings bepaald.

Bij de fecale stalen van bijna alle kinderen was een gelijkaardige dominante band aanwezig op het DGGE profiel (aangeduid met een rode kader zie Figuur VIII.2). Enkel staal K14B_CB vormt hier een duidelijke uitzondering op. Het micro-organisme (de micro-organismen) uit dit DGGE bandje is blijkbaar een belangrijke kolonisator van de darmmicrobiota bij de baby's uit deze studie. Bijgevolg werd dit bandje verder onderzocht. Door het bandje uit te snijden bij staal K19B_CB en op te zuiveren kon het DNA-fragment uitbesteed worden voor Sanger sequencer (zie X.7.3). Er werd een fragment gegenereerd via de 338 F primer (>e2f.f) en twee fragmenten via de 518 primer(>e1r.r en >e2r.r) (zie Tabel VIII.2). Het dominante *species* werd geïdentificeerd als *Bifidobacterium breve* aangezien een sequentiesimilariteit van meer dan 98% eenzelfde *species* aangeeft.

Tabel VIII.2. Identificatie van een dominante bacterie bij de darmmicrobiota van baby's. Door middel van Sanger sequencer met de 338 F of 518 R primer werden nucleotidesequenties bekomen, respectievelijk >e2f.f en >e1r.r/>e2r.r. Volgens een nucleotide BLAST search zijn deze sequenties afkomstig van *Bifidobacterium breve*. Afkortingen: Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), Nucleotide BLAST (BLASTn)

	Sequenties	BLASTn search	Query coverage	Indentities
>e1r.r	120bp	Bifidobacterium breve	100%	120/120
	AAAGTGCCTTGCTCCCTAACAAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCTCCATCCCTCACGCGGCGTCGCTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCAATATTTCCCACTGCTGCCTCCCGTAGG			
>e2f.f	137bp	Bifidobacterium breve	99%	136/136
	AGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGGAGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTGTTAGGGAGCAA GGCACTTTGTGTTGAGTGACCTTTGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAA			
>e2r.r	117bp	Bifidobacterium breve	100%	117/117
	AAGTGCCTTGCTCCCTAACAAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCTCCATCCCTCACGCGG GTCGCTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCAATATTTCCCACTGCTGCCTCCCGTA			

Hoofdstuk 3: Resultaten

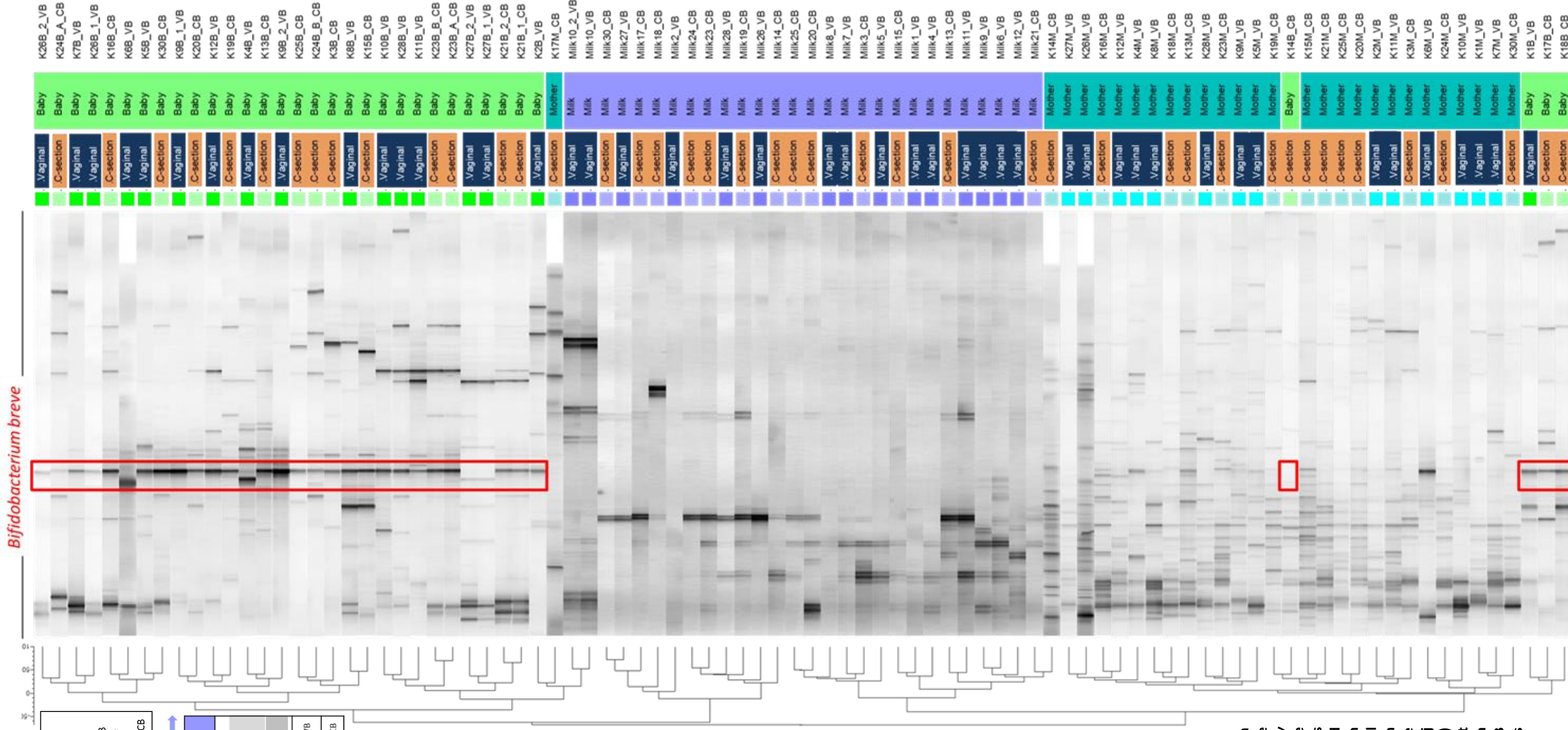


Figuur VIII.1. De bandenpatronen van moedermelk DNA extracten bekomen via verschillende extractie technieken en de overeenkomstige bandenpatronen van de PCR-fragmenten en DGGE profielen. (A) Het bandenpatroon van de DNA-extracten werd bekomen door de NucliSENS® easyMAG® (easy), FastPrep (Fast) en QIAamp® (QIA) extractiemethoden uit te voeren op de moedermelkstalen. Voor sommige stalen werden verschillende staalvolumes getest waarbij de 5 en 10ml stalen 30 min gecentrifugeerd werden en het DNA werd vervolgens geëxtraheerd uit de *pellet*. De DNA merker (M) bevat DNA fragmenten van gekende lengte waardoor via dit migratieprofiel de lengte van de overige fragmenten kan ingeschat worden. Het vers staal is een moedermelkstaal dat enkele uren voor de extractie werd afgekolfd en intussen bewaard werd in de koelkast (8°C) en dus niet ingevroren (-20°C) werd zoals de overige stalen. SHIME is een lumaal vloeistofstaal uit een werkende SHIME opstelling dat meteen na afname werd geëxtraheerd. Dit doet dienst als positieve controle aangezien deze extractiemethode geoptimaliseerd is voor dit type staal. Genomisch DNA is enkel zichtbaar op de agarose gel na de FastPrep DNA extractie op de moedermelk stalen na ingevroren bewaring (9 en 25). (B) Visualisatie van het bandenpatroon van de PCR-fragmenten na amplificatie van het bacterieel DNA uit de extracten. De laatste drie laantjes bevatten de controles. Het plusteken toont aan of de PCR-reactie gewerkt heeft, de positieve controle. De negatieve controles geven mogelijke contaminatie van de reactie weer respectievelijk voor (-1), dus de mastermix op zich, en na (-2) de staalvoorbereiding. Behalve bij de bevroren bewaarde moedermelk stalen (9 en 25) geëxtraheerd met de easyMAG® methode, werd bij alle stalen een PCR-product gevisualiseerd. (C) De DGGE-profielen van de moedermelk, bekomen via verschillende extractietechnieken. De lettercode bij de stalen is overeenkomstig met de letters die vermeld staan bij de DGGE-codering (A). Via easyMAG® kan er uit hetzelfde verse staal een extra band gevisualiseerd worden in vergelijking met FastPrep. Dit in tegenstelling tot het patroon na QiaAmp extractie. Enkel de FastPrep extractie levert een DGGE profiel op voor de bevroren moedermelk stalen. Aangezien bij 5ml een gelijkaardig patroon bekomen wordt als bij 10ml, geniet de FastPrep DNA extractie op de opgeconcentreerde *pellet* van 5ml bevroren moedermelk de voorkeur.

Afkortingen: Desoxyribonucleïnezuur (DNA), Polymerase Chain Reaction (PCR), Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME) 25

Codering:
Kandidaat nummer Staatstype_ Bevallingswijze
 Bv. De 16^{de} kandidaat, moeder, die beviel via keizersnede
 K16 M _CB = K16M_CB
 Bv. Bij de eerst geborene baby van de tweeling van de 23^{ste} kandidaat
 die geboren werd met een keizersnede
 K23 B_A_ _CB = K23B_A_CB

			Moeder	Baby	Moeder melk
tweeling		Oudste (eerstgeborene)	M_	B_A_	Milk_
		Jongste		B_B_	
2 staalthames		Eerste		B_1_	
		Tweede		B_2_	Milk_2_
Vaginal	_VB		M_VB	B_VB	Milk_VB
C-section	_CB		M_CB	B_CB	Milk_CB



Figuur VIII.2. De DGGE profielen van alle fecale en moedermelk stalen. De clustering werd uitgevoerd met de band-gebaseerde Jaccard index, Ward's *linkage*, *fuzzy logic* en *area sensitivity* De best passende tolerantie settings werden bepaald en toegepast. Deze analyses werden uitgevoerd met behulp van Bionumerics (Applied Maths NV, Sint-Martens-Latem, België). De stalen clusteren bijna allemaal samen op basis van het type staal (moeder fecaal – kind fecaal – moedermelk). De stalen van de eeneiige tweelingen (A_ en B_) clusteren in het ene geval samen en in het andere niet. Staalnames bij hetzelfde kind op een verschillend tijdstippen (_1 en _2) clusteren wel meestal samen. De rode kader duid het bandje aan dat dominant voorkomt bij de stalen van bijna alle kinderen. Het desbetreffende bandje van K19B_CB werd gesequeneerd en geïdentificeerd als *Bifidobacterium breve*.

VIII.2.3. Diversiteits indices berekend aan de hand van de DGGE

Op basis van de bandklassen van de DGGE profielen (zie Figuur VIII.2) werden enkele indices berekend die de aanwezige bacteriële populatie beschrijven.

Gini-coëfficiënt (evenness)

De *evenness* geeft een beeld van de gelijkheid in abundanties binnen een bacteriële populatie. Via de Gini-coëfficiënt wordt de ongelijkheid uitgedrukt en deze coëfficiënt werd berekend voor de belangrijkste subpopulaties van de stalen (zie Figuur VIII.3) waarop de clustering werd uitgevoerd. Om parametrische testen uit te voeren, zoals de vergelijking van Gini waarden tussen twee groepen, moeten drie voorwaarden nagegaan worden (zie X.7.2).

Aan de eerste voorwaarde, voor een onafhankelijke en identiek verdeelde staalname werd voldaan door de opzet van de studie. De tweede voorwaarde werd getest door middel van Q-Q plots (zie A.1) en Shapiro-Wilk testen. Uit de Q-Q plots blijkt de normaliteit niet voldaan te zijn bij de data van:

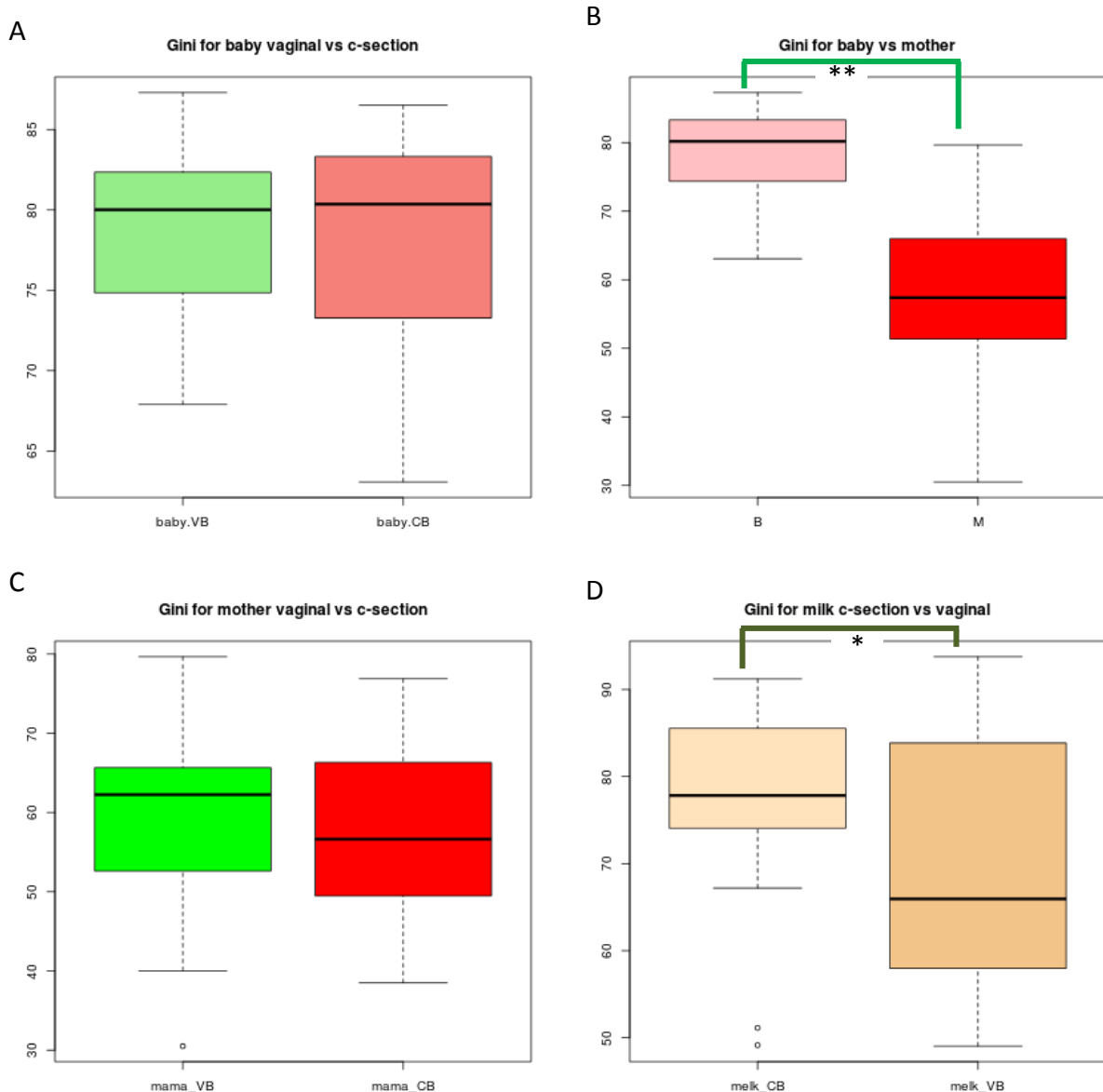
- de moeders die met een keizersnede bevielen (mama_CB)
- de baby's na vaginale bevalling (baby_VB) en keizersnede (baby_CB)
- de moedermelkstalen (melk_CB)(melk_VB)

De Shapiro-Wilk test verworpt enkel de normaliteit voor de melkstalen na een keizersnede, indien rekening gehouden wordt met de *outliers* (melk_CB)(p-waarde=0,0471). Wanneer de *outliers* (Milk15_CB en Milk21_CB) niet in rekening worden gebracht, wordt de nulhypothese van een normale verdeling niet langer verworpen (p-waarde=0,6947).

Tenslotte voldeden alle stalen aan het criterium van homoscedasticiteit via Levene-type testen. Bij de vergelijking tussen alle baby's (B) en moeders (M) (p-waarde=0,0013) en de dataset van de moedermelk zonder *outliers* (p-waarde=0,0024) was de homoscedasticiteit niet voldaan.

Indien voldaan werd aan de voorwaarden, worden de Gini-coëfficiënten vergeleken door middel van t-testen. Voor de vergelijking tussen baby's (B) en moeders (M) en de moedermelkstalen (melk_CB-melk_VB) zonder *outliers* werd een Welch-gemodificeerde t-test uitgevoerd. Om de moedermelk dataset zonder *outliers* te vergelijken (melk_CB-melk_VB) werd een Wilcoxon rank sum test uitgevoerd. Bij de vergelijkingen van deze Gini-coëfficiënten werd er maar in één geval een significant verschil ($p < 0,05$) vastgesteld en dat was bij de vergelijking tussen moeders (M) en baby's (B) (p-waarde < 0.0001). De Gini-coëfficiënt bij de baby's zal gemiddeld 19,81 groter zijn dan de coëfficiënt bij de moeders. Dit wil zeggen dat de darmmicrobiota bij baby's door een beperkt aantal *species* gedomineerd worden, wat bij volwassenen niet het geval is.

Aangezien het verwijderen van de *outliers* in de melk dataset hier geoorloofd lijkt, kan ook hier een significant verschil in Gini-coëfficiënt worden vastgesteld. Zo zal de Gini-coëfficiënt van de melk microbiota na een keizersnede gemiddeld 12 tot 13 keer hoger liggen dan de coëfficiënt na een vaginale bevalling (p-waarde=0,0267). Na een keizersnede zou de melk dus, behalve enkele uitzonderingen, minder *even* zijn en dus een minder gelijke spreiding van abundanties hebben vergeleken met een vaginale bevalling.



Figuur VIII.3. Een overzicht van de Gini-coëfficiënten van de belangrijkste subpopulaties binnen deze steekproef. De Gini-coëfficiënten werden berekend via de similariteitsmatrix gebaseerd op de Jaccard-Ward clustering van de stalen (zie Figuur VIII.2). Deze coëfficiënt geeft de ongelijkheid weer van een populatie. De coëfficiënten werden vergeleken op basis van bevallingswijze tussen de darmmicrobiota van baby's onderling (A), de darmmicrobiota van de moeders onderling (C) en de moedermelk (D). De baby's en moeders werden ook met elkaar vergeleken (B). Enkel tussen moeder en kind (B) verschilt de Gini-coëfficiënt significant (*). Bij de microbiota in de moedermelk na een keizersnede bevalling zijn er duidelijk *outliers* waarneembaar. Als deze buiten beschouwing gelaten worden is er wel een significant verschil tussen de Gini-coëfficiënten van de microbiota in de moedermelk na vaginale en keizersnede bevalling (**). Afkortingen: Baby's (B), Moeders (M), Bevalling via keizersnede (CB), Vaginale bevalling (VB).

Richness

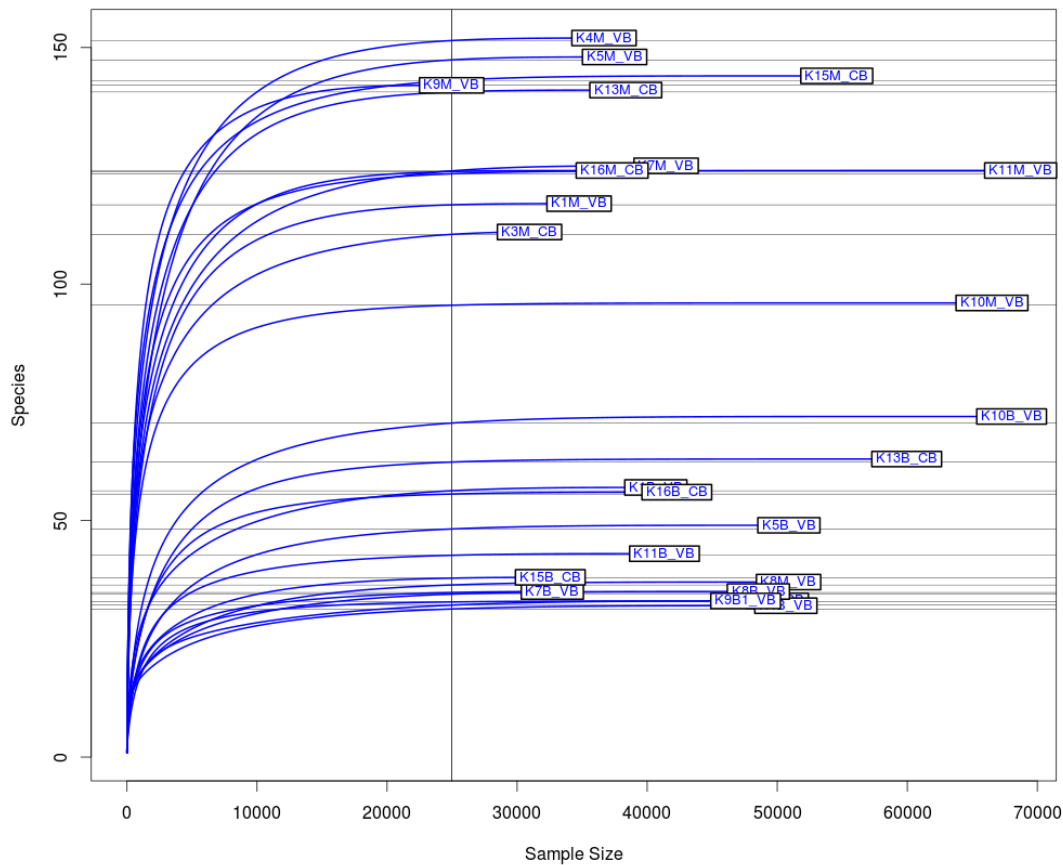
De *richness* is een maatstaf voor het aantal banden op de DGGE *fingerprint*. Enkel bij moeder (M) en kind (B) kan er via een Wilcoxon rank sum test een significant verschil aangetoond worden in de cumulatieve distributie curves van de *richness* (p -waarde < 0.0001). Via een Hodges-Lehman schatter kan het verschil in medianen, in dit geval 9, worden ingeschat (p -waarde < 0.0001). Dit betekent dat de baby's gemiddeld 9 bandjes minder zullen hebben dan de moeder en in 95% van de gevallen zal dat verschil variëren tussen 11 en 6. Er is algemeen 75% kans op minder *richness* bij baby's dan bij mama's.

VIII.3. Karakterisatie op basis van Illumina sequenering en taxonomische eigenschappen van de microbiële gemeenschap in moedermelk en fecale stalen

De microbiota in de stalen werden niet enkel onderzocht via DGGE maar ook uitgestuurd voor Illumina sequenering. Er dient opgemerkt te worden dat de volgende analyses zijn uitgevoerd op een subset van de stalen. Want van de 62 stalen die werden opgestuurd voor Illumina sequenering, werden er nog maar 27 stalen effectief gesequeneerd.

VIII.3.1. Kwaliteit van de sequenering

De diepte van een sequenering wordt nagegaan door *rarefaction* curves op te stellen. Deze curve geeft de *species richness* weer in functie van de staalname grootte. Indien de curve van een bepaald staal afvlakt dan was er voldoende sampling en de reactie dus succesvol. Bij deze analyse werd een *subsampling cut-off* ingesteld vanaf staal K9M_VB. Dit staal vlakt nog net genoeg af om in te sluiten en stalen met een lagere sample size (K2M_VB) werden uit de dataset verwijderd en niet geanalyseerd. Door een *rarefying* stap wordt de bias door een variërend aantal reads ingeperkt.

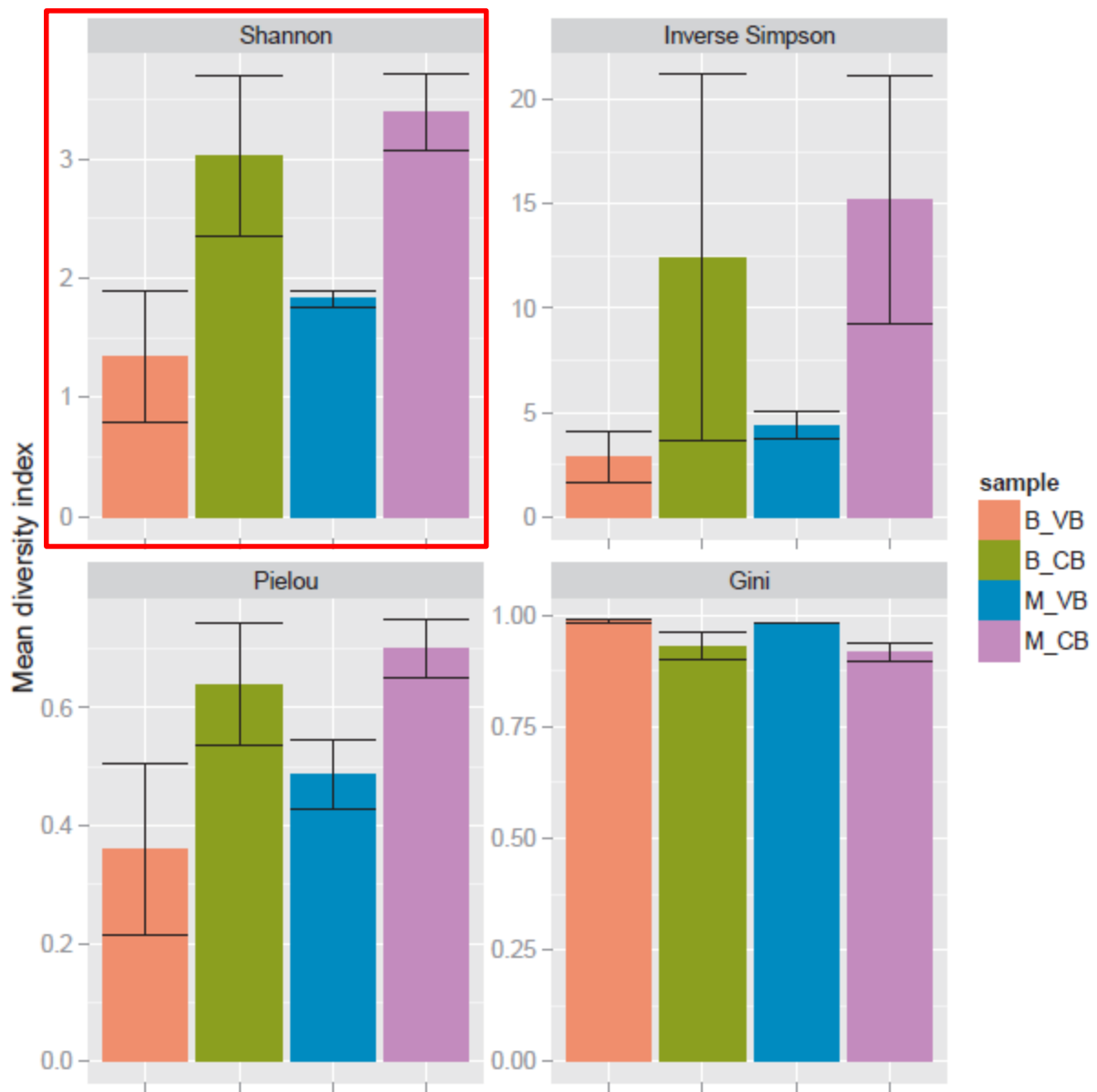


Figuur VIII.4. De rarefaction curve van de Illumina sequenceringsresultaten van fecale stalen. Behalve bij het staal K9_M_VB, vlakken alle curves af waardoor de totale diversiteit van de stalen opgepikt werd in de reads. Enkel het staal K2M_VB werd uit de dataset verwijderd, aangezien het onder de aangeduide *subsampling cutoff* ligt en is niet weergegeven op deze figuur. De stalen van de moeders hebben een hogere diversiteit dan die van de baby's. Opvallend is dat het 10^{de} moeder-kind paar (K10), erg dicht bij elkaar ligt. Afkortingen: Baby's (B_), Moeders (M_), Bevalling via keizersnede (CB), Vaginale bevalling (VB) en het staalnummer (K..).

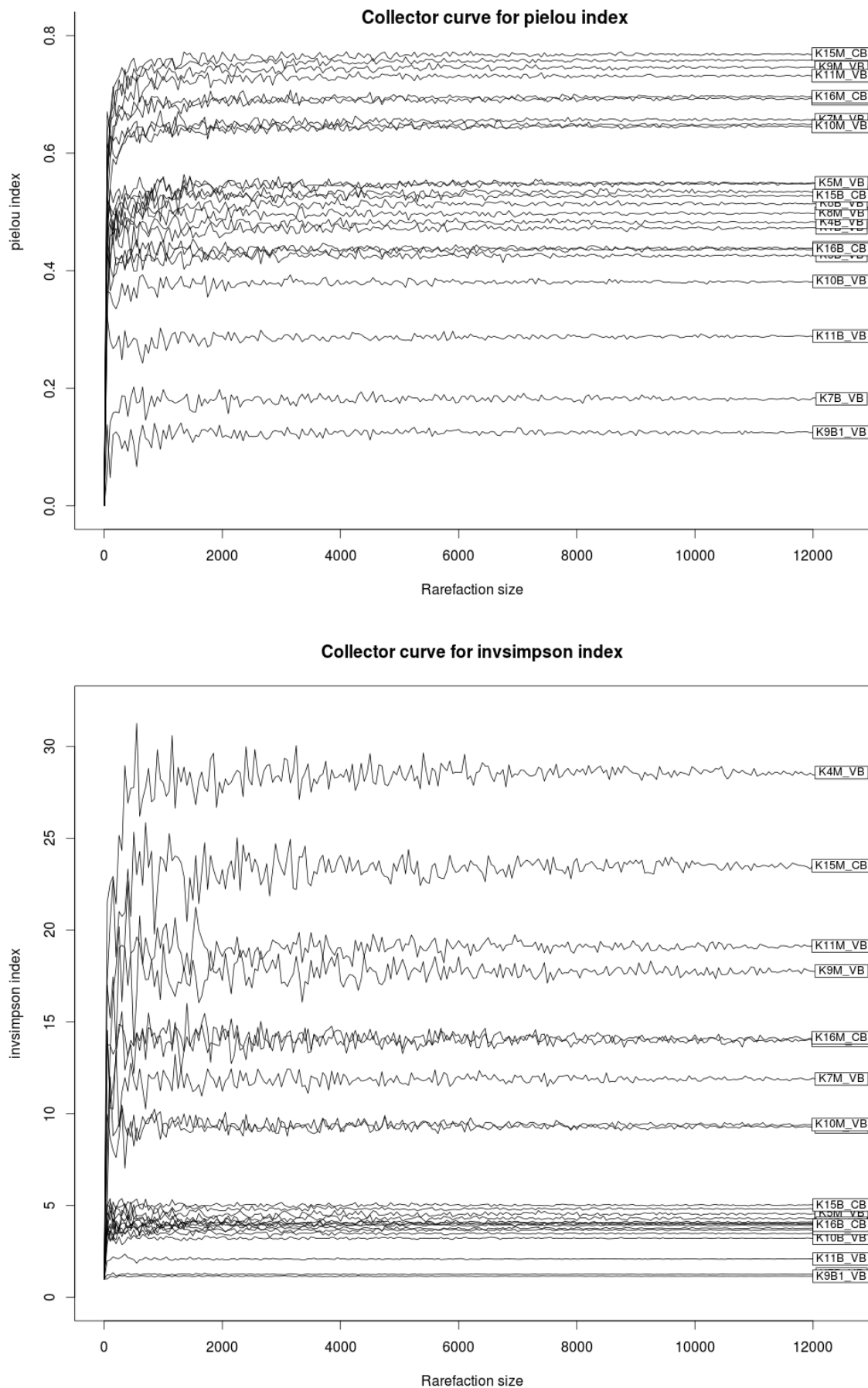
VIII.3.2. Diversiteitsindices

Ook de sequenceringsdata kan omschreven worden door diversiteitsindices zoals de Shannon, inverse Simpson, Gini en Pielou indices (zie Figuur VIII.3). Door collector curves op te stellen werd nagegaan welke index ongevoelig was aan de staalgrootte voor de huidige dataset (Figuur VIII.6). Een collector curve is een cumulatieve grafiek die opgesteld wordt op basis van herhaalde random staalname van de dataset (het principe van "rarefaction"). Voor deze curve wordt voor een telkens toenemende staalnamegrootte volledig at random een vast en toenemend aantal observaties uit de dataset genomen zonder teruglegging. Vervolgens berekent men voor deze random subset van de data de betreffende index en herhaalt men het proces voor een volgende subset van de data waaraan opnieuw een zelfde hoeveelheid random geselecteerde observaties toegevoegd werd. Als de curve een stabiel verloop vertoont en afvlakt dan heeft de index bij die subset al de meeste species beschreven en vertoont die een stabiel gedrag ongeacht verder toegenomen sampling. Het startpunt van een collectorscurve is bijgevolg de diversiteitsindex wanneer slechts 1 observatie per staal random geselecteerd werd.

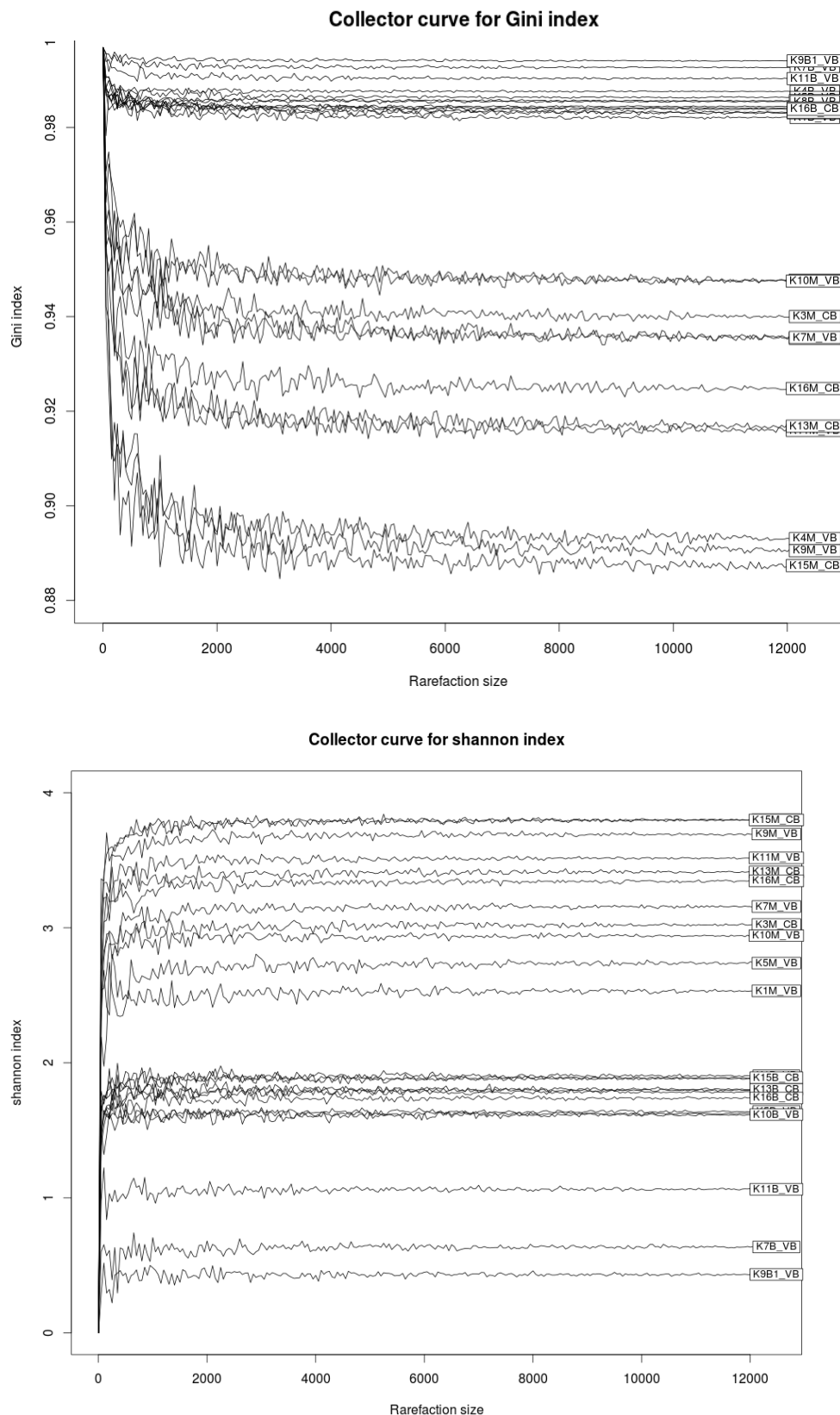
Uiteindelijk bleek de Shannon index het beste toepasbaar op deze dataset. Deze populaire diversiteitsindex toont aan dat de diversiteit bij de moeders hoger ligt dan bij de kinderen. De Shannon index baseert zich op de abundantie en *evenness* van de aanwezige *species*.



Figuur VIII.5. Een overzicht van verschillende diversiteitsindices bepaald op Illumina sequenceringsdata van fecale stalen. De verschillende indices beschrijven de diversiteit ook op een verschillende manier waardoor collector curves werden opgesteld om te bepalen welke index dit soort data het beste kan beschrijven (zie Figuur VIII.6). Uit die analyse bleek dat de Shannon index (rode kader) het best toepasbaar is op deze data. Afkortingen: Baby's (B_), Moeders (M_), Bevalling via keizersnede (_CB), Vaginale bevalling (_VB)



Figuur VIII.6. Deel 1. Afkortingen: Baby's (B_), Moeders (M_), Bevalling via keizersnede (_CB), Vaginale bevalling (_VB)

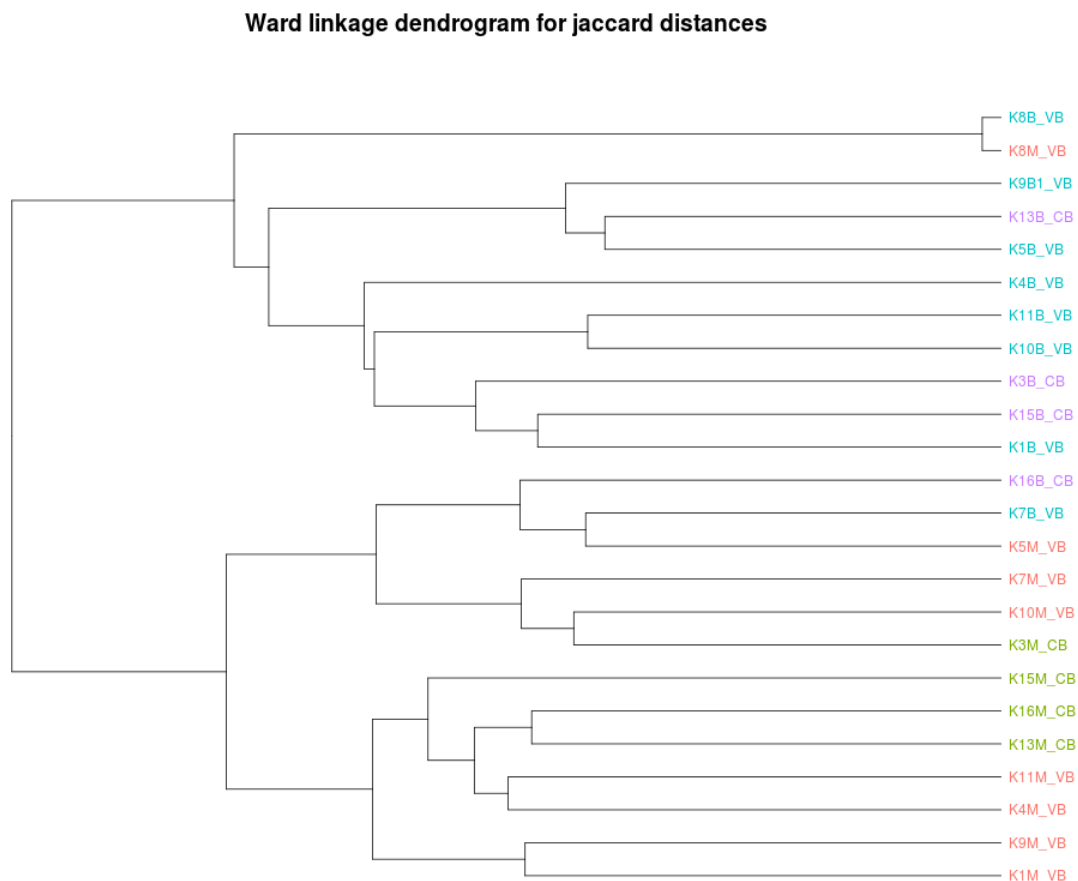


Figuur VIII.6. Collector curves van verschillende diversiteitsindices om na te gaan welke deze dataset het beste omschrijft. Zoals het afvlakken van de grafieken laat zien bepaalde indices beter in het omschrijven van deze dataset. Zo kan de inverse Simpson de stalen van de moeders wel goed omschrijven maar is veel minder toepasbaar voor de baby's. Het omgekeerde is het geval bij de Gini index. Voor deze dataset zou zowel de Shannon index als de Pielou kunnen gebruikt worden. Er werd geopteerd voor de Shannon index door de stabielere afvlakking.

Afkortingen: Baby's (B_), Moeders (M_), Bevalling via keizersnede (_CB), Vaginale bevalling (_VB)

VIII.3.3. Clustering van de sequenceringsdata

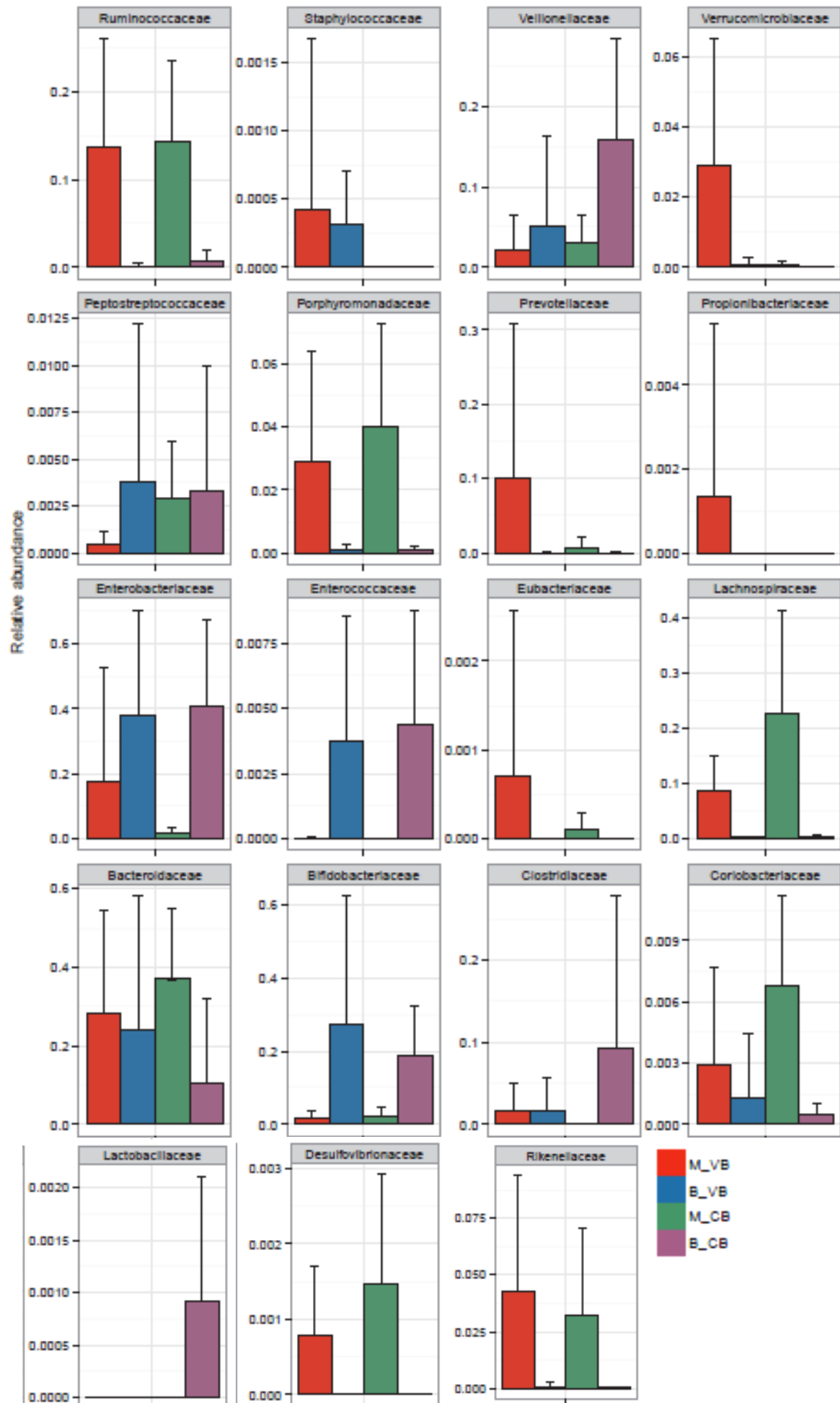
Om een idee te krijgen van de verbanden tussen de stalen worden ze weergegeven via Jaccard-Ward clustering (zie Figuur VIII.7). Op een heel verwant moeder-kind paar (K8B_VB en K8M_VB) na, groeperen de stalen volgens leeftijd.



Figuur VIII.7. De Ward-Jaccard clustering van *subsamped* Illumina sequenceringsdata van fecale stalen. De stalen van de moeders clusteren onderling samen, net als die van de baby's. Afkortingen: Baby's (B_), Moeders (M_), Bevalling via keizersnede (_CB), Vaginale bevalling (_VB), *Baby's die geboren werden via keizersnede (B_CB)*, *Baby's die vaginaal geboren werden (B_VB)*, *Moeders die een vaginale bevalling hadden (M_VB)*, *Moeders die een bevalling via keizersnede hadden (M_CB)*

VIII.3.4. Relevante taxonomische families

Om een overzicht te krijgen van de OTU-counts werden de frequent voorkomende darmbacteriën weergegeven per familie (zie Figuur VIII.8).



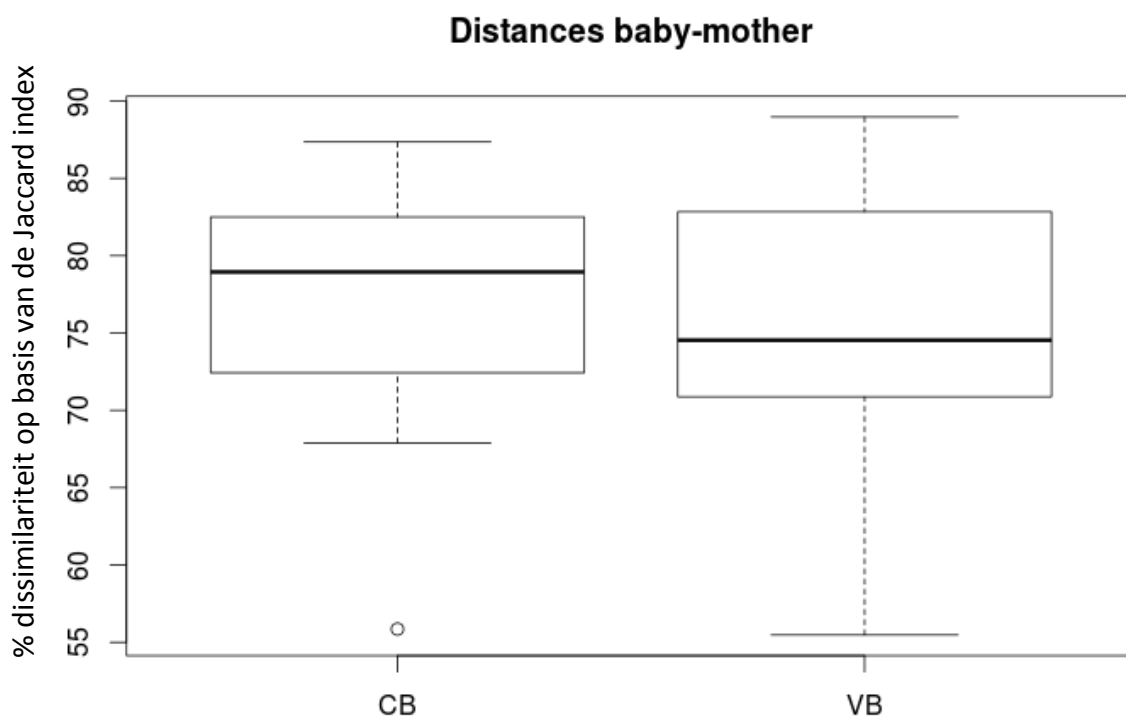
Figuur VIII.8. Een taxonomisch overzicht van de relatieve abundantie waarmee deze families voorkwamen in de Illumina sequenceringsresultaten van de fecale stalen. De abundanties variëren sterk tussen de 4 subgroepen. De grootte op de verticale as verschilt per grafiek.

VIII.4. Vergelijking tussen de microbiota van moeder en kind

Door de verticale moeder-kind transfer van maternale darmbacteriën naar het kind wordt verwacht dat de microbiota van het kind gelijkenissen vertoont met deze van hun moeder. Naast een mogelijks contact tijdens de bevalling (zie VI.3.2), afhankelijk van de bevallingswijze, staan de kinderen uit deze doelgroep dagelijks in contact met maternale microbiota via de moedermelk (zie VI.3.3). Door de entero—mammaire pathway zou de moedermelkmicrobiota bovendien gelinkt zijn aan de maternale darmmicrobiota. Om het aspect van de bevallingswijze op zich te bekijken werd de dissimilariteit bekeken tussen moeder-kind paren. Hierbij wordt vergeleken op basis van bevallingswijze (zie Figuur VIII.9).

Aangezien de data uit de keizersnedegroep normaal verdeeld is en die uit de vaginaal bevallen groep niet, kan er geen t-test uitgevoerd worden maar wordt de data geanalyseerd met een Wilcoxon test. De test toont aan dat de cumulatieve distributiefuncties van de dissimilariteit tussen moeder en kind significant verschillen afhankelijk van de bevallingswijze.

Via een Kolmogorov-Smirnov test kon de nulhypothese in verband met de locatieshift niet verworpen worden waardoor er geen uitspraken kunnen gedaan worden over de mediaan. De probabilistische index kon wel bepaald worden, via een Wilcoxon mann whitney test. Hierdoor kan met zekerheid gesteld worden dat bij 70% van de vaginale geboortes het neonatale darmmicrobioom meer overeenkomt met dat van de moeder dan dat dit bij een keizersnede het geval zou zijn.



Figuur VIII.9. De Jaccard dissimilariteit tussen moeder-kind paren afhankelijk van de bevallingswijze. De Jaccard afstand geeft de dissimilariteit weer tussen moeder en kind. Deze vergelijking is gebaseerd op DGGE profielen. Kandidaat 14 vormt een *outlier* voor de groep die beviel via keizersnede. Afkortingen: Keizersnede bevalling (CB), Vaginale bevalling (VB)

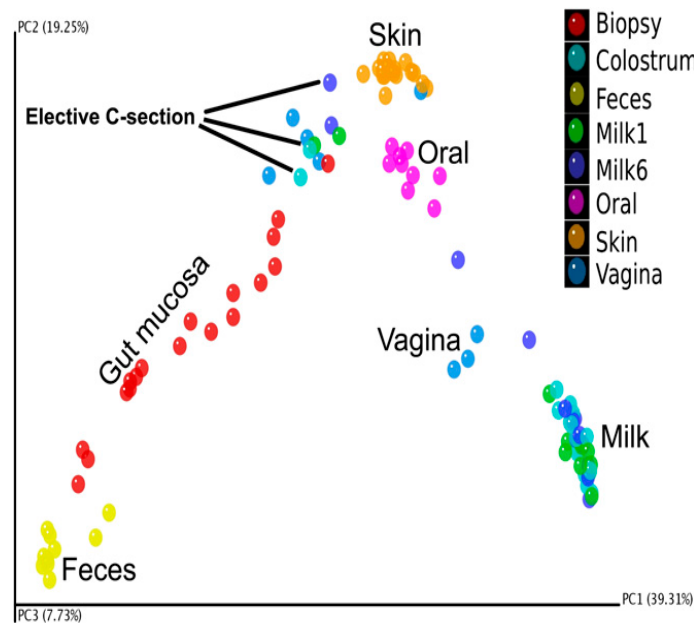
Hoofdstuk 4: Discussie

Tijdens de eerste levensweken en maanden zijn niet enkel de kersverse ouders gefascineerd door dit nieuwe leven maar ook voor microbiologen is deze levensfase intrigerend. Allerlei factoren beïnvloeden namelijk de ontwikkeling van een evenwichtige darmsamenstelling. Dit ook tijdens de eerste levensdagen en met name tijdens de bevalling. Het is uiteindelijk de interactie van deze microbiota die een impact zal uitoefenen op de gezondheid. Eén van die mogelijke invloedrijke parameters is de arbeid tijdens de bevalling. De stress die de arbeid op het lichaam uitoefent, zou wel eens cruciaal kunnen zijn voor de gezondheid van het kindje op lange termijn.

Door de karakterisatie van de darmmicrobiota bij Belgische kinderen, wou deze studie nagaan in welke mate de bevallingswijze een invloedrijke parameter is bij de opbouw van de darmmicrobiota. Dit door kinderen te vergelijken die minstens drie maanden exclusief borstvoeding kregen en via keizersnede of vaginaal geboren werden. Er is een uitgesproken verschil in kolonisatie waarneembaar vlak na de bevalling, waarbij keizersnede kindjes eerder gelijkenissen vertonen met de huid en de omgeving dan met de intestinale bacteriën (zie VI.3.2). Deze samenstelling bevindt zich echter niet in een afgesloten omgeving dus verschillende parameters kunnen gedurende de verdere levensloop een invloed uitoefenen. Eén van die invloedrijke factoren is het type voeding, voor deze doelgroep dus exclusief borstvoeding. Het effect van borstvoeding valt niet te onderschatten aangezien het niet alleen ondersteunende componenten aanlevert voor het immuunsysteem maar het heeft ook een pre- en probiotische werking (zie VI.3.3). Het probiotische aspect verwijst naar de moedermelk microbiota. Deze micro-organismen zouden via de enetero-mammaire pathway een link vormen tussen de maternale en neonatale microbiota. Op die manier zou via borstvoeding, het contact dat ontbrak tijdens de bevalling eventueel kunnen gecompenseerd worden.

IX.1. Effect van de bevallingswijze

Bij de vergelijking van de verzamelde stalen op basis van DGGE was er geen duidelijk onderscheid waarneembaar op basis van de bevallingswijze. De clustering van zowel de DGGE (zie Figuur VIII.2) als de sequenceringsdata (zie Figuur VIII.7) toonde een groepering die beïnvloed werd door het type staal (moedermelk, fecaal staal van de moeder of het kind). Een onderscheid tussen fecale en melk stalen sluit aan bij eerdere suggesties dat moedermelk microbiota duidelijk te onderscheiden zijn van andere humane niches zoals de huid (Cabrera-Rubio et al., 2012).



Figuur IX.1. De relatie tussen melk microbiota en de microbiota van andere lichaamssites. De principale componenten analyse toont melkstalen van vlak na de geboorte (colostrum) en één (Milk1) tot zes maanden na de bevalling (Milk6). De melkstalen clusterden samen onafhankelijk van wanneer ze genomen werden. Stalen na een geplande keizersnede, resulteren wel in een afzonderlijke clustering. (Cabrera-Rubio et al., 2012)

In deze studie konden verschillen in moedermelkmicrobiota aangetoond worden afhankelijk van de bevallingswijze. Dit effect was enkel significant als de outliers buiten beschouwing werden gelaten (zie Figuur VIII.3). Deze kandidaten, de outliers, die bevallen waren via keizersnede hadden beide een lange arbeid doorgemaakt alvorens geopteerd werd om een spoedkeizersnede uit te voeren. Het (micro)biologische effect van ongeplande spoedkeizersnedes en hun confounding effect tijdens de analyses binnen deze studie wordt verder toegelicht (zie IX.1.2).

Een beperkte verhoging van de gelijkenis tussen moeder en kind werd vastgesteld na een vaginale bevalling ten opzicht van een keizersnede. Op basis van de relatieve abundanties kon bij sommige relevante families een shift waargenomen worden tussen subpopulaties met een verschillende bevallingswijze.

IX.1.1. Effect van de bevallingswijze op de moedermelk

Dat er op het eerste zicht niet echt een clustering wordt waargenomen bij de DGGE profielen van de melkmicrobiota is overeenkomstig met wat er in de literatuur beschreven staat (Martin et al., 2007). Idealiter dient de melk ook geanalyseerd te worden met een andere technieken zoals qPCR om het effect van de bevallingswijze te onderzoeken. Het verschil in bacteriële concentratie, na een keizersnede, is echter na drie maanden waarschijnlijk niet meer waarneembaar. Dit verschil wordt gedetecteerd in colostrumstalen en de moedermelk gedurende de eerste weken na de bevalling. Een verhoogde *Bifidobacterium*concentratie in de moedermelk, na een vaginale bevalling, zou wel nog detecteerbaar kunnen zijn. Via een qPCR analyse met *Bifidobacterium*-specifieke-primers zou deze hypothese kunnen getest worden.

Niet enkel een alternatieve moedermelkanalysetechniek zou een mogelijks verband tussen de moedermelkstalen en de bevallingswijze kunnen blootleggen. Misschien wordt een clustering volgens bevallingswijze bemoeilijkt doordat de keizersnede groep niet werd onderverdeeld in geplande en spoedkeizersnede. Deze veronderstelling wordt ondersteund door de eerder beschreven outliers bij de analyses van de darmmicrobiota.

IX.1.2. Onderscheid tussen een geplande en niet geplande keizersnede

Ondanks het samenclusteren van melkstalen onderling en afzonderlijk van andere lichaamssites, vormt de moedermelk na een geplande keizersnede hier een uitzondering op (zie **Figuur IX.1**)(Martin et al., 2007). De melkmicrobiota na een geplande keizersnede vertonen minder sterke gelijkenissen met die van moeders die vaginaal bevielen (Cabrera-Rubio et al., 2012).

Deze onderverdeling binnen de keizersnede populatie is belangrijk aangezien bij een geplande keizersnede niet dezelfde invloed factoren aanwezig zijn zoals bij een vaginale bevalling of spoedkeizersnede. De hormonale veranderingen, stress en het breken van de vliezen zijn enkele voorbeelden van dergelijke invloedrijke parameters.

Aangezien deze onderverdeling niet gemaakt werd bij het opstellen van deze studie wordt het effect van de bevallingswijze getemperd door de combinatie van geplande en spoedkeizersneden waarbij laatstgenoemde eerder vergelijkbaar is met een vaginale bevalling. Het effect van deze bevallingswijzen op de melkmicrobiota en de geregistreerde *outliers* ondersteunen deze bevinding (zie **Figuur VI.5**).

De effecten van een geplande en spoedkeizersnede beperken zich niet enkel tot de melkmicrobiota. Bij de darmmicrobiota is de invloed zelfs zodanig groot dat de twee soorten keizersneden de twee extreemste darmsamenstellingen veroorzaken. Zo zorgt een geplande keizersnede voor de laagste diversiteit en rijkdom terwijl een spoedkeizersnede net de hoogste diversiteit en rijkdom veroorzaakt (Azad et al., 2013).

Toekomstig onderzoek met een driedelige onderverdeling op basis van bevallingswijze (vaginaal-geplande keizersnede-spoedkeizersnede) is nodig om een gefundeerd besluit te maken over het effect van de bevallingswijze op de darm en/of moedermelkmicrobiota. Hierbij is niet alleen het bestuderen van de effecten belangrijk maar ook de exacte oorzaken van de verschillen bij deze bevallingwijzen kunnen nuttige informatie opleveren om negatieve verstoringen van de microbiota vervolgens te beperken. Mogelijke oorzaken zijn het ontbreken van het microbiële contact vanaf het breken van de vliezen en het ontbreken van de stress door de arbeid afhankelijk van het type keizersnede. Met de huidige data, waarbij de melkmicrobiota na spoedkeizersnede meer gelijkenis vertoont met het patroon na vaginale bevalling dan na geplande keizersnede, kunnen al enkele hypothesen opgesteld worden. Met name de arbeid wordt gesuggereerd als de *trigger* voor een goede melkmicrobiota samenstelling, de endocytose theorie (zie VI.3.3.2).

Verder onderzoek hiernaar is belangrijk zodat het ontstaan van een goede melkmicrobiota beter kan ontrafeld worden evenals hoe op langere termijn een interventie kan geïmplementeerd worden bij geplande keizersneden om de verschillen te beperken. Bovendien zijn de *shifts* in de melkmicrobiota zelfs na zes maanden nog steeds zichtbaar waardoor de kennis bijdraagt tot de gezondheid op lange termijn.

IX.1.3. Compensatie door moedermelk

Naast een technische tekortkoming en overschaduwing van het effect door geen onderverdeling te maken tussen geplande en spoedkeizersnede, is het mogelijk dat op de leeftijd van drie tot zes maanden het initiële effect van de bevallingwijze werd gecompenseerd door de moedermelk. De doelgroep van minimum drie maanden oud die exclusief borstvoeding kreeg selecteerde een leeftijdscategorie van ongeveer drie tot zes maand (introductie vaste voeding) oud. Gedurende die maanden dat het kind exclusief moedermelk krijgt, vormt dit bijgevolg dus een sterke invloed factor voor het opbouwende intestinale ecosysteem.

Dit voedingspatroon, moedermelk, bevat bovendien een combinatie van pre- en probiotica waardoor deze voedingsmatrix een heel specifieke microbiota veroorzaakt (zie VI.3.3). Ondanks het feit dat de melkmicrobiota zelf zou kunnen beïnvloed worden door de bevallingswijze, zou de melk alsnog een compenserende werking kunnen uitoefenen. Ondanks dat er tot op de leeftijd van zeven jaar verschillen worden geregistreerd op basis van de bevallingswijze, is borstvoeding waarschijnlijk één van de belangrijke ondersteuningsfactoren van de darmmicrobiota ((Isolauri et al., 2004)). De datasets waarbij nog steeds verschillen worden gedetecteerd op latere leeftijd omvatten niet uitsluitend kinderen die exclusief borstvoeding kregen. Aangezien daarvoor in deze subpopulatie wel geselecteerd werd, zou het kunnen dat de effecten van bevallingswijze daardoor minder duidelijk op te pikken zijn (Azad & al., 2014).

Extra onderzoeken naar de beschermende effecten van borstvoeding zijn noodzakelijk om de borstvoedingsaanbevelingen in de ziekenhuizen, zeker na (geplande) keizersnede, kracht bij te zetten.

IX.1.4. De link tussen moeder en kind.

Naast de transfer van micro-organismen via de moedermelk vindt er tijdens een vaginale bevalling ook al een verticale transfer van moeder naar kind plaats (Collado et al., 2014). Dit contact tussen moeder en kind werd in verschillende studies reeds aangewend als achterliggende oorzaak voor de gelijkenis van de fecale microbiota tussen moeder kind (bij een vaginale bevalling) (Jakobsson et al., 2014).

Dit effect, van de bevallingswijze op de gelijkenis tussen moeder en kind, werd maar in beperkte mate terug gevonden binnen deze studie. Een mogelijke oorzaak hiervoor is het moment van staalname bij de moeder. Voorgaande studies vergelijken immers de microbiota van de moeder binnen de week na de bevalling met het evolutive van de microbiota bij het kind. Bij dit soort staalnames is er een gelijkenis waarneembaar tussen moeder en kind, als het een vaginale geboorte was. De gelijkenis loopt zelfs door tot de ontwikkeling van de stabiele microbiota op latere leeftijd van het kind. Gelijkaardige resultaten zouden dus op het eerste zicht ook verwacht worden bij deze dataset. Het tijdstip van de staalname bij de moeder verschilt echter. Normaal gezien zou door de stabiliteit van de microbiota een staal bij een volwassene ook een representatief beeld moeten geven van de microbiota enkele maanden voordien. Recent werd echter aangetoond dat de zwangerschap een uitzondering vormt op deze regel. De darmmicrobiota van een zwangere vrouw veranderen drastisch naarmate het 3^{de} trimester (T3) vordert. Er wordt onder andere een sterke toename aan diversiteit waargenomen terwijl de rijkdom daalt. Algemeen nemen ook Proteobacteria en Actinobacteria toe in aantal (Koren et al., 2012). Ondanks het feit dat er geen uitgebreide postpartum studies beschikbaar zijn kan aangenomen worden dat de darmmicrobiota van de moeder niet meteen na de bevalling terugkeert naar haar oorspronkelijke samenstelling. Tot op heden werd er geen melding gemaakt van een aparte cluster binnen de volwassenen, met vrouwen die al eens zwanger geweest waren. Een basis samenstelling, kenmerkend voor volwassenen daarentegen, wordt wel teruggevonden. Als de darmmicrobiota van de moeder binnen de drie maanden na de bevalling terug de basis samenstelling bevat zoals voordien verklaart dit de beperkte gelijkenis tussen moeder en kind in deze studie. De microbiota van het kind zou in dit geval dan immers vergeleken worden met microbiota die substantieel afwijkt van degene waarmee het tijdens de bevalling werd gekoloniseerd. Dit effect zou eenvoudig in rekening kunnen gebracht worden door een additionele staalname bij de moeder, vlak na de geboorte. Dit soort studies kunnen waardevolle resultaten opleveren aangezien dan ook de maternale microbiota evolutie postpartum in kaart gebracht wordt.

In het kader van deze studie werd enkel 3 à 6 maanden na de bevalling een staal genomen bij de moeder. Bovenstaande hypothese kan dus niet meer getest worden. Een vergelijking van de bekomen microbiotagegevens met de standaard microbiotasamenstelling bij volwassenen kan wel een suggestie geven over het verloop van de microbiota postpartum. Als de data uit deze studie immers meer gelijkenis zou vertonen met referentiegegevens uit het humaan microbiom project, dit reflecteert de basis samenstelling bij volwassenen, dan met de T3 samenstelling suggereert dit dat het effect van de zwangerschap niet meer waarneembaar is drie maanden postpartum. Daardoor zou de maternale microbiota drie tot zes maanden postpartum niet meer vergelijkbaar zijn met de microbiota vlak na de bevalling, waarmee het kind gekoloniseerd werd. Deze hypothese kon momenteel niet getest worden via Qiime (<http://www.microbio.me/qiime/>, (Caporaso et al., 2010)) aangezien de web applicatie tijdelijk off-line werd gehaald.

Er zijn zeker nog meer studies nodig die het effect van zwangerschap op de microbiota bestuderen, ook de evolutie postpartum is hierbij belangrijk. Deze kennis is nodig om de effecten van een bepaalde bevallingswijze beter in te schatten.

IX.2. De relatieve abundantie op familieniveau

Aan de hand van de sequenceringsdata werd er een overzicht gemaakt van de relatieve abundantie van de families die relevant zijn voor de darmomgeving. Het grote aandeel *Bifidobacteriaceae* bij de baby's was verwacht, aangezien *Bifidobacterium* vaak vermeld wordt als het dominante genus bij baby's (Penders et al., 2006). Na een keizersnede geboorte wordt er normaal wel een daling ervan waargenomen en ook hier ligt de abundantie bij hen iets lager (Huurre et al., 2008; Penders et al., 2006). Het effect wordt in deze studie wel gedeeltelijk afgezwakt aangezien de kinderen exclusief borstvoeding krijgen, waardoor *Bifidobacterium* toeneemt (zie **Figuur VI.3**). Ook de daling in *Atopobium* spp. bij keizersnede kindjes, wordt in deze studie teruggevonden namelijk als daling van de *Coriobacteriaceae*.

Bij de overige families wordt er niet echt een *shift* waargenomen bij de baby's. Enkel de aanwezigheid van *Lactobacillaceae* bij keizersnede kindjes is in tegenspraak met de huidige literatuur die een verhoging suggereert bij kinderen die vaginaal geboren werden. Het is echter wel zo dat het krijgen van borstvoeding het aantal lactobacilli dan weer doet toenemen waardoor dit effect kan verklaard worden. Alleen wordt deze *shift* dan ook verwacht bij baby's die vaginaal geboren werden (zie **Figuur VI.3**).

Huidbacteriën zoals *Corynebacterium*, die na de geboorte gelinkt worden met keizersnede kindjes kunnen nu niet meer teruggevonden worden. De evolutie van de darmomgeving is waarschijnlijk niet langer gunstig voor hun kolonisatie (zie **Figuur VI.1**).

IX.3. *Bifidobacterium breve* domineert de darmmicrobiota bij baby's

Het dominante bandje in de DGGE profielen van de kinderen werd geïdentificeerd als *Bifidobacterium breve*. Hiermee wordt *B. breve* bevestigd als één van de meest abundante *Bifidobacterium* species in de darmmicrobiota voor de introductie van vaste voeding (*Biasucci et al., 2010; Roger et al., 2010*). Dat dit species talrijk aanwezig is bij deze exclusief borstvoeding krijgende kinderen niet verwonderlijk aangezien het ook de moedermelk dit sals een predominante groep aanlevert (Martin et al., 2009).

Hoofdstuk 5: Materiaal en Methoden

X.1. In vivo studie - Verzameling van de kandidaten en stalen

Voorafgaand aan de staalnames wordt voor deze studie een ethische goedkeuring aangevraagd en toegekend (zie A.1). Om de kandidates te rekruteren wordt een flyer ontworpen en vervolgens verspreid via verschillende kanalen (zie A.3). Vanaf augustus 2013 tot en met maart 2014 worden 30 kandidaten, moeder-kind paren, geselecteerd minimum drie maand na de geboorte. De doelgroep omvat kinderen die uitsluitend borstvoeding gekregen hebben, geen andere voedingsmiddelen of vloeistoffen, om zo de beïnvloeding door het type voeding te vermijden (zie VI.3). Door de verspreiding van de flyer, mede via vroedvrouwen en lactatiedeskundigen, worden voornamelijk moeders bereikt die borstvoeding gaven na een vaginale bevalling. Dit valt te verklaren door het aantal keizersneden dat met een frequentie van 19,7% gewoon lager ligt (Cammu et al., 2013). Bovendien wordt de mogelijke doelgroep nog extra beperkt door het inclusie criterium voor het krijgen van exclusief borstvoeding tot op de leeftijd van drie maanden. Na een keizersnede wordt er maar in 3.5% van de gevallen borstvoeding gegeven in vergelijking met 71.5% na een vaginale bevalling (Zanardo et al., 2010) (Prior et al., 2012). Een combinatie van beide kenmerken zorgde ervoor dat een nationale oproep nodig was. Hiervoor worden specifieke sociale mediakanalen en fora voor moeders die borstvoeding geven gebruikt.

Na het doornemen van de informatiebrief ondertekenen alle kandidates een *informed consent* (zie A.4 en A.5). Aan de hand van bijgeleverde instructies namen de moeders een moedermelk- en stoelgangstaal af, van de baby en zichzelf (zie A.6). De stalen worden na afname zo snel mogelijk ingevroren (-20°C), de invriesmethode heeft weinig effect op de darmmicrobiota samenstelling van de fecale stalen (Wu et al, 2010). In het geval van moedermelkstalen werd dit nagegaan door vergelijking met een vers en ingevroren staal.

Het dieet van de moeders wordt nagegaan via een voedselfrequentie-vragenlijst (FFQ) (zie A.7)(Bolca et al, 2009). Aan de hand van een literatuurstudie wordt een lijst opgesteld van factoren die mogelijks een invloed uitoefenen op (de ontwikkeling van) de darmmicrobiota. Een bijkomende vragenlijst polste naar deze factoren en ook algemene kenmerken zoals het geboortegewicht (zie A.7).

X.2. DNA extractie

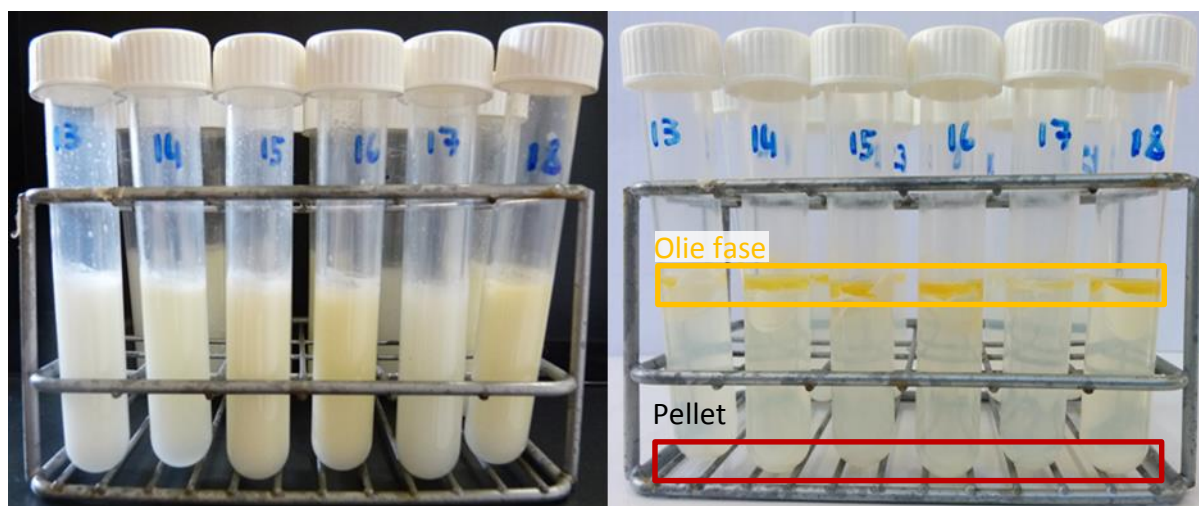
De methode om DNA te extraheren wordt geoptimaliseerd naargelang het type staal namelijk moedermelk of fecaal. Hiervoor worden verschillende staalvoorbereidings- en extractie methodes getest (zie Tabel X.1).

Tabel X.1. Een overzicht van het gebruikte startmateriaal en de methodes die erop getest worden. De FastPrep DNA-extractie methode blijkt goed te werken voor fecale stalen. Dit is niet het geval voor 2 mL van het onbehandeld moedermelkstaal. Daarom worden verschillende volumes moedermelk opgeconcentreerd door middel van een centrifugatiestap. De extractie wordt vervolgens uitgevoerd op de bekomen *pellet* waardoor bovendien de interfererende vetrijke fase wordt verwijderd (zie Figuur X.1).

Type staal	Hoeveelheid	Centrifugatiestap	FastPrep (zie X.2.1)	QIAamp (zie X.2.2)	EasyMAG (zie X.2.3)
Fecaal	0,2g		☑		
Moedermelk	2ml		☑		
	5ml	30min 5650g	☑		
	5ml	30min 21475g	☑		
	9ml	30min 21475g	☑		☑
	1ml				☑
	1ml			☑	
	9ml	15min 16837g		☑	

Bij de moedermelk wordt er een vers en ingevroren melkstaal vergeleken om de impact van het invriezen na te gaan. De stalen worden ook opgeconcentreerd door een krachtige centrifugatiestap. Uit 2ml staal kon immers onvoldoende DNA geëxtraheerd worden voor een werkende PCR-reactie. De extractie wordt vervolgens uitgevoerd op de bekomen *pellet* waardoor bovendien de interfererende vetrijke fase wordt verwijderd (zie Figuur X.1).

Het geëxtraheerde DNA wordt steeds gecontroleerd via nanodrop ND1000 (zie X.3) en agarose gel elektroforese (zie X.5).



Figuur X.1. Staalvoorbereiding van de moedermelk voor DNA extractie. Voor de centrifugatie (links) wordt 5ml moedermelk steriel uitverdeeld in 10ml tubes. Na centrifugatie van deze tubes (rechts) worden drie fases bekomen. De twee bovenste lagen, een olie- en waterige fase, worden verwijderd om vervolgens de DNA extractie uit te voeren op de *pellet*.

X.2.1. FastPrep DNA extractie

Afhankelijk van het startmateriaal (zie Tabel X.1) wordt er 0,2g, 2ml of de *pellet* na centrifugatie gebruikt om DNA uit te extraheren op basis van de LabMET SOP MOLEC-001 zoals beschreven door (Vilchez-Vargas et al., 2013)(zie 0). Hierbij wordt een *bead beating* stap uitgevoerd door het FastPrep®-96 toestel (MP Biomedicals, Santa Ana, USA) met glasparels en een lyse buffer die hoge EDTA, NaCl en SDS concentraties bevat. Na deze combinatie van mechanische en fysicochemische lyse worden onzuiverheden zoals eiwitten verwijderd door onder andere een fenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1) precipitatie.

Om een succesvolle PCR-reactie te bekomen op alle stalen wordt de laatste precipitatiestap herhaald. Er wordt aan de gedroogde *pellet* nogmaals 1 volume Isopropyl alcohol (-20°C) en 1/10de volume natrium acetaat (3M) toegevoegd. De stalen worden overnacht ingevroren bij -20°C na het inverteren van de tubes. Er wordt een *pellet* bekomen na 30 minuten centrifugeren bij 4°C aan maximale snelheid. Na het drogen wordt deze *pellet* opgelost in 50µl T10E1 (1X).

X.2.2. QIAamp® DNA Stool mini kit DNA extractie

De QIAamp® DNA Stool mini kit (Qiagen, Hilden, Duitsland) wordt gebruikt volgens de instructies van de fabrikant om DNA te extraheren. Een additionele *bead beating* stap, nadat ASL buffer (Qiagen) wordt toegevoegd aan het staal of de *pellet*, verbeterde het lyseren van de cellen (Martin et al., 2007). Bij deze stap wordt 0.5 g *glass beads* toegevoegd aan het ASL-staal mengsel en vervolgens gehomogeniseerd in het FastPrep®-96 toestel (MP Biomedicals, Santa Ana, USA) voor 150s bij 1200rpm.

X.2.3. NucliSENS® easyMAG® DNA extractie

De DNA extractie methode via NucliSENS® EasyMAG® (BioMérieux Benelux BV, Frankrijk) maakt gebruik van magnetische silica dat in hoge zoutconcentraties bindt met nucleïnezuren (zie A.10). Deze binding vindt plaats nadat de cellen gelyseerd worden met de lyse buffer. Na verschillende wasstappen met de wasbuffers worden de nucleïne zuren geëluëerd met de elutiebuffer. Door de magnetische silica te verwijderen uit de elutiebuffer worden gepurifieerde en opgeconcentreerde nucleïnezuren bekomen.

X.3. Nanodrop

De zuiverheid en DNA concentratie van de DNA extracten (zie X.2) wordt nagegaan via de Nanodrop ND-1000 spectrofotometer (Isogen lifescience, De Meern, Nederland). De DNA concentratie wordt bepaald aan de hand van de absorptie bij 260nm. Een indicatie voor de zuiverheid wordt bepaald door de OD260nm/280nm verhouding die de verhouding DNA/eiwit weergeeft en idealiter tussen 1,8 en 2,2 ligt. OD260nm/230nm is idealiter hoger dan 1,8. Een lagere waarde wijst op contaminatie door bijvoorbeeld eiwitten of een erg lage concentratie.

X.4. DNA-opzuivering

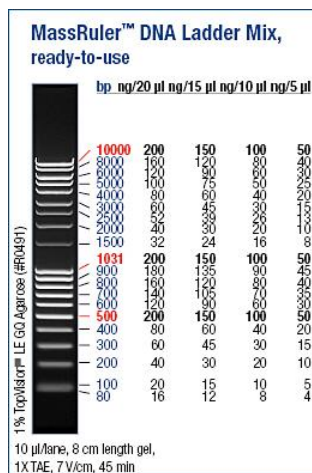
Enkele DNA-extracten (zie X.2) worden opgezuiverd door middel van het Wizard® DNA Clean-Up System (Promega, Leiden, Nederland) volgens de instructies van de fabrikant. Het gezuiverde DNA wordt geëluëerd in 20µl EB buffer (Promega) en vervolgens bewaard bij -20°C.

X.5. Agarose gelelektroforese

Agarose gelelektroforese scheidt DNA strengen op basis van hun lengte door middel van een elektrisch veld aangezien kleinere moleculen sneller migreren. Agarose gelelektroforese is een techniek om het DNA-extract (zie X.2) of PCR-product te visualiseren. Na een PCR-reactie (zie X.5) wordt een agarose gel gebruikt om te controleren of de PCR-reactie gewerkt heeft, hoeveel fragmenten er gevormd worden en welke lengte die fragmenten hebben.

In een 1,2% agarose gel (Ultrapure™ Agarose, Life technologies™, Madrid, Spanje) wordt een mengsel van 4µL DNA-staal en 1 µL 6X Mass Ruler™ Loading Dye Solution (Fermentas Molecular Biology Tools, Burlington, Canada) geladen.

Mass Ruler™ DNA Ladder Mix (Fermentas Molecular Biology Tools, Burlington, Canada) wordt als merker gebruikt om de lengte van de geladen fragmenten te bepalen (zie Figuur X.2).



Figuur X.2. Mass Ruler™ DNA Ladder Mix.

De elektroforese wordt uitgevoerd in het Muprid®-exu Submarine elektroforesetoestel (Eurogentec, België) gedurende 25 minuten met 100V. De elektroforese tank is gevuld met Tris-Acetaat-EDTA (TAE) buffer (AppliChem, Darmstadt, Duitsland). Na een ethidiumbromide kleuring van minimum 10 minuten wordt het DNA gevisualiseerd door middel van OptiGo UV-toestel (Isogen Life Science, Sint-Pieters-Leeuw, België), een UV-transilluminator.

X.6. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Het geëxtraheerde DNA wordt exponentieel geamplificeerd door een PCR-reactie. Dit cyclisch proces doorloopt achtereenvolgens deze stappen:

- denaturatie van *template* DNA (bij 95°C)
- *annealing*: primers hechten aan het enkelstrengig DNA (bij 53°C)
- extensie van dat fragment (bij 72°C)

De PCR-mix, 1 µL staal met 24 µL mastermix (zie Tabel X.2), wordt gemaakt in een kleine Eppendorf tube en doorloopt het cyclisch PCR-programma (zie

Tabel X.4) in het 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, VS) PCR-toestel. De PCR-programma's worden per staaltype geoptimaliseerd. Het eindproduct wordt bewaard bij -20°C na controle via agarose gelelektroforese (zie X.5).

Tabel X.2. Samenstelling van de mastermix. Er wordt gebruik gemaakt van de Fermentas® PCR kit (Fermentas International Inc., Burlington, Canada). De sequenties van de primers staan vermeld in Tabel X.3.

Product	Finale concentratie
10x Taq-buffer + KCl – MgCl ₂	1x
MgCl ₂	1.5 mM
dNTP (deoxynucleoside triphosphate)	200 µM
Primer forward	0.2 µM
Primer reverse	0.2 µM
Taq DNA Polymerase	0.025 U/µL
Bovine Serum Albumine	50 ng/µL

Tabel X.3. Overzicht van de gebruikte primersequenties. Afkortingen: Forward (F) en reverse (R) pimer.

Primer	Sequentie
338 F-GC:	5' CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGACTCCTACGGGAGGCAGCAG 3'
338 F	5' ACTCCTACGGGAGGCAGCAG 3'
518 R	5' ATTACCGCGGCTGCTGG 3'
63F	5' CAGGCCTAACACACATGCAAGTC 3'
1378R	5' CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG 3'

Tabel X.4. Overzicht van de gebruikte primers en hun overeenkomstige PCR-programma * Voor de amplificatie van het 16S rRNA fragment bij de fecale stalen was een nested PCR nodig waarbij eerst PCR1 wordt uitgevoerd en vervolgens vormt dit PCR-product het startmateriaal voor een tweede PCR reactie namelijk PCR2. Afkortingen Desoxyribonucleïnezuur (DNA), Polymerase Chain Reaction (PCR), Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), 16S ribosomal ribonucleic acid (16S rRNA), Forward (F) en reverse (R) primer.

Toepassing		Forward primer	Reverse primer	Target	PCR-programma
PCR op DNA extract (zie X.2) uit fecaal materiaal					
Nested PCR* voor DGGE (zie X.7)	PCR1	63F	1378R	Algemeen 16S rRNA 1315 bp	a) 5 min bij 94°C b) 1 min bij 95°C ← 25x 1 min bij 53°C 2 min bij 72°C — c) 10 min bij 72°C
	PCR2	338 F-GC	518 R	Algemeen 16S rRNA 180 bp	a) 5 min bij 94°C b) 1 min bij 95°C ← 30x 1 min bij 53°C 2 min bij 72°C — c) 10 min bij 72°C
PCR voor Sanger Sequencing (zie X.7.3)		338 F	518 R	Algemeen 16S rRNA 180 bp	a) 5 min bij 94°C b) 1 min bij 95°C ← 30x 1 min bij 53°C 2 min bij 72°C — c) 10 min bij 72°C
PCR op DNA extract (zie X.2) uit moedermelk					
PCR voor DGGE (zie X.7)		338 F-GC	518 R	Algemeen 16S rRNA 180 bp	a) 5 min bij 94°C b) 1 min bij 95°C ← 32x 1 min bij 53°C 2 min bij 72°C — c) 10 min bij 72°C

X.7. Denaturerende Gradiënt Gel Elektroforese (DGGE)

DGGE is de meest gebruikte *community fingerprinting* techniek om bacteriële gemeenschappen te visualiseren zoals bijvoorbeeld het menselijk gastro-intestinaal stelsel (Maukonen et al., 2006; Satokari et al., 2001; Zoetendal et al., 1998).

De analyse wordt uitgevoerd op PCR-producten (zie V.5) met een GC-klem (Muyzer et al., 1993). Deze worden bekomen door de 338 F-GC en 518 R primers te gebruiken (zie Tabel X.3 en Tabel X.4). In een INGENYphorU-toestel (Ingeny International, Goes, Nederland) wordt een 45-60% denaturatiegradiënt aangemaakt volgens de LabMET SOP MOLEC-006 zoals beschreven door (Muyzer et al., 1993)(zie A.11). Aan de DGGE-merkers en PCR producten wordt 4µl *loading dye* toegevoegd om vervolgens te laden op de gel. De gels worden gedurende 16 uren gelopen bij 60°C en 120V in 1 x TAE buffer. Nadien wordt de gel gekleurd met 16µl SYBR® Green I nucleic acid gel (1:10 000 verdunning, Invitrogen™, Carlsbad, USA). Na ethidiumbromide kleuring wordt het DGGE patroon gevisualiseerd door middel van OptiGo UV- transilluminator (Isogen Life Science, Sint-Pieters-Leeuw, België).

X.7.1. Bionumerics: Clustering van de DGGE profielen

Het programma Bionumerics (Applied Maths NV, Sint-Martens-Latem, België) wordt gebruikt om de DGGE gels te verwerken, er wordt onder andere een normalisatie uitgevoerd. Vervolgens worden de stalen geclusterd op basis van densiometrische curves (Pearson correlatie, UPGMA linkage type) en/of het bandenpatroon (Jaccard index, Ward linkage type).

X.7.2. Populatie Indices: evenness en rijkdom

Gebaseerd op de band *classes* van een DGGE *fingerprint*, bepaald via Bionumerics, kunnen enkele ecologische indices berekend worden om de microbiële ecologie te beschrijven.

Evenness – Gini-coëfficiënt

De evenness van een populatie is een dergelijke index die weergeeft hoe gelijk de abundanties van de aanwezige *species* zijn. Dominantie door één of enkele bacteriën zorgt bijvoorbeeld voor een ongelijke gemeenschap. Rijkdom daarentegen geeft het aantal banden weer. De Gini-coëfficiënt wordt berekend als evenness-maat, meer bepaald voor de ongelijkheid (Marzorati et al., 2008). Dus als de Gini gelijk is aan 0 dan zijn alle *species* met gelijke abundantie aanwezig. De coëfficiënt wordt opgesteld volgens:

$$G = \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n |x_i - x_j|}{2n^2 \bar{x}}$$

Voordat parametrische testen kunnen uitgevoerd worden om Gini waarden tussen twee groepen te vergelijken moet er aan drie voorwaarden voldaan zijn:

- 1) Een onafhankelijke en identiek verdeelde staalname
- 2) De gegevens moeten normaal verdeeld zijn
- 3) Homoscedasticiteit moet voldaan zijn

Aan de eerste voorwaarde wordt voldaan door het opzet van de studie. De tweede voorwaarde wordt nagegaan door middel van Q-Q plots en Shapiro-Wilk testen. Tenslotte wordt homoscedasticiteit, de gelijkheid van varianties, nagegaan door Levene-type testen.

Als aan alle voorwaarden voldaan wordt kunnen niet parametrische testen zoals een t-test gebruikt worden.

Richness

De *richness* is een maatstaf voor het aantal banden op de DGGE *fingerprint*. Parametrische methodes kunnen niet worden toegepast op deze data aangezien het discrete *counts* zijn. De vergelijking wordt wel gemaakt door middel van niet-parametrische testen zoals de Wilcoxon rank sum test, die de verdeling van de mediaan nagaat.

X.7.3. Identificatie van een DGGE bandje via Sanger sequencer

De DNA-sequentie uit een bepaald DGGE-bandje kan onderzocht worden door dit bandje uit te snijden. Met dit fragment als startmateriaal wordt nogmaals een PCR-reactie (zie X.5) uitgevoerd maar dan met primers zonder GC-klem namelijk 338 F en 518 R (zie Tabel X.3 en Tabel X.4). Het PCR-product wordt gecontroleerd op agarose gel (zie X.5). Via de Qiaquick agarose gel DNA extraction kit (Qiagen, Hilden, Duitsland) wordt uit die agarose gel het specifieke DNA bandje geëxtraheerd. Hiervoor worden de instructies gevolgd zoals vermeld in bijlage (zie A.11).

Het geëxtraheerde DNA wordt gesequeneerd via Sanger sequencer door LGC Genomics (Berlijn, Duitsland). Er wordt gebruik gemaakt van het ABI 3730 XL platform (Applied Biosystems, Foster City, VS). Via de resulterende sequentie kan met de Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) het isolaat geïdentificeerd worden

X.8. Illumina sequencer

De V1-2 regio van het 16S rRNA wordt geamplificeerd uit de DNA extracten (zie X.2) door middel van 27F en 338R primers (zie Tabel X.5). Op deze PCR producten wordt *paired end* Illumina sequencer uitgevoerd met de Illumina MiSeq desktop sequencer (Illumina Inc., San Diego, VS) in het Helmholtz Centre for Infection Research in Braunschweig (Duitsland) volgens (Camarinha-Silva et al., 2013).

Tabel X.5. Overzicht van de primersequenties voor Illumina sequencer

Primer	Sequentie
27F	5' GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCAGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'
338R	5' GCCTCCCTCGCGCCATCAGNNNNNNNNCATGCTGCCTCCCGTAGGAGT 3'

De resulterende OTU's worden taxonomisch geclassificeerd via de RDP naïeve Bayesian classificatie (RDP classifier)(Wang et al., 2007).

X.9. Statistische analyses

De statistische analyses van de FFQ worden uitgevoerd met behulp van een synthax in de SPSS Statistics 20 software (SPSS Inc., Chicago, USA).

De overige statistische analyses worden uitgevoerd in de RStudio server IDE v.0.98.501 (Boston, VS, <http://www.rstudio.com/products/RStudio/#Server>) met R versie 3.0.2 (Wenen, Oostenrijk, <http://www.r-project.org/>)(Team, 2014). Voor de levene-type testen wordt het pakket lawstat (versie 2.4.1) gebruikt (Gastwirth et al., 2013). Voor visualisaties wordt gebruik gemaakt van het pakket ggplot2 (versie 0.9.3.1)(Wickham, 2009). Voor ordinatie en diversiteitsanalyses wordt het pakket vegan (versie 2.0-10) gebruikt (Oksanen et al., 2013). Voor het niet-parametrisch meervoudig vergelijken van gemiddelden wordt het pakket nparcomp (versie 2.0) gebruikt (Konietschke, 2012). Voor het berekenen van de Gini index wordt gebruikt gemaakt van het pakket ineq (versie 0.2-11)(Zeileis, 2013). Voor het berekenen van bepaalde richness indices wordt gebruik gemaakt van het pakket SPECIES (versie 1.0)(Wang, 2011). Voor clusteranalyse wordt beroep gedaan op het pakket cluster (versie 1.15.2). Verschillende andere utiliteitspakketen (onder andere, maar niet beperkt tot plyr, reshape2, gtools, gplots, Matrix, xlsx) worden ook geladen.

Referenties

Adlerberth I, Carlsson B, de Man P, Jalil F, Khan SR, Larsson P, Mellander L, Svanborg C, Wold AE, Hanson LA (1991) Intestinal colonization with Enterobacteriaceae in Pakistani and Swedish hospital-delivered infants. *Acta paediatrica Scandinavica* **80**: 602-610

Adlerberth I, Lindberg E, Aberg N, Hesselmar B, Saalman R, Strannegard IL, Wold AE (2006) Reduced enterobacterial and increased staphylococcal colonization of the infantile bowel: an effect of hygienic lifestyle? *Pediatric research* **59**: 96-101

Adlerberth I, Strachan DP, Matricardi PM, Ahrne S, Orfei L, Aberg N, Perkin MR, Tripodi S, Hesselmar B, Saalman R, Coates AR, Bonanno CL, Panetta V, Wold AE (2007) Gut microbiota and development of atopic eczema in 3 European birth cohorts. *The Journal of allergy and clinical immunology* **120**: 343-350

Adlerberth I, Wold AE (2009) Establishment of the gut microbiota in Western infants. *Acta Paediatr* **98**: 229-238

Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, Tap J, Bruls T, Batto JM, Bertalan M, Borruel N, Casellas F, Fernandez L, Gautier L, Hansen T, Hattori M, Hayashi T, Kleerebezem M, Kurokawa K, Leclerc M, Levenez F, Manichanh C, Nielsen HB, Nielsen T, Pons N, Poulain J, Qin J, Sicheritz-Ponten T, Tims S, Torrents D, Ugarte E, Zoetendal EG, Wang J, Guarner F, Pedersen O, de Vos WM, Brunak S, Dore J, Antolin M, Artiguenave F, Blottiere HM, Almeida M, Brechot C, Cara C, Chervaux C, Cultrone A, Delorme C, Denariatz G, Dervyn R, Foerstner KU, Friss C, van de Guchte M, Guedon E, Haimet F, Huber W, van Hylckama-Vlieg J, Jamet A, Juste C, Kaci G, Knol J, Lakhdari O, Layec S, Le Roux K, Maguin E, Merieux A, Melo Minardi R, M'Rini C, Muller J, Oozeer R, Parkhill J, Renault P, Rescigno M, Sanchez N, Sunagawa S, Torrejon A, Turner K, Vandemeulebrouck G, Varela E, Winogradsky Y, Zeller G, Weissenbach J, Ehrlich SD, Bork P (2011) Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* **473**: 174-180

AZ Sint-Lucas Brugge (2012) De keizersnede. http://www.stlucasbe/diensten/moeder-kindzorg/arbeid_bevaling/keizersnede.htm moeder-kindzorg

Azad, al. e (2014) Impact of cesarean section delivery and breastfeeding on infant gut microbiota at one year of age. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology* **10**

Azad MB, Konya T, Maughan H, Guttman DS, Field CJ, Chari RS, Sears MR, Becker AB, Scott JA, Kozyrskyj AL (2013) Gut microbiota of healthy Canadian infants: profiles by mode of delivery and infant diet at 4 months. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* **185**: 385-394

Belga. (2014) Ruim 1,3 miljoen Belgen in behandeling voor depressie. *Knack*. Roularta Media Group, Brussel.

Biagi E, Candela M, Fairweather-Tait S, Franceschi C, Brigidi P (2012) Ageing of the human metaorganism: the microbial counterpart. *Age* **34**: 247-267

Biasucci G, Rubini M, Riboni S, Morelli L, Bessi E, Retetangos C (2010) Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. *Early human development* **86 Suppl 1**: 13-15

Bjorksten B (2004) Effects of intestinal microflora and the environment on the development of asthma and allergy. *Springer seminars in immunopathology* **25**: 257-270

Black RE, Victora CG, Walker SP, Bhutta ZA, Christian P, de Onis M, Ezzati M, Grantham-McGregor S, Katz J, Martorell R, Uauy R, Maternal, Child Nutrition Study G (2013) Maternal and child undernutrition and overweight in low-income and middle-income countries. *Lancet* **382**: 427-451

Cabrera-Rubio R, Collado MC, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E, Mira A (2012) The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *The American journal of clinical nutrition* **96**: 544-551

Camarinha-Silva A, Jauregui R, Chaves-Moreno D, Oxley AP, Schaumburg F, Becker K, Wos-Oxley ML, Pieper DH (2013) Comparing the anterior nares bacterial community of two discrete human populations using Illumina amplicon sequencing. *Environmental microbiology*

Cammu H, Martens E, Van Mol C, Jacquemyn Y (2013) Perinatale Activiteiten in Vlaanderen 2012. *Studiecentrum voor Perinatale Epidemiologie*

Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Pena AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods* **7**: 335-336

Cardwell CR, Stene LC, Joner G, Cinek O, Svensson J, Goldacre MJ, Parslow RC, Pozzilli P, Brigis G, Stoyanov D, Urbonaite B, Sipetic S, Schober E, Ionescu-Tirgoviste C, Devoti G, de Beaufort CE, Buschard K, Patterson CC (2008) Caesarean section is associated with an increased risk of childhood-onset type 1 diabetes mellitus: a meta-analysis of observational studies. *Diabetologia* **51**: 726-735

Cho J, Ahn S (2014) [Development and Evaluation of Breastfeeding Promotion Program for Mothers with Breast Engorgement following Cesarean Birth]. *Journal of Korean Academy of Nursing* **44**: 170-178

Chow J, Lee SM, Shen Y, Khosravi A, Mazmanian SK (2010) Host-bacterial symbiosis in health and disease. *Advances in immunology* **107**: 243-274

Claesson MJ, Cusack S, O'Sullivan O, Greene-Diniz R, de Weerd H, Flannery E, Marchesi JR, Falush D, Dinan T, Fitzgerald G, Stanton C, van Sinderen D, O'Connor M, Harnedy N, O'Connor K, Henry C, O'Mahony D, Fitzgerald AP, Shanahan F, Twomey C, Hill C, Ross RP, O'Toole PW (2011) Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108 Suppl 1**: 4586-4591

Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S, Power SE, O'Connor EM, Cusack S, Harris HM, Coakley M, Lakshminarayanan B, O'Sullivan O, Fitzgerald GF, Deane J, O'Connor M, Harnedy N, O'Connor K, O'Mahony D, van Sinderen D, Wallace M, Brennan L, Stanton C, Marchesi JR, Fitzgerald AP, Shanahan F, Hill C, Ross RP, O'Toole PW (2012) Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature* **488**: 178-184

Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R (2012) The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell* **148**: 1258-1270

Collado MC, Cernada M, Bauerl C, Vento M, Perez-Martinez G (2014) Microbial ecology and host-microbiota interactions during early life stages. *Gut microbes* **5**

Collado MC, Delgado S, Maldonado A, Rodriguez JM (2009) Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative real-time PCR. *Letters in applied microbiology* **48**: 523-528

Coppa GV, Zampini L, Galeazzi T, Gabrielli O (2006) Prebiotics in human milk: a review. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* **38 Suppl 2**: S291-294

Decker E, Engelmann G, Findeisen A, Gerner P, Laass M, Ney D, Posovszky C, Hoy L, Hornef MW (2010) Cesarean delivery is associated with celiac disease but not inflammatory bowel disease in children. *Pediatrics* **125**: e1433-1440

Dewey KG, Nommsen-Rivers LA, Heinig MJ, Cohen RJ (2003) Risk factors for suboptimal infant breastfeeding behavior, delayed onset of lactation, and excess neonatal weight loss. *Pediatrics* **112**: 607-619

DiGiulio DB (2012) Diversity of microbes in amniotic fluid. *Seminars in fetal & neonatal medicine* **17**: 2-11

Dinan TG, Cryan JF (2013) Melancholic microbes: a link between gut microbiota and depression? *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* **25**: 713-719

Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, Knight R (2010) Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 11971-11975

Donnet-Hughes A, Perez PF, Dore J, Leclerc M, Levenez F, Benyacoub J, Serrant P, Segura-Roggero I, Schiffrin EJ (2010) Potential role of the intestinal microbiota of the mother in neonatal immune education. *The Proceedings of the Nutrition Society* **69**: 407-415

Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA (2005) Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* **308**: 1635-1638

Fallani M, Young D, Scott J, Norin E, Amarri S, Adam R, Aguilera M, Khanna S, Gil A, Edwards CA, Dore J (2010) Intestinal microbiota of 6-week-old infants across Europe: geographic influence beyond delivery mode, breast-feeding, and antibiotics. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **51**: 77-84

Fanaro S, Chierici R, Guerrini P, Vigi V (2003) Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr Suppl* **91**: 48-55

Fernandez L, Langa S, Martin V, Maldonado A, Jimenez E, Martin R, Rodriguez JM (2013) The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* **69**: 1-10

Franks AH, Harmsen HJ, Raangs GC, Jansen GJ, Schut F, Welling GW (1998) Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Applied and environmental microbiology* **64**: 3336-3345

Gastwirth JL, Gel YR, Hui WLW, Lyubchich V, Miao W, Noguchi K (2013) lawstat: An R package for biostatistics for biostatistics, public policy, and law. <http://CRANR-project.org/package=lawstat> R package version 2.4.1.

Gibson GR (1998) Dietary modulation of the human gut microflora using prebiotics. *The British journal of nutrition* **80**: S209-212

- Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, Gordon JI, Relman DA, Fraser-Liggett CM, Nelson KE (2006) Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* **312**: 1355-1359
- Goldblum RM, Ahlstedt S, Carlsson B, Hanson LA, Jodal U, Lidin-Janson G, Sohl-Akerlund A (1975) Antibody-forming cells in human colostrum after oral immunisation. *Nature* **257**: 797-798
- Gonzalez R, Klaassens ES, Malinen E, de Vos WM, Vaughan EE (2008) Differential transcriptional response of *Bifidobacterium longum* to human milk, formula milk, and galactooligosaccharide. *Applied and environmental microbiology* **74**: 4686-4694
- Gronlund MM, Lehtonen OP, Eerola E, Kero P (1999) Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **28**: 19-25
- Hamer HM, De Preter V, Windey K, Verbeke K (2012) Functional analysis of colonic bacterial metabolism: relevant to health? *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* **302**: G1-9
- Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost FJ, Brummer RJ (2008) Review article: the role of butyrate on colonic function. *Alimentary pharmacology & therapeutics* **27**: 104-119
- Hamosh M (1998) Protective function of proteins and lipids in human milk. *Biology of the neonate* **74**: 163-176
- Hamosh M (2001) Bioactive factors in human milk. *Pediatric clinics of North America* **48**: 69-86
- Hanson LA (2007) Session 1: Feeding and infant development breast-feeding and immune function. *The Proceedings of the Nutrition Society* **66**: 384-396
- Healthist, Kominato K, Yakult (2013) Intestinal *Bifidobacteria* passed on from mother to child. *Healthist*
- Heikkila MP, Saris PE (2003) Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *Journal of applied microbiology* **95**: 471-478
- Hennart PF, Brasseur DJ, Delogne-Desnoeck JB, Dramaix MM, Robyn CE (1991) Lysozyme, lactoferrin, and secretory immunoglobulin A content in breast milk: influence of duration of lactation, nutrition status, prolactin status, and parity of mother. *The American journal of clinical nutrition* **53**: 32-39
- Holgerson PL, Harnevik L, Hernell O, Tanner ACR, Johansson I (2011) Mode of Birth Delivery Affects Oral Microbiota in Infants. *Journal of dental research* **90**: 1183-1188
- Hoppu U, Isolauri E, Laakso P, Matomaki J, Laitinen K (2012) Probiotics and dietary counselling targeting maternal dietary fat intake modifies breast milk fatty acids and cytokines. *European journal of nutrition* **51**: 211-219
- Hunt KM, Foster JA, Forney LJ, Schutte UM, Beck DL, Abdo Z, Fox LK, Williams JE, McGuire MK, McGuire MA (2011) Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. *PloS one* **6**: e21313
- Huurre A, Kalliomaki M, Rautava S, Rinne M, Salminen S, Isolauri E (2008) Mode of delivery - effects on gut microbiota and humoral immunity. *Neonatology* **93**: 236-240

Hyman RW, Fukushima M, Diamond L, Kumm J, Giudice LC, Davis RW (2005) Microbes on the human vaginal epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 7952-7957

Isolauri E (2012) Development of healthy gut microbiota early in life. *Journal of paediatrics and child health* **48 Suppl 3**: 1-6

Isolauri E (2014) The Impact of Early Gut Microbiota on Child Health *2nd international symposium of probiotics and prebiotics in pediatrics 2014*

Isolauri E, Salminen S, Ouwehand AC (2004) Microbial-gut interactions in health and disease. Probiotics. *Best practice & research Clinical gastroenterology* **18**: 299-313

Jacquot A, Neveu D, Aujoulat F, Mercier G, Marchandin H, Jumas-Bilak E, Picaud JC (2011) Dynamics and clinical evolution of bacterial gut microflora in extremely premature patients. *The Journal of pediatrics* **158**: 390-396

Jakobsson HE, Abrahamsson TR, Jenmalm MC, Harris K, Quince C, Jernberg C, Bjorksten B, Engstrand L, Andersson AF (2014) Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by caesarean section. *Gut* **63**: 559-566

Janas LM, Picciano MF (1982) The nucleotide profile of human milk. *Pediatric research* **16**: 659-662

Jernberg C, Lofmark S, Edlund C, Jansson JK (2007) Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *The ISME journal* **1**: 56-66

Jeurink PV, van Bergenhenegouwen J, Jimenez E, Knippels LM, Fernandez L, Garssen J, Knol J, Rodriguez JM, Martin R (2013) Human milk: a source of more life than we imagine. *Beneficial microbes* **4**: 17-30

Johnson CL, Versalovic J (2012) The human microbiome and its potential importance to pediatrics. *Pediatrics* **129**: 950-960

Jost T, Lacroix C, Braegger C, Chassard C (2013) Assessment of bacterial diversity in breast milk using culture-dependent and culture-independent approaches. *The British journal of nutrition* **110**: 1253-1262

Khanna S, Tosh PK (2014) A clinician's primer on the role of the microbiome in human health and disease. *Mayo Clinic proceedings* **89**: 107-114

Khodayar-Pardo P, Mira-Pascual L, Collado MC, Martinez-Costa C (2014) Impact of lactation stage, gestational age and mode of delivery on breast milk microbiota. *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association*

Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, Angenent LT, Ley RE (2011) Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108 Suppl 1**: 4578-4585

Kolling G, Wu M, Guerrant RL (2012) Enteric pathogens through life stages. *Frontiers in cellular and infection microbiology* **2**: 114

Konietschke F (2012) nparcomp: Perform multiple comparisons and compute simultaneous confidence intervals for the nonparametric relative contrast effects. <http://CRAN.R-project.org/package=nparcomp> R package version 2.0

Koren O, Goodrich JK, Cullender TC, Spor A, Laitinen K, Backhed HK, Gonzalez A, Werner JJ, Angenent LT, Knight R, Backhed F, Isolauri E, Salminen S, Ley RE (2012) Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy. *Cell* **150**: 470-480

Kovatcheva Datchary P (2013) *The Prokaryotes*, Vol. The Gut Microbiota, Berlin Heidelberg.

Langhendries JP (2006) Early bacterial colonisation of the intestine: why it matters? *Archives de pediatrie : organe officiel de la Societe francaise de pediatrie* **13**: 1526-1534

Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, Almeida M, Arumugam M, Batto JM, Kennedy S, Leonard P, Li J, Burgdorf K, Grarup N, Jorgensen T, Brandslund I, Nielsen HB, Juncker AS, Bertalan M, Levenez F, Pons N, Rasmussen S, Sunagawa S, Tap J, Tims S, Zoetendal EG, Brunak S, Clement K, Dore J, Kleerebezem M, Kristiansen K, Renault P, Sicheritz-Ponten T, de Vos WM, Zucker JD, Raes J, Hansen T, Meta HITc, Bork P, Wang J, Ehrlich SD, Pedersen O (2013) Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* **500**: 541-546

Makino H, Kushiro A, Ishikawa E, Kubota H, Gawad A, Sakai T, Oishi K, Martin R, Ben-Amor K, Knol J, Tanaka R (2013) Mother-to-infant transmission of intestinal bifidobacterial strains has an impact on the early development of vaginally delivered infant's microbiota. *PloS one* **8**: e78331

Marques TM, Wall R, Ross RP, Fitzgerald GF, Ryan CA, Stanton C (2010) Programming infant gut microbiota: influence of dietary and environmental factors. *Current opinion in biotechnology* **21**: 149-156

Martin R, Heilig HG, Zoetendal EG, Jimenez E, Fernandez L, Smidt H, Rodriguez JM (2007) Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women. *Research in microbiology* **158**: 31-37

Martin R, Jimenez E, Heilig H, Fernandez L, Marin ML, Zoetendal EG, Rodriguez JM (2009) Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. *Applied and environmental microbiology* **75**: 965-969

Martin R, Langa S, Reviriego C, Jimenez E, Marin ML, Olivares M, Boza J, Jimenez J, Fernandez L, Xaus J, Rodriguez JM (2004) The commensal microflora of human milk: new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. *Trends Food Sci Tech* **15**: 121-127

Martin R, Langa S, Reviriego C, Jimenez E, Marin ML, Xaus J, Fernandez L, Rodriguez JM (2003) Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *The Journal of pediatrics* **143**: 754-758

Martin V, Maldonado-Barragan A, Moles L, Rodriguez-Banos M, Campo RD, Fernandez L, Rodriguez JM, Jimenez E (2012) Sharing of bacterial strains between breast milk and infant feces. *Journal of human lactation : official journal of International Lactation Consultant Association* **28**: 36-44

Marzorati M, Wittebolle L, Boon N, Daffonchio D, Verstraete W (2008) How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology. *Environmental microbiology* **10**: 1571-1581

Matamoros S, Gras-Leguen C, Le Vacon F, Potel G, de La Cochetiere MF (2013) Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. *Trends in microbiology* **21**: 167-173

Maukonen J, Matto J, Satokari R, Soderlund H, Mattila-Sandholm T, Saarela M (2006) PCR DGGE and RT-PCR DGGE show diversity and short-term temporal stability in the Clostridium

coccoides-Eubacterium rectale group in the human intestinal microbiota. *FEMS microbiology ecology* **58**: 517-528

Mitsuoka T (1978) *Intestinal bacteria and health: an introductory narrative*: Harcourt Brace Jovanovich Japan.

Mitsuoka T (1992) Intestinal flora and aging. *Nutrition reviews* **50**: 438-446

Morelli L (2008) Postnatal development of intestinal microflora as influenced by infant nutrition. *The Journal of nutrition* **138**: 1791S-1795S

Mshvildadze M, Neu J, Shuster J, Theriaque D, Li N, Mai V (2010) Intestinal microbial ecology in premature infants assessed with non-culture-based techniques. *The Journal of pediatrics* **156**: 20-25

Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology* **59**: 695-700

Negele K, Heinrich J, Borte M, von Berg A, Schaaf B, Lehmann I, Wichmann HE, Bolte G, Group LS (2004) Mode of delivery and development of atopic disease during the first 2 years of life. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* **15**: 48-54

O'Hara AM, Shanahan F (2006) The gut flora as a forgotten organ. *EMBO reports* **7**: 688-693

O'Toole PW (2012) Changes in the intestinal microbiota from adulthood through to old age. *Clin Microbiol Infect* **18**: 44-46

Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH, Wagner H (2013) vegan: Community Ecology Package. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan> R package version 2.0-10

Ottman N, Smidt H, de Vos WM, Belzer C (2012) The function of our microbiota: who is out there and what do they do? *Frontiers in cellular and infection microbiology* **2**: 104

Owen CG, Martin RM, Whincup PH, Davey-Smith G, Gillman MW, Cook DG (2005) The effect of breastfeeding on mean body mass index throughout life: a quantitative review of published and unpublished observational evidence. *The American journal of clinical nutrition* **82**: 1298-1307

Owen CG, Martin RM, Whincup PH, Smith GD, Cook DG (2006) Does breastfeeding influence risk of type 2 diabetes in later life? A quantitative analysis of published evidence. *The American journal of clinical nutrition* **84**: 1043-1054

Owen CG, Whincup PH, Cook DG (2011) Breast-feeding and cardiovascular risk factors and outcomes in later life: evidence from epidemiological studies. *The Proceedings of the Nutrition Society* **70**: 478-484

Owen CG, Whincup PH, Kaye SJ, Martin RM, Davey Smith G, Cook DG, Bergstrom E, Black S, Wadsworth ME, Fall CH, Freudenheim JL, Nie J, Huxley RR, Kolacek S, Leeson CP, Pearce MS, Raitakari OT, Lisenin I, Viikari JS, Ravelli AC, Rudnicka AR, Strachan DP, Williams SM (2008) Does initial breastfeeding lead to lower blood cholesterol in adult life? A quantitative review of the evidence. *The American journal of clinical nutrition* **88**: 305-314

Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO (2007) Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS biology* **5**: e177

- Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, van den Brandt PA, Stobberingh EE (2006) Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* **118**: 511-521
- Perez PF, Dore J, Leclerc M, Levenez F, Benyacoub J, Serrant P, Segura-Roggero I, Schiffrin EJ, Donnet-Hughes A (2007) Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? *Pediatrics* **119**: e724-732
- Picciano MF (2001) Representative values for constituents of human milk. *Pediatric clinics of North America* **48**: 263-264
- Prior E, Santhakumaran S, Gale C, Philipps LH, Modi N, Hyde MJ (2012) Breastfeeding after cesarean delivery: a systematic review and meta-analysis of world literature. *The American journal of clinical nutrition* **95**: 1113-1135
- Putignani L, Del Chierico F, Petrucca A, Vernocchi P, Dallapiccola B (2014) The human gut microbiota: a dynamic interplay with the host from birth to senescence settled during childhood. *Pediatric research*
- Raes J. (2014) The human microbiome in health and disease. *Permanente vorming Obesitas*.
- Ramsay DT, Kent JC, Owens RA, Hartmann PE (2004) Ultrasound imaging of milk ejection in the breast of lactating women. *Pediatrics* **113**: 361-367
- Rescigno M, Rotta G, Valzasina B, Ricciardi-Castagnoli P (2001) Dendritic cells shuttle microbes across gut epithelial monolayers. *Immunobiology* **204**: 572-581
- Richardson (2013) Cesarean vs. Vaginal Delivery: Differences in early gut flora and immune system developmen. <http://www.waphysicianintraining.com/cesarean-vs-vaginal-delivery-differences-in-gut-microbe-and-immune-system-development/>
- Rinne M, Kalliomaki M, Arvilommi H, Salminen S, Isolauri E (2005) Effect of probiotics and breastfeeding on the bifidobacterium and lactobacillus/enterococcus microbiota and humoral immune responses. *The Journal of pediatrics* **147**: 186-191
- Riordan J (2005) *Breastfeeding and Human Lactation*, third edn. Sudbury: Jones and bartlett publishers.
- RIZIV. (2010) Diabetes in België: stand van zaken. *Thematische uiteenzettingen - Diabetes in België: stand van zaken*, Vol. 4, pp. 45-52.
- Roger LC, Costabile A, Holland DT, Hoyles L, McCartney AL (2010) Examination of faecal Bifidobacterium populations in breast- and formula-fed infants during the first 18 months of life. *Microbiology* **156**: 3329-3341
- Roger LC, McCartney AL (2010) Longitudinal investigation of the faecal microbiota of healthy full-term infants using fluorescence in situ hybridization and denaturing gradient gel electrophoresis. *Microbiology* **156**: 3317-3328
- Romero R, Espinoza J, Goncalves LF, Kusanovic JP, Friel LA, Nien JK (2006) Inflammation in preterm and term labour and delivery. *Seminars in fetal & neonatal medicine* **11**: 317-326
- Romero R, Hassan SS, Gajer P, Tarca AL, Fadrosch DW, Bieda J, Chaemsaitong P, Miranda J, Chaiworapongsa T, Ravel J (2014) The vaginal microbiota of pregnant women who subsequently have spontaneous preterm labor and delivery and those with a normal delivery at term *Microbiome* **2**: 18

- Roux ME, McWilliams M, Phillips-Quagliata JM, Weisz-Carrington P, Lamm ME (1977) Origin of IgA-secreting plasma cells in the mammary gland. *The Journal of experimental medicine* **146**: 1311-1322
- Salminen S, Collado MC, Isolauri E, Gueimonde M (2009) Microbial-host interactions: selecting the right probiotics and prebiotics for infants. *Nestle Nutrition workshop series Paediatric programme* **64**: 201-213; discussion 213-207, 251-207
- Salminen S, Gibson GR, McCartney AL, Isolauri E (2004) Influence of mode of delivery on gut microbiota composition in seven year old children. *Gut* **53**: 1388-1389
- Satokari RM, Vaughan EE, Akkermans AD, Saarela M, de Vos WM (2001) Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and environmental microbiology* **67**: 504-513
- Singhal A, Macfarlane G, Macfarlane S, Lanigan J, Kennedy K, Elias-Jones A, Stephenson T, Dudek P, Lucas A (2008) Dietary nucleotides and fecal microbiota in formula-fed infants: a randomized controlled trial. *The American journal of clinical nutrition* **87**: 1785-1792
- Spor A, Koren O, Ley R (2011) Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. *Nature reviews Microbiology* **9**: 279-290
- Tannock GW, Fuller R, Smith SL, Hall MA (1990) Plasmid profiling of members of the family Enterobacteriaceae, lactobacilli, and bifidobacteria to study the transmission of bacteria from mother to infant. *Journal of clinical microbiology* **28**: 1225-1228
- Team RC (2014) R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing Vienna, Austria*
- Thavagnanam S, Fleming J, Bromley A, Shields MD, Cardwell CR (2008) A meta-analysis of the association between Caesarean section and childhood asthma. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* **38**: 629-633
- Tomita M, Takase M, Wakabayashi H, Bellamy W (1994) Antimicrobial peptides of lactoferrin. *Advances in experimental medicine and biology* **357**: 209-218
- Tsolia M, Psoma M, Gavrili S, Petrochilou V, Michalas S, Legakis N, Karpathios T (2003) Group B streptococcus colonization of Greek pregnant women and neonates: prevalence, risk factors and serotypes. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **9**: 832-838
- Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, Sogin ML, Jones WJ, Roe BA, Affourtit JP, Egholm M, Henrissat B, Heath AC, Knight R, Gordon JI (2009) A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* **457**: 480-484
- Vaishampayan PA, Kuehl JV, Froula JL, Morgan JL, Ochman H, Francino MP (2010) Comparative metagenomics and population dynamics of the gut microbiota in mother and infant. *Genome biology and evolution* **2**: 53-66
- Vilchez-Vargas R, Geffers R, Suarez-Diez M, Conte I, Waliczek A, Kaser VS, Kralova M, Junca H, Pieper DH (2013) Analysis of the microbial gene landscape and transcriptome for aromatic pollutants and alkane degradation using a novel internally calibrated microarray system. *Environmental microbiology* **15**: 1016-1039
- W.H.O. (2013a) European health for all database (HFA-DB). <http://dataeurowho.int/>

W.H.O. (2013b) Monitoring and surveillance : Overweight and obesity in three age groups. http://www.euro.who.int/data/assets/pdf_file/0009/243288/Belgium-WHO-Country-Profile.pdf

W.H.O. (2014a) Infant and young child feeding. In Organisation WH (ed.).

W.H.O. (2014b) Mental health - Data and statistics. <http://www.euro.who.int/en/health-topics/noncommunicable-diseases/mental-health/data-and-statistics> **Health topics - Noncommunicable diseases**

Walker A (2010) Breast milk as the gold standard for protective nutrients. *The Journal of pediatrics* **156**: S3-7

Wall R, Ross RP, Ryan CA, Hussey S, Murphy B, Fitzgerald GF, Stanton C (2009) Role of gut microbiota in early infant development. *Clinical medicine Pediatrics* **3**: 45-54

Wang J-P (2011) SPECIES: An R Package for Species Richness Estimation. *Journal of Statistical Software*, <http://www.jstatsoft.org/v40/i09/> **40**: 1--15

Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR (2007) Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and environmental microbiology* **73**: 5261-5267

Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ (1998) Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 6578-6583

Wickham H (2009) ggplot2: elegant graphics for data analysis. *Springer New York*

Xanthou M (1998) Immune protection of human milk. *Biology of the neonate* **74**: 121-133

Xu J, Gordon JI (2003) Honor thy symbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 10452-10459

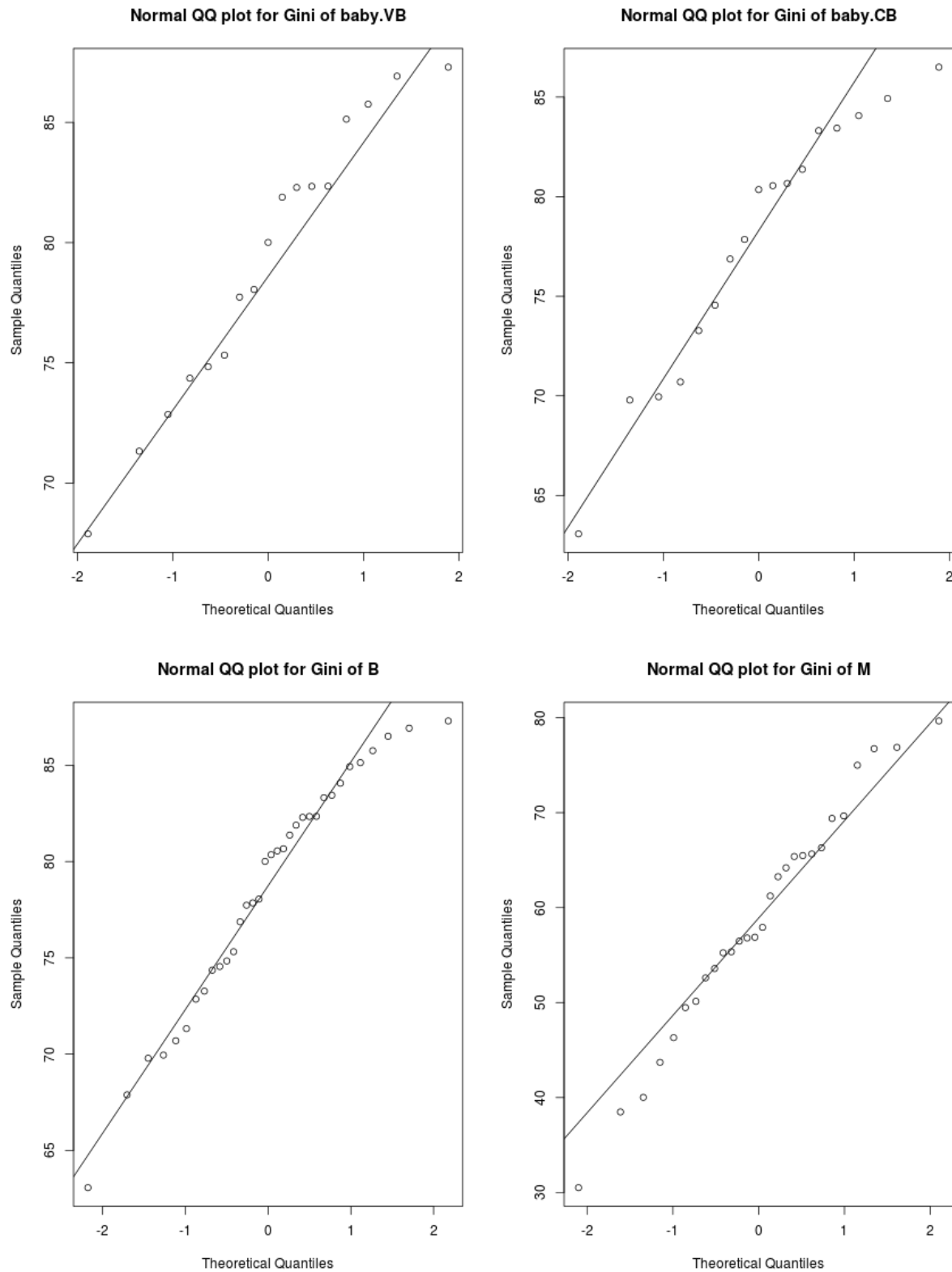
Zanardo V, Svegliado G, Cavallin F, Giustardi A, Cosmi E, Litta P, Trevisanuto D (2010) Elective cesarean delivery: does it have a negative effect on breastfeeding? *Birth* **37**: 275-279

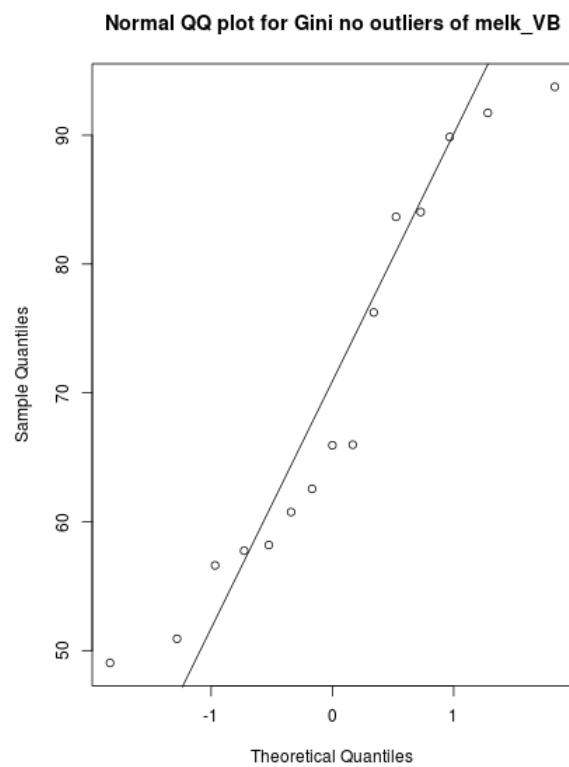
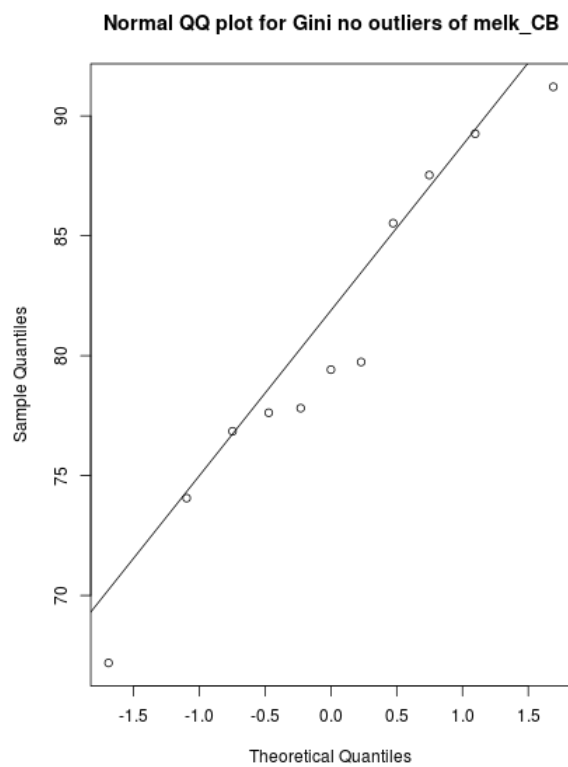
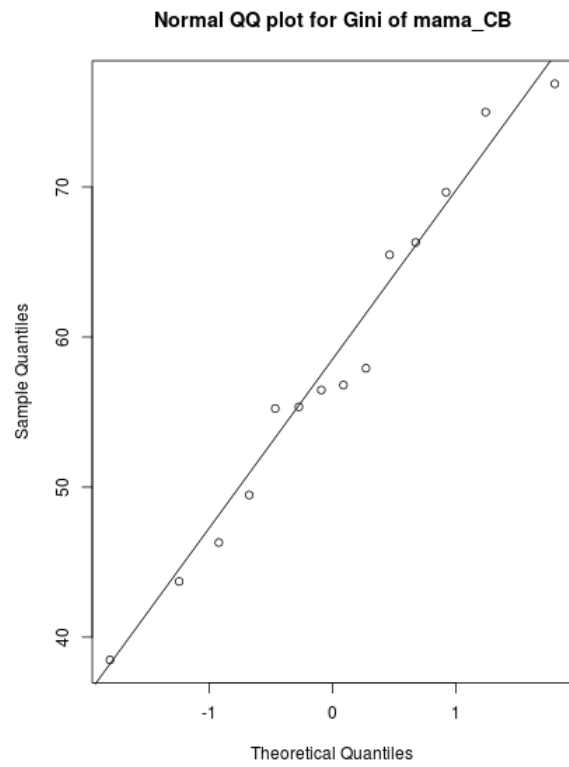
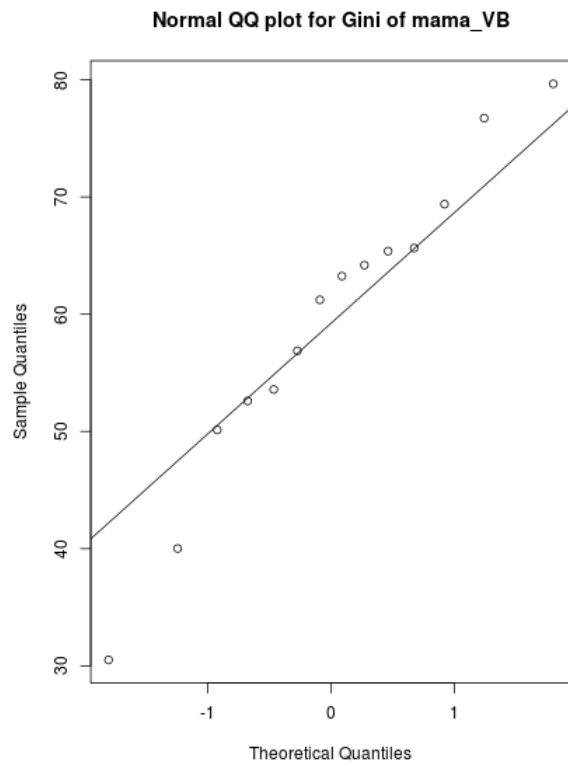
Zeileis A (2013) ineq: Measuring Inequality, Concentration, and Poverty. <http://CRAN.R-project.org/package=ineq> **R package version 0.2-11**

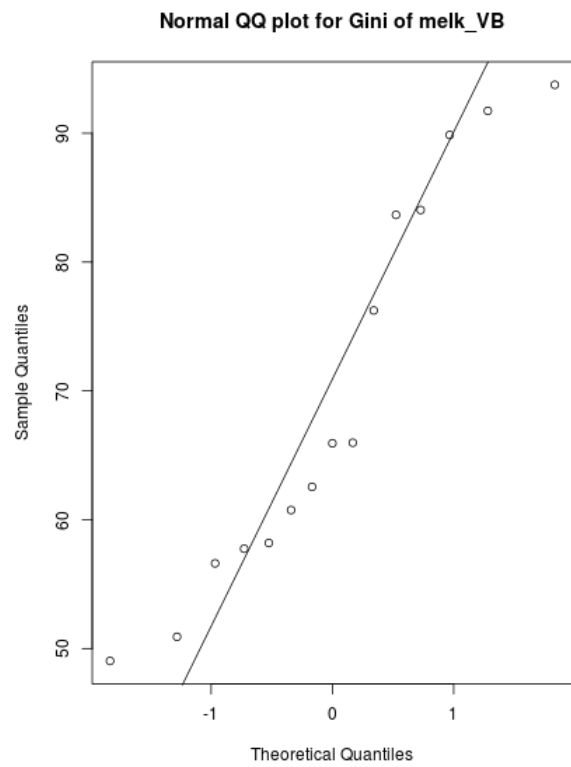
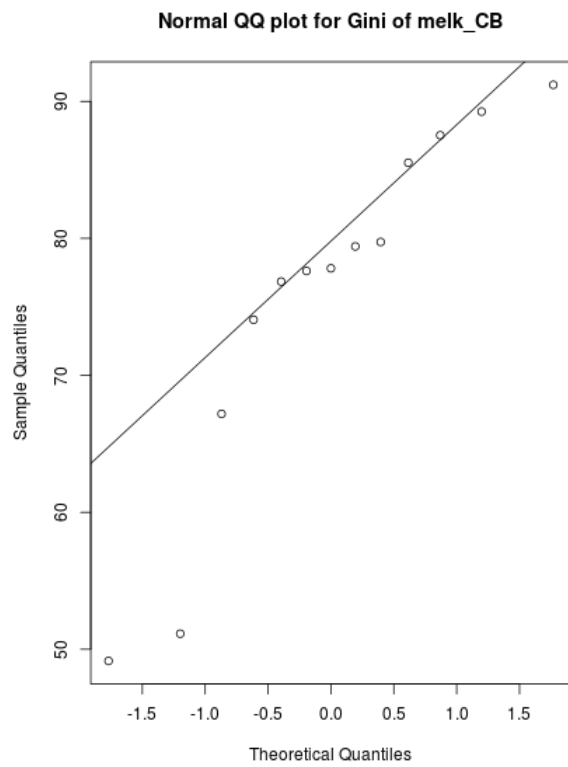
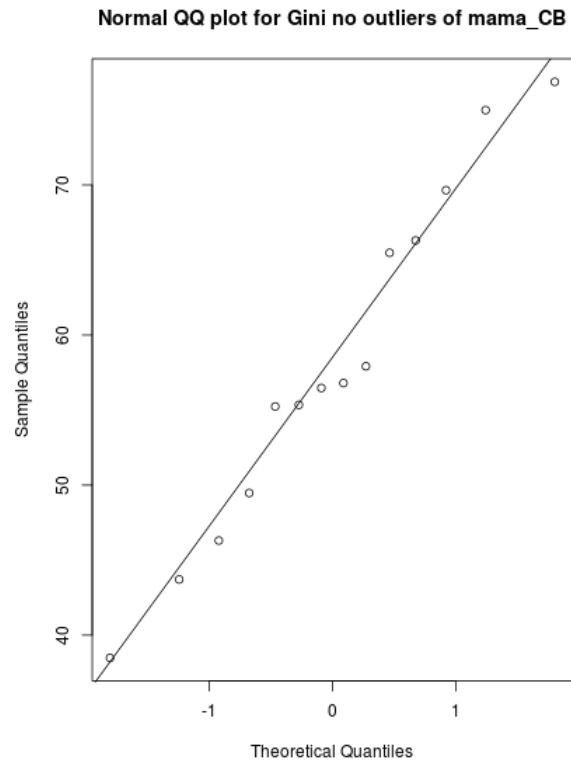
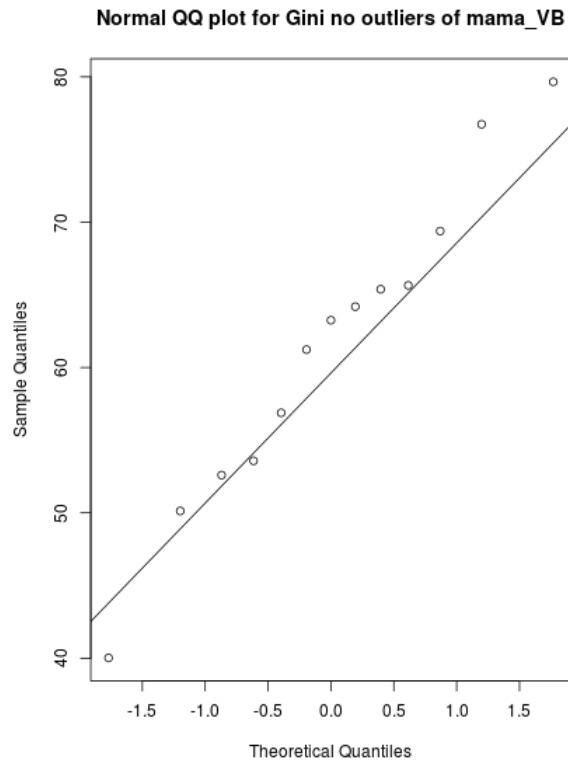
Zoetendal EG, Akkermans AD, De Vos WM (1998) Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Applied and environmental microbiology* **64**: 3854-3859

Bijlage

A.1. De kwantiel plots om de normale verdeling van de gegevens na te gaan







A.2. Het positief advies van het ethisch comité voor de aanvraag van dit project



Atz: Commissie voor Medische Ethiek

Universiteit Gent
Vakgroep Biochemische en Microbiële Technologie
Laboratorium voor Microbiële Ecologie en Technolog
Dr. Tom VAN DE WIELE
Coupure Links 653
9000 Gent
BTW nr. 248.015.142

COMMISSIE VOOR MEDISCHE
ETHIEK

Voorzitter:
Prof. Dr. D. Matthys
Secretaris:
Prof. Dr. K. Vandewoude

CONTACT Secretariaat	TELEFOON +32 (0)9 332 56 13 +32 (0)9 332 59 25	FAX +32 (0)9 332 49 62	E-MAIL ethisch.comite@ugent.be
UW KENMERK	ONS KENMERK 2013/748	DATUM 22-okt-13	KOPIE Zie "CC"

BETREFT

Advies voor monocentrische studie met als titel:
Direct analysis of faecal samples and breast milk, and subsequent use of faecal samples in batch experiments to simulate the physiological/microbial conditions of the gastrointestinal tract.
Rechtstreekse analyse van faecale stalen en moedermelk, evenals gebruik van faecale tijdens batchexperimenten die de fysiologische/microbiële condities van het spijsverteringsstelsel nabootsen.

Belgisch Registratienummer: B670201318456

- * Begeleidende brief dd. 16/09/2013
- * (Patiënten)informatie- en toestemmingsformulier dd. 16/09/2013
- * Vragenlijsten: Voedselfrequentie (FFQ)
- * Antwoord onderzoekers dd. 11/10/2013 (ontv. 16/10/2013) op opmerkingen EC dd.
- * Adviesaanvraagformulier dd. 16/09/2013
- * Vragenlijsten voor karakterisatie van faecale stalen/moedermelk (aangepaste versie cfr. Brief onderzoeker dd. 11/10/2013)
- * Flyer (aangepaste versie cfr. Brief onderzoeker dd. 11/10/2013)

Advies werd gevraagd door:

Dr. T. VAN DE WIELE ; Hoofdonderzoeker

BOVENVERMELDE DOCUMENTEN WERDEN DOOR HET ETHISCH COMITÉ BEOORDEELD.
ER WERD EEN POSITIEF ADVIES GEGEVEN OVER DIT PROTOCOL OP 21/10/2013. INDIEN DE STUDIE NIET WORDT OPGESTART VOOR 21/10/2014, VERVALT HET ADVIES EN MOET HET PROJECT TERUG INGEDIEND WORDEN.

Vooraleer het onderzoek te starten dient contact te worden genomen met het Trial Bureau (09/332 05 00).

THE ABOVE MENTIONED DOCUMENTS HAVE BEEN REVIEWED BY THE ETHICS COMMITTEE.
A POSITIVE ADVICE WAS GIVEN FOR THIS PROTOCOL ON 21/10/2013. IN CASE THIS STUDY IS NOT STARTED BY 21/10/2014, THIS ADVICE WILL BE NO LONGER VALID AND THE PROJECT MUST BE RESUBMITTED.

Before initiating the study, please contact the Trial Bureau (09/332 05 00).

DIT ADVIES WORDT OPGENOMEN IN HET VERSLAG VAN DE VERGADERING VAN HET ETHISCH COMITÉ VAN 19/11/2013

THIS ADVICE WILL APPEAR IN THE PROCEEDINGS OF THE MEETING OF THE ETHICS COMMITTEE OF 19/11/2013

Universitair Ziekenhuis Gent
De Pintelaan 185,B- 9000 Gent
www.uzgent.be

Veerle De Rouck
09/332 22 66
veerle.derouck@uzgent.be

./.

A.3. De flyer die werd ontworpen om de kandidates te rekruteren

GEZOCHT

GEZONDE
MAMA'S & BABY'S
VOOR
ONDERZOEK OVER
HET
EFFECT VAN
BORSTVOEDING &
DE MANIER VAN
BEVALLEN
OP DE
DARMFLOORA

CONTACT GEGEVENS

Contacteer me gerust indien u
interesse heeft om deel te
nemen of voor verdere vragen!

Emmy Van Daele
Masterstudente
Biochemie-Biotechnologie
Tel: +32 498/030649
Emvdaele.vandaele@UGent.be


**UNIVERSITEIT
GENT**


Tel: +32 9/264 59 76
Coupure Links 653
9000 Gent
<http://www.labmet.ugent.be>

ONDERZOEK OVER BORSTVOEDING





HET ONDERZOEK

In het kader van mijn thesis zal ik een onderzoek uitvoeren omtrent het effect van **borstvoeding** en de **manier van bevallen** op de darmflora van de baby.

De darmflora draagt niet alleen bij tot een goede vertering maar wordt steeds meer gelinkt aan de algemene gezondheid en de weerstand tegen ziektes.

De samenstelling van deze flora wordt beïnvloed door verschillende factoren waaronder het eetpatroon. In het geval van een baby die borstvoeding krijgt, speelt de **moedermelk** dus een grote rol.

Hiernaast zou de **manier van bevallen** (natuurlijke bevalling of keizersnede) ook een effect hebben. Een keizersnede is een operatie in een steriele omgeving waardoor blootstellingen aan bepaalde gunstige micro-organismen niet plaatsvinden.

Deze verschillende effecten op de darmflora willen wij met behulp van uw medewerking verder onderzoeken.

Dit opent perspectieven om alle pasgeborenen aan een gelijkaardig profiel van micro-organismen bloot te stellen.



INTERESSE?

Nodige gegevens :

- Adres
- Geboortedatum baby
- Manier van bevallen (keizersnede/natuurlijk)

DEELNAME

WIE KAN DEELNEMEN?

Gezonde moeders die **uitsluitend borstvoeding** geven aan hun baby (ongeveer **3 maand oud**) op het moment van staalname. (oktober-december 2013)

NODIGE STALEN

éénmalige staalname:

- stoelgangstaal van de moeder (minimum 5g)
- moedermelk (10ml)
- stoelgang staal van de baby (minimum 5g)

+

Algemene en voedingsvragenlijst

VRAGEN?

Mail deze gerust door naar:

Emvdaele.vandaele@UGent.be

A.4. Informatiebrief over de deelname aan het onderzoek

Informatiebrief voor de deelnemers aan experimenten

1 Titel van de studie:

Effect van borstvoeding en de manier van bevallen op de darmflora van de pasgeborene.

2 Beschrijving van de studie:

We zullen onderzoeken wat het effect is van de manier van bevallen (natuurlijke bevalling versus keizersnede) en het al dan niet geven van borstvoeding op de darmflora van een 3-maand oude baby. Een goede initiële kolonisatie is belangrijk voor een optimale ontwikkeling van het immuunsysteem. De darmflora draagt immers niet alleen bij tot een goede vertering maar wordt steeds meer gelinkt aan de algemene gezondheid en weerstand tegen ziektes. Een keizersnede is een operatie in een steriele omgeving waardoor blootstellingen aan bepaalde gunstige micro-organismen niet kan plaatsvinden. Een andere risicofactor is het niet ontvangen van moedermelk omdat via deze weg ook bacteriën doorgegeven kunnen worden. Vandaar gaan we via stoelgangstalen en moedermelk nagaan hoe deze processen de darmflora van de baby beïnvloeden om zo cruciale bacteriën bij pasgeborenen te identificeren.

De deelname aan de studie vereist een éénmalige donatie van stoelgang- en moedermelkstalen. Er zullen in totaal 40 moeders en hun baby's deelnemen aan deze studie.

3 Wat wordt verwacht van de deelnemer?

We willen moeders recruteren die uitsluitend borstvoeding geven aan hun baby (ongeveer 3 maand oud). Voor het welslagen van de studie, is het belangrijk dat u volledig meewerkt met de onderzoeker en dat u zijn/haar instructies die bij het staalnamemateriaal bijgevoegd zijn nauwlettend opvolgt. Verder vragen we een vragenlijst omtrent uw voedingsgewoonten in te vullen, evenals een vragenlijst om het verloop van de eerste maanden van uw baby in kaart te brengen.

4 Deelname en beëindiging:

De deelname aan deze studie vindt plaats op vrijwillige basis. Deelname aan deze studie brengt voor u geen onmiddellijk therapeutisch voordeel. Uw deelname in de studie kan in de toekomst wel helpen om baby's die via keizersnede geboren worden, of die via flessenvoeding gevoed worden, te helpen om een betere darmflora te ontwikkelen. U kan weigeren om deel te nemen aan de studie, en u kunt zich op elk ogenblik terugtrekken uit de studie zonder dat u hiervoor een reden moet opgeven. Als u deelneemt, wordt u gevraagd het toestemmingsformulier te tekenen.

5 Procedures:

Een eerste vragenlijst zal pijlen naar uw voedingspatroon. Een tweede vragenlijst zal trachten het verloop van de eerste maanden van uw baby in kaart te brengen.

Verder zal **éénmalig** (ongeveer 3 maanden na geboorte) gevraagd worden stoelgang van u en uw baby (in beide gevallen ongeveer 5 gram), evenals moedermelk (ongeveer 10 mL) in de daartoe voorziene recipiënten te verzamelen.

1 Risico's en voordelen:

Vermits er enkel een niet-invasieve staalname gebeurt (stoelgang van de baby wordt uit de pamber verzameld, moedermelk wordt bemonsterd vanuit afgekolven melk), worden er absoluut geen risico's of ongemakken verwacht tijdens deze studie. Anderzijds zijn er ook geen directe voordelen voor de deelnemer. Er kan wel feedback gegeven worden over de samenstelling van de microflora van uw baby maar doordat dit onderzoek nog in zijn kinderschoenen staat, zullen deze resultaten allicht eerder observationeel zijn.

Deze studie werd goedgekeurd door een onafhankelijke Commissie voor Medische Ethiek verbonden aan het UZ Gent en wordt uitgevoerd volgens de richtlijnen voor de goede klinische praktijk (ICH/GCP) en de verklaring van Helsinki opgesteld ter bescherming van mensen deelnemend aan klinische studies. In geen geval dient u de goedkeuring door de Commissie voor Medische Ethiek te beschouwen als een aanzet tot deelname aan deze studie.

2 Kosten:

Uw deelname aan deze studie brengt geen extra kosten mee voor U.

3 Vertrouwelijkheid:

In overeenstemming met de Belgische wet van 8 december 1992 en de Belgische wet van 22 augustus 2002, zal u persoonlijke levenssfeer worden gerespecteerd en zal u toegang krijgen tot de verzamelde gegevens. Elk onjuist gegeven kan op uw verzoek verbeterd worden. Vertegenwoordigers van de opdrachtgever, auditoren, de Commissie voor Medische Ethiek en de bevoegde overheden hebben rechtstreeks toegang tot Uw medische dossiers om de procedures van de studie en/of de gegevens te controleren, zonder de vertrouwelijkheid te schenden. Dit kan enkel binnen de grenzen die door de betreffende wetten zijn toegestaan. Door het toestemmingsformulier, na voorafgaande uitleg, te ondertekenen stemt U in met deze toegang.

Als u akkoord gaat om aan deze studie deel te nemen, zullen uw persoonlijke en klinische gegevens tijdens deze studie worden verzameld en gecodeerd (hierbij kan men uw gegevens nog terug koppelen naar uw persoonlijk dossier). Verslagen waarin U wordt geïdentificeerd, zullen niet openlijk beschikbaar zijn. Als de resultaten van de studie worden gepubliceerd, zal uw identiteit vertrouwelijke informatie blijven.

4 Letsels ten gevolge van deelname aan de studie:

De onderzoeker voorziet in een vergoeding en/of medische behandeling in het geval van schade en/of letsel tengevolge van deelname aan de studie. Voor dit doeleinde is een verzekering afgesloten met foutloze aansprakelijkheid conform de wet inzake experimenten op de menselijke persoon van 7 mei 2004. Op dat ogenblik kunnen uw gegevens doorgegeven worden aan de verzekeraar.

5 Contactpersoon:

Als er letsel optreedt tengevolge van de studie, of als U aanvullende informatie wenst over de studie of over uw rechten en plichten, kunt U in de loop van de studie op elk ogenblik contact opnemen met: Emmy Van Daele (0498030649) of prof. Tom Van de Wiele (0477605455).

A.5. Informed consent



Toestemmingsformulier

Ik, _____ bevestig hierbij dat ik geïnformeerd werd over de studie en dat ik een informatieve flyer en het document “Informatiebrief voor de deelnemers aan experimenten” pagina 1 tot en met 2 gelezen heb en er een kopij van ontvangen heb. Ik heb de informatie gelezen en begrepen. De studieverantwoordelijke gaf me voldoende informatie betreffende de voorwaarden en duur van de studie. Daarnaast heb ik voldoende tijd gekregen om de informatie te beoordelen en vragen te stellen, waarop ik duidelijke antwoorden kreeg. Ik heb een kopij gekregen van dit ondertekende en gedateerde formulier voor “Toestemmingsformulier”.

Men heeft mij ingelicht over het bestaan van een verzekeringspolis in geval er letsel zou ontstaan dat aan de studieprocedures is toe te schrijven. Ik ben me ervan bewust dat deze studie werd goedgekeurd door een onafhankelijke Commissie voor Medische Ethiek verbonden aan het UZ Gent en dat deze studie zal uitgevoerd worden volgens de richtlijnen voor de goede klinische praktijk (ICH/GCP) en de verklaring van Helsinki, opgesteld ter bescherming van mensen deelnemend aan experimenten. Deze goedkeuring was in geen geval de aanzet om te beslissen om deel te nemen aan deze studie.

Ik begrijp dat ik op elk ogenblik mijn deelname aan de studie kan beëindigen zonder hiervoor een reden op te geven, nadat de studieverantwoordelijke op de hoogte gebracht te hebben hierover, en dat deze beslissing niet ten nadele zal zijn van mij of mijn kind. Ik ben op de hoogte waarvoor de data verzameld en verwerkt wordt in deze studie. Ik geef vrijwillig de toestemming voor mijn deelname en die van mijn kind aan dit onderzoek.

Ik begrijp dat auditors, vertegenwoordigers van de opdrachtgever, de Commissie voor Medische Ethiek of bevoegde overheden, mijn gegevens mogelijk willen inspecteren om de verzamelde informatie te controleren. Door dit document te ondertekenen, geef ik toestemming voor deze controle. Ten alle tijden zal mijn privacy gerespecteerd worden.

Ik ben bereid op vrijwillige basis deel te nemen aan deze studie.

Naam en voornaam van de deelnemer _____

Naam en voornaam van het kind van de deelnemer _____

Handtekening van de deelnemer _____

Datum _____
dag/maand/jaar

Verklaring van de onderzoeker

Ik bevestig dat de deelnemster aan deze studie de mogelijkheid heeft gekregen om vragen te stellen en dat alle vragen op de, binnen mijn mogelijkheden, best mogelijke manier beantwoord werden. Ik verklaar dat de deelnemende persoon aan deze studie niet gedwongen werd om te participeren en dat de toestemming dus vrijwillig gegeven werd. Een kopie van deze geïnformeerde toestemming werd aan de deelnemende persoon bezorgd.

Naam en voornaam van de onderzoeker _____

Handtekening van de onderzoeker _____

Datum _____
dag/maand/jaar

A.6. Handleiding bij de staalname



HANDLEIDING VOOR STAALNAME



De inhoud van het pakket:



1. Een emmer voor het stoelgangstaal van de volwassene
2. Recipiënt voor stoelgangstaal van baby
3. Steriele spuit voor opname van moedermelk
4. Recipiënt voor moedermelk
5. Bundel met vragenlijsten (niet weergegeven)

STAALNAME – STOELGANG VOLWASSENE

1) Hands wassen



2) Vang de stoelgang rechtstreeks op in de emmer (1.) zonder in contact te komen met het toilet(water).

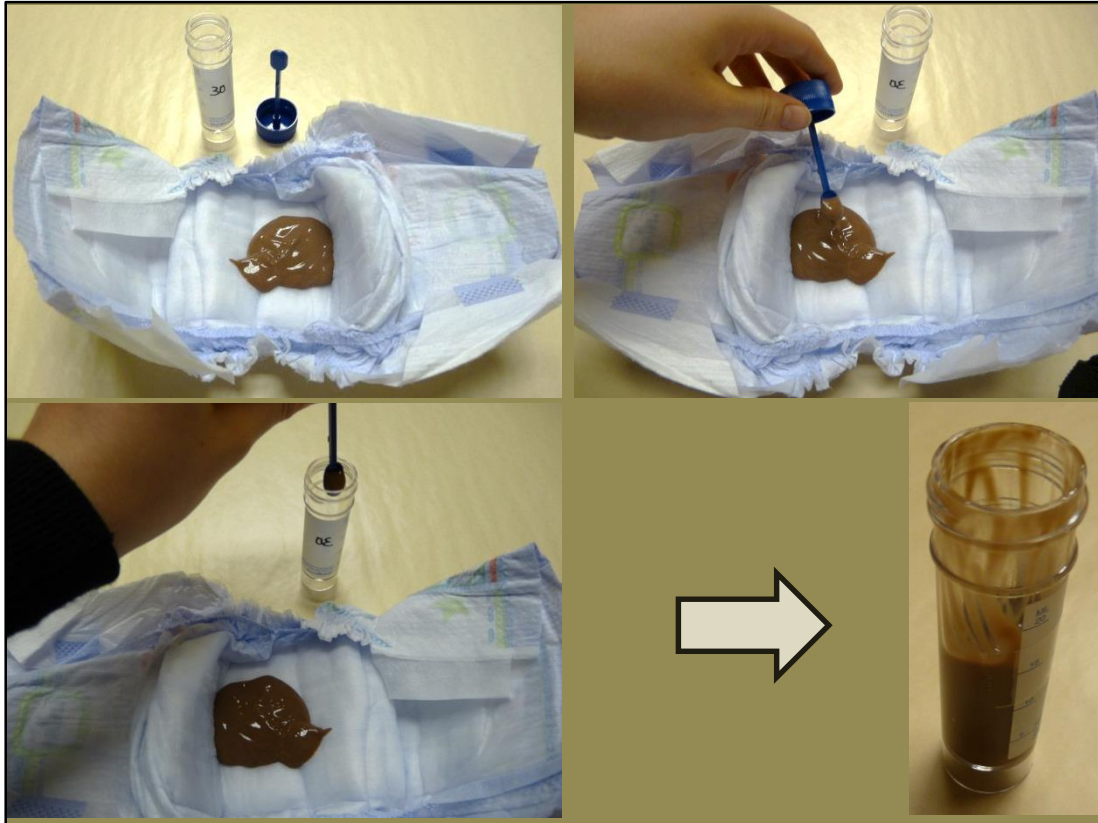


- 3) Sluit de emmer goed af na het toiletbezoek en plaats deze in je diepvries. Het is belangrijk dat het staal zo snel mogelijk wordt ingevroren en ook bevroren blijft tot het wordt opgehaald.
- 4) Noteer de nodige gegevens op het staalname blad.

STAALNAME – STOELGANG BABY

- 1) Handsen wassen
- 2) Vul de tube met blauwe schroefdop (2.) zo vol mogelijk* met stoelgang van de baby uit een pampers (zo vers mogelijk). Gebruik hiervoor het lepeltje op het deksel van de tube.

*Zorg er voor dat de lepel er nog terug in past als je het deksel straks dicht draait. Hoe vol je de tube kan doen is afhankelijk van de hoeveelheid stoelgang, er hoeft geen extra staal toegevoegd te worden op een ander tijdstip.



- 3) Draai de tube goed dicht en plaats deze in je diepvries. Het is belangrijk dat het staal zo snel mogelijk wordt ingevroren en ook bevroren blijft tot het wordt opgehaald.
- 4) Noteer de nodige gegevens op het staalname blad.

STAALNAME – MOEDERMELK

- 1) Handsen wassen
- 2) Collecteer de moedermelk, dit kan via afkolven of manueel. Bij voorkeur via afkolven als uw baby drinkt uit een flesje met afgekolfd melk (via handkolf/batterijkolf/elektrische kolf/... zoals u gewoon bent) of manueel als uw baby normaalgezien aan de borst drinkt.



- 3) Breng de melk over in de tube met witte schroefdop (4.) door gebruik te maken van de steriele spuit (3.).



- 4) Draai de tube goed dicht en plaats deze in je diepvries. Het is belangrijk dat het staal zo snel mogelijk wordt ingevroren en ook bevroren blijft tot het wordt opgehaald.



- 4) Noteer de nodige gegevens op het staalname blad.

A.7. Voedsel frequentie vragenlijst (FFQ)

-

Voedselfrequentie-vragenlijst

Deze vragenlijst peilt naar uw voedingsgewoonten van het afgelopen jaar.

In onderstaande tabel staat een hele reeks voedingsmiddelen(groepen). Probeer (zo exact mogelijk) weer te geven hoe vaak u de opgesomde producten eet of drinkt en hoeveel u ervan gebruikt. Denk hierbij ook aan de maaltijden of voedingsmiddelen die u buitenshuis gebruikt.

Hoe vaak (frequentie)?

In de kolom onder de titel "Hoe vaak gebruikt u het opgesomde voedingsmiddel?", staan 6 keuzemogelijkheden.

Onder "Voorbeeld portiegroottes" vindt u een aantal richtinggevende maten en gewichten. Die helpen u de gebruikte hoeveelheden in gewichten om te zetten.

Hoeveel?

In de kolom onder de titel "en hoeveel dan gemiddeld op zo'n dag?", staan 3, 4 of 5 keuzemogelijkheden.

Onder "Voorbeeld portiegroottes" vindt u een aantal richtinggevende maten en gewichten. Die helpen u de gebruikte hoeveelheden in gewichten om te zetten.

Welke soort gebruikt u meestal?

In de laatste kolom dient u bij een aantal voedingsmiddelen(groepen) de soort die u meestal gebruikt aan te duiden. Gelieve slechts 1 antwoord aan te duiden, enkel indien antwoorden evenveel voorkomen, kan je 2 bolletjes zwart maken.

Mocht u bij toeval het verkeerde bolletje zwart kleuren, dan kan u dit doorstrepen en een ander bolletje zwart maken. Duid in dit geval het juiste bolletje met een pijltje aan. Zorg er hierbij voor dat u altijd een bolletje zwart maakt. Indien u een product zelden of nooit eet, dan maakt u het bolletje zwart onder "nooit of minder dan een dag per maand". U hoeft in dat geval geen hoeveelheid, noch soort aan te geven.

Voorbeeld

Als voorbeeld nemen we een persoon die elke ochtend thuis een tas koffie (met cafeïne) drinkt en op het werk (5 dagen per week) als 10-uurtje een tas kruiden thee. Gedurende het weekend neemt hij/zij in plaats van kruiden thee een tas Engelse thee als 10-uurtje.

Voedingsmid- delengroepen	Hoe vaak gebruikt u het opgesomde voedingsmiddel?	en hoeveel dan <u>gemiddeld op zo'n dag</u> ?	Voorbeeld portiegroottes	Welke soort gebruikt u <u>meestal</u> ? <i>*slechts 1 antwoord aanduiden, enkel indien antwoorden evenveel voorkomen, kan je 2 bolletjes zwart maken</i>
Koffie	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☒ elke dag	☒ 200 ml of minder ☐ tussen 200 en 400 ml ☐ tussen 400 en 600 ml ☐ 600 ml of meer	1 tas = 125 ml 1 beker = 225 ml	☒ met cafeïne ☐ met minder cafeïne ☐ zonder cafeïne
Thee	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☒ elke dag	☒ 200 ml of minder ☐ tussen 200 en 400 ml ☐ tussen 400 en 600 ml ☐ 600 ml of meer	1 tas = 125 ml 1 beker = 225 ml	☐ gewone Engelse thee ☐ groene thee ☒ kruiden thee

Voedingsmid- delengroepen	Hoe vaak gebruikt u het opgesomde voedingsmiddel?	en hoeveel dan <u>gemiddeld op zo'n dag</u> ?	Voorbeeld portiegroottes	Welke soort gebruikt u <u>meestal</u> ? <i>*slechts 1 antwoord aanduiden, enkel indien antwoord evenveel voorkomen, kan je 2 bolletjes zwart maken</i>
Koffie	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 125 ml of minder ☐ tussen 125 en 250 ml ☐ tussen 250 en 375 ml ☐ tussen 375 en 500 ml ☐ 500 ml of meer	1 tas = 125 ml 1 beker = 225 ml	☐ met cafeïne ☐ met minder cafeïne ☐ zonder cafeïne
Thee	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 125 ml of minder ☐ tussen 125 en 250 ml ☐ tussen 250 en 375 ml ☐ tussen 375 en 500 ml ☐ 500 ml of meer	1 tas = 125 ml 1 beker = 225 ml	☐ gewone Engelse thee ☐ groene thee ☐ kruiden thee
Melk/koffiemelk in koffie/thee	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 8 ml of minder ☐ tussen 8 en 16 ml ☐ tussen 16 en 24 ml ☐ 24 ml of meer	1 cupje koffiemelk = 8 ml 1 koffielepel melk = 5 ml 1 eetlepel melk = 10 ml	☐ koffiemelk ☐ magere melk ☐ halfvolle melk ☐ volle melk
Bier	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 200 ml of minder ☐ tussen 200 en 400 ml ☐ tussen 400 en 600 ml ☐ tussen 600 en 800 ml ☐ meer dan 800 ml	1 flesje/glas = 250 of 330 ml 1 blik = 330 ml of 500 ml	☐ alcoholvrij bier ☐ zwaar bier (Categorie S) (Duvel, trappist, ...) ☐ ander bier (pils, Palm, Kriek,...)
Wijn/ schuimwijn	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 200 ml of minder ☐ tussen 200 en 400 ml ☐ tussen 400 en 600 ml ☐ 600 ml of meer	1 glas = 100 ml (schuimwijn) 1 glas = 125 ml (rode, rosé, witte wijn)	

Voedingsmid- delengroepen	Hoe vaak gebruikt u het opgesomde voedingsmiddel?	en hoeveel dan gemiddeld op zo'n dag?	Voorbeeld portiegroottes	Welke soort gebruikt u meestal*? *slechts 1 antwoord aanduiden, enkel indien antwoorden evenveel voorkomen, kan je 2 bolletjes zwart maken
Aperitief (Porto, Pineau, Pisang,.....)	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 75 ml of minder ☐ tussen 75 en 150 ml ☐ tussen 150 en 225 ml ☐ 225 ml of meer	1 glas = 75 ml	
Liqueur en sterke drank	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 35 ml of minder ☐ tussen 35 en 70 ml ☐ tussen 70 en 105 ml ☐ 105 ml of meer	1 glas = 35 ml	
Soep	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 200 ml of minder ☐ tussen 200 en 400 ml ☐ tussen 400 en 600 ml ☐ 600 ml of meer	1 soepkom = 250 ml 1 boltaas = 250 ml 1 beker = 225 ml	☐ bouillon (heldere soep zonder toevoegsels) ☐ soep met peulvruchten ☐ soep overige
Fruitsap/ groentesap	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 150 ml of minder ☐ tussen 150 en 300 ml ☐ tussen 300 en 450 ml ☐ 450 ml of meer	1 glas = 150 ml 1 brik = 200 ml 1 flesje (bv. Looza) = 200 ml	☐ fruitsap ☐ groentesap
"Therapeutische" zuiveldranken	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 85 ml of minder ☐ tussen 85 en 110 ml ☐ tussen 110 en 175ml ☐ 175 ml of meer	1 Yakult = 65ml 1 Benecol = 70 ml 1 Actimel of 1 Becel ProActiv = 100 ml 1 Optifit (Aldi) = 125 ml	☐ Probiotische dranken (Actimel, Yakult, ...) ☐ met plantensterolen (Benecol, Danaool, ...) ☐ andere, nl. :

P. 3

Voedingsmid- delengroepen	Hoe vaak gebruikt u het opgesomde voedingsmiddel?	en hoeveel dan gemiddeld op zo'n dag?	Voorbeeld portiegroottes	Welke soort gebruikt u meestal*? *slechts 1 antwoord aanduiden, enkel indien antwoorden evenveel voorkomen, kan je 2 bolletjes zwart maken
Soja- / zuiveldranken (Dan'Up, Fristi,) en milkshake	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 125 ml of minder ☐ tussen 125 en 250 ml ☐ tussen 250 en 375 ml ☐ 375 ml of meer	1 glas = 150 ml 1 beker = 225 ml 1 sojadrank = 250 ml 1 brikje zuiveldrank = 200 ml 1 flesje Dan'Up = 600 ml	☐ sojadranken ☐ zuiveldranken en milkshake
Chocolademelk	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 125 ml of minder ☐ tussen 125 en 250 ml ☐ tussen 250 en 375 ml ☐ 375 ml of meer	1 tas = 125 ml 1 beker = 225 ml 1 boltaas = 250 ml 1 glas = 150 ml 1 brik = 200 ml	☐ kant en klaar gekocht ☐ zelfbereid met magere melk ☐ zelfbereid met halfvolle melk ☐ zelfbereid met volle melk
Melk	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 125 ml of minder ☐ tussen 125 en 250 ml ☐ tussen 250 en 375 ml ☐ 375 ml of meer	1 tas = 125 ml 1 beker = 225 ml 1 boltaas = 250 ml 1 glas = 150 ml	☐ kamemelk ☐ magere melk ☐ halfvolle melk ☐ volle melk
Platte kaas	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 75 g of minder ☐ tussen 75 en 150 g ☐ tussen 150 en 225 g ☐ 225 g of meer	1 klein potje Petit Gervais = 55 g 1 groot potje Petit Gervais (maxi) = 100 g 1 potje Jogging (Aldi) = 150 g 1 vierkant potje Danio = 200 g	☐ magere platte kaas ☐ halfvolle platte kaas ☐ volle platte kaas
Yoghurt met vezelverrijking (bv. Activia met vezels,)	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 125 g of minder ☐ tussen 125 en 250 g ☐ tussen 250 en 375 g ☐ 375 g of meer	1 industrieel potje = 125 g	☐ magere yoghurt met vezelverrijking ☐ halfvolle yoghurt met vezelverrijking ☐ volle yoghurt met vezelverrijking

P. 4

Voedingsmid- delengroepen	Hoe vaak gebruikt u het opgesomde voedingsmiddel?	en hoeveel dan gemiddeld op zo'n dag?	Voorbeeld portiegroottes	Welke soort gebruikt u meestal*? <i>*slechts 1 antwoord aanduiden, enkel indien antwoorden evenveel voorkomen, kan je 2 bolletjes zwart maken</i>
Yoghurt met fruit (niet vezelverrijkt)	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 125 g of minder ☐ tussen 125 en 250 g ☐ tussen 250 en 375 g ☐ 375 g of meer	<i>1 industrieel potje = 125 g 1 tas = 125 g 1 schaalje = 150 g 1 boltas = 250 g</i>	☐ magere yoghurt met fruit ☐ halfvolle yoghurt met fruit ☐ volle yoghurt met fruit
Yoghurt natuur of met aroma (zonder fruit en niet vezelverrijkt)	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 125 g of minder ☐ tussen 125 en 250 g ☐ tussen 250 en 375 g ☐ 375 g of meer	<i>1 industrieel potje = 125 g 1 potje natuur yoghurt Danone of Milbona = 150 g 1 tas = 125 g 1 schaalje = 150 g 1 boltas = 250 g</i>	☐ magere yoghurt ☐ halfvolle yoghurt ☐ volle yoghurt
Desserts op basis van melk en/of soja	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 100 g of minder ☐ tussen 100 en 200 g ☐ tussen 200 en 300 g ☐ 300 g of meer	<i>1 industrieel potje pudding of sojadesoort = 125 g 1 potje flan = 100 g 1 potje rijstap = 100 g of 200 g 1 schaalje = 150 g 1 boltas = 250 g</i>	☐ kant en klaar gekocht ☐ zelfbereid met magere melk ☐ zelfbereid met halfvolle melk ☐ zelfbereid met volle melk
Chocolademousse, ijs, bavaois, tiramisu	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 50 g of minder ☐ tussen 50 en 100 g ☐ tussen 100 en 150 g ☐ 150 g of meer	<i>1 industrieel potje chocolademousse = 70 g 1 bolletje ijs = 35 g 1 ijsroomtje = 75 g 1 portie tiramisu of bavaois = 80 g</i>	☐ bavaois ☐ chocolademousse ☐ ijs ☐ tiramisu ☐ andere, nl.:
Noten/zaden & noten-/zadenpasta (pindakaas, sesampasta, ...)	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 15 g of minder ☐ tussen 15 en 30 g ☐ tussen 30 en 45 g ☐ 45 g of meer	<i>10 stuks gepelde pindanoten = 20 g 1 eetlepel nootjes = 25 g 1 eetlepel pindakaas = 15 g</i>	

P. 5

Voedingsmid- delengroepen	Hoe vaak gebruikt u het opgesomde voedingsmiddel?	en hoeveel dan gemiddeld op zo'n dag?	Voorbeeld portiegroottes	Welke soort gebruikt u meestal*? <i>*slechts 1 antwoord aanduiden, enkel indien antwoorden evenveel voorkomen, kan je 2 bolletjes zwart maken</i>
Olijven	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 15 g of minder ☐ tussen 15 en 30 g ☐ tussen 30 en 45 g ☐ 45 g of meer	<i>5 stuks olijven = 20 g</i>	
Gedroogd fruit	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 15 g of minder ☐ tussen 15 en 30 g ☐ tussen 30 en 45 g ☐ 45 g of meer	<i>1 gedroogde pruim, abrikoos of dadel = 8 g 1 eetlepel rozijnen = 12 g</i>	
Bessen, bramen en frambozen	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 40 g of minder ☐ tussen 40 en 80 g ☐ tussen 80 en 120 g ☐ 120 g of meer	<i>1 schaalje = 100 g</i>	
Ander fruit (vers, in blik, als moes)	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 100 g of minder ☐ tussen 100 en 200 g ☐ tussen 200 en 300 g ☐ 300 g of meer	<i>1 mandarijn = 60 g 1 kiwi = 75 g 1 perzik, nectarine = 100 g 1 appel, peer, banaan, sinaasappel = 130 g 1 eetlepel appelmoes = 40 g</i>	
Chocolade en candybars (Balioto, Mars, Twix,)	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 25 g of minder ☐ tussen 25 en 50 g ☐ tussen 50 en 75 g ☐ 75 g of meer	<i>1 individuele reep chocolade of 1 grote candybar (Mars, Snickers) = 50 g 1 reep chocolade v.e. pak van 200 g of 1 middelgrote candybar (ChaCha, ...) = 25 g 1 Mignonette = 10 g</i>	☐ chocolade met noten ☐ chocolade zonder noten ☐ candybars met noten (Bounty, Snickers,) ☐ candybars zonder noten

P. 6

Voedingsmid- delengroepen	Hoe vaak gebruikt u het opgesomde voedingsmiddel?	en hoeveel dan gemiddeld op zo'n dag?	Voorbeeld portiegroottes	Welke soort gebruikt u meestal*? *slechts 1 antwoord aanduiden, enkel indien antwoorden evenveel voorkomen, kan je 2 bolletjes zwart maken
Snoep op basis van chocolade (pralines, M&M's, chocotoff, ...) GEEN candybars	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 15 g of minder ☐ tussen 15 en 30 g ☐ tussen 30 en 45 g ☐ 45 g of meer	1 praline of truffel = 15 g 1 Bouchée = 25 g 1 zakje M&M's = 45 g 1 chocotoff = 9 g	
Confituurtaart/ fruitaarten en -flappen GEEN biscuit met fruit	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 80 g of minder ☐ tussen 80 en 160 g ☐ tussen 160 en 240 g ☐ 240 g of meer	1 fruitflap = 100 g 1 confituurtaartje = 80 g 1 fruitaart (stuk of individueel taartje) = 150 g	☐ fruitflap ☐ confituurtaart ☐ fruitaart
Andere taart	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 80 g of minder ☐ tussen 80 en 160 g ☐ tussen 160 en 240 g ☐ 240 g of meer	1 portie taart = 120 g	☐ met slagroom of crème au beurre ☐ frangipane, mattentaart ☐ flantaart, rijstaart, éclair, pompouze
Cake (ook madeleine, sterren, Zebra, ...)	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 20 g of minder ☐ tussen 20 en 40 g ☐ tussen 40 en 60 g ☐ 60 g of meer	1 plak cake of 1 individueel cakeje = 30 g	
Pannenkoek	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 60 g of minder ☐ tussen 60 en 120 g ☐ tussen 120 en 240 g ☐ 240 g of meer	1 pannenkoek = 60 g	

P. 7

Voedingsmid- delengroepen	Hoe vaak gebruikt u het opgesomde voedingsmiddel?	en hoeveel dan gemiddeld op zo'n dag?	Voorbeeld portiegroottes	Welke soort gebruikt u meestal*? *slechts 1 antwoord aanduiden, enkel indien antwoorden evenveel voorkomen, kan je 2 bolletjes zwart maken
Vezelrijke koeken (Grany, Evergreen, kokoerotsjes, volkorenkoeken)	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 20 g of minder ☐ tussen 20 en 40 g ☐ tussen 40 en 60 g ☐ 60 g of meer	1 Grany zacht = 30 g 1 pakje Evergreen (2 koekjes) = 40 g 1 klein kokoerotsje = 15 g	
Wafel of galet	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 30 g of minder ☐ tussen 30 en 60 g ☐ tussen 60 en 90 g ☐ 90 g of meer	1 krokante galet = 10 g 1 Kempische galet = 30 g 1 zachte wafel (eier/ vanillewafel) = 40 g 1 Luikse wafel = 60 g	☐ met chocolade ☐ zonder chocolade
Droge koeken (Petit Beurre, Boudoir, Café Noir, Maria, Pim's, studentenkoek, ...) GEEN vezelrijke	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 15 g of minder ☐ tussen 15 en 30 g ☐ tussen 30 en 45 g ☐ 45 g of meer	1 pakje fruitbiscuits (type Sultana, 3 koekjes) = 45 g 1 Choco As = 20 g 1 Petit Beurre met chocolade = 13 g 1 plak peperkoek = 23 g	☐ fruitbiscuits (type Sultana) ☐ droge met chocolade (Choco As, Pim's) ☐ droge zonder chocolade (Boudoir, Petit Beurre)
Andere koeken (Prince koek, sprits, speculaas)	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 15 g of minder ☐ tussen 15 en 30 g ☐ tussen 30 en 45 g ☐ 45 g of meer	1 speculaasje = 7 g 1 sprits of Prince koek = 20 g	☐ met chocolade ☐ zonder chocolade
Hartige snacks (chips, gezouten koekjes, Ringlings)	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 20 g of minder ☐ tussen 20 en 40 g ☐ tussen 40 en 60 g ☐ 60 g of meer	1 klein pakje chips = 45 g 1 Tuc koekje = 3 g (1 pakje Tuc koekjes = 100 g) 1 zak Bugles, Mama Mia's, Ringlings, Sticks = 100 g	

P. 8

Voedingsmid- delengroepen	Hoe vaak gebruikt u het opgesomde voedingsmiddel?	en hoeveel dan gemiddeld op zo'n dag?	Voorbeeld portiegroottes	Welke soort gebruikt u meestal*? *slechts 1 antwoord aanduiden, enkel indien antwoorden evenveel voorkomen, kan je 2 bolletjes zwart maken
Ontbijtgranen: muesli en krokante muesli (= cruesli) (bv. Extra van Kellogg's, Kwakies van de Aldi)	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 30 g of minder ☐ tussen 30 en 60 g ☐ tussen 60 en 90 g ☐ 90 g of meer	1 kop (kommetje) muesli of cruesli = 40 g	☐ muesli ☐ cruesli
Ontbijtgranen: All Bran en Weetabix	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 30 g of minder ☐ tussen 30 en 60 g ☐ tussen 60 en 90 g ☐ 90 g of meer	1 kop (kommetje) All bran = 40 g 1 Weetabix = 20 g	☐ All Bran Plus ☐ All Bran Flakes ☐ All Bran Choco ☐ Weetabix
Ontbijtgranen: vezelrijke vlokken (vezelrijke flakes)	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 30 g of minder ☐ tussen 30 en 60 g ☐ tussen 60 en 90 g ☐ 90 g of meer	1 kop (kommetje) flakes = 30 g	☐ Clusters ☐ Fitness ☐ type Fruit 'n Fibre
Ontbijtgranen: overige (comflakes, Chocapic, Special K)	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 30 g of minder ☐ tussen 30 en 60 g ☐ tussen 60 en 90 g ☐ 90 g of meer	1 kop (kommetje) ontbijtgranen = 30 g	☐ met chocolade ☐ zonder chocolade
Beschuit, cracotte, knäckebröd, Zweedse broodjes, rijstwafels	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 10 g of minder ☐ tussen 10 en 20 g ☐ tussen 20 en 30 g ☐ 30 g of meer	1 beschuit, rijstwafel of knäckebröd (bv. Parovita) = 8 g 1 cracotte = 6 g 1 Zweeds broodje = 10 g	☐ bruine of volkoren soorten ☐ ander (witte, rijstwafels)

P. 9

Voedingsmid- delengroepen	Hoe vaak gebruikt u het opgesomde voedingsmiddel?	en hoeveel dan gemiddeld op zo'n dag?	Voorbeeld portiegroottes	Welke soort gebruikt u meestal*? *slechts 1 antwoord aanduiden, enkel indien antwoorden evenveel voorkomen, kan je 2 bolletjes zwart maken
Koffiekoeken	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 50 g of minder ☐ tussen 50 en 100 g ☐ tussen 100 en 150 g ☐ 150 g of meer	1 middelgrote koffiekoek = 65 g	
Sandwiches en fantasiebrood	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 30 g of minder ☐ tussen 30 en 60 g ☐ tussen 60 en 90 g ☐ 90 g of meer	1 sandwich = 40 g 1 sneede van een groot brood = 30 g 1 sneede van een klein brood = 20 g	☐ sandwiches ☐ fantasiebrood
Wit brood / pistolet / stokbrood	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 30 g of minder ☐ tussen 30 en 60 g ☐ tussen 60 en 90 g ☐ 90 g of meer	1 piccolo/pistolet = 40 g 10 cm stokbrood = 40 g 1/2 stokbrood = 120 g 1 sneede van een groot brood = 30 g 1 sneede van een klein brood = 20 g	
Bruin en volkoren brood/pistolet/ stokbrood	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 30 g of minder ☐ tussen 30 en 60 g ☐ tussen 60 en 90 g ☐ 90 g of meer	1 piccolo/pistolet = 40 g 10 cm stokbrood = 40 g 1/2 stokbrood = 120 g 1 sneede van een groot brood = 30 g 1 sneede van een klein brood = 20 g	☐ bruin brood/pistolet/stokbrood ☐ volkoren brood
Vetstof op brood en broodjes (boter, margarine, minarine)	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 7 g of minder ☐ tussen 7 en 14 g ☐ tussen 14 en 21 g ☐ 21 g of meer	5 g per sneede brood of per beschuit 8 g per broodje (pistolet, sandwich)	☐ boter / margarine met extra laag vetgehalte (15-25%) (Vitelma Minelma, Buttella light, Solight, Becel Essential, Alpro Line S, ...) ☐ boter / margarine met verlaagd vetgehalte (35-45%) (Balade, Becel Control, Buttella soja, spring, Vitelma Progress,...) ☐ volle boter en klassieke margarine (Fama, Planta, Roda, ...) ☐ andere nl.:

P. 10

Voedingsmid- delengroepen	Hoe vaak gebruikt u het opgesomde voedingsmiddel?	en hoeveel dan gemiddeld op zo'n dag?	Voorbeeld portiegroottes	Welke soort gebruikt u meestal*? *slechts 1 antwoord aanduiden, enkel indien antwoorden evenveel voorkomen, kan je 2 bolletjes zwart maken
Chocoladepasta/ -hagelslag/ -vlokken	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 15 g of minder ☐ tussen 15 en 30 g ☐ tussen 30 en 45 g ☐ 45 g of meer	15 g voor 1 snede van een groot brood 10 g voor 1 snede van een klein brood	☐ chocoladehagel / -vlokken ☐ chocoladepasta
Jam (confituur)	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 15 g of minder ☐ tussen 15 en 30 g ☐ tussen 30 en 45 g ☐ 45 g of meer	15 g voor 1 snede van een groot brood 10 g voor 1 snede van een klein brood	
Fetakaas, geitenkaas en Mozzarella	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-8 dagen per week ☐ elke dag	☐ 15 g of minder ☐ tussen 15 en 30 g ☐ tussen 30 en 45 g ☐ 45 g of meer	15 g voor 1 snede van een groot brood 10 g voor 1 snede van een klein brood 1 blokje fetakaas = 5 g 1 'bolletje' Mozzarella = 125 g	
Verse kaas (type Philadelphia)	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 15 g of minder ☐ tussen 15 en 30 g ☐ tussen 30 en 45 g ☐ 45 g of meer	15 g voor 1 snede van een groot brood 10 g voor 1 snede van een klein brood	☐ natuur ☐ met kruiden / fruit / groenten ☐ 'light'
Gesmolten kaas (smeerkaas en fondueoneetjes zoals Ziz)	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 15 g of minder ☐ tussen 15 en 30 g ☐ tussen 30 en 45 g ☐ 45 g of meer	15 g voor 1 snede van een groot brood 10 g voor 1 snede van een klein brood	☐ dubbelroom ☐ gewoon ☐ mager

P. 11

Voedingsmid- delengroepen	Hoe vaak gebruikt u het opgesomde voedingsmiddel?	en hoeveel dan gemiddeld op zo'n dag?	Voorbeeld portiegroottes	Welke soort gebruikt u meestal*? *slechts 1 antwoord aanduiden, enkel indien antwoorden evenveel voorkomen, kan je 2 bolletjes zwart maken
Harde en halfharde kaas (Gouda, Westlife, Passendale, ...)	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 20 g of minder ☐ tussen 20 en 40 g ☐ tussen 40 en 60 g ☐ 60 g of meer	1 snede kaas (10 op 10 cm) = 25 g	☐ gewoon ☐ mager (bv. St Maarten, Westlife, ...)
Overige kazen (Brie, Boursin, Camembert, Roquefort, ...)	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 15 g of minder ☐ tussen 15 en 30 g ☐ tussen 30 en 45 g ☐ 45 g of meer	15 g voor 1 snede van een groot brood 10 g voor 1 snede van een klein brood	
Vegetarisch broodbeleg (zelfansalade, vegetarische boterhamworst, ...) GEEN notenpasta	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 15 g of minder ☐ tussen 15 en 30 g ☐ tussen 30 en 45 g ☐ 45 g of meer	15 g voor 1 snede van een brood 10 g voor 1 snede van een klein brood	
Bereide salades (garnalen-, kip-, krab-, vleessalade,...)	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 20 g of minder ☐ tussen 20 en 40 g ☐ tussen 40 en 60 g ☐ 60 g of meer	15 g voor 1 snede brood 35 g voor 1 piccolo 75 g voor 1/2 stokbrood	
Viswaren (gerookte vis, vis uit blik)	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 30 g of minder ☐ tussen 30 en 60 g ☐ tussen 60 en 90 g ☐ 90 g of meer	1 snede gerookte heilbot of zalm = 30 g 1 maatje of rolmops = 80 g 1 uitgelekt blikje sardines = 100 g	☐ gerookte vis ☐ vis uit blik

P. 12

Voedingsmid- delengroepen	Hoe vaak gebruikt u het opgesomde voedingsmiddel?	en hoeveel dan gemiddeld op zo'n dag?	Voorbeeld portiegroottes	Welke soort gebruikt u meestal*? *slechts 1 antwoord per vraag aanduiden, enkel indien antwoorden evenveel voorkomen, kan je 2 bolletjes
Vette vleeswaren (pâté, salami, filet américain préparé, ...)	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 20 g of minder ☐ tussen 20 en 40 g ☐ tussen 40 en 60 g ☐ 60 g of meer	15 g voor 1 snede brood	
Magere vleeswaren (filet d'Anvers, ham, kippenwit, ...)	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 20 g of minder ☐ tussen 20 en 40 g ☐ tussen 40 en 60 g ☐ 60 g of meer	15 g voor 1 snede brood	☐ gerookte vleeswaren (filet de Saxe, gerookte ham, ...) ☐ niet gerookte vleeswaren (gekookte ham, kippenwit, ...)
Eieren	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 1 stuk of minder ☐ 2 stuks ☐ 3 stuks of meer	per stuks	Bereidingswijze ☐ bereid met vetstof ☐ bereid zonder vetstof
Vleesvervangers (tofoe, Quorn, vegetarische burgers, ...) GEEN peulvruchten	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 50 g of minder ☐ tussen 50 en 100 g ☐ tussen 100 en 150 g ☐ 150 g of meer	1 plakje tofoe = 75 g 1 kleine vegetarische burger = 55 g 1 grote vegetarische burger = 95 g	☐ gepaneerde vleesvervangers ☐ niet gepaneerde vleesvervangers (tofoe, quomgehakt, ...) Bereidingswijze ☐ bereid met vetstof ☐ bereid zonder vetstof
Schelp- en schaaldieren en inktvis	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 50 g of minder ☐ tussen 50 en 100 g ☐ tussen 100 en 150 g ☐ 150 g of meer	1 eetlepel gamalen = 20 g 1 kg mosselen met schaal = 200 g mosselvlees	Bereidingswijze ☐ bereid met vetstof ☐ bereid zonder vetstof

P. 13

Voedingsmid- delengroepen	Hoe vaak gebruikt u het opgesomde voedingsmiddel?	en hoeveel dan gemiddeld op zo'n dag?	Voorbeeld portiegroottes	Welke soort gebruikt u meestal*? *slechts 1 antwoord per vraag aanduiden, enkel indien antwoorden evenveel voorkomen, kan je 2 bolletjes
Vis, vissticks (vers of uit diepvries) GEEN viswaren	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 60 g of minder ☐ tussen 60 en 120 g ☐ tussen 120 en 180 g ☐ tussen 180 en 240 g ☐ 240 g of meer	1 visstick = 30 g 1 portie vis = 175 g	☐ gepaneerde vis en vette vis (haring, makreel, paling, zalm) ☐ andere vis (niet gepaneerd en mager) Bereidingswijze ☐ bereid met vetstof ☐ bereid zonder vetstof
Gevogelte (ook gehakt en braadworsten van gevogelte)	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 60 g of minder ☐ tussen 60 en 120 g ☐ tussen 120 en 180 g ☐ tussen 180 en 240 g ☐ 240 g of meer	1 kippennugget = 25 g 1 kippenfilet of kalkoenlapje = 160 g 1 kippenbil = 160 g (gewicht zonder bot)	☐ gepaneerd of gegeten met vel ☐ niet gepaneerd en gegeten zonder vel Bereidingswijze ☐ bereid met vetstof ☐ bereid zonder vetstof
Vet vlees: spek, gehakt, burgers en worst (ook bloedworst) NIET op basis van gevogelte	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 60 g of minder ☐ tussen 60 en 120 g ☐ tussen 120 en 180 g ☐ tussen 180 en 240 g ☐ 240 g of meer	1 braadworst = 130 g 1 burger (ham-, kaas-, ...) = 130 g	Bereidingswijze ☐ bereid met vetstof ☐ bereid zonder vetstof
Halfvet vlees: koteletten, ribbetjes, stoofvlees en alle lamsvlees	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 60 g of minder ☐ tussen 60 en 120 g ☐ tussen 120 en 180 g ☐ tussen 180 en 240 g ☐ 240 g of meer	1 kotelet (varkens- of kalfs-) of 2 lamskoteletten = 150 g (zonder bot) 1 portie stoofvlees = 160 g	Bereidingswijze ☐ bereid met vetstof ☐ bereid zonder vetstof
Mager vlees: gebraad, lapjes, steaks	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 60 g of minder ☐ tussen 60 en 120 g ☐ tussen 120 en 180 g ☐ tussen 180 en 240 g ☐ 240 g of meer	1 biefstuk = 175 g 1 cordon bleu of schnitzel = 150 g	Bereidingswijze ☐ bereid met vetstof ☐ bereid zonder vetstof

P. 14

Voedingsmid- delengroepen	Hoe vaak gebruikt u het opgesomde voedingsmiddel?	en hoeveel dan gemiddeld op zo'n dag?	Voorbeeld portiegroottes	Welke soort gebruikt u meestal*? *slechts 1 antwoord aanduiden, enkel indien antwoorden evenveel voorkomen, kan je 2 bolletjes zwart maken
Deegwaren (penne, spaghetti, ...)	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 40 g onbereid of minder = 100 g bereid of minder ☐ tussen 40 en 80 g onbereid = tussen 100-200 g bereid ☐ tussen 80 en 120 g onbereid = tussen 200-300 g bereid ☐ tussen 120 en 160 g onbereid = tussen 300-400 g bereid ☐ 160 g onbereid of meer = 400 g bereid of meer	50 g ongekokte deegwaren geeft 125 g gekookte deegwaren 1 eetlepel gekookte deegwaren = 25 g	☐ volkoren ☐ niet volkoren
Rijst en andere granen (bulgur, quinoa, ...)	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 25 g onbereid of minder = 62 g bereid of minder ☐ tussen 25 en 50 g onbereid = tussen 62-125 g bereid ☐ tussen 50 en 75 g onbereid = tussen 125-187 g bereid ☐ tussen 75 en 100 g onbereid = tussen 187-250 g bereid ☐ 100 g onbereid of meer = 250 g bereid of meer	60 g ongekokte rijst of 1/2 tweepersoons buitje geeft 150 g gekookte rijst 1 eetlepel gekookte rijst = 25 g	☐ volle rijst ☐ witte rijst ☐ andere granen
Gefrituurde aardappelproducten (krokettes, frieten, ...)	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 100 g of minder ☐ tussen 100 en 200 g ☐ tussen 200 en 300 g ☐ 300 g of meer	2 gesneden aardappelen of 3 à 4 krokettes of 20 frieten = 100 g 1 middelgroot pak frieten (frietkraam) = 250 g	
Aardappelen (gekookt, gestoomd, gebakken, puree, ...)	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 75 g of minder ☐ tussen 75 en 150 g ☐ tussen 150 en 225 g ☐ tussen 225 en 300 g ☐ 300 g of meer	1 gekookte aardappel (grootte kippenei) = 50 g 1 eetlepel puree = 50 g	Bereidingswijze ☐ gestoomd / gekookt ☐ gebakken ☐ gepureerd

P. 15

Voedingsmid- delengroepen	Hoe vaak gebruikt u het opgesomde voedingsmiddel?	en hoeveel dan gemiddeld op zo'n dag?	Voorbeeld portiegroottes	Welke soort gebruikt u meestal*? *slechts 1 antwoord aanduiden, enkel indien antwoorden evenveel voorkomen, kan je 2 bolletjes zwart maken
Rauwe groenten	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 80 g of minder ☐ tussen 80 en 120 g ☐ tussen 120 en 180 g ☐ tussen 180 en 240 g ☐ 240 g of meer	1 portie rauwe bladgroenten = 50 g (= 1/5 van 1 krop sla) 1 eetlepel geraspte wortelen = 20 g 1 tomaat = 150 g	
Mais, doperwten en peulvruchten (witte bonen, rode bonen, linzen, ...)	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 40 g of minder ☐ tussen 40 en 80 g ☐ tussen 80 en 120 g ☐ 120 g of meer	1 eetlepel doperwten of mais = 20 g 1 eetlepel gekookte peulvruchten = 30 g	
Bereide groenten zonder (witte) saus <i>GEEN mais, doperwten of peulvruchten</i>	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 80 g of minder ☐ tussen 80 en 120 g ☐ tussen 120 en 180 g ☐ tussen 180 en 240 g ☐ 240 g en meer	1 eetlepel bereide groenten = 30 g	Bereidingswijze ☐ bereid met vetstof (gestoofd) ☐ bereid zonder vetstof (gekookt, gestoomd)
Bereide groenten met (witte) saus (bloemkool met kaasaus, spinazie in roomsaus, ...)	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 80 g of minder ☐ tussen 80 en 120 g ☐ tussen 120 en 180 g ☐ tussen 180 en 240 g ☐ 240 g en meer	1 eetlepel groenten in saus = 30 g	Bereidingswijze ☐ in saus bereid met vetstof ☐ in saus bereid zonder vetstof

P. 16

Voedingsmid- delengroepen	Hoe vaak gebruikt u het opgesomde voedingsmiddel?	en hoeveel dan gemiddeld op zo'n dag?	Voorbeeld portiegroottes	Welke soort gebruikt u meestal*? *slechts 1 antwoord aanduiden, enkel indien antwoorden evenveel voorkomen, kan je 2 bolletjes zwart maken
Koude sausen (mayonaise, cocktailsaus, vinaigrette, ...) GEEN ketchup of pickles	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 12 g of minder ☐ tussen 12 en 25 g ☐ tussen 25 en 50 g ☐ 50 g of meer	1 eetlepel mayonaise = 25 g 1 koffielepel mayonaise = 10 g 1 eetlepel vinaigrette = 10 g	☐ dressing (mayonaise met verlaagd vetgehalte) ☐ gewone mayonaise ☐ andere koude saus (cocktail-, tartaar-, ...)
Warme sausen bij vlees, gevogelte, vis (vleessoaus/jus, champignonsaus, ...)	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 25 g of minder ☐ tussen 25 en 50 g ☐ tussen 50 en 100 g ☐ 100 g of meer	1 eetlepel vleessoaus/jus = 12 g 1 eetlepel currysous = 20 g	☐ vleessoaus/jus niet verdund ☐ vleessoaus/jus verdund ☐ saus op basis van een roux
Room in bereidingen (in soep, saus, op ijs, op cappuccino, ...)	☐ nooit of minder dan 1 dag per maand ☐ 1-3 dagen per maand ☐ 1 dag per week ☐ 2-4 dagen per week ☐ 5-6 dagen per week ☐ elke dag	☐ 15 g of minder ☐ tussen 15 en 30 g ☐ tussen 30 en 45 g ☐ tussen 45 en 60 g ☐ 60 g of meer	1 eetlepel niet opgeklopte room = 10 g 1 toef slagroom = 10 g 1 portie room bij cappuccino = 20 g 1 portie room op ijs = 30 g	☐ sojaroam ☐ room met verlaagd vetgehalte ☐ gewone room (30 tot 40 % vet)

Invuldatum / /

Hartelijk bedankt voor het invullen van de vragenlijst!

Het is voor het onderzoek heel belangrijk dat de vragenlijst volledig is ingevuld.
Wil je even nakijken of je alle vragen beantwoord hebt, controleer vooral ook de ommezijde!

Dank je wel!



A.8. Algemene vragenlijst

Vragenlijst



ALGEMENE INFORMATIE OVER UW BABY

1 Wat is de geboortedatum van uw baby?

DATUM: Dag Maand Jaar

2 Wat is het geslacht van uw baby?

Jongen ☐Meisje ☐

3 Welke voeding krijgt uw baby?

Indien het voedingspatroon niet eenvoudig in te delen valt kan u dit onderaan toelichten.

Exclusief moedermelk:

		0%	25%	50%	75%	100%
Moedermelk	rechstreeks aan de borst	☐	☐	☐	☐	☐
	flesje na afkolven	☐	☐	☐	☐	☐

Behalve moedermelk:

Indien het antwoord bij één van onderstaande vragen ja is gelieve dan te specificeren op het daarvoor voorziene lijntje wanneer uw baby deze zaken genuttigd heeft (Hoe frequent? Vanaf welke leeftijd?)

Water Nee ☐ Ja ☐

Andere op water gebaseerde dranken Nee ☐ Ja ☐

Bijvoorbeeld venkelthee.

Definieer welk product dit was: _____

Fruitsap Nee ☐ Ja ☐

Definieer: _____

Vitamine K Nee ☐ Ja ☐

Vitamine D Nee ☐ Ja ☐

Indien dit voedingspatroon niet gehanteerd werd sinds de bevalling noteer hier dan wat u kind reeds heeft genuttigd, op welke leeftijd en hoe frequent: _____

Opmerkingen of verdere details: _____

4

Werd er reeds antibioticum/geneesmiddelen toegediend aan uw baby?
Sinds de geboorte.

Antibioticum:

Nee ☐Ja ☐

Meer bepaald: _____

Op de leeftijd van: _____

Frequentie: _____

Geneesmiddel:

Nee ☐Ja ☐

Meer bepaald: _____

Op de leeftijd van: _____

Frequentie: _____

5

Hoeveel broers/zussen heeft uw baby?

Aantal broers verwant langs moeders zijde Aantal zussen verwant langs moeders zijde

ALGEMENE INFORMATIE OVER DE BEVALLING

6

Wat was de manier van bevallen?

Vaginale bevalling ☐Keizersnede ☐Was het een natuurlijke keizersnede: Ja ☐Nee ☐

Een natuurlijke keizersnede, ook wel 'gentle sectio' genoemd, heeft als uitgangspunt dat vrouwen meer betrokken worden bij de ingreep onder andere doordat het afscheidingslaken doorzichtig is. Het tempo waarin de baby uit je buik wordt gehaald, is lager dan bij een normale keizersnee. Dit is beter om de longen optimaal te openen. De navelstreng mag rustig uitkloppen, voordat deze wordt doorgesneden. Moeder en kind worden na de geboorte niet gescheiden aangezien de kinderarts het kindje meteen onderzoekt en na twee minuten ligt hij ongewassen bij jou en blijft daar ook. Daardoor verloopt de hechting tussen moeder en kind beter, en komt de borstvoeding sneller op gang.

Werd het amnionmembraan gebroken bij de bevalling? (zijn uw vliezen gebroken/doorprikt)

Ja, doorprikt door vroedkundige ☐Ja, spontaan ☐Nee, bijvoorbeeld bij een geplande keizersnede ☐Weet ik niet ☐Had u arbeid voor de bevalling? Ja ☐ Nee ☐

7

Waar bent u bevallen?

In het ziekenhuis ☐Thuis ☐

ALGEMENE INFORMATIE OVER DE STAALNAME

1 Wanneer werd het staal genomen?

STAAL	DATUM (dag/maand/jaar)	TIJDSTIP AFNAME (uur:min)	TIJDSTIP OPSLAG (in diepvries) (uur:min)
moedermelk	/ /	:	:
Stoelgangstaal moeder	/ /	:	:
Stoelgangstaal baby	/ /	:	:

Wanneer werd het moedermelk staal afgenomen? Losstaande van een voeding of van een andere borst (voormelk)? _____

2 Details afname borstvoedingsstaal

Hoe heeft u het borstvoedingsstaal afgenomen?

Manueel

☐

Afgekolfd

☐

Bedankt om deze vragen te beantwoorden!

Controleert u even of u geen vragen hebt overgeslagen?

A.9. SOP MOLEC-001: FastPrep DNA extractie

To prepare lysis buffer (composition)

- 5 ml 1M Tris pH8 (final C: 100mM).
- 10 ml 0.5M EDTA pH8 (final C: 100mM).
- 1 ml 5 M NaCl (final C: 100mM).
- 5ml 10% (wt/vol) polyvinylpyrrolidone (PVP40) (final C: 1%).
- 10ml 10% (wt/vol) sodium dodecyl sulphate (SDS) (final C: 2%).
- Add water to 50ml.
- note that EDTA is not easy to dissolve. Add high concentration NaOH (>>>5M) untill the solution clears, then add HCl to drop the pH back to 8.

Protocol

- Start with 0.5 g of soil, or the *pellet* from 50 ml of water, or the *pellet* of 100µl-1ml of pure culture, or the sample with a matrix (cotton, paper...) and transfer the sample to a FastPrep compatible tube (2 ml).
- When extraction is to be performed on a different point in time, transfer sample into 2ml tubes (FastPrep compatible) and centrifuge until a *pellet* is obtained. If required, repeat this step by repeating supernatant removal, centrifugation and subsequent refilling of the tube until a *pellet* is obtained.
- Alternatively, spin down the sample in a larger tube (such as falcon tube), remove supernatant, dissolve the *pellet* in physiological solution, transfer it to a 2ml tube, *pellet* it again and remove the supernatant for subsequent storage at -20 or direct addition of lysis buffer.
- When extracting solids (such as colonies on a plate), dissolve the solids in physiological solution (NaCl 0,85%) and spin down the sample in a FastPrep tube. Remove the complete aqueous phase and freeze at -20 up untill extraction.
- Add 200 mg of glass beads, and then, 1000 µl of lysis buffer.
- Transfer the tube to Fast Prep and disrupt 2 times at 1600rpm for 40 sec.
- Centrifuge samples 5 min. Max speed.
- Take the supernatant , transfer to a 1.5ml eppy and add 500 µl of phenol:chloroform:isoamilic alcohol pH7. (Beware of T10mME1mM in upper phase of the stock!)
- Vortex and mix vigorously by inverting the tubes.
- Centrifuge 1 min. max speed and take the supernatant.
- Transfer the supernatant to a new 1.5 ml eppendorf and add 700 µl of chloroform.
- Mix vigorously and centrifuge 1 min maximum speed. Take the upper phase.
- Divide the supernatant into new 1.5ml eppys (450 µl each), add 45 µl of sodium acetate 3M, mix and add 500 µl of Isopropyl alcohol at -20°C. (The theory says: 1 vol. isopropyl alcohol or 3 vols. of Ethanol, here better 1 vol. of Isopropyl alcohol because with Ethanol will precipitate the salts from the lysis buffer)
- Mix by inverting the tubes.
- Keep at -20°C at least during 1 hour or overnight
- Centrifuge 30 min at 4°C maximum speed.
- Dry the *pellet*.

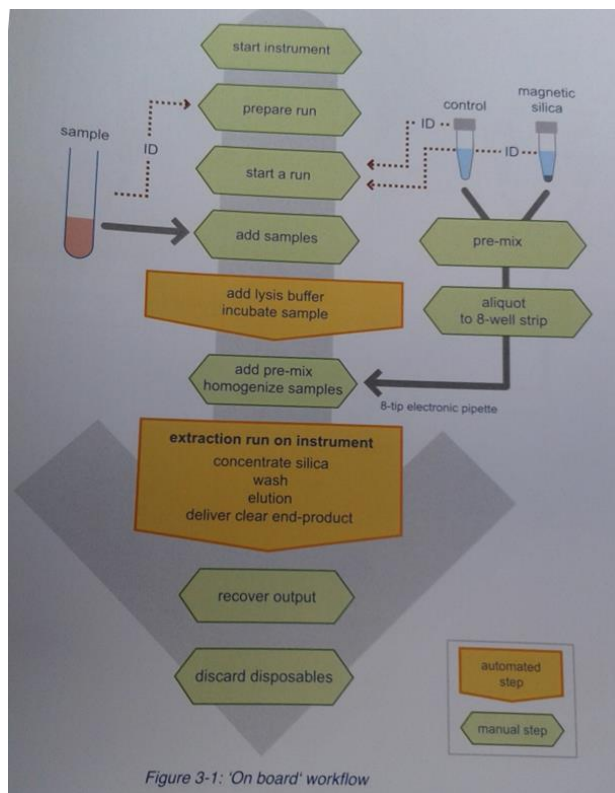
- Add 100 µl of T10E1 1X and dissolve the *pellet* (if *pellet* is colourless then dissolves it in 20-50µl of water or TE 1X).
- You can check the concentration using a nanodrop or put it on agarose gel straight away at this stage. Depending on the sample, you should observe 3 bands (genomic and both rRNA bands) and an RNA blob. When measuring the concentration with the nanodrop, don't forget to check your DNA purity.

A.10. NucliSENS® easyMAG®DNA extractie protocol

Tabel XII.1. Het gebruikte materiaal bij de EasyMAG DNA extractie (BioMérieux, Frankrijk)

Reagens	Beschrijving	Functie
NucliSENS easyMAG lyse buffer	Bevat guanidine thiocyanate	De lysebuffer wordt gebruikt om virale partikels of cellen te inactiveren en ook de nucleases te inactiveren
NucliSENS easyMAG magnetische silica	Bevat silica gesuspendeerd in een biocide oplossing	Dit wordt gebruikt als vaste fase voor de binding van de vrijgekomen nucleïnezuren om het wassen te vergemakkelijken van staalcomponenten en guanidine dat kan interfereren met de nucleïnezuurdetectie
NucliSENS easyMAG extractiebuffer 1	Bevat guanidine thiocyanate	Dit zijn de wasbuffers
NucliSENS easyMAG extractiebuffer 2	Bevat organische buffer en een biocide oplossing	
NucliSENS easyMAG extractiebuffer 3	Bevat een anorganische buffer en een biocide oplossing	Vergemakkelijkt het vrijkomen van gezuiverde nucleïnezuren van de magnetische silica
NucliSENS easyMAG disposables (tips en houder)		

De werkwijze



1. Zet het NucliSENS®EasyMAG® RNA/DNA extractie (BioMérieux Benelux BV, Frankrijk) toestel aan
2. Wanneer het lichtje op het toestel groen kleurt, zet dan de computer aan
3. Wacht tot het programma opgestart is
4. Log in
5. 1ste icoon (daily use) in de bovenste rij
 - Sample ID: kies de namen van de stalen (facultatief)
 - Protocol: generic protocol 2.01
 - Volume: staal bevat 0,500 ml vloeistof
 - Eluaat: 25 µl instellen
 - Type: primary (= on-board lysis)
 - Matrix: other
6. Druk op het icoontje met de verschillende sterretjes

grootte stalen = 24 en op 'yes' klikken
7. Creëer een nieuwe run door op de knop 'organize runs' te klikken
 - Geef de run een naam (zoals je zelf wil)
 - Alle icoontje moeten in het geel staan (kan je aanpassen door er op te klikken)
 - drukken op symbool '>>>>'. Op die manier worden de stalen naar de juiste plaats gebracht. De naam van de stalen verschijnt nu rechts op het scherm.

8. Laad de stalen

- plaats de houders en de tips in de machine
- scan de barcode van de machine en daarna van de houder
- klik op het icoontje met de vier flessen (install reagents) en scan de barcodes in van de machine en daarna van elke fles. !!! fles D wordt bewaard in de koelkast en moet dus voor gebruik vervangen worden door de fles aanwezig in de koelkast.
- alles moet aangeduid staan in het groen en niets in het rood. Dan kan er gestart worden met de extractie.
- laad daarna stalen door 500 μ l van het staal toe te voegen in de houder (1 houder per staal)
- sluit de kast en druk op het icoontje 'start' (tweede icoontje aan de rechterkant met C, startsymbool en sterretjes er op)
- gedurende 10 minuten zal het toestel lysis buffer toevoegen.
- het toestel geeft vervolgens aan dat het klaar is
- 50 μ l magnetische silica toevoegen per houder (!!!!silica zeer goed schudden voor gebruik)
- meng de silica goed met het staal door ongeveer 800 ml enkele keren op en neer te pipetteren
- druk op de startknop (bovenste icoontje aan de rechterkant met pijl er op)
- na 40 minuten is de DNA extractie klaar (!! wacht niet langer want de silica kan de extracten contamineren)
- neem de 25 μ l DNA extract uit de houders en breng het in een gesteriliseerd eppendorfbuisje. (!! let op dat je hierbij de silicaparels niet raakt)

9. Log het toestel af en zet de computer uit eens het toestel een rood lichtje aangeeft.

A.11. Qiaquick agarose gel DNA extraction

Before starting:

- Set up water bath at 50 Celsius.
- Isopropanol is necessary (from Falcon tube in freezer)
- Prepare Eppendorf tubes and place them in a rack that you can discard (because of potential contamination with ethidium bromide).
- Be careful with the UV light and wear the helmet, covering arms and neck.

1. Excise DNA fragment from the agarose gel with a sterile blade. Place it in an 1.5 ml tube.
2. weigh the gel slice and add 3 volumes of Buffer QG
(i.e. if slice is 110 mg, add 330 µl of Buffer)
3. Incubate the tube at 50°C for 10 minutes, or until the gel has dissolved. Vortex every 2-3 minutes to ease the process
4. Once the gel has dissolved, check that the colour of the mixture is yellow. It may have an orange undertone due to the loading dye. However, if it is very orange or violet, add 10 µl of 3M sodium acetate and mix.
5. Add One volume of isopropanol and mix (if your slice was 110 mg, add 110 µl of isopropanol). Mix 5-6 times by inversion.
6. Place column into a 2 ml tube. Add sample and centrifuge at maximum speed for 1. minute. Discard the flow-through.
7. Place back the column into the tube. Add 500µl of Buffer QG. Centrifuge at maximum speed for 1 minute and discard the flow-through.
8. Incubate the column for 1 minute at room temperature.
9. Wash the column with 750µl of Buffer PE. Centrifuge for 1 minute at maximum speed and discard the flow-through. Repeat the centrifugation step.
10. Place column in a new 1.5 ml tube. Add 20µl of EB buffer. Incubate for 4 minutes at room temperature and centrifuge at maximum speed for 1 minute.
11. DNA is ready to be analysed in the Nan Drop (remember to use EB buffer as blank).

A.12. Protocol Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

Requirements

PCR products

- Prepare the PCR products you want to visualize on DGGE. Use the primers 338 F-GC and 518 R in case of a standard V3 16s DGGE.
- Add 4 µL loading dye to your PCR product, provided the sample still has 20µl remaining
- Organize your PCR vials, and note down the order in your lab notebook. Add markers in between.
 - If you are preparing an Ingeny gel: you have 48 slots available. Leave 5 slots open at either side. You may load the 20 middle lanes without internal marker, as no smiling should occur here. A safe sample amount is 30-32.

DGGE marker

- Make a DGGE marker by amplifying a known DNA mixture of which you verified the complete gradient you want to use is covered by it.
- Add 4 µL loading dye to your marker per 20µl of volume.

Buffer preparation (prepare before casting)

- The volumes in the table are for 50 ml solution (Falcon tube). Add the components below together and add milli-Q up to 50 ml.
- Make sufficient buffer. Store in the cold room (max 3 months).
- When 45-60 gradients are the eventual goal, make 3x60% for every 0% buffer you prepare. You'll need 3 times more 60% for every gel.

Composition of the 60% denaturation buffer

Product	8% Acrylamide
Acrylamide (40% stock)	10 ml
BisAA (2% stock)	2,5 ml
Urea	12,5 g
Formamide	12 ml
TAE (50X stock)	1 ml
TOTAL VOLUME (add Milli-Q)	50ml (falcon tube full)

Composition of the 0% denaturation buffer

Acrylamide (40% stock)	10 ml
BisAA (2% stock)	2,5 ml
TAE (50x stock)	1 ml
TOTAL VOLUME (add Milli-Q)	50ml (falcon tube full)

Procedure

1 Preparation

Different buffers can be prepared out of the 0 and 60% solutions. The table below indicates the amounts of these solutions needed per gradient solution. Be aware that the gradient solutions for casting Ingeny gels have a volume of 24ml/solution

% denaturation	60 % denaturation buffer	0% denaturation buffer
45%	18 ml (Ingeny)	6 ml (Ingeny)
55%	9.16 ml (Ingeny)	0.84 ml (Ingeny)
40%	6.66 ml (Ingeny)	3.4 ml (Ingeny)

- Retrieve TEMED from the coldroom. TEMED will be the initiator of your polymerization reaction.
- Prepare a fresh ammonium persulfate (APS) solution by adding 0.1 g in 1 ml milli-Q (10% final concentration). This is a catalyst, which makes your gel solidify faster. You find this product in the closet reserved for DGGE glass plates. Store in cold room in an eppendorf as you'll need it for your all the different parts of your gel.
- Refresh the buffer in the DGGE tank with TAE 1x buffer (if needed, once a week suffices). The TAE stock solution is 50x concentrated: To make 5l of TAE, you add 100ml of 50x TAE in a 5l vessel and fill up to the 5l indicator. Fill the DGGE apparatus with TAE 1X up to the minimum level.
- Preheat the buffertank for at least 1 hour at 60 °C

2 Preparing the gel (start at least 3h before you want to load samples)

- Clean the glass plates and the spacers thoroughly using desinfectol and dust-free tissue. Make sure no ethanol residues remain. Be carefull when rubbing the plates dry to avoid static charge.
- Make sure the spacers don't contain any more gel from the previous run.
- Install the glass plates in the cassette by placing the spacer on one of the glass plates and flipping the second plate on top of it.
- For Ingeny gels, be sure the following conditions are met:
 - The smaller plate with big horns should be installed facing the inside of the cassette with the horns UP.
 - The bigger plate with small horns should be installed facing the outside of the cassette with the horns DOWN.
 - The spacer in the middle of the plates should be pushed down completely, and pulled back up UNTILL IT HITS ONE OF THE GLASS PLATES. If plates start to move, you've pulled it too far!
 - If you only have one gel, then install it in the front holder, and a dummy (thick glass plate) on the other side (make sure the red electrode is to your right-hand side, as this is how the cassette will be inserted into the buffertank)
 - Tighten the knobs of the cassette so the glass plates are fixed. There is NO need to apply force in this step. Force will cause smiling.
 - Insert your comb at this stage but make sure the pressure on the knobs is still equally divided.

3 Casting the bottom gel

- This must be done fast. Prepare with cold products:
- 1,5 ml 60% denaturation buffer per Ingeny gel
- 20 μ L APS per 1ml of bottom gel.
- 1 μ L TEMED per 1ml of bottom gel.
 - Add everything together in a tube and shake
 - Use a syringe (3 ml) with green needle to take the gel and dispense next to one of your spacers to ensure the buffers runs down in a straight line.
 - Swirl holder a bit to make the gel run across the bottom of the plates faster.
 - Let the gel polymerize for 15 minutes.

4 Casting the gradient

- Rinse the tubing by adding milly-Q in the communicating vessels and put the pumpspeed on 99. Make sure the vessels are open (connected). Make sure to close the vessels after rinsing.
- Remove the needle (if any) from the tubing and make sure the needle-connector is free from gel. If not, poke out old gel with a needle and hot water (refrain from poking yourself!)
- Take the freshly made gradient solutions of 60 % and 45 %
- Add for the highest denaturing solution: 130 μ L APS & 10 μ L TEMED (per 24ml buffer)
- Mix and fill the appropriate compartment. Vessel for high denaturing gel is located closest to the pump.
- Remove the air bubble between the compartments (open and close the tap very quickly).
- Then bring the little volume that moved to the lowest gradient vessel back to the highest volume vessel using a 1ml micropipette.
- Make sure the filled vessel is centered in the middle of the magnetic stirrer and switch it on. You want to mix the solution, so the speed should be moderate.
- Add APS and TEMED to the low denaturing buffer and discard in the right-hand vessel.
- Open the tap and switch on the pump (pump speed 30) at the same time.
 - Verify the pump does not cause pressure on the tubing due to blockage
 - Verify the gel enters the glass plates in a constant manner
 - Avoid air bubbles by aiding the tubing to go up-hill until the tubing is filled with gradient buffer
- When the plates are almost filled (about 0.5cm until the buffer reaches the comb), remove the needle and rinse the vessels with milli-Q and pump action.
- Switch off the pump when the tube is empty.
- Add 1 to 2 ml of MQ water on top of the gel with a syringe and green needle slowly
- Wait min. 1 hour and cover the gel with aluminum foil. You may wait longer if needed.

5 Casting the stacking gel

- Turn the plates on their sides to get the extra water off (use some dustfree tissue)
- Now make the stacking gel (per gel):
 - 5 ml 0 % denaturation solution
 - 5 µl TEMED
 - 100 µl APS (10 %)
 - Shake.
- Use a syringe with green needle to get stacking gel in quickly (about 6 ml) until you reach the rim
 - You did a good job if there are some small air bubbles in the top of the lanes just below the comb. Avoid embedding your comb in gel!
- Cover the gel with aluminum foil and let it rest for 30 minutes.

6 Loading and running the gel (start around 15h30 – finish around 16h30)

- Get your comb out slowly.
- Ingeny only: open the screws on the side a bit until plate is barely fixed (not too hard), the ones of the bottom should be opened completely. Push the spacers down.
- Slots that collapsed can be saved by straightening them using a blue needle.
- Put the holder in the tank, slowly and in a 30° angle
 - Ingeny only: Normally the tank should be at **low voltage** at that moment
- Now make sure the gel is submerged in 1X TAE buffer
- Ingeny only: fix tubing and electrodes and make sure no buffer runs on the gel anymore
- Make sure the airbubbles are out of the lanes
- Load the gel with the PCR-samples (10 µl)
- Ingeny only: Close the tank and press the **HV** button and wait for 5 minutes
- Ingeny only: Turn the upper button on the right hand side of the tank from the 3 o'clock position to the 12 o'clock position
- Switch on the powerpack and enter you desired voltage depending on your protocol:
For standard runs: Ingeny:120V. Press the runner symbol.

Development of the gel (the day after around 8h30)

- Preparation:
 - Get a piece of Aluminum foil and put it on the bench (large enough)
 - Get the plastic Tupperware box from the EtBr room and put it on the Aluminum foil
 - Prepare 300ml TAE 1x in a measuring cylinder
 - Put some paper on the bench to put the gel-holder on
 - Get out 1 small epp (approx. 14 µL) of SybrGreen from the freezer of the ATP.
These aliquots contain undiluted 10.000X concentrated SybrGreen.
- Shut down the powerpack (Ingeny: switch to LV)
- Get the gel-holder out of the DGGE tank
- Ingeny only: unscrew the knobs
- Take out the 2 glass plates with spacer and put it into the Tupperware box
- Carefully release the gel from the glass plates and let it slide into the tank using buffer.
 - Remove 1 glass plate, so the gel sticks on the other glass plate
 - Remove spacer (glass plates and spacer in the sink to clean afterwards)

- If the gel is now on 1 glass plate: put it horizontal & roll the highest part of the gel a bit down
- Pour 300 ml TAE 1x on the rolled side of the gel, so the gel comes loose and drops into the Tupperware box
- If you happen to remove stacking gel, throw it away as it is of no importance to the picture
- Cover the tank with Aluminum foil
- Take the Tupperware box to the DGGE room
- Make sure the gel is completely submerged in buffer
- Add the complete SybrGreen aliquot to the buffer by pipetting it next to the gel and stain the gel 20 minutes. You may need to swirl the tank after 10 minutes to improve contact with the buffer and prevent the gel from drying out on one side.
- Cover the trays (lid or alumina foil).

Taking pictures of the gel

- Install the SybrGreen filter onto the camera (remove the EtBr filter which may potentially still be attached to the camera lens, and make sure both the lens and the correct filter are present).
- Open the program ProXima AQ4 on the desktop
- Open the machine and roll out the transilluminator
- Clean with dust-free paper and ethanol until it is clean and dry
- Ensure the UV transilluminator is at 70% capacity and switched ON.
- Take the tray with your gel and pour the water out into a jar while holding your hand under the tip of the tray to prevent it from tearing apart.
- Leave a little bit of buffer in and then, with a smooth move, put the gel on the plate (REMOVE as much buffer as possible)
- Manipulate the gel so it is flattened
 - The stacking gel at the top
 - If pieces fall off, remove them
 - Be careful with the gel
 - If the gel gets sticky, move it a bit and add some water on top (A LITTLE BIT!)
 - Remove air bubbles and prevent pieces present below the gel
- Close the machine
- Photograph the stained gel using the software.
 - Put the UV bottom on (right hand corner) and select preview
 - Zoom in and center by positioning, focus and manipulate the exposure time. Hit the "auto" button on the left hand side in the visualisation options panel.
 - Iris: standard 1,5 (the smaller, the sharper) and focus on 1-20.
 - When happy, press acquire.
 - Go to file/save as, and make sure you tick "with visualisation options".
 - Repeat the "exposure time - acquire - auto - save" steps multiple times, so you obtain both under- and overexposed images. One of them should be usable in bionumerics. Typically images between 500 and 5000 milliseconds are acquired.