

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Jasna KOSMAČ

**VPLIV INHIBITORJEV IZLIVNIH ČRPALK NA AKTIVNOST
ŽOLČNIH SOLI PROTI BAKTERIJAM RODU *Campylobacter***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**INFLUENCE OF EFFLUX PUMP INHIBITORS ON ACTIVITY
OF BILE SALTS AGAINST *Campylobacter***

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo v laboratorijih Katedre za živilsko mikrobiologijo in Katedre za biotehnologijo na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Sonjo Smole Možina in za recenzentko prof. dr. Veroniko Abram.

Mentorica: prof. dr. Sonja Smole Možina

Recenzentka: prof. dr. Veronika Abram

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Jasna Kosmač

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dd
DK	UDK 579.24+579.26:577.18:615.33(043)=163.6
KG	patogeni mikroorganizmi/ <i>Campylobacter</i> /bakterijska odpornost/odpornost na žolčne soli/žolčne soli/natrijev deoksiholat/natrijev dodecil sulfat/inhibitorji membranskih izlivnih črpalk/PAßN/NMP/
AV	KOSMAČ, Jasna
SA	SMOLE MOŽINA, Sonja (mentorica)/ABRAM, Veronika (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2008
IN	VPLIV INHIBITORJEV IZLIVNIH ČRPALK NA AKTIVNOST ŽOLČNIH SOLI PROTI BAKTERIJAM RODU <i>Campylobacter</i>
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XI, 59 str., 15 pregl., 21 sl., 70 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	V diplomskem delu smo z mikrodilucijsko metodo določali minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) žolčnih soli in detergentov (natrijevega deoksiholata, natrijevega dodecil sulfata), ter vpliv inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk na odpornost 20 izolatov proti žolčnim solem in omenjenim detergentom bakterij rodu <i>Campylobacter</i> iz hrane, vode in humanih kliničnih vzorcev. Izmerjene vrednosti MIC so se gibale od 16 mg/ml do >64 mg/ml za žolčne soli, od 2 mg/ml do >64 mg/ml za Na deoksiholat ter od 256 µg/ml do 512 µg/ml za Na dodecil sulfat. V primeru žolčnih soli in Na deoksiholata so bile vrednosti MIC bistveno višje kot tiste, ki jim je <i>Campylobacter</i> izpostavljen v črevesju. Od 20 testiranih izolatov na Na dodecil sulfat jih je bilo 65 % visoko odpornih ($MIC \geq 512 \mu\text{g/ml}$), 35 % pa odpornih ($256 \leq MIC \leq 512 \mu\text{g/ml}$). Drugi cilj diplomskega dela je bil ugotoviti, v kolikšni meri inhibitorji izlivnih črpalk prispevajo k večji občutljivosti bakterij rodu <i>Campylobacter</i> na omenjene protimikrobne spojine. Kot inhibitorja smo preizkusili fenilalanilarginin-β-naftilamid (PAßN) s koncentracijo 20 µg/ml in 1-(1-naftilmetil)-piperazin (NMP) s koncentracijo 80 µg/ml. Kot gojišče smo uporabili tekoče gojišče Mueller-Hinton bujon (MHB), kot trdno gojišče pa ogljeni cefoperazon deoksiholat agar (CCDA). Princip merjenja vrednosti MIC temelji na reakciji redukcije resazurina v resorufin, ki služi kot merilo metabolične aktivnosti bakterijskih celic, ki jo določamo z dodajanjem reagenta CellTiter-Blue® in merjenjem fluorescentnega signala s čitalcem mikrotitrskih ploščic. Ugotovili smo, da dodatek inhibitorjev izlivnih črpalk pomembno vpliva na povečanje občutljivosti sevov na žolčne soli in detergenta. Učinek inhibitorja je odvisen od vrste in koncentracije uporabljenega inhibitorja ter vrste in odpornosti testiranih sevov. Na testiranih izolatih se je inhibitor NMP izkazal za učinkovitejšega od PAßN.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
 DC UDC 579.24+579.26:577.18:615.33(043)=163.6
 CX pathogens/*Campylobacter*/bacterial resistance/resistance on bile salts/ bile salts/sodium deoxycholate/sodium dodecyl sulfate/ inhibitors of efflux pumps/PABN/NMP/
 AU KOSMAČ, Jasna
 AA SMOLE MOŽINA, Sonja (supervisor)/ABRAM, Veronika (reviewer)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
 PY 2008
 TI INFLUENCE OF EFFLUX PUMP INHIBITORS ON ACTIVITY OF BILE SALTS AGAINST *Campylobacter*
 DT Graduation thesis (University studies)
 NO XI, 59 p., 15 tab., 21 fig., 70 ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB In this study we have determined minimum inhibitory concentration (MIC) of bile salts and detergents (sodium deoxycholate, sodium dodecyl sulfate) and effect of efflux pump inhibitors on activity of bile salts and the mentioned detergents against 20 food, water and human clinical *Campylobacter* isolates using broth microdilution method. We determined MIC values of bile salts in the range from 16 mg/ml to >64 mg/ml, from 2 mg/ml to >64 mg/ml of sodium deoxycholate and from 256 µg/ml to >512 µg/ml of sodium dodecyl sulfate. Regarding the results, the isolates were extremely resistant to bile salts and sodium deoxycholate. In addition, 65 % of the tested isolates were high-level resistant (HLR), 35 % of them were resistant (R) to sodium dodecyl sulfate. The second goal of this study was to determine the level of contribution of efflux pump inhibitors on sensitivity of bacteria on the above antimicrobials. We tested fenilalanilarginin-β-naftilamid (PABN) with concentration 20 µg/ml and 1-(1-naftilmetil)-piperazin (NMP) with concentration 80 µg/ml as efflux pump inhibitors. All tested cultures were cultivated in Mueller-Hinton bujon (MHB) liquid medium and on charcoal cefoperazone deoxycholate agar (CCDA) plates. The metabolic activity of the bacterial cells was determined by using CellTiter-Blue® reagent and reduction of resazurin to resorufin, which was detected with a fluorescence detector. We were able to confirm that efflux pump inhibitors play an important role in increased susceptibility (decreased resistance) of the tested antimicrobials. The effect of the inhibitors depended on a type and concentration of an inhibitor used, tested strain and its resistance. Both inhibitors used in the mentioned concentration had good effect on reducing MIC values. Inhibitor NMP proved to have greater effect on reducing MIC values than PABN.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XI
1 UVOD	1
1.1 CILJI IN DELOVNE HIPOTEZE DIPLOMSKE NALOGE.....	2
1.1.1 Cilji diplomske naloge.....	2
1.1.2 Delovne hipoteze.....	2
2 PREGLED OBJAV.....	3
2.1 ZNAČILNOSTI BAKTERIJ RODU <i>Campylobacter</i>.....	3
2.1.1 Značilnosti bakterij rodu <i>Campylobacter</i>	3
2.1.2 Epidemiologija, patogeneza in zdravljenje bolezni.....	4
2.1.3 Incidenca in prevalenca kampilobaktrov.....	5
2.1.4 Incidenca odpornih sevov.....	5
2.1.5 Preventiva.....	6
2.2 ŽOLČNE SOLI KOT NARAVNA PROTIMIKROBNA SNOV	6
2.2.1 Sestava in vloga žolča in žolčnih soli.....	6
2.2.2 Sinteza in izločanje žolča ter žolčnih soli.....	8
2.2.3 Protimikrobna aktivnost žolča.....	10
2.2.4 Detergenti.....	11
2.2.4.1 Natrijev deoksiholat (NaDC).....	11
2.2.4.2 Natrijev dodecil sulfat (SDS).....	12
2.3 RAZVOJ BAKTERIJSKE ODPORNOSTI NA ŽOLČNE SOLI IN DETERGENTE	12
2.3.1 Mehanizmi odpornosti bakterije <i>Campylobacter</i> spp.....	13
2.3.1.1 Povečana odpornost zaradi sinteze lipopolisaharidov in proteinov.....	13
2.3.1.2 Povečana odpornost in membranske izlivne črpalke.....	14
2.3.1.3 Membranske izlivne črpalke pri kampilobaktirih.....	16
2.3.2 Inhibicija izlivnih črpalk.....	17
2.4 METODE UGOTAVLJANJA ODPORNOSTI BAKTERIJ RODU <i>Campylobacter</i> NA ŽOLČNE SOLI IN DETERGENTE	19

2.4.1 Metoda difuzije v agarju.....	20
2.4.2 Dilucijske metode.....	21
2.4.2.1 Dilucijska metoda v agarju	21
2.4.2.2 Mikrodilucijska metoda v bujonu.....	21
2.4.3 Metode z uporabo plošč z gradientom.....	22
2.4.4 Metode z uporabo spiralne cepitve plošč	23
2.4.5 Inhibicijske krivulje.....	23
3 MATERIAL IN METODE	24
3.1 POTEK DELA.....	24
3.2 MATERIAL.....	25
3.2.1 Mikroorganizmi.....	25
3.2.1.1 Mikrobiološka gojišča	25
Agar CCDA	25
Tekoče gojišče Mueller Hinton bujon – MHB.....	26
3.2.2 Priprava raztopin žolčnih soli in detergentov	26
3.2.2.1 Žolčne soli (SIGMA-ALDRICH CO.)	26
3.2.2.2 Natrijev deoksiholat (SIGMA- ALDRICH CO.).....	26
3.2.2.3 Natrijev dodecil sulfat (INVITROGEN)	27
3.2.3 Priprava inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk	27
3.2.3.1 Inhibitor PAβN (SIGMA-ALDRICH CO.)	27
3.2.3.2 Inhibitor NMP (Chess, Mannheim, Nemčija).....	27
3.2.4 Priprava reagentov, raztopin in ostalih dodatkov	27
3.2.4.1 Fiziološka raztopina.....	27
3.2.4.2 Barvilo resazurin CellTiter-Blue® (Promega Corporation)	27
3.2.5 Laboratorijska oprema.....	28
3.3 METODE DELA.....	28
3.3.1 Revitalizacija kultur	28
3.3.2 Priprava inokuluma	28
3.3.3 Določanje koncentracije celic v inokulumu	29
3.3.4 Mikrodilucijska metoda v bujonu.....	30
3.3.4.1 Priprava koncentracij žolčnih soli in detergentov.....	30
3.3.4.2 Priprava kulture	30
3.3.4.3 Princip in izvedba metode	31
3.3.4.4 Določitev živosti bakterijskih celic.....	34
4 REZULTATI.....	36
4.1 ODPORNOST BAKTERIJ <i>Campylobacter</i> NA ŽOLČNE SOLI IN DETERGENTE	37
4.2 TESTIRANJE VPLIVA RAZLIČNIH KONCENTRACIJ INHIBITORJEV NA VREDNOST MIC KOT MERILO ODPORNOSTI SEVOV <i>Campylobacter</i> NA ŽOLČNE SOLI IN DETERGENTE	38
4.3 ODPORNOST BAKTERIJ <i>Campylobacter</i> NA ŽOLČNE SOLI IN DETERGENTE BREZ IN Z DODATKOM INHIBITORJEV	39
4.3.1 Žolčne soli	39
4.3.2 Natrijev deoksiholat	41
4.3.3 Natrijev dodecil sulfat	43
4.4 RELATIVNA UČINKOVITOST INHIBITORJEV PABN IN NMP PRI ZMANJŠANJU ODPORNOSTI PROTI ŽOLČNIM SOLEM IN DETERGENTOM	45

4.5 PRIMERJAVA RELATIVNE UČNIKOVITOSTI (U) INHIBITORJEV PAŽN IN NMP NA ZMANJŠANJE ODPORNOSTI NA ŽOLČNE SOLI IN ERITROMICIN	46
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	47
5.1 RAZPRAVA	47
5.1.1 Razlogi in posledice prisotnosti odpornih izolatov kampilobaktrov pri pri ljudeh in živalih ter vpliv inhibitorjev na njihovo zmanjšanje	47
5.1.2 Relativni učinek inhibitorjev na občutljivost sevov na žolčne soli in detergente	49
5.1.2.1 Žolčne soli	50
5.1.2.2 Natrijev deoksiholat (NaDC)	50
5.1.2.3 Natrijev dodecil sulfat (SDS)	50
5.1.2.4 Primerjava relativne učinkovitosti inhibitorjev na zmanjšanje odpornosti na žolčne soli in eritromicin	51
5.1.3 Mehanizmi, vpleteni v navzkrižno odpornost sevov <i>Campylobacter</i>	51
5.2 SKLEPI	52
6 POVZETEK	53
7 VIRI	54
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Glavne sestavine in kemijske karakteristike žolča (Begley in sod., 2005)	7
Preglednica 2: Sestava osnovnega medija za agar CCDA	25
Preglednica 3: Sestava dodatka za selektivnost CCDA Selective Supplement	25
Preglednica 4: Sestava osnovnega medija za MHB	26
Preglednica 5: Oznaka vdolbinic v mikrotitrski ploščici in njihova vsebina	32
Preglednica 6: Prikaz mikrotitrške plošče po končanem dodajanju reagentov in kulture	33
Preglednica 7: Zbirna preglednica vrednosti MIC (mg/ml, µg/ml) kot merila odpornosti sevov <i>Campylobacter</i> na žolčne soli in detergenta	37
Preglednica 8: Zbirna preglednica vrednosti MIC (mg/ml) kot merila odpornosti sevov rodu <i>Campylobacter</i> na žolčne soli v prisotnosti oz. odsotnosti inhibitorjev PAβN in NMP (µg/ml) različnih koncentracij	38
Preglednica 9: Zbirna preglednica vrednosti MIC (mg/ml) kot merila odpornosti sevov rodu <i>Campylobacter</i> na natrijev deoksiholat v prisotnosti oz. odsotnosti inhibitorjev PAβN in NMP (µg/ml) različnih koncentracij	38
Preglednica 10: Zbirna preglednica vrednosti MIC (µg/ml) kot merila odpornosti sevov rodu <i>Campylobacter</i> na natrijev dodecil sulfat v prisotnosti oz. odsotnosti inhibitorjev PAβN in NMP (µg/ml) različnih koncentracij	38
Preglednica 11: Zbirna preglednica vrednosti MIC (mg/ml) kot merila odpornosti sevov rodu <i>Campylobacter</i> na žolčne soli v prisotnosti oz. odsotnosti inhibitorjev PAβN in NMP	40
Preglednica 12: Zbirna preglednica vrednosti MIC (mg/ml) kot merila odpornosti sevov rodu <i>Campylobacter</i> na natrijev deoksiholat v prisotnosti oz. odsotnosti inhibitorjev PAβN in NMP	42
Preglednica 13: Zbirna preglednica vrednosti MIC (µg/ml) kot merila odpornosti sevov rodu <i>Campylobacter</i> na natrijev dodecil sulfat v prisotnosti oz. odsotnosti inhibitorjev PAβN in NMP	44
Preglednica 14: Zbirna preglednica relativne učinkovitosti (U) inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk na zmanjšano odpornost na žolčne soli in oba detergenta	45
Preglednica 15: Zbirna preglednica primerjave relativne učinkovitosti (U) inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk na zmanjšano odpornost na žolčne soli in eritromicin	46

KAZALO SLIK

Slika 1: <i>Campylobacter</i> pod elektronskim mikroskopom (Cordemans, 2008)	3
Slika 2: Strukturna formula žolčnih soli (Sigma-Aldrich, 2008a)	7
Slika 3: Anatomski prikaz mesta sinteze in izločanja žolča (Selby, 2008)	9
Slika 4: Enterohepatični cikel žolčnih soli (Voliwiler in sod., 2008)	10
Slika 5: Strukturna formula natrijevega deoksiholata (Sodium deoxycholate, 2008)	12
Slika 6: Strukturna formula natrijevega dodecil sulfata (Sodium lauril sulfate, 2008)	12
Slika 7: Model tridelne membranske izlivne črpalke. Rdeča barva označuje protein na zunanji membrani (CmeC), zelena notranji membranski transportni protein (CmeB), modra pa periplazemski fuzijski protein (CmeA) (Piddock, 2006)	16
Slika 8: Strukturna formula inhibitorja membranskih izlivnih črpalk PABN (Sigma-Aldrich, 2008b)	18
Slika 9: Strukturna formula inhibitorja membranskih izlivnih črpalk NMP (Sigma-Aldrich, 2008c)	19
Slika 10: Mikrotitrna ploščica	22
Slika 11: Shema poskusa diplomskega dela	24
Slika 12: Rast kolonij bakterij <i>Campylobacter</i> na selektivnem gojišču CCDA	29
Slika 13: Redukcija resazurina (Riss in Moravec, 2003)	34
Slika 14: Dodajanje barvila CellTiter-Blue® v vdolbinice na mikrotitrski plošči	35
Slika 15: Prikaz mikrotitrne plošče po končani analizi. (Rdečkasto-roza obarvane vdolbinice kažejo, da so v njih žive mikrobne celice, ki so bile sposobne reducirati resazurin v resorufin. Nežive mikrobne celice so v vdolbinicah, ki so temno-vijolične. V teh vdolbinicah barvilo ostane iste barve kot pred inkubacijo. MIC predstavlja zadnjo vdolbinico v koloni, ki ni spremenila barve. Dodane reagentne in koncentracije spojin prikazujeta preglednici 5 in 6).	35
Slika 16: Primer grafičnega določanja vrednosti MIC žolčnih soli pri sevu <i>C. coli</i> 137	39
Slika 17: Primer grafičnega določanja vrednosti MIC žolčnih soli pri sevu <i>C. coli</i> 2235	39

Slika 18: Primer grafičnega določanja vrednosti MIC NaDC pri sevu <i>C. coli</i> VC 110722	41
Slika 19: Primer grafičnega določanja vrednosti MIC NaDC pri sevu <i>C. coli</i> GC 154	41
Slika 20: Primer grafičnega določanja vrednosti MIC SDS pri sevu <i>C. coli</i> VC 11076	43
Slika 21: Primer grafičnega določanja vrednosti MIC SDS pri sevu <i>C. coli</i> VC 110725	43

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ABC	(angl. ATP binding cassette)
ATP	adenozintrifosfat
ATCC	(angl. American Type Culture Collection)
bp	bazni par
CCCP	karbonil cianid m-klorofenilhidrazon
CCDA	(angl. charcoal cefoperazone desoxycholate agar), ogljeni cefoperazon deoksiholat agar
CFU	(angl. colony forming unit), število kolonijskih enot
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EFSA	(angl. European Food safety Authority), Evropska agencija za varnost hrane
EPI	(angl. efflux pump inhibitor), inhibitorji membranskih izlivnih črpalk
HACCP	(angl. hazard analysis critical control point) analiza tveganja in ugotavljanja kritičnih točk
HLR	(angl. high level resistance), visoko odporni sevi
kbp	kilobazni par
MATE	(angl. multidrug and toxic compound extrusion)
MDR	(angl. multidrug resistance), večkratna odpornost proti protimikrobnim snovem
MHB	Mueller-Hinton bujon
MFS	(angl. major facilitator superfamily)
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija
NaDS	natrijev deoksiholat
NMP	1-(1-naftilmetil)-piperazin
PAβN	fenilalanilarginin-β-naftilamid
PCR	(angl. polymerase chain reaction), verižna reakcija s polimerazo
RNA	ribonukleinska kislina
RND	(angl. resistance nodulation cell division)
RFU	(angl. relative fluorescence units), relativne enote fluorescence
SDS	natrijev dodecil sulfat
SMR	(angl. small multidrug resistance), majhna večkratna odpornost
U	učinkovitost inhibitorja PAβN
V	volumen
μg	mikrogram (10^{-6} g)

1 UVOD

Bakterije rodu *Campylobacter* so patogene bakterije, ki so poznane kot ene izmed najpogostejših povzročiteljev akutnih gastroenteritisov v svetu (Mishu Allos, 2001). Kampilobaktri predstavljajo del normalne črevesne flore številnih ptic in domačih ter divjih živali, sposobne so celo kolonizacije njihovih sečil in rodil (Ketley, 1997; Mishu Allos, 2001). Bolezni, ki jih kampilobaktri povzročajo, se imenujejo kampilobakterioze. To so zoonoze, ki so razširjene po vsem svetu. V Sloveniji je *Campylobacter* na drugem mestu med bakterijskimi povzročitelji diareje pri ljudeh (Andlovic, 2002; Epidemiološko-spremljanje..., 2008).

Rezervoar kampilobaktrov je črevesje perutnine, goveda in prašičev. Najbolj pogost vzrok okužbe s kampilobaktri pri ljudeh je prenos povzročitelja iz gastrointestinalnega trakta živali med prirejo živali ali klanjem. Prav tako se lahko okužimo z zaužitjem hrane, ki je bila navzkrižno kontaminirana (oprema, voda) s povzročitelji (van Vliet in Ketley, 2001). Ocene kažejo, da je več kot 80 % okužb ljudi posledica uživanja kontaminiranih in premalo obdelanih živil, še posebej perutnine (EFSA, 2007a; Epidemiološko-spremljanje..., 2008).

Glavna povzročitelja okužb iz rodu *Campylobacter* sta *Campylobacter jejuni*, ki predstavlja 80 % do 85 % vseh okužb in *C. coli*, ki predstavlja 10 % do 15 % vseh okužb (Moore in sod., 2005). Okužba prebavil s to bakterijo poteka kot vodena driska, ki jo spremlja v večini primerov visoka vročina, trebušni krči in slabo počutje. Inkubacijska doba traja od enega dne do enega tedna. V hujši obliki bolezni vodena driska preide v krvavo, v blatu se pojavijo tudi levkociti. Komplikacije nastopijo zelo redko (Ketley, 1997; Mishu Allos, 2001).

Sodobni načini proizvodnje in distribucije živil in živilskih izdelkov so zelo stresni za bakterije. Zaradi sposobnosti preživetja se le te prilagajajo na stresne razmere tako, da razvijajo posebne mehanizme zaznavanja in prilagajanja okoljskim dejavnikom, ki imajo za posledico večanje bakterijske odpornosti. Odpornost bakterijskih izolatov iz živil na telesu lastno obrambo (žolčne soli) in antibiotike je izrazito nezaželjena, saj to vodi do večje incidence kampilobakterioz kot tudi v neučinkovito zdravljenje okužb. Povečana bakterijska odpornost lahko predstavlja tudi tveganje prenosa odpornosti na druge bakterije. Literatura navaja, da odpornost bakterij *Campylobacter* proti protimikrobnim snovem različnega izvora narašča, kar je posledica vedno večje porabe antibiotikov, tako v humani kot veterinarski medicini.

Širok spekter dejavnikov je povzročil, da so bakterije, tudi kampilobaktri, razvile različne mehanizme, ki povečajo njihovo odpornost v boju s protimikrobnimi snovmi različnega izvora. Naše zanimanje so pritegnile novejšje študije, ki poročajo, da pri *C. jejuni* in *C. coli* igrata izlivne črpalke aktivno vlogo pri razvoju intrinzične in tudi pridobljene odpornosti proti žolčnim solem in makrolidnim antibiotikom. Kot protimikrobna sredstva smo uporabili žolčne soli, ki predstavljajo lastno obrambo telesa pred mikroorganizmi in detergenta natrijev deoksiholat ter natrijev dodecil sulfat. Detergenta smo testirali zato, da bi preverili, če imata podobna kemijska sestava detergenta in žolčnih soli tudi podoben vpliv na učinkovitost navedenih spojin. V eksperimentalni del smo vključili 20 izolatov bakterij *C. jejuni* in *C. coli* iz živil, vode ali humanih kliničnih vzorcev, ki so se v predhodnih raziskavah izkazali kot zanimivi, saj so vsi izolati imeli povečano odpornost proti eritromicinu. Za določitev

vrednosti MIC smo uporabili mikrodilucijsko metodo v bujonu v kombinaciji z reagentom CellTiter-Blue[®]. Za odčitavanje fluorescentnega signala smo uporabili avtomatizirani čitalec mikrotitrskih plošč.

1.1 CILJI IN DELOVNE HIPOTEZE DIPLOMSKE NALOGE

1.1.1 Cilji diplomske naloge

Pred začetkom eksperimentalnega dela smo si zadali naslednje cilje:

- o Z mikrodilucijsko metodo izbranim sevom kampilobaktrov določiti vrednosti MIC za žolčne soli in detergenta (natrijev deoksiholat ter natrijev dodecil sulfat) in s tem pridobiti podatke o odpornosti na omenjene spojine pri izbranih sevih *Campylobacter jejuni* in *C. coli*;
- o Istim izbranim sevom določiti vrednosti MIC ob prisotnosti subinhibitorne koncentracije inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk PAβN in NMP;
- o Z analizo dobljenih rezultatov sklepati na mehanizme, vpletene v odpornost sevov *Campylobacter*.

1.1.2 Delovne hipoteze

Predpostavili smo:

- o Pri izolatih *Campylobacter coli* in *C. jejuni* se pogosto pojavlja odpornost proti žolčnim solem in detergentom;
- o Dodatek inhibitorja membranskih izlivnih črpalk PAβN in NMP vpliva na občutljivost bakterij *Campylobacter coli* in *C. jejuni* proti žolčnim solem in detergentom, vendar je ta učinek predvidoma različen pri posameznih spojinah.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZNAČILNOSTI BAKTERIJ RODU *Campylobacter*

2.1.1 Značilnosti bakterij rodu *Campylobacter*

Rod *Campylobacter* (družina Campylobacteraceae) so tanke, nesporogene, po Gramu negativne zoonotske bakterije. Njihova oblika je značilno spiralno zavita ali ukrivljena z enopolarnimi ali bipolarnimi bički, kar jim omogoča dobro gibljivost. Bakterije merijo v dolžino 1,5-6 μm , v širino pa 0,2-0,5 μm (Ketley, 1997). Na gojiščih tvorijo sive, ploščate, izbočene kolonije nepravilnih oblik (Snelling in sod., 2005).



Slika 1: *Campylobacter* pod elektronskim mikroskopom (Cordemans, 2008)

Kljub veliki razširjenosti teh bakterij rod *Campylobacter* obstaja šele od leta 1973, ko so jih izolirali iz fečesa. S spoznavanjem pogojev rasti in uporabo selektivnih medijev za rast so šele sredi osemdesetih let prejšnjega stoletja ugotovili, da so ravno kampilobaktri eni od najpogostejših vzrokov diareje v svetu (Mishu Allos, 2001; Wassenaar in Blaser, 1999). Kampilobaktri za svojo rast in razvoj potrebujejo specifične pogoje. So mikroaerofilne bakterije, zato jim najbolj ustreza atmosfera, sestavljena iz 3-15 % O_2 in 3-5 % CO_2 . Poleg tega so termofili z optimalno temperaturo za rast 42 °C, kar si lahko razlagamo kot adaptacijo na temperaturo črevesja toplokrvnih živali in ptic (Ketley, 1997). Rastejo razmeroma počasi, saj je za izolacijo iz fečesa potrebna inkubacija 72-96 ur, iz krvi pa še daljša (Mishu Allos, 2001). Kampilobaktri živijo v simbiozi z gostiteljem. Najpogostejši rezervoar so prebavila in sečila, lahko pa tudi rodila domačih in divjih živali ter človeka (van Vliet in Ketley, 2001). Razmeroma majhen genom bakterij odraža njihovo potrebo po kompleksnem mediju za rast,

nezmožnost fermentacije ogljikovih hidratov ter razgradnje kompleksnih substratov (Ketley, 1997).

2.1.2 Epidemiologija, patogeneza in zdravljenje bolezni

Kampilobaktri so znani povzročitelji črevesnih bolezni pri toplokrvnih živalih in ljudeh. Bolezen, ki jo povzročajo, imenujemo kampilobakterioza. Črevesne okužbe povzročajo le gibljivi sevi, ki so se sposobni pritrditi na črevesno sluznico. Najpogostejša povzročitelja okužb sta *C. jejuni*, kateri predstavlja 80 % do 85 % vseh okužb in *C. coli*, ki pa predstavlja 10 % do 15 % vseh okužb (Moore in sod., 2005). Skupaj sta odgovorna kar za 80-90 % vseh infekcij s kampilobaktri, preostali delež pa predstavljajo *C. upsaliensis*, *C. hyointestinalis* in *C. lari* (Ketley, 1997). Vir okužbe so bolne živali in ljudje, lahko pa tudi klicenosci brez vidnih simptomov bolezni (Andlovic, 2002).

Kampilobaktri spadajo v prvo ekološko-epidemiološko skupino mikroorganizmov, saj se prenašajo s hrano, a se v njej ne razmnožujejo, ampak jo uporabljajo samo kot vektor prenosa. Minimalna infektivna doza (MID) je zelo nizka, saj je za razvoj bolezni dovolj 500-800 organizmov (Black in sod., 1988).

Najbolj pogost vzrok okužbe s kampilobaktri pri ljudeh je prenos povzročitelja iz gastrointestinalnega trakta živali med prirejo ali klanjem živali z uporabo kontaminirane opreme ali vode na živila in preko zaužitja le-teh na človeka. V izogib okužbi je zato ključnega pomena pravilno izvajanje sistema HACCP. Najpomembnejše kritične kontrolne točke v procesu so higiena oseb, opreme in vode pri zakolu in distribuciji mesa, preprečevanje navzkrižne kontaminacije in pravilna toplotna obdelava mesa. Samo dosledno izvajanje sistema HACCP in izobraževanje zaposlenih zagotavlja potrošniku mikrobiološko neoporečen izdelek in nenazadnje ščiti proizvajalca (van Vliet in Ketley, 2001).

Kampilobaktri z zaužitjem okužene hrane ali vode vstopajo v prebavni trakt gostitelja. Ob hitrem prehodu skozi želodec dosežejo spodnji del ileuma in kolon. V naslednji stopnji pride do adhezije na površino epitelnih celic. S hitrim gibanjem bakterijska celica predre in kolonizira mukozni sloj, ki prekriva črevesne epitelne celice ter z invazivnostjo in z izdelovanjem toksinov onemogoči delovanje epitelnih celic črevesja (Ketley, 1997). Zaradi infekcije je površina sluznice v jejunumu, ileumu in kolonu uničena. Sluznica je vneta in infiltrirana z nevrofilci (Andlovic, 2002). Osnovni pogoj za uspešno infekcijo so številni virulentni dejavniki. Najpomembnejši dejavnik je gibljivost zaradi prisotnosti bičkov, ki bakteriji pomagajo premagati peristaltična gibanja v prebavilih in igrajo pomembno vlogo pri invaziji v epitelne celice. Poleg tega se tvorijo termolabilni enterotoksini in citotoksini. Pomembno vlogo igra tudi lipid A, komponenta lipopolisaharidnega sloja v celični steni Gram negativnih bakterij, ki ima endotoksično aktivnost (Wassenaar in Blaser, 1999).

Inkubacijska doba bolezni traja od enega dneva do enega tedna, običajno 24 do 48 ur. Patogene bakterije povzročajo vodno diarejo in/ali hemoragični kolitis s spremljajočo bolečino v trebuhu in vročino (Mamelli in sod., 2003). Okužba s kampilobaktri se najpogosteje izraža kot vodena diareja, ki v najhujšem primeru lahko preide v krvavo diarejo (Wassenaar in Blaser, 1999). Pri večini bolnikov bolezni mine po enem tednu, običajno zadostuje le simptomatično zdravljenje z nadomeščanjem tekočine in elektrolitov. V primeru

pojava krvave diareje pa je nujno zdravljenje z uporabo antibiotikov (Andlovic, 2002). Bolezenske komplikacije so redke, najbolj pogost je t.i. Guillain-Barréjev sindrom, akutna bolezen perifernega živčnega sistema, ki lahko vodi v odpoved dihalne miškulature in posledično smrt. Zdravljenje z antibiotiki se obvezno uporablja pri bolnikih z oslabljenim imunskim sistemom, saj je pri njih velika nevarnost pojava bakteriemije, katere smrtnost je zelo visoka. Najpogostejše uporabljeni antibiotiki za zdravljenje bolezni so makrolidi (zlasti eritromicin) in fluorokinoloni (Mamelli in sod., 2003).

2.1.3 Incidenca in prevalenca kampilobaktrov

Znotraj rodu *Campylobacter* vrsti *Campylobacter jejuni* in *C. coli* povzročata kar 80-90 % kampilobakterioz. Kampilobakterioza je ena izmed najbolj pogostih bakterijskih črevesnih nalezljivih bolezni, v Sloveniji zaseda drugo mesto po pogostosti takoj za salmonelo. Glavni vir okužbe s kampilobaktri je okuženega perutninskega meso (EFSA, 2007a; Epidemiološko-spremljanje,... 2008).

Iz poročila Evropske agencije za varnost hrane (EFSA, 2007a) je bilo razvidno, da je bilo v letu 2006 v 21 državah EU prijavljenih 175.561 humanih kampilobakterioz, kar to bolezen postavlja na prvo mesto med zoonozami, prenosljivimi s hrano. Incidenca bolezni je 46,1 obolelih na 100.000 prebivalcev. Največ okužb je bilo evidentiranih v poletnih mesecih. Med obolelo populacijo je veliko otrok do 4 leta. Glede na statistične podatke se je povečalo tudi število okužb med živalmi. Statistični podatki opozarjajo tudi na povečevanje odpornosti kampilobakterjev na različne antibiotike (EFSA, 2007a).

Najnovejši statistični podatki, ki jih je objavil Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije (IVZ RS) leta 2008, pravijo, da je bilo v Sloveniji leta 2007 evidentiranih 1075 primerov enteritisov, povzročenih z bakterijo *Campylobacter*, od tega kar 984 (91 %) s *C. jejuni*. Incidenca bolezni je 53,72 obolelih na 100.000 prebivalcev. V primerjavi z letom 2006 se je število kampilobakterioz povečalo za 12 %. Obolevnost je bila najvišja pri otrocih in mladostnikih. Število obolelih je naraslo v poletnih mesecih, to je od junija do septembra. Kot glavne dejavnike tveganja IVZ RS izpostavlja pripravo in uživanje piščančjega mesa, uživanje svinjine s kostmi, stik s perutnino, uživanje nepasteriziranega mleka (Epidemiološko-spremljanje,...2008).

2.1.4 Incidenca odpornih sevov

Zdravstveni inšpektorat Republike Slovenije poroča o sorazmerno visokem deležu vzorcev mesa, okuženih s kampilobaktri. Leta 2004 je bilo 34 % vzorcev pozitivnih na *C. jejuni*, leta 2007 že 63 % vzorcev, od tega 49 % na *C. jejuni* (Epidemiološko-spremljanje,... 2008). Iz poročila Evropske agencije za varnost hrane (EFSA, 2007a) lahko vidimo, da je bilo v letu 2006 v 21 državah EU z eritromicinom zdravljenih 5.202 humanih kampilobakterioz. Pri zdravljenju so evidentirali 3,4 % odpornih, 2,6 % srednje odpornih in 93,6 % občutljivih izolatov na eritromicin. V Sloveniji je bilo 69 primerov humanih kampilobakterioz v letu 2006 zdravljenih z eritromicinom. Med njimi sta bila samo dva primera odporna na zdravljenje z eritromicinom (EFSA, 2007b). Za leto 2007 podatkov še ni na voljo. Statistika kaže tudi na porast odpornih izolatov živalskega izvora. To še posebej velja za svinjino, saj se

tu še vedno uporablja največ antibiotikov. Večina humanih okužb s kampilobaktri je povezana s hrano, saj ocene kažejo, da je več kot 80 % okužb ljudi povzročenih z uživanjem kontaminiranih ali premalo toplotno obdelanih živil, še posebej perutnine (EFSA, 2007a; EFSA, 2007b).

2.1.5 Preventiva

Statistični podatki kažejo, da incidenca kampilobakterioz stalno narašča, zato je potrebno poudarjati pomen preventive in ozaveščanja ljudi, saj lahko v izogib infekciji največ storimo sami. Bolezen se večinoma pojavlja sporadično in je sezonske narave. Zaradi masovne proizvodnje in distribucije hrane se je v industriji uveljavil HACCP sistem, ki se je izkazal za učinkovitega pri obvladovanju različnih infekcij. Največji problem še vedno predstavljajo posamezniki in njihove navade. Osnovnega pomena za zaježitev infekcij je osebna higiena pri rokovanju s hrano in preprečevanje navzkrižnih kontaminacij, zlasti preko kuhinjskih desk. Osebe z diarejo v času bolezni ne smejo rokovati s hrano. Infekciji so najbolj izpostavljeni ljudje, ki potujejo v tuje dežele, majhni otroci, nosečnice, starejši ljudje in osebe z oslabljenim imunskim sistemom (Ketley, 1997).

2.2 ŽOLČNE SOLI KOT NARAVNA PROTIMIKROBNA SNOV

Da bi preživel razmere v prebavnem traktu človeka, morajo mikroorganizmi premagati številne okoljske ekstreme, ki vladajo v prebavilih. Variiranje pH vrednosti, nizka koncentracija kisika, pomanjkanje hranil in povišana osmolarnost predstavljajo mikroorganizmom potencialno nevarnost za preživetje (Begley in sod., 2005).

Žolč je prebavni izloček, ki igra pomembno vlogo pri emulgiranju in topnosti lipidov. Sposoben je vplivati na fosfolipide in proteine, ki sestavljajo celično membrano in s tem porušiti celično homeostazo. Sposobnost toleriranja žolča, ki so jo razvile patogene bakterije in komezali, naj bi imele velik vpliv na preživetje in posledično kolonizacijo prebavnega trakta (Begley in sod., 2005).

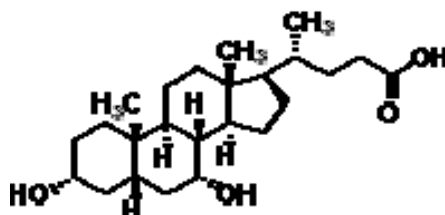
2.2.1 Sestava in vloga žolča in žolčnih soli

Žolč je rumeno-zelena vodna raztopina anorganskih in organskih spojin, od katerih prevladujejo žolčne kisline, holesterol, fosfolipidi (pretežno fosfatidilholin) in pigment biliverdin. V žolč se izločajo imunoglobulin A in mukus, ki preprečujeta bakterijsko rast in adhezijo in endogene substance kot so lipovitamini, v vodi topni vitamini (B₁₂, folna kislina, piridoksin), hormona progesteron in estrogen ter kortikosteroidi (Begley in sod., 2005).

Preglednica 1: Glavne sestavine in kemijske karakteristike žolča (Begley in sod., 2005).

SESTAVINE ŽOLČA	
Na ⁺ (mmol/l)	145
K ⁺ (mmol/l)	4
Cl ⁻ (mmol/l)	90
žolčne soli (mmol/l)	40
holesterol (mmol/l)	3
fosfolipidi (mmol/l)	7
suha snov (mg/ml)	20
osmolarnost (mOsm/l)	280
pH	7,5-8

Hidroksilne skupine (COOH) dajejo žolčnim kislinam hidrofilen značaj, steroidni ogljikov skelet pa hidrofoben značaj. Molekula žolčne kisline je zato amfipatska (slika 2). Za amfipatske molekule je značilno, da se v vodnih medijih lahko združijo v polimolekularne agregate, micela. Micela je sestavljena iz 4-50 molekul žolčnih kislin, odvisno od njihove zgradbe. V posebnih fizioloških pogojih se micela lahko transformirajo v mešane micela, ki so odgovorne za topnost holesterola v tankem črevesju (Fernández- Leyes in sod., 2007).



Slika 2: Strukturna formula žolčnih soli (Sigma-Aldrich, 2008a)

Žolč v telesu deluje kot biološki detergent, saj emulgira in topi maščobe. Poleg tega se z žolčem iz telesa odstranijo substance, ki se z urinom ne izločijo v zadostni meri zaradi slabe topnosti v njem.

Amfipatska narava žolčnim kislinam omogoča, da delujejo kot detergenti, saj razbijajo maščobne kroglice na drobne kapljice. Emulgacija poveča površino maščobe, ki tako postane bolj dostopna lipazam, ki sicer same ne morejo vstopiti v notranjost maščobne kroglice (Begley in sod., 2005).

Klinični pomen sinteze žolčnih soli v telesu lahko povzamemo v štirih točkah (King in Marchesini, 2008):

- sinteza žolčnih kislin in posledično izločanje v feces predstavlja glavni mehanizem za izločanje odvečnega holesterola iz telesa
- žolčne kisline in fosfolipidi topijo holesterol v žolču in tako preprečijo obarvanje holesterola v žolčniku
- kot emulgatorji pospešijo presnovo prehranskih triacilglicerolov

- pospešijo absorpcijo v maščobah topnih vitaminov

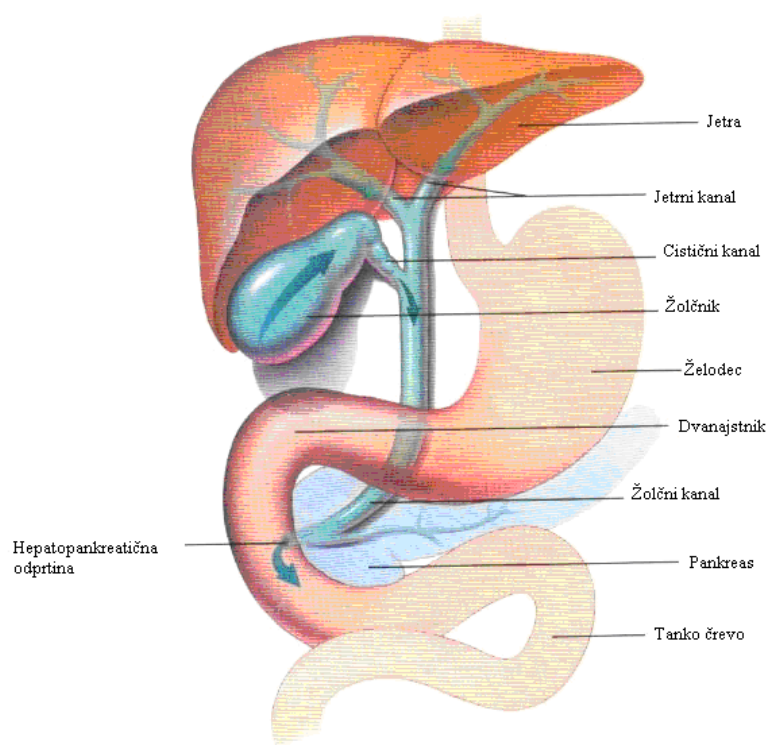
2.2.2 Sinteza in izločanje žolča ter žolčnih soli

Žolč se nastaja v jetrih, zbira se v žolčniku, po potrebi pa se sprošča v tanko črevo, kjer sodeluje v presnovi maščob. Najpomembnejša sestavina žolča so žolčne soli, ki so po kemijski zgradbi detergenti. Poleg presnove in absorpcije so žolčne soli pomembne tudi zaradi protimikrobne aktivnosti. Žolčne soli so amfipatske molekule z baktericidnim delovanjem, saj so sposobne razgraditi fosfolipidni sloj celične membrane, kar vodi v smrt celice. Za preživetje v prebavnem traktu so bakterije razvile številne mehanizme odpornosti na protibakterijsko aktivnost žolčnih soli (Gunn, 2000; Lin in sod., 2003).

Žolč se sintetizira v jetrnih celicah, t.i. hepatocitih in se izloča v tanke kanalčke, imenovane žolčni kanalikuli. Kanalikuli odteka v žolčne kanale, ki se spojijo v jetrne kanale. Žolč zapusti jetra skozi jetrni kanal, ki se združi s cističnim kanalom iz žolčnika, s katerim tvorita žolčni kanal. Ko žolč zapusti ta kanal, vstopi v dvanajstnik na spoju, ki ga regulira Oddijev sfinkter (slika 3). Žolč sodeluje pri emulgaciji maščob.

Žolčnik je vrečast organ, ki se kadar je poln, razširi in spominja na hruško. Žolčnik iz žolča odstrani vodo in elektrolite in ga zakisa s pomočjo Na^+ K^+ izmenjave. Žolčnik ni nujno potreben za izločanje žolča, pa vendar olajša njegovo shranjevanje in pripravo na presnovo maščob. V žolčnik vstopa samo polovica žolča in se tam koncentrira in shranjuje, preostala polovica pa žolčnik zaobide in vstopa v dvanajstnik ter se vključuje v enterohepatični cikel. Konjugirane in nekonjugirane žolčne kisline se absorbirajo s pasivno difuzijo vzdolž črevesja, z aktivnim transportom pa v spodnji del ileuma. Reabsorbirane žolčne kisline vstopijo v krvni obtok, od koder jih hepatociti ponovno izločijo v žolč. Učinkovitost absorpcije je 95 %, kar pomeni, da se s fecesom dnevno izloči 0,3-0,6 g žolčnih kislin. Izgube se kompenzirajo z sintezo žolčnih kislin v jetrih. Pri sesalcih in pticah odstranitev žolčnika ne povzroči motenj presnove ali malabsorpcije.

Ko želodčna kaša vstopa v tanko črevo, kisline in delno presnovljene maščobe stimulirajo sekrecijo hormonov sekretina in holecistokinina, ki sta odgovorna za sekrecijo in pretok žolča. Sekretin stimulira celice žolčnih kanalov da izločajo bikarbonat in vodo in tako povečajo volumen žolča. Holecistokinin (holecisto= žolčnik, kinin= gibanje) stimulira kontrakcijo žolčnika in žolčnih kanalov. Posledica tega je krčenje žolčnika, relaksacija Oddijevega sfinktra, zaradi katere se 80 % vsebine žolčnika sprosti v dvanajstnik (Begley in sod., 2005).



Slika 3:Anatomski prikaz mesta sinteze in sekrecije žolča (Selby, 2008)

Žolčne kisline predstavljajo približno 50 % organskih spojin, ki sestavljajo žolč. Biosinteza žolčnih kislin se začne z acetyl-CoA. V večjih stopnjah nastane holesterol in iz njega žolčne kisline, oziroma žolčne soli. Nastanejo v jetrih kot končni produkt v metabolizmu holesterola. Sinteza žolčnih kislin je glavni način odstranjevanja odvečnega holesterola iz telesa, ki pa nikakor ne more uravnovati presežka holesterola, ki ga v telo vnesemo zaradi nepravilne prehrane (Begley in sod., 2005).

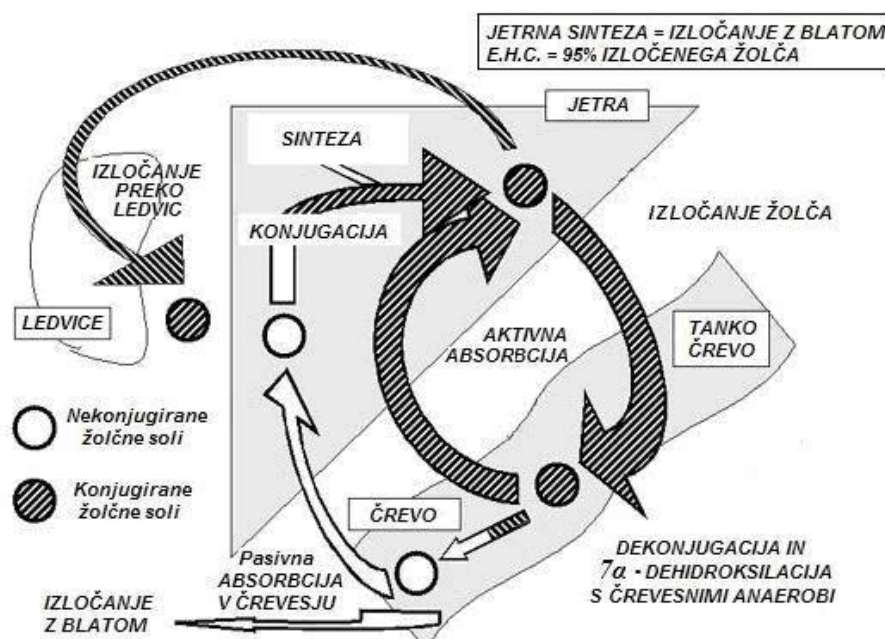
Prva stopnja v sintezi žolčnih soli je konverzija holesterola v primarni žolčni kislino, kenodeoksiholno kislino in holno kislino. Reakcijo katalizira encim 7 α -hidrolaza. Konverzija 7 α -hidroksiholesterola v žolčne kisline je večstopenjski proces (King in Marchesini, 2008).

Najbolj pogosti žolčni kislini, ki sestavljata humani žolč sta kenodeoksiholna (45%) in holna (31%) kislina. Sta primarni žolčni kislini, ki v črevesju reagirata z bakterijami in se pretvorita v sekundarni žolčni kislino deoksiholat (iz holata) in litholat (iz kenodeoksiholata). Tako obe primarni kot sekundarni žolčni kislini se reabsorbirajo v črevesju in po krvnem obtoku vrnejo nazaj v jetra (King in Marchesini, 2008).

V jetrih poteka konjugacija karboksilnih skupin primarnih in sekundarnih žolčnih kislin z amidnimi skupinami bodisi glicina ali tavrina. Konjugacija je pomembna zato, ker izboljša topnost žolčnih kislin v fiziološkem pH. V procesu konjugacije nastanejo glikokonjugati in tavrokongjugati, ki so v humanem žolču v razmerju 3:1. Ta proces mora potekati, še preden se žolčne kisline ponovno izločijo v žolčne kanalikule (Begley in sod., 2005).

Skozi žolčno cev se žolčne kisline prenesejo iz jeter v žolčnik, kjer se shranijo do uporabe (slika 3). Iz žolčnika se izločajo v tanko črevo, kjer sodelujejo pri emulgaciji maščob (King in Marchesini, 2008).

Po opravljeni nalogi se žolčne soli bodisi odstranijo iz telesa s fecesom kot sterkobilinogen (v manjši meri), večji del (95 %) pa jih črevo resorbira (urobilinogen) in vrne nazaj v jetra. Proces izločanja žolčnih kislin iz jeter v žolčnik, nato v tanko črevo, resorpcija v črevesju in vračanja nazaj v jetra imenujemo enterohepatični cikel (enterohepatični obtok- slika 4) (King in Marchesini, 2008; Voliwiler in sod., 2008).



Slika 4: Enterohepatični cikel žolčnih soli (Voliwiler in sod., 2008)

Na eni strani konjugiranje žolčnih kislin povečuje topnost, na drugi pa zmanjšuje pasivno absorpcijo žolčnih kislin v žolčnem traktu in tankem črevesju. Rezultat tega je velika izvenselična koncentracija žolča, ki pospešuje izločanje holesterola in je pomembna za olajšanje presnove maščob in absorpcijo. Velika izvenselična koncentracija žolčnih kislin inducira sekrecijo elektrolitov in vode, kar se klinično izraža kot diareja. Zmanjšana koncentracija žolčnih soli je posledica motenj v enterohepatičnem obtoku ali absorpciji. Kaže se kot motena topnost lipidov in vodi v malabsorpcijo. Poleg tega je žolč lahko prenasičen s holesterolom, kar vodi v nastanek žolčnih kamnov. To so kristalinične strukture, ki se tvorijo iz holesterol monohidrata in zmesi kalcijevih soli, žolčnih kislin, žolčnih pigmentov, proteinov, fosfolipidov in maščobnih kislin (Begley in sod., 2005).

2.2.3 Protimikrobna aktivnost žolča

Da žolč oziroma žolčne kisline v prvi vrsti delujejo na celične membrane, so potrdili z eksperimenti na eritrocitih. Dodatek žolča je povzročil hemolizo in glede na to, da eritrociti ne vsebujejo organelov, so sklepali, da je liza posledica poškodb membrane. Najpomembnejši dejavniki, ki določajo učinkovanje žolča na celične membrane, so koncentracija žolča, tip in struktura žolča, zgradba in sestava membrane (Begley in sod., 2005).

Velika koncentracija žolčnih soli lahko zlahka raztopi membranske lipide in povzroči razdružitev integralnih membranskih proteinov. Nizka koncentracija pa na drugi strani povzroči spremembo v integriteti membrane, zlasti spremembo prepustnosti in fluidnosti membrane, pa tudi hidrofobnosti (Begley in sod., 2005).

Vezava žolčnih kislin na membranske lipide je v korelaciji z njihovo hidrofobnostjo. Konjugirane žolčne kisline so pri fiziološkem pH popolnoma ionizirane in ostajajo na zunanji strani lipidnega dvosloja, razen, če imajo na voljo ustrezen transportni sistem, ki jim omogoči vstop v notranjost membrane. Nekongugirane žolčne kisline pa pasivno prehajajo skozi lipidni dvosloj celične membrane. Kako hiter je ta prehod je odvisno od števila hidroksilnih skupin. Dihidroksi žolčne kisline tako prehajajo hitreje kot trihidroksi žolčne kisline. Žolč goveda vsebuje trihidroksi konjugirane žolčne soli in je zato manj inhibitorjen za mikrobne celice kot žolč prašiča, ki vsebuje dihidroksi konjugirane žolčne soli (Begley in sod., 2005).

Na protimikrobno učinkovitost žolča imajo pomemben vpliv naboj, hidrofobnost in fluidnost membrane. Dokazano je, da strukturne poškodbe lipopolisaharidov, ki jih povzroči zamrzovanje, povečajo občutljivost *E. coli* O157:H7 na žolčne soli. Na povečano permeabilnost membran na žolč pa vpliva celo CO₂ (Begley in sod., 2005).

Poleg učinka na membrane žolč lahko deluje protimikrobno tudi tako, da aktivira encime, ki sodelujejo pri popravljanju DNA, tako bakterijskih kot sesalskih celic. Poleg tega žolč lahko povzroča oksidativne strese, prisotnost žolča v celici pa zniža intracelularno koncentracijo ionov kalcija in železa, ker kelira ione kovine (Begley in sod., 2005).

2.2.4 Detergenti

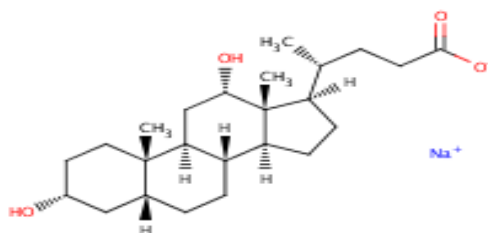
Detergenti so površinsko aktivne snovi, ki so v vodi topne. Sestavljeni so iz hidrofobnega dela, ki ga predstavlja alkilna veriga in hidrofilne (v vodi topne) skupine, ki je vezana na hidrofobno verigo.

Detergente delimo glede na naboj hidrofobnega dela molekule v štiri skupine (Sigma-Aldrich, 2008d):

- o anionski detergenti (NaDC, SDS)
- o neionski detergenti
- o kationski detergenti
- o amfipatski detergenti

2.2.4.1 Natrijev deoksiholat (NaDC)

Natrijev deoksiholat je anionski detergent. V telesu predstavlja glavno komponento metabolizma holesterola pri nastajanju žolčnih kislin (King in Marchesini, 2008).



Slika 5: Kemijska strukturna formula natrijevega deoksiholata (Sodium deoxycholate, 2008)

2.2.4.2 Natrijev dodecil sulfat (SDS)

Natrijev dodecil sulfat (natrijev lauril sulfat) je anionski detergent. Zgrajen je iz repa, ki ga sestavlja 12-C atomov in sulfatne skupine, kar daje molekuli amfipatski značaj, ki je osnovna karakteristika detergenta. Je vsesplošno uporaben v kozmetični industriji kot sestavina izdelkov za osebno nego in razmaščevalec v industriji. V analitiki se uporablja za določanje molekulske mase proteinov s poliakrilamidno gelsko elektroforezo. Poleg tega je zelo razširjena njegova uporaba v molekularni biologiji in sicer pri razbijanju celične stene in razgradnji kislinsko-proteinskih kompleksov v DNA in RNA (Sodium dodecyl sulfate, 2008).



Slika 6: Kemijska strukturna formula natrijevega dodecil sulfata (Sodium lauril sulfate, 2008)

2.3 RAZVOJ BAKTERIJSKE ODPORNOSTI NA ŽOLČNE SOLI IN DETERGENTE

Žolčne soli so amfipatske molekule, ki lahko poškodujejo fosfolipidni dvosloj bakterijske celične membrane. Za preživetje v prebavnem traktu so zato črevesne bakterije razvile mehanizme odpornosti, s katerimi se ubranijo pred baktericidnim delovanjem žolčnih soli (Lin in sod., 2003).

Učinkovitost delovanja protimikrobnih snovi je odvisna od občutljivosti oziroma odpornosti mikrobnih celic. Oba pojava sta genetsko determinirana. Bakterijska odpornost je fenotipska ali/in genotipska značilnost bakterij. Bakterijsko odpornost delimo glede na izvor in glede na tip. Glede na izvor ločimo naravno (intrinzično) in pridobljeno odpornost, glede na tip pa

večkratno in navzkrižno odpornost. Navzkrižna odpornost je odpornost bakterijskih celic na kemijsko sorodne protimikrobne snovi z enakim mehanizmom odpornosti. Večkratna odpornost je odpornost bakterijskih celic na kemijsko nesorodne protimikrobne snovi z različnimi mehanizmi odpornosti (Sefton, 2002).

Odpornost na protimikrobne snovi, ki so jo razvile Gram negativne bakterije, med njimi tudi kampilobaktiri, je izrazito nezaželen pojav. O naravni odpornosti govorimo takrat, kadar so posamezne bakterijske vrste ali rodovi odporni proti določenim protimikrobnim snovem, na primer žolčnim solem. Pridobljena odpornost bakterij proti protimikrobnim snovem pa je posledica mutacij genov na kromosomih ali v plazmidih in jo lahko razvijejo tudi samo določeni bakterijski sevi znotraj vrste ali rodu. Poleg mutacij lahko celica pridobi novo genetsko informacijo tudi s prenosom dednega materiala preko plazmidov ali transpozonov. Plazmidi so samostojne, krožne molekule DNA, sposobne samostojne replikacije, ki ne kodirajo življensko pomembnih funkcij. Transpozoni so DNA sekvence, ki se lahko premikajo na druga mesta genoma brez nujne homologije sekvenc DNA. Najpomembnejši načini genskega prenosa informacij so konjugacija (prenos genske informacije preko neposrednega kontakta bakterijskih celic), transdukcija (prenos genske informacije s pomočjo bakteriofagov) in transformacija (prenos genske informacije preko eksogene DNA) (Seme, 2002). V literaturi ni opisanega primera z mutacijo pridobljene odpornosti na žolčne soli, pač pa so opisani naslednji mehanizmi bakterijske odpornosti proti žolčnim solem (Gunn, 2000; Lin in sod., 2003):

- o aktivno izčrpavanje žolčnih soli iz bakterijske celice
- o sinteza lipopolisaharidov in različnih proteinov (stresni proteini, porini)
- o sinteza hidrolaz, ki so odgovorne za dekonjugacijo žolčnih soli (zmanjšujejo toksičnost)

2.3.1 Mehanizmi odpornosti bakterije *Campylobacter* spp.

Raziskave kažejo, da je odpornost bakterij na žolčne soli, tudi kampilobaktrov, predvsem posledica prisotnosti membranskih izlivnih črpalk, v manjši meri pa tudi sinteze lipopolisaharidov in porinov ter encimov hidrolaz (Gunn, 2000; Lin in sod., 2003).

2.3.1.1 Povečana odpornost zaradi sinteze lipopolisaharidov in proteinov

Celična stena Gram negativnih bakterij je zgrajena pretežno iz lipopolisaharidnega ovoja (LPS-sloj), ki je sestavljen iz zunanega polisaharidnega in notranjega lipidnega dela. Zunanji, t.i. O-polisaharid štrli iz površine celične stene in tako predstavlja glavno bariero za vstop različnih komponent v celico. Izguba O-polisaharida lahko vodi v zmanjšano odpornost na žolčne soli. Za povečanje odpornosti na žolčne soli bakterijske celice sintetizirajo komponente LPS-sloja, poleg tega pa tudi porine (Gunn, 2000).

Porini so proteini v obliki cevki premera 1nm v celični steni Gram negativnih bakterij. Njihova vloga je omogočanje pasivnega transporta hidrofilnih ionov in molekul do molekulske mase 600 Da v celico. Hitrost difuzije delcev je odvisna od razlike v koncentraciji

na obeh straneh periplazme. Kampilobakterji sintetizirajo porine OmpF in OmpC (angl. outer membrane proteins) (Bergmann, 2004).

V navzkrižno odpornost proti protimikrobnim snovem, ki strukturno niso povezane, je vpleten operon *marRAB*. Aktivacija operona *marRAB* naj bi vplivala na zmanjšanje sinteze porinov OmpF in s tem na zmanjšanje prehoda žolčnih soli v celico. Študija je pokazala, da so žolčne soli vpletene v aktivacijo *mar* operona in s tem neposredno povezane z bakterijsko odpornostjo. S tem je bila potrjena hipoteza, da so črevesne bakterije ne samo sposobne razviti odpornost, pač pa tudi vključiti žolčne soli v svoj metabolizem kot regulatorni signal, najverjetneje z neposredno interakcijo med regulatornimi proteini in žolčnimi solmi (Proutly in sod., 2004).

Okoli in sod., (2007) so v svoji študiji objavili podatek, da kar 60 različnih proteinov sodeluje pri povečani toleranci Gram negativnih bakterij na žolčne soli.

Največji vpliv imajo proteini Tol, med katerimi je najpomembnejši Tol C. Tol C je multifunkcionalni protein, vključen v *AcrAB* gen, zato njegova odsotnost vpliva na spremenjeno odpornost bakterij na žolčne soli. Mutacije Tol C vodijo v destabilizacijo celične stene, kar omogoča vstop žolčnim solem v citoplazmo in posledično poveča občutljivost bakterij na žolčne soli. Tol mutanti so občutljivi tudi na prisotnost antibiotikov in detergentov. Nedavno so identificirali protein CbrR (angl. bile response regulator), kateri je v interakciji z *cmeR* genom, represorjem za *cmeABC*. Kompleks CbrR-CmeR modulira izražanje CmeABC efluksnega sistema.

Identificirali so še druge proteine, ki naj bi bili vključeni v odpornost bakterij na žolčne soli: proteine toplotnega šoka (DnaK, GroES, GroEL), proteine, ki so vključeni v biosintezo lipidov in encim adenilat-kinazo (Okoli in sod., 2007).

2.3.1.2 Povečana odpornost in membranske izlivne črpalke

Bakterije so sposobne omejevati vstop za celico toksičnih snovi s sintezo ovojnic z majhno prepustnostjo. Do manjšega vnosa toksičnih snovi lahko pride tudi po energetski poti s t.i. aktivnim izčrpavanjem snovi iz celice ob posredovanju izlivnih črpalk. Membranski izlivni transport je v vseh živih celicah, tako evkariontskih kot prokariontskih. V literaturi ga opisujejo z izrazom sistem transportnih proteinov oziroma »efluksne črpalke«. Osnovna naloga izlivnih črpalk je izčrpavanje snovi iz celice, ki so zanjo škodljive, kot npr. antibiotiki, detergenti, kovinski ioni (Mahamoud, in sod., 2007). Pri izčrpavanju snovi iz celice delujeta dve družini transportnih proteinov, ki jih ločimo po načinu pridobivanja energije potrebne za transport. Primarni transporterji pridobivajo energijo s hidrolizo ATP, sekundarni transporterji oziroma antiporterji (prevladujejo pri prokariontih) pa izkoriščajo protonski gradient kot obliko energije (Pumbwe in Piddock, 2002; Marquez, 2005; Poole, 2005; Piddock, 2006).

Prvič so izlivne črpalke opisali na sesalskih celicah. Ugotovili so, da fosfoglikoprotein v celični steni bakterij pomembno prispeva k odpornosti bakterij na kemoterapevtike. Konec osemdesetih let 20. stoletja so prvič opisali vlogo izlivnih črpalk pri odpornosti na protimikrobne snovi. Z nadaljnjimi genetskimi študijami so odkrili, da so izlivne črpalke

prisotne pri vseh organizmih, zlasti prokarionti naj bi vsebovali cel spekter različnih izlivnih črpalk (Paulsen, 2003). Aktivnost membranskih izlivnih črpalk je opisana pri številnih klinično pomembnih bakterijskih vrstah, kot so *Escherichia coli* (AcrAB, AcrB, EmrE), *Staphylococcus aureus* (QacA), *Pseudomonas aeruginosa* (MexAB-OprM), *Vibrio parahaemolyticus* (NorM) ter tudi pri rodu *Campylobacter* (CmeABC) (Lin in sod., 2005b; Poole, 2005). Chatterjee in sod. so leta 2004 dokazali, da je izlivni sistem ključen za preživetje bakterij *Vibrio cholerae* v prisotnosti žolčnih soli.

Membranske izlivne črpalke so ene izmed najpomembnejših komponent v bakterijski celični steni, saj kar 15 do 20 % genoma *E. coli* kodira zapise za njihovo sintezo (Ge in sod., 2005). Število genov, ki kodirajo lastnosti teh črpalk, je odvisno od velikosti genoma. Geni, ki kodirajo lastnosti za izlivne črpalke, so na kromosomih ali plazmidih. Genska ekspresija membranskih izlivnih črpalk je kontrolirana z regulatornim proteinom. Odpornost je povezana s povečano ekspresijo genov (tistih genov, ki kodirajo sintezo izlivnih črpalk), do katere pride zaradi mutacij znotraj represijskih genov. Mutacije na represorju ali na represorskih sekvencah povzročajo povečano ekspresijo izlivnih črpalk, kar vpliva na povečano bakterijsko odpornost na strukturno nesorodne protimikrobne snovi. Večje število membranskih izlivnih črpalk ima za posledico večje izločanje strukturno nesorodnih in škodljivih snovi iz celice, med njimi tudi protimikrobnih snovi. Določeni organizmi (tudi kampilobaktri) imajo lahko izraženih več skupin izlivnih membranskih sistemov hkrati (Akiba in sod., 2005), lahko pa učinkujejo tudi sinergistično z ostalimi mehanizmi, ki povečujejo odpornost (točkovne mutacije). V tem primeru pride do izražanja fenotipa MDR oz. večkratne ali mnogokratne odpornosti proti številnim protimikrobnim snovem. Ugotovljeno je bilo tudi, da so vrednosti MIC sevov z izraženim fenotipom MDR dva do osemkrat višje kot pri sevih, ki nimajo izraženega fenotipa MDR (Lin in sod., 2005b; Cagliero in sod., 2005; Piddock, 2006).

Številne študije nakazujejo, da ima fenotip MDR pomembno vlogo pri izražanju virulenčnih dejavnikov, predvsem kolonizacije *in vivo* in tako še dodaten vpliv na preživetje bakterij v gostitelju (Lin in sod., 2003; Piddock, 2006).

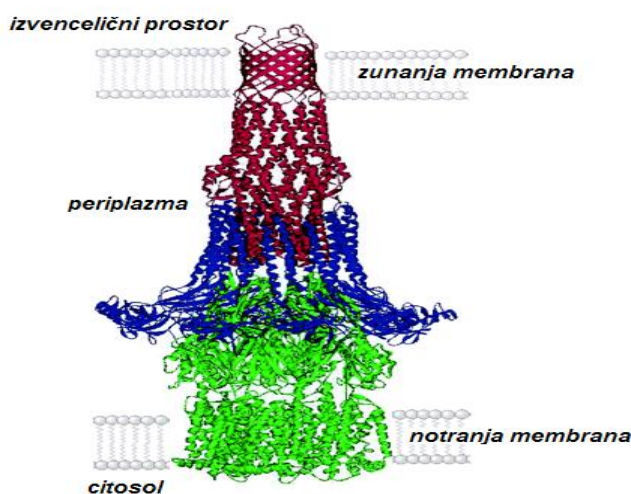
Fenotip MDR je pri prokariontih posledica delovanja 5 družin proteinov. Ločimo (Ge in sod., 2005; Marquez, 2005; Mahamoud in sod., 2007):

- o RND (angl. resistance nodulation division) skupino prenašalcev,
- o MFS (angl. major facilitator superfamily) skupino prenašalcev,
- o SMR (angl. small multidrug resistance) skupino prenašalcev,
- o MATE (angl. multidrug and toxic compound extrusion) skupino prenašalcev in
- o ABC (angl. ATP binding cassette) skupino prenašalcev.

Zelo malo bakterij iz skupine črpalk ABC ima izražen MDR fenotip. ABC črpalke pogosto najdemo pri bakterijah, ki proizvajajo antibiotike (*Streptomyces*). Delovanje teh črpalk je posledica hidrolize molekul ATP, s katero pridobijo energijo. Skupina ABC črpalk ima pomembno vlogo v transportu fosfoglikoproteina, ki je pomemben pri odpornosti tumorskih celic na kemoterapevtike (Marquez, 2005). Za delovanje skupine MATE črpalk so odgovorni prenašalci Na⁺, ki hkrati črpajo v celico natrijeve ione, iz celice pa toksične snovi. Na ta način se iz celice transportirajo aminoglikozidi, fluorokinoloni in kationske snovi. Skupina SMR so najmanjši prenašalci, ki črpajo lipofilna kationska zdravila iz celice in so podskupina večje skupine DMT (angl. drug metabolite transporter) črpalk. Raziskovanje odpornosti na

Črpalke RND sodelujejo pri transportu lipofilnih ali amfifilnih molekul in divalentnih kationov. Najdemo jih pretežno pri Gram negativnih bakterijah. Sestavljene so iz treh delov: proteina v citoplazemski membrani in porina v zunanji membrani, ki ju povezuje periplazemski fuzijski protein (slika 7). Kompleksna zgradba omogoča učinkovito črpanje molekul iz citoplazme in periplazme v izvencelični prostor (Marquez, 2005).

Vlogo membranskih izlivnih črpalk pri kampilobaktrih so prvič opisali Charvalos in sodelavci leta 1995. Leta 2002 sta Pumbwe in Piddock identificirala gen *cmeB* v bakterijskem genomu *C. jejuni*. Gen *cmeB* kodira izlivno črpalko CmeB (angl. *Campylobacter* multidrug efflux), za katero so ugotovili, da pripomore k intrinzični odpornosti *C. jejuni* proti vrsti strukturno nesorodnih protimikrobnih snovi. Še istega leta so Lin in sod. identificirali izlivno črpalko CmeABC, ki so jo tako kot CmeB uvrstili v skupino RND prenašalcev (Pumbwe in Piddock, 2002; Lin in sod., 2003).



Ge in sod. (2005) so pri kampilobaktrih identificirali 10 različnih genov, ki kodirajo proteine za membranske izlivne črpalke, nekateri od teh genov so bili skupni vsem testiranim izolatom. Največji vpliv na intrinzično odpornost proti žolčnim solem in detergentom kot tudi antibiotikom pri kampilobakterjih ima CmeABC črpalka (Lin in sod., 2003). CmeABC je pri kampilobaktrih najpomembnejši membransko izlivni sistem, ki ga kodira gen *cmeABC*.

Ekspresijo gena *cmeABC* nadzira transkripcijski represor *CmeR*, ki ga kodira gen *cmeR*, prisotnost žolčnih soli na gen ne vpliva (Lin in sod., 2005a). Izlivni sistem je sestavljen iz treh glavnih komponent, ki se med seboj razlikujejo tako po velikosti, kot tudi po funkcijah, ki jih opravljajo. Največji izmed njih je notranjo-membranski transportni protein CmeB, ki ga kodira 3123 bp velik gen *Cj0366c*. Drugi po velikosti je protein na zunanji membrani CmeC, katerega kodira gen *Cj0365c*, ki obsega 1479 bp. Najmanjši je periplazemski fuzijski protein CmeA, ki ga kodira gen *Cj0367c* velikosti 1104 bp in za svoje delovanje potrebuje energijo iz ATP. Predvidevajo, da omenjeni proteini delujejo sinhrono in tvorijo membranske kanalčke, skozi katere se izločajo za celico toksične snovi (Lin in sod., 2003).

Lin in sod. so leta 2003 ugotovili, da prisotnost žolčnih soli *in vivo* vpliva na zmanjšano občutljivost kampilobaktrov na antibiotike. Odgovor na prisotnost žolčnih soli v črevesju je ekspresija gena *cmeABC*.

Leta 2004 so Pumbwe in sod. pri bakterijah *Campylobacter jejuni* opisali še drugo tridelno črpalko CmeDEF. Akiba in sod. (2005) ugotavljajo, da igra dominantno vlogo pri intrinzični odpornosti črpalka CmeABC, CmeDEF pa je sekundarnega pomena, čeprav dokazano deluje vzajemno s CmeABC. Zadnje študije kažejo, da CmeDEF ne prispeva k odpornosti kampilobakterjev na žolčne soli (Lin in Martinez, 2006).

2.3.2 Inhibicija izlivnih črpalk

Od spoznanja, da glavno vlogo pri povečani odpornosti kampilobaktrov na žolčne soli (in antibiotike) igra črpalka CmeABC, so vse raziskave usmerjene v iskanje molekul, ki bi inhibirale delovanje omenjene črpalke. V zadnjem desetletju so identificirali številne inhibitorje izlivnih črpalk (EPI-ang. efflux pump inhibitor), od katerih so se mnogi izkazali kot potencialno uporabni za zmanjšanje intrinzične kot tudi pridobljene odpornosti na protimikrobne snovi. Gre za kemijsko različne spojine, ki so lahko naravnega (produkt sekundarnega metabolizma rastlin) ali sintetičnega izvora (Lomovskaya in sod., 2001; Quinn in sod., 2006). Inhibicija delovanja bakterijskih izlivnih črpalk je najpomembnejši dejavnik za zmanjšanje bakterijske odpornosti na protimikrobne snovi.

Inhibitorji izlivnih črpalk imajo velik potencial v humani in veterinarski medicini, kljub temu pa zaradi pomanjkanja študij vpliva trenutno še ni na voljo inhibitorja z licenco za klinično uporabo (Lin in Martinez, 2006; Quinn in sod., 2006).

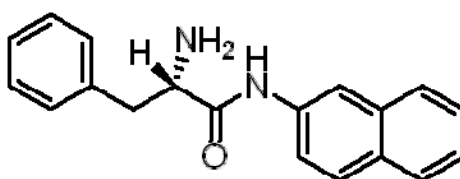
Do zdaj objavljene študije omenjajo tri načine, s katerimi inhibitorji blokirajo aktivnost membranskih izlivnih črpalk (Zloh in sod., 2003; Marquez, 2005; Pagès in sod., 2005; Martinez in Lin, 2006; Lomovskaya in Bostian, 2006):

- ustvarijo zamašek, ki poškoduje kanal v zunanji membrani
- s protimikrobnimi snovmi tekmujejo za vezavno mesto na zunanjem delu membranske črpalke
- posredno je zaradi tekmovanja za vezavno mesto moteno delovanje energijskega sistema, ki ga membranske črpalke potrebujejo za svoje delovanje

Mahamoud in sod. (2007) so naredili pregled uporabnih inhibitorjev in definirali njihov način delovanja. Inhibitorje so razdelili v tri skupine: derivati fluorokinolonov, peptidomimetiki in arilpiperazini. Največji problem za širšo klinično uporabo teh inhibitorjev je njihova toksičnost. V študijah najbolj uporabljen je inhibitor fenilalanilarginin- β -naftilamid (PA β N) (slika 8), ki spada med peptidomimetike. PA β N prispeva k znižanju intrinzične in pridobljene odpornosti na protimikrobne snovi vseh Gram negativnih bakterij (Mamelli in sod., 2003). Najnovejše študije ugotavljajo vpliv inhibitorja 1-(1-naftilmetil)-piperazina (NMP) iz skupine arilpiperazinov. Arilpiperazini povzročijo zmanjšanje intrinzične odpornosti RND tipa izlivnih črpalk, vendar mehanizem delovanja še ni pojasnjen (Pannek in sod., 2006). Poleg tega imajo arilpiperazini tudi sposobnost znotrajcelične akumulacije določenih protimikrobnih snovi, kar je še dodaten mehanizem v korist zmanjšanja bakterijske odpornosti na protimikrobne snovi (Mahmoud in sod., 2007). Analogi fluorokinolonov so nova skupina inhibitorjev, ki pa je še povsem neraziskana. Pagès in sod. (2005) navajajo tudi inhibitor karbonil cianid m-klorofenilhidrazon (CCCP), ki onemogoča delovanje membranskega energijskega transporta.

Študije vpliva inhibitorja membranskih izlivnih črpalk PA β N so dokazale, da dodatek inhibitorja vpliva na zmanjšanje bakterijske odpornosti pri izbranih sevih *kampilobaktrov*. Opravljene so bile predvsem na antibiotikih, iz njih pa kljub temu lahko sklepamo na podoben vpliv na žolčne soli, ki imajo prisotno isto črpalko CmeABC. Mamelli in sod. (2003) so na izolatih *Campylobacter jejuni* in *C. coli* s fenotipom MDR kot prvi ugotavljali vpliv inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk na povečanje bakterijske odpornosti. Na vseh izolatih so določali vrednosti MIC brez in z dodatkom inhibitorja PA β N. Ugotovili so, da dodatek inhibitorja vpliva na zmanjšanje vrednosti MIC makrolidnih antibiotikov. Sklepali so, da inhibitor blokira membranske izlivne črpalke, ki imajo vlogo pri črpanju protimikrobnih snovi iz celice.

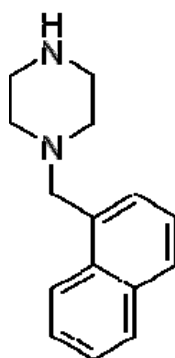
Payot in sod. (2004) so analizirali vpliv različnih koncentracij inhibitorja PA β N (10, 20, 40, 60, 120 μ g/ml) na odpornost *C. coli* na eritromicin. Ugotovili so, da je najbolj optimalna koncentracija za povečanje občutljivosti 40 μ g/ml. Učinek inhibitorja se je pokazal tako pri občutljivih, kot tudi pri odpornih izolatih. Ugotovili so, da PA β N inhibira delovanje membranskih izlivnih črpalk, ki sodelujejo pri črpanju protimikrobnih snovi iz celice. Do enakih zaključkov so prišli tudi Corcoran in sod. (2006), ki so inhibitor PA β N testirali pri vrstah *Campylobacter coli* in *C. jejuni*. Kramar in sod. (2009, pripravljeno za objavo) poudarjajo vpliv koncentracije inhibitorja na odpornost sevov *Campylobacter*. Ugotavljajo, da inhibitor PA β N v koncentraciji 10 μ g/ml ne prispeva bistveno k zmanjšani odpornosti testiranih izolatov. Inhibitor bolje učinkuje na seve *C. coli* kot na *C. jejuni*.



Slika 8: Strukturna formula inhibitorja membranskih izlivnih črpalk PA β N (Sigma- Aldrich, 2008b)

Bohnert in Kern (2005) pa sta kot prva ugotavljala vpliv arilpiperazinov na bakterije *Escherichia coli*. Ugotovila sta, da se je med aripiperazini najboljše odrezal NMP (slika 9).

NMP je poleg zmanjšanja vrednosti MIC tudi akumuliral antibiotike v celici. Primerjalne študije kažejo, da ima NMP manjši učinek na zmanjšanje odpornosti proti protimikrobnim snovem kot PAßN pri isti koncentraciji. Študije vpliva NMP so bile opravljene že na različnih bakterijah (Pannek in sod., 2006; Schumacher in sod., 2006; Kern in sod., 2006), vendar med njimi ni kampilobaktrov. Kramar in sod. (2009, pripravljeno za objavo) so testirali vpliv inhibitorja NMP s koncentracijo 60 µg/ml na seve *Campylobacter*. Ugotovili so, da inhibitor v omenjeni koncentraciji ne pripomore bistveno k zmanjšanju odpornosti testiranih sevov. Tako kot PAßN tudi NMP bolje učinkuje na seve *C. coli*.



Slika 9: Strukturna formula inhibitorja membranskih izlivnih črpalk NMP (Sigma- Aldrich, 2008c)

Hanula in Hänninen (2008) sta primerjala učinkovitost navedenih inhibitorjev na izolatih *Campylobacter coli* in *C. jejuni*. Občutljivost na eritromicin in rifampicin se je v prisotnosti PAßN povečala 8-32 krat, pri dodatku NMP pa nekoliko manj.

Poleg tega sta ugotavljala vpliv induktorjev izlivnih črpalk, salicilata in natrijevega deoksiholata v prisotnosti ciprofloksacina. Salicilat je 2-4 krat povečal MIC vrednost ciprofloksacina, natrijev deoksiholat pa je imel minimalen vpliv.

2.4 METODE UGOTAVLJANJA ODPORNOSTI BAKTERIJ RODU *Campylobacter* NA ŽOLČNE SOLI IN DETERGENTE

Trenutno se kot standardizirano metodo za ugotavljanje občutljivosti bakterij rodu *Campylobacter* na različne protimikrobne snovi uporablja dilucijska metoda v agarju. Zaradi njenih slabih strani-velike porabe materiala, časa in denarja, se čedalje bolj uveljavljajo tudi različne dilucijske metode v bujonu, metoda difuzije v agarju z diski ter E-test (McDermott in sod., 2005).

Metode določanja protimikrobnih snovi temeljijo na fenotipskih in genotipskih lastnostih mikroorganizmov. Med genotipske metode spadajo sekveniranje genov, ki so odgovorni za

odpornost in tehnike na osnovi verižne reakcije s polimerazo (PCR). Te so bolj specifične in se izvajajo manj pogosto kot fenotipske metode, ki so hitrejše in cenejše. Izbira metode je odvisna od njene občutljivosti, enostavnosti, fleksibilnosti ter ponovljivosti (Vigil in sod., 2005).

Fenotipske metode lahko delimo v 2 skupini (Vigil in sod., 2005):

- o metode s končno točko merjenja
- o deskriptivne oz. opisne metode, pri katerih rezultate spremljamo v odvisnosti od časa (sledimo kinetiko delovanja).

Metode s končno točko merjenja lahko razdelimo na (Vigil in sod., 2005):

- o metode difuzije v agarju
- o dilucijske metode v agarju ali bujonu
- o metode z uporabo plošč z gradientom koncentracije protimikrobnih snovi
- o metode z uporabo spiralne cepitve plošč
- o sanitarne in razkuževalne suspenzijske teste.

Deskriptivne metode so metode, kjer spremljamo kinetiko protimikrobnega delovanja v daljšem časovnem obdobju z merjenjem mikrobne rasti. Najpogosteje mikrobno rast določamo turbidimetrično z merjenjem optične gostote mikrobnih celic. Možna izpeljava te metode je tudi metoda z eno točko merjenja, kjer merimo intenziteto prepuščene sipane svetlobe, ki je odvisna od gostote celic v merjeni suspenziji. Princip te metode je spektrofotometrično (pri karakterističnih valovnih dolžinah) merjenje gostote mikrobne populacije v prisotnosti protimikrobnega sredstva. Po končanem merjenju dobljene rezultate primerjamo z referenčnimi vzorci. Ta metoda je zelo omejena z občutljivostjo inštrumenta. Rast mikroorganizmov lahko spremljamo tudi na druge načine, s štetjem pod mikroskopom, z merjenjem metabolične aktivnosti ali cepljenjem vzorcev na agarske plošče, kjer po inkubaciji preštajemo kolonije (CFU/ml) (Vigil in sod., 2005).

2.4.1 Metoda difuzije v agarju

Metoda difuzije v agarju, imenovana tudi Kirby-Bauerjev test, je preprosta metoda, s katero ugotavljamo odpornost posameznih testnih bakterij na različna protimikrobna sredstva. Na gojišče z že nacepljeno kulturo položimo papirnate diske, prepojene s protimikrobnim sredstvom, ki nato difundira v gojišče. Z naraščajočo razdaljo od diska koncentracija protimikrobnega sredstva logaritemsko pada. Po končani inkubaciji merimo t.i. inhibicijske cone mikrobne rasti, katerih premer je odvisen od koncentracije in odpornosti mikroorganizma na testirano protimikrobno sredstvo. Uporaba kontrolnega vzorca je obvezna, saj na velikost inhibicijske cone vpliva tudi količina agarja, koncentracija testnega inokuluma, temperatura in čas inkubacije. Čim večja je cona, tem večji učinek ima protimikrobno sredstvo. Če kot protimikrobno sredstvo uporabimo antibiotik, tej metodi rečemo difuzijski antibiogram (Vigil in sod., 2005).

2.4.2 Dilucijske metode

Dilucijske metode se uporabljajo za določanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) protimikrobne snovi, ki je potrebna za inhibicijo rasti mikroorganizma. Znotraj teh metod razlikujemo dilucijsko metodo v agarju, kjer protimikrobno snov razredčimo v trdnem gojišču ter dilucijsko metodo v bujonu, kjer je razredčitev opravljena v tekočem gojišču (Vigil in sod., 2005).

2.4.2.1 Dilucijska metoda v agarju

Dilucijska metoda v agarju je standardizirana in zanesljiva tehnika, ki se velikokrat uporablja kot referenčna metoda. Metodo izvajamo tako, da v petrijeve plošče vlivamo neselektivni agar z dodanimi različnimi koncentracijami protimikrobne snovi. Ko se agar strdi, nacepimo kulture mikroorganizmov ter inkubiramo. Prednosti te metode sta sočasno testiranje velikega števila vzorcev ter testiranje bakterij, ki v tekočih gojiščih rastejo slabo. Glavna slabost pa je velika poraba materiala in časa (Vigil in sod., 2005).

2.4.2.2 Mikrodilucijska metoda v bujonu

Pri dilucijskih metodah v bujonu glede na volumen gojišča ločimo makrodilucijsko in mikrodilucijsko metodo. Razredčevanje pri makrodilucijski metodi poteka v epruветah in vključuje pripravo serijskih razredčitev protimikrobne snovi v tekočem mediju. Končni volumen znaša 1-2 ml na epruveto. Prva faza je inokulacija medija s standardizirano bakterijsko suspenzijo. Sledi inkubacija, ki pri kampilobaktrih poteka v mikroaerofilnih pogojih. Po inkubaciji kvantitativno določimo koncentracijo protimikrobne snovi, ki še inhibira rast mikroorganizmov - MIC. Slabosti te metode so poraba velikih količin reagentov in možnost napake analitika pri pripravi medija in ustreznih razredčitev (Jorgensen in Ferraro, 1998).

Leta 2003 so Luber in sod. kot prvi standardizirali mikrodilucijsko metodo v bujonu za ugotavljanje občutljivosti bakterij *Campylobacter coli* in *C. jejuni*. Zaradi enostavnosti in manjše porabe materiala je bolj primerna za rutinske preiskave v laboratorijih. Njena bistvena prednost je v spremljanju odpornosti večjega števila izolatov hkrati oz. hkratnem testiranju večjega števila protimikrobnih snovi.



Slika 10: Mikrotitrna ploščica

Pri tej metodi se uporablja mikrotitrna plošča (slika 10), kjer protimikrobno snov skupaj z gojiščem serijsko razredčujemo vzdolž kolon na ploščici. Za razliko od makrodilucijske metode pri tej metodi porabimo bistveno manjše volumne gojišča in reagentov, saj je volumen vdolbinice v mikrotitrski ploščici le nekaj sto mikrolitrov. Mikrotitrna ploščica ima 96 vdolbinic, v katere dodajamo posamezne reagente in bakterijsko kulturo. Po končani inkubaciji učinek protimikrobnega agensa ugotavljamo z merjenjem fizikalno-kemijskih lastnosti, kot so: absorbanca oziroma optična gostota, ki temelji na merjenju motnosti ter fluorescenca ali luminiscenca, katere intenziteto merimo s čitalcem mikrotitrskih plošč ob dodatku ustreznih reagentov. Rezultati mikrodilucijske metode v bujonu se pogosto zelo razlikujejo od rezultatov, pridobljenih z drugimi metodami. Številni avtorji ugotavljajo, da je vzrok tega pomanjkanje mednarodnih standardov pri interpretaciji rezultatov, kar ima za posledico neenotno uporabo gojišč in pogojev kultivacije. Kot možno rešitev navajajo uporabo referenčnih sevov, saj se le tako lahko preveri točnost, natančnost in ponovljivost metode (Luber in sod., 2003; Holasova in sod., 2007).

Prednosti te metode se kažejo v boljši ekonomičnosti, predvsem v majhni porabi reagentov, gojišč, krajšem času, bistveno večjem številu opravljenih analiz v primerjavi z makrodilucijsko metodo v enakem časovnem obdobju. Mikrodilucijska metoda je precej ponovljiva ter jo je možno avtomatizirati. Njena slaba stran pa je pomanjkanje mednarodnih standardov (Luber in sod., 2003; Holasova in sod., 2007).

2.4.3 Metode z uporabo plošč z gradientom

Protimikrobni agens v različnih koncentracijah dodajamo v tekoči agar, nato ga v štirikotnih petrijevkah razlivamo tako, da količina agarja pada z ene strani proti drugi. Ko se agar z dodatkom protimikrobne snovi strdi, čezenj prelijemo agar brez dodane protimikrobne snovi. Kmalu se pojavi gradient, ki je odvisen od sposobnosti difundiranja protimikrobnega sredstva skozi agar. Sledi cepitev kulture in inkubacija (Vigil in sod., 2005).

2.4.4 Metode z uporabo spiralne cepitve plošč

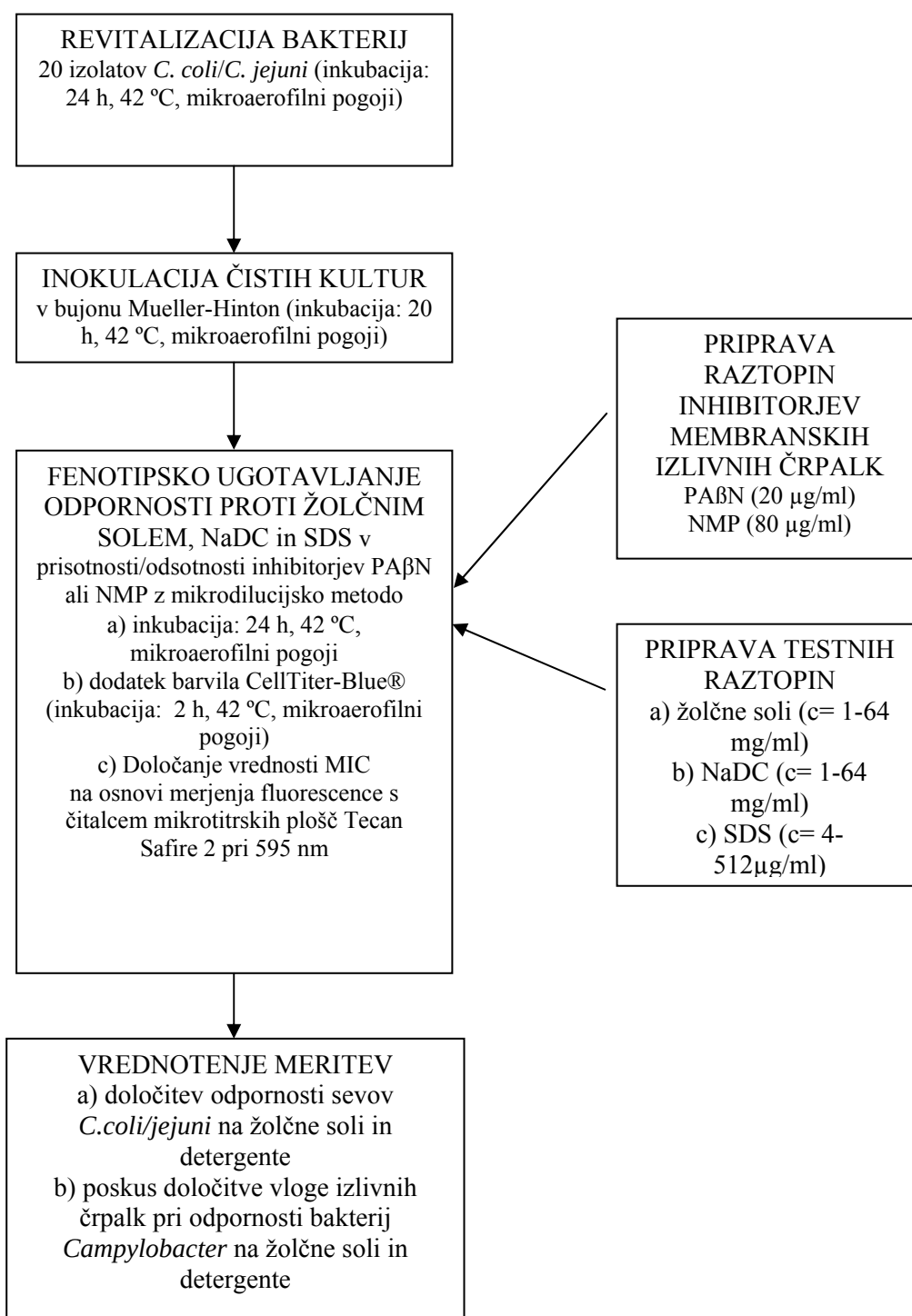
To je avtomatska metoda, pri kateri naprava avtomatsko vbrizgava določene koncentracije protimikrobnega sredstva v obliki arhimedove krivulje in hkrati cepi kulturo. Nastali gradient pada od notranjosti proti zunanosti petrijevke. Po inkubaciji sledi avtomatsko odčitavanje rezultatov (Vigil in sod., 2005).

2.4.5 Inhibicijske krivulje

Pri tej metodi bujonu dodamo določene koncentracije protimikrobnega sredstva in testnega organizma. Sledi dolga inkubacija in odvzem vzorcev med inkubacijo v različnih časovnih intervalih. Te vzorce nato cepimo na plošče ali kako drugače spremljamo rast. Sledi izris krivulj (Vigil in sod., 2005).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 POTEK DELA



Slika 11: Shema poskusa diplomskega dela

3.2 MATERIAL

3.2.1 Mikroorganizmi

Za proučevanje bakterijske odpornosti na žolčne soli in oba detergenta smo uporabili 20 izbranih izolatov *C. jejuni* in *C. coli* iz zbirke Katedre za živilsko mikrobiologijo, od teh sta bila ATCC 33559 in ATCC 33560 referenčna izolata, izolirana iz živalskega fecesa. Ostali so bili izbrani humani, živilski in živalski sevi. Iz zbirke smo jih izbrali na osnovi predhodno zbranih podatkov o odpornosti proti eritromicinu. Kulture so bile shranjene v tekočem gojišču BHI z dodatkom glicerola in defibrilirane konjske krvi na temperaturi -80°C . Prva faza v pripravi kultur je bila revitalizacija. Kulturo smo namnožili na selektivnem krvnem agarju CCDA. Bakterije rodu *Campylobacter* so termofilni in mikroaerofilni mikroorganizmi, zato smo jim prilagodili inkubacijo na temperaturo 42°C in zagotovili kontrolirano atmosfero, sestavljeno iz 3 % O_2 , 10 % CO_2 in 87 % N_2 .

3.2.1.1 Mikrobiološka gojišča

Agar CCDA

Sestava:

- o Osnovni medij CCDA (Oxoid, CM 739);
- o Dodatek za selektivnost CCDA Selective Supplement (Oxoid, SR155E);
- o 500 ml dH_2O .

Preglednica 2: Sestava osnovnega medija za agar CCDA

SESTAVINE	KOLIČINA (g/l)
hranilni bujon	25,0
aktivno oglje	4,0
hidroliziran kazeinat	3,0
železov sulfat	0,25
natrijev piruvat	0,25
agar	12,0

Preglednica 3: Sestava dodatka za selektivnost CCDA Selective Supplement

SESTAVINE	KOLIČINA (mg/l)
cefoperazon	64,0
amfotericin	20,0

Priprava:

Zatehto 22,75 g osnovnega medija (preglednica 2) za agar CCDA smo raztopili v 500 ml dH₂O ter ga sterilizirali 15 minut pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,1 bar. Medij smo nato ohladili na temperaturo 45 °C, dodali raztopino CCDA dodatka za selektivnost (preglednica 3), premešali ter razlili v petrijevke.

Tekoče gojišče Mueller Hinton bujon – MHB

Sestava:

- o Osnovni medij Mueller Hinton (Oxoid, CM0405)
- o 500 ml dH₂O
- o 25 ml sterilne defibrilirane konjske krvi (Oxoid, SR048C)
- o 1 steklenička dodatka za rast *Campylobacter* Growth Supplement (Oxoid, SR232E)
- o 1 steklenička dodatka za selektivnost *Campylobacter* Selective Supplement (Oxoid, SR069E)

Preglednica 4: Sestava osnovnega medija za MHB

SESTAVINE	KOLIČINA (g/l)
mesni ekstrakt	300,0
hidroliziran kazeinat	17,5
škrob	1,5

Priprava:

Zatehto 10,5 g osnovnega medija (preglednica 3) smo raztopili v 500 ml dH₂O ter sterilizirali 15 minut pri temperaturi 155 °C in tlaku 1,1 bar. Po sterilizaciji smo medij ohladili v vodni kopeli (na 45 °C) in mu aseptično dodali 25 ml defibrilirane konjske krvi, raztopino dodatka za rast ter raztopino dodatka za selektivnost. Vse skupaj smo dobro premešali in pripravljeno gojišče hranili pri temperaturi 4 °C. Če gojišča nismo potrebovali takoj, smo mu konjsko kri dodali tik pred uporabo.

3.2.2 Priprava raztopin žolčnih soli in detergentov

3.2.2.1 Žolčne soli (SIGMA-ALDRICH CO.)

Zatehto žolčnih soli (0,5 g) smo raztopili v 2 ml ddH₂O, dobro premešali in jo prefiltrirali skozi 0,2 µm filter. 512 µl prefiltrirane raztopine smo nato dodali 488 µl gojišča MHB. Začetna koncentracija raztopine žolčnih soli je tako znašala 128 mg/ml.

3.2.2.2 Natrijev deoksiholat (SIGMA-ALDRICH CO.)

Postopek priprave je bil enak kot pri žolčnih solih.

3.2.2.3 Natrijev dodecil sulfat (INVITROGEN)

Zatehto natrijevega dodecil sulfata (0,0064 g) smo raztopili v 1,25 ml ddH₂O, dobro premešali in raztopino prefiltrirali skozi 0,2 µm filter. 0,4 ml prefiltrirane raztopine smo nato dodali 1,6 ml gojišča MHB. Začetna koncentracija raztopine detergenta je tako znašala 5120 µg/ml.

3.2.3 Priprava inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk

3.2.3.1 Inhibitor PAβN (SIGMA-ALDRICH CO.)

Zatehtali smo 0,0010 g PAβN in ga raztopili v 2 ml ddH₂O ter dobljeno raztopino premešali v vrtinčniku in jo prefiltrirali skozi 0,2 µm filter. Koncentracija inhibitorja je znašala 500 µg/ml.

3.2.3.2 Inhibitor NMP (Chess, Mannheim, Nemčija)

Zatehtali smo 0,0080 g NMP in ga raztopili v 1 ml absolutnega etanola ter dobljeno raztopino premešali v vrtinčniku in jo prefiltrirali 0,2 µm filter. Koncentracija inhibitorja je znašala 8000 µg/ml.

3.2.4 Priprava reagentov, raztopin in ostalih dodatkov

3.2.4.1 Fiziološka raztopina

Sestavine za pripravo KH₂PO₄:

- o 3,4 g KH₂PO₄ (Kemika)
- o 1100 ml dH₂O

Priprava:

Zatehto 3,4 g KH₂PO₄ smo raztopili v 100 ml dH₂O in uravnali pH na 7,2. Nato smo 1,25 ml pripravljene osnovne raztopine razredčili v 1000 ml dH₂O, premešali in sterilizirali v avtoklavu (15 minut, T = 121 °C).

3.2.4.2 Barvilo resazurin CellTiter-Blue[®] (Promega Corporation)

Barvilo je bilo skladiščeno v zamrzovalni omari pri temperaturi -20 °C. Pred uporabo smo ga odtajali na sobni temperaturi, zaščitene pred svetlobo.

3.2.5 Laboratorijska oprema

- o splošni mikrobiološki material: petrijeve plošče (Labortechnika, Golias), cepilne zanke, avtomatske pipete in nastavki za pipete (Gilson, Eppendorf), merilni valji (Plastibrand), mikrocentrifugirke (Eppendorf), laboratorijske steklenice (Duran), plastični lončki (Labortechnika Golias), baterijski pipetor (Eppendorf easypet);
- o zaščitna mikrobiološka komora SMBC 122AV (Iskra PIO);
- o digestorij (TIP382, Elektromedicina);
- o tehtnici (Sartorius Analytic (v območju delovanja od 10 mg do 120 g $\pm$ 0,01 mg) in Mettler Toledo (v območju delovanja od 0,5 g do 1510 g $\pm$ 0,01 g));
- o inkubator (Kambič SP190);
- o mikrovalovna pečica (Cook n'grill 1300, Sanyo);
- o zamrzovalnik (LTH), nastavljen na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- o zamrzovalna omara (Heto Ultra Freeze), nastavljena na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- o hladilnik (Bosch);
- o vrtničnik (Yellowline, IKA);
- o plinski gorilnik;
- o plinska bomba z mešanico plina: 3% O₂, 10% CO₂, 87% N₂ (Istragas);
- o anaerobni lonci (Anaerojal 2,5l, Oxoid Ago 25A);
- o injekcijske brizgalke (PB Plastik);
- o filtrirni papir (Millipore; Isopore membrane filters 0,2 μm , GTBP);
- o programska oprema: Microsoft Office, programski paket Magellan;
- o centrifuga (5415C, Eppendorf Centrifuge);
- o čitalec mikrotitrskih plošč (Tecan Safire 2);
- o črne mikrotitrne plošče z ravnim dnom (Nunc);
- o 12 – kanalna pipeta (Eppendorf);
- o kad za tekoče gojišče (Eppendorf);
- o sterilizator-avtoklav, V= 40 dm³ (Sutjeska);

3.3 METODE DELA

3.3.1 Revitalizacija kultur

Posamezne izolate bakterij, ki so bili shranjeni v krioepruvetkah (z dodatkom BHI, glicerola, defibrilirane konjske krvi) pri temperaturi $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, smo s cepilno zanko aseptično prenesli na trdno gojišče CCDA. Petrijeve plošče, na katerih so bile nacepljene kulture kampilobaktrov, smo inkubirali v mikroaerofilnih pogojih (atmosfera s 3 % O₂, 10 % CO₂, 87 % N₂) za 48 ur pri $42\text{ }^{\circ}\text{C}$, oziroma do pojava tipičnih kolonij.

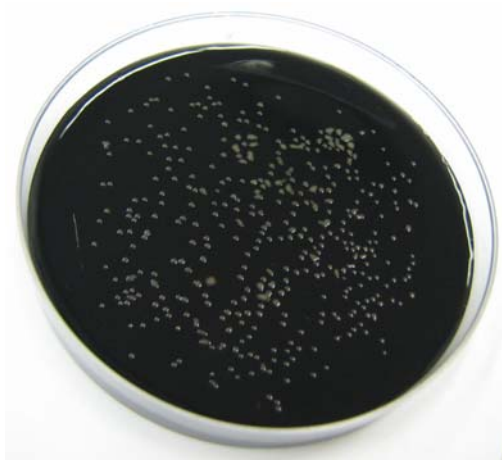
3.3.2 Priprava inokuluma

Po končani inkubaciji so bile na selektivnem gojišču CCDA opazne značilne sive kolonije kampilobaktrov, podobne drobnim vodnim kapljicam. Postopek priprave inokuluma smo izvajali v mikrobiološki komori, ki je zagotovila aseptične pogoje. S cepilno zanko smo posamezne kolonije za vsak izolat posebej resuspendirali v tekočem gojišču MHB (4 ml),

kateremu je bila dodana sterilna defibrilirana konjska kri (0,2 ml). Začetna koncentracija celic je tako znašala 10^5 - 10^6 CFU/ml. Za zagotovitev dobre disperzije mikrobnih celic v gojišču smo raztopino v epruvetah z vrtinčnikom dobro premešali. Končno smo epruvete, v katerih so bila gojišča s posameznimi izolati, inkubirali v mikroaerofilnih pogojih 15 ur pri 42 °C.

3.3.3 Določanje koncentracije celic v inokulumu

Koncentracijo celic v inokulumu smo določali s štetjem bakterijskih kolonij na trdnem gojišču CCDA. Pojav kolonij na gojišču je pomenil, da so bile izolirane celice metabolično aktivne in sposobne delitve. Kolonije, ki so se pojavile na gojišču, so bile sive barve in različnih oblik. Najbolj pogosto so bile ploščate ali okrogle z neravnim robom (slika 12).



Slika 12: Rast kolonij bakterij *Campylobacter* na selektivnem gojišču CCDA

Poizkus smo izvedli v aseptični komori. Uporabili smo metodo razredčevanja po Kochu. Najprej smo v mikrocentrifugirke (Eppendorf) pipetirali 900 µl sterilne fiziološke raztopine. Za prvo razredčitev smo pipetirali 100 µl inokuluma v mikrocentrifugirko s fiziološko raztopino ter vsebino dobro premešali. Iz prve mikrocentrifugirke smo nato v drugo prenesli 100 µl razredčenega inokuluma. Postopek smo ponavljali do razredčitve -6, iz katere smo 100 µl razredčenega inokuluma prenesli na gojišče CCDA v petrijevih ploščah in tako pridobili končno razredčitev -7, iz mikrocentrifugirke z razredčitvijo -5 pa smo še pred tem prenesli 100 µl vsebine na gojišče CCDA, s čimer smo pridobili končno razredčitev -6. Tako smo na ploščah z gojiščem dobili za vsak izolat razredčitvi -7 in -6. Petrijeve plošče smo nato za 24 ur inkubirali v mikroaerofilnih pogojih pri temperaturi 42 °C. Po končani inkubaciji smo ob gorilniku prešteli kolonije, ki so zrasle na ploščah. Za izračun povprečnega števila kolonij na števnih ploščah (25-250 kolonij) smo uporabili sledečo enačbo:

$$N = \frac{\sum c}{(a + 0,1b)d}$$

N...CFU/ml

$\sum c$... vsota kolonij na vseh ploščah

- a...število plošč prve števnice razredčitve
- b...število plošč druge števnice razredčitve
- d...razredčitveni faktor (prve števnice razredčitve)

3.3.4 Mikrodilucijska metoda v bujonu

3.3.4.1 Priprava koncentracij žolčnih soli in detergentov

Odpornost kampilobaktrov smo preizkušali z uporabo žolčnih soli in dveh detergentov (natrijev deoksiholat, natrijev dodecil sulfat). Po navodilih proizvajalca smo za najboljšo učinkovitost raztopin soli in detergentov le-te raztopili v ddH₂O, intenzivno premešali na vrtinčniku in prefiltrirali skozi filter (velikost por 0,2 µm). Pravilno shranjene raztopine (v hladilniku, zavite v alu folijo) smo lahko uporabljali en teden. Delovno raztopino, ki smo jo nanašali na mikrotitrsko ploščico (tako pripravljene žolčne soli oz. detergente, raztopljene v MHB), pa smo si pripravljali vsak dan sproti. V predhodno izvedenih testnih poskusih smo ugotovili, da širok koncentracijski razpon ni potreben, zato smo za žolčne soli in natrijev deoksiholat uporabili koncentracije od 1 mg/ml do 64 mg/ml, za natrijev dodecil sulfat pa od 4 µg/ml do 512 µg/ml. Izračun masnih koncentracij je prikazan spodaj.

Masna koncentracija začetne raztopine žolčnih soli (natrijevega deoksiholata): $c = 0,5 \text{ g} / 2 \text{ ml} = 250 \text{ mg/ml}$

Masna koncentracija začetne raztopine natrijevega dodecil sulfata: $c = 0,0064 \text{ g} / 1,25 \text{ ml} = 5120 \text{ µg/ml}$

Masa žolčnih soli (natrijevega deoksiholata) v raztopini: $m = 250 \text{ mg/ml} \times 0,512 \text{ ml} = 128 \text{ mg}$

Masna koncentracija žolčnih soli (natrijevega deoksiholata) po dodatku gojišča MHB:

$c = 128 \text{ mg} / (0,512 + 0,488) \text{ ml} = 128 \text{ mg/ml}$

Masa natrijevega dodecil sulfata v raztopini: $m = 5120 \text{ g/ml} \times 0,4 \text{ ml} = 2048 \text{ µg}$

Masna koncentracija natrijevega dodecil sulfata po dodatku gojišča MHB: $c = 2048 \text{ µg} / (0,4 + 1,6) \text{ ml} = 1024 \text{ µg/ml}$

Ker smo po dodatku 100 µl raztopine natrijevega dodecil sulfata s koncentracijo 1024 µg/ml v vdolbinice na mikrotitrski plošči dodali še kulturo v razmerju 1:1, je začetna koncentracija znašala 512 µg/ml. Enako smo postopali pri žolčnih solih. Začetna koncentracija žolčnih soli (natrijevega deoksiholata) je tako znašala 64 mg/ml.

3.3.4.2 Priprava kulture

Za pripravo inokuluma smo prenesli 150 µl namnožene 15-urne kulture v epruveto, v kateri je bilo 10 ml gojišča MHB. V tej fazi je bilo izredno pomembno, da smo 15-urno kulturo pred dodatkom v MHB dobro premešali in s tem dosegli homogeno razporeditev mikrobnih celic po celotnem volumnu. Iz epruvete, v kateri je bilo 10 ml gojišča z MHB s kulturo, smo v

vdolbinice na mikrotitrski plošči nanašali 50 µl raztopine. Pred vsakim dodatkom te raztopine v vdolbinico smo tudi to vsebino epruvete prav tako dobro premešali na vrtinčniku.

3.3.4.3 Princip in izvedba metode

Mikrotitrna ploščica ima 96 vdolbinic, označenih s črkami (A-H) po vrsticah in s številkami (1-12) po stolpcih. Na vsaki plošči smo merili fluorescenco za samo gojišče (slepi vzorec) zato, da bi izključili morebiten vpliv gojišča. Dobljeno vrednost smo nato odšteli od izmerjene vrednosti za posamezno koncentracijo žolčnih soli (detergenta). Naredili smo še test »pozitivne kontrole«. To smo storili tako, da smo v vdolbinice dodali samo gojišče in kulturo. Izmerjena vrednost takega vzorca je podala informacijo o metabolični aktivnosti uporabljene kulture. Podobno smo naredili tudi v vdolbinici, v katero smo poleg gojišča in kulture dodali še inhibitor. S tem poizkusom smo preverili, če je imel dodatek inhibitorja vpliv na rast bakterij.

V vdolbinico, ki je predstavljala največjo koncentracijo žolčnih soli (detergenta) smo najprej z avtomatsko pipeto dodali 100 µl že prej pripravljene raztopine žolčnih soli ali natrijevega deoksiholata monohidrata s koncentracijo 64 mg/ml oziroma natrijevega dodecil sulfata s koncentracijo 512 µg/ml. V vse ostale vdolbinice smo dodali 50 µl gojišča MHB z 12-kanalno pipeto. Nato smo iz vdolbinice, v katero smo dodali največjo koncentracijo žolčnih soli (detergenta) prenesli 50 µl raztopine v naslednjo vdolbinico navpično navzdol in dobro premešali z nekaj potegi raztopine v nastavek pipete in nazaj. Nato smo iz te vdolbinice prenesli 50 µl raztopine v naslednjo, ter spet dobro premešali. Tak postopek smo ponavljali vse do vdolbinice, kjer je bila najmanjša koncentracija žolčnih soli (detergenta). Tak način priprave razredčitev nam je zagotovil, da se je koncentracija žolčnih soli (detergenta) zmanjševala za polovico po koloni navzdol. Ker smo raztopine prenašali iz vdolbinice, kjer je bila večja koncentracija v naslednjo, je bil končni volumen v vseh vdolbinicah 50 µl. Iz zadnje vdolbinice smo zato 50 µl raztopine zavrgli. Pri vsaki spojini smo opravili tri serije razredčitev, saj je bila prva serija brez dodanega inhibitorja, drugi dve pa sta bili z dodatkom PAßN in NMP. Kjer je bil potreben dodatek inhibitorja, smo dodali še 4,17 µl PAßN s koncentracijo 20 µg/ml oz. 2,04 µl NMP s koncentracijo 80 µg/ml. Ko smo napravili ustrezne razredčitve, smo v vse vdolbinice (razen v slepi vzorec) dodali po 50 µl standardizirane čiste kulture *Campylobacter* različnega izvora. Po njenem dodatku smo vsebino v vdolbinici dobro premešali (preglednica 5). Tako smo dobili končne delovne koncentracije testiranih spojin. Po končanem postopku smo mikrotitrsko ploščo pokrili s pokrovom, jo dali v posodo, ki je dobro tesnila in jo prepihali z mešanico plina (3 % O₂, 10 % CO₂, 87 % N₂). Posodo, v kateri je bila mikrotitrna ploščica, smo dobro zaprli ter jo inkubirali 24 ur pri 42 °C.

Delo smo si olajšali tako, da smo na pokrov prazne mikrotitrne ploščice označili potek dela. Najbolj sistematičen način je bila analiza enega izolata na tri spojine-preglednica 6 (žolčne soli, NaDC, SDS) na isti ploščici, kjer smo tako določili vrednosti MIC za tri spojine brez in z obema inhibitorjema. Na eni ploščici smo tako lahko analizirali en izolat na tri spojine.

Preglednica 5: Oznaka vdolbinic v mikrotitrski ploščici in njihova vsebina pri testiranju natrijevega dodecil sulfata

Oznaka vdolbinice	Dodani reagenti v posamezni vdolbinici
BL (1A)	Slepi vzorec: 100 µl MHB
PC S3 (8A)	Pozitivna kontrola: 50 µl MHB + 50 µl kulture
PC S3 + I₁ (8B)	50 µl MHB+ 50 µl kulture + 4,17 µl PABN
PC S3 + I₂ (8C)	50 µl MHB+ 50 µl kulture + 2,04 µl NMP
1R (1x razredčitev)	100 µl SDS (c=512 µg/ml) + 50 µl kulture
2R (2x razredčitev)	50 µl raztopine MHB in SDS (c=256 µg/ml) + 50 µl kulture
3R (3x razredčitev)	50 µl raztopine MHB in SDS (c=128 µg/ml) + 50 µl kulture
4R (4x razredčitev)	50 µl raztopine MHB in SDS (c=64 µg/ml) + 50 µl kulture
5R (5x razredčitev)	50 µl raztopine MHB in SDS (c=32 µg/ml) + 50 µl kulture
6R (6x razredčitev)	50 µl raztopine MHB in SDS (c=16 µg/ml) + 50 µl kulture
7R (7x razredčitev)	50 µl raztopine MHB in SDS (c=8 µg/ml) + 50 µl kulture
8R (8x razredčitev)	50 µl raztopine MHB in SDS (c=4 µg/ml) + 50 µl kulture

Preglednica 6: Prikaz mikrotitrne plošče po končanem dodajanju reagentov in kulture

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	S1- 1R BS	S1- 1R BS+I ₁	S1- 1R BS+I ₂	S2- 1R DEO	S2- 1R DEO+I ₁	S2- 1R DEO+I ₂	PC- S3	S3- R1 SDS	S3- 1R SDS+I ₁	S3- 1R SDS+I ₂	/
B	PC- S1	S1- 2R BS	S1- 2R BS+I ₁	S1- 2R BS+I ₂	S2- 2R DEO	S2- 2R DEO+I ₁	S2- 2R DEO+I ₂	PC- S3+I ₁	S3- 2R SDS	S3- 2R SDS+I ₁	S3- 2R SDS+I ₂	/
C	PC- S1+I ₁	S1- 3R BS	S1- 3R BS+I ₁	S1- 3R BS+I ₂	S2- 3R DEO	S2- 3R DEO+I ₁	S2- 3R DEO+I ₂	PC- S3+I ₂	S3- 3R SDS	S3- 3R SDS+I ₁	S3- 3R SDS+I ₂	/
D	PC- S1+I ₂	S1- 4R BS	S1- 4R BS+I ₁	S1- 4R BS+I ₂	S2- 4R DEO	S2- 4R DEO+I ₁	S2- 4R DEO+I ₂	/	S3- 4R SDS	S3- 4R SDS+I ₁	S3- 4R SDS+I ₂	/
E	PC- S2	S1- 5R BS	S1- 5R BS+I ₁	S1- 5R BS+I ₂	S2- 5R BS+I ₂	S2- 5R DEO+I ₁	S2- 5R DEO+I ₂	/	S3- 5R SDS	S3- 5R SDS+I ₁	S3- 5R SDS+I ₂	/
F	PC- S2+I ₁	S1- 6R BS	S1- 6R BS+I ₁	S1- 6R BS+I ₂	S2- 6R DEO	S2- 6R DEO+I ₁	S2- 6R DEO+I ₂	/	S3- 6R SDS	S3- 6R SDS+I ₁	S3- 6R SDS+I ₂	/
G	PC- S2+I ₂	S1- 7R BS	S1- 7R BS+I ₁	S1- 7R BS+I ₂	S2- 7R DEO	S2- 7R DEO+I ₁	S2- 7R DEO+I ₂	/	S3- 7R SDS	S3- 7R SDS+I ₁	S3- 7R SDS+I ₂	/
H	/	S1- 8R BS	S1- 8R BS+I ₁	S1- 8R BS+I ₂	S2- 8R DEO	S2- 8R DEO+I ₁	S2- 8R DEO+I ₂	/	S3- 8R SDS	S3- 8R SDS+I ₁	S3- 8R SDS+I ₂	/

BS = ŽOLČNE SOLI; BS + I₁ = ŽOLČNE SOLI + PAβN; BS + I₂ = ŽOLČNE SOLI + NMP

DEO= Na DEOKSIHOLAT; DEO+ I₁= Na DEOKSIHOLAT+ PABN; DEO+ I₂= Na DEOKSIHOLAT+ NMP

SDS= Na DODECIL SULFAT; SDS+ I₁= Na DODECIL SULFAT+ PABN; SDS+ I₂=Na DODECIL SULFAT + NMP

PC-S1 = POZITIVNA KONTROLA; PC-S1+I₁ = POZITIVNA KONTROLA S PABN; PC-S1+I₂ = POZITIVNA KONTROLA Z NMP

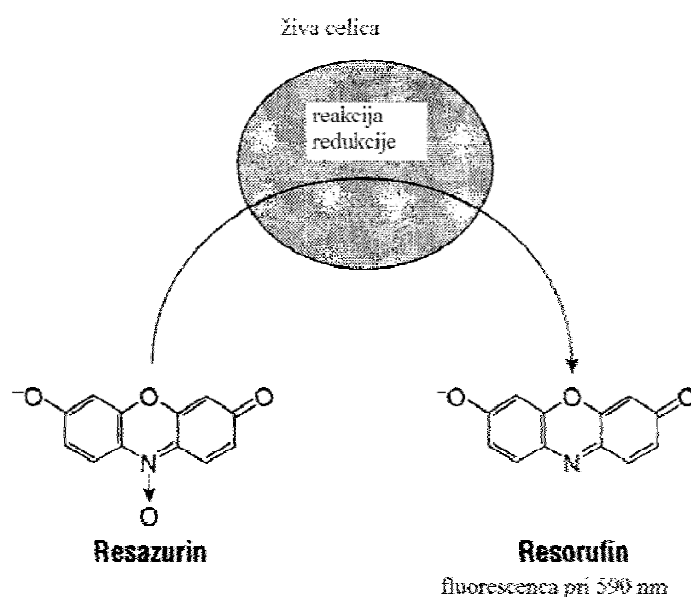
BL = BLANK (slepi vzorec)

3.3.4.4 Določitev živosti bakterijskih celic

Po končani inkubaciji smo v vse vdolbinice dodali 10 µl reagenta CellTiter-Blue[®], ki se uporablja za določanje živosti celic na mikrotitrskih ploščah (slika 14). Sledila je inkubacija mikrotitrške plošče za 2 uri pri 42 °C v mikroaerofilnih pogojih in v temi.

Reagent CellTiter-Blue[®] vsebuje indikatorsko barvilo resazurin, ki meri metabolično kapaciteto celic - je indikator živosti. Žive celice ohranijo sposobnost redukcije resazurina v resorufin, ki močno fluorescira (slika 13). Nežive celice hitro izgubijo metabolično kapaciteto, ne reducirajo indikatorskega barvila in tako ne proizvajajo fluorescentnega signala. Intenziteta fluorescence je sorazmerna številu živih celic. Linearno območje in nizka meja detekcije sta odvisna od vrste mikroorganizma in njegove sposobnosti redukcije resazurina (Riss in Moravec, 2003).

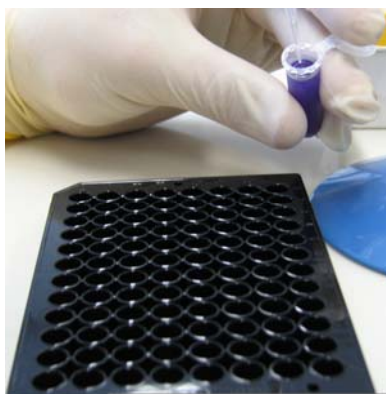
Indikatorsko barvilo resazurin je temno modre barve in ima majhno intrinzično fluorescenco, dokler ni reduciran v resorufin, ki je roza barve in močno fluorescira. Živost se lahko spremlja na osnovi fluorescence ali absorbance (Riss in Moravec, 2003).



Slika 13: Redukcija resazurina (Riss in Moravec, 2003)

Spremembo barve smo opazili brez dodatne opreme (slika 14), fluorescenco pa izmerili s čitalcem mikrotitrskih plošč Tecan Safire 2. Uporabili smo naslednje pogoje:

- valovna dolžina vzbujanja: 550 nm
- valovna dolžina merjenja emitirane fluorescence: 595 nm



Slika 14: Dodajanje barvila CellTiter-Blue® v vdolbinice na mikrotitrski plošči



Slika 15: Prikaz mikrotitrške plošče po končani analizi. Rdečkasto-roza obarvane vdolbinice kažejo, da so v njih žive mikrobne celice, ki so bile sposobne reducirati resazurin v resorufin. Nežive mikrobne celice so v vdolbinicah, ki so temno-vijolične. V teh vdolbinicah barvilo ostane iste barve kot pred inkubacijo. MIC predstavlja zadnjo vdolbinico v koloni, ki ni spremenila barve. Dodane reagentne in koncentracije spojin prikazujeta preglednici 5 in 6.

Čitalec mikrotitrskih ploščic rezultat izrazi kot relativno enoto fluorescence (RFU). Te enote smo nato preračunali v procent rasti po relaciji (1):

$$\text{rast (\%)} = \frac{(RFU - \text{praznivzorec})_{\text{vzorec}}}{(RFU - \text{praznivzorec})_{\text{PC} - \text{S1}}} \times 100 \quad \dots (1)$$

RFU... relativna fluorescentna enota

prazni vzorec... relativna fluorescentna enota gojišča

PC - S1... pozitivna kontrola

Relacija (1) prikazuje delež živih celic (grafičen prikaz v rezultatih), izražen glede na rast pozitivne kontrole, izmerjene za vsak izolat posebej.

Učinkovitost inhibitorja (U) in s tem vlogo membranskih črpalk pri odpornosti proti testiranim spojinam smo izračunali iz izmerjenih vrednosti MIC po relaciji (2):

$$U = \text{MIC}_{\text{brez inhibitorja}} / \text{MIC}_{\text{z inhibitorjem}} \quad \dots (2)$$

4 REZULTATI

V eksperimentalni del raziskave smo vključili 20 izolatov, med katerimi je bilo 7 izolatov perutninskega, 4 prašičjega, 5 humanega izvora, 2 sta bila izolirana iz vode, 2 pa sta bila referenčna vzorca. Vsi testirani izolati so bili odporni na eritromicin.

Testiranje bakterijske občutljivosti je potekalo z žolčnimi solmi ter detergentoma natrijevim deoksiholatom in natrijevim dodecil sulfatom v koncentracijskih območjih od 1 mg/ml do 64 mg/ml za prvi dve spojini in od 4 µg/ml do 512 µg/ml za tretjo.

Za ugotavljanje bakterijske občutljivosti smo uporabili mikrodilucijsko metodo v bujonu s katero smo določali minimalno inhibitorno koncentracijo določene spojine-MIC, ki je veljala tudi kot merilo za občutljivost bakterij na preiskovane spojine. MIC je tista koncentracija spojine, ki še inhibira rast bakterij in smo jo določali grafično.

Skladno s hipotezami diplomske naloge smo določali tudi MIC spojin pri izbranih izolatih *Campylobacter* v prisotnosti oz. odsotnosti subinhibitornih koncentracij inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk fenilalanilarginin-β-naftilamida-PAβN in 1-(1-naftilmetil)-piperazina-NMP. Na osnovi predhodno izvedenih testnih poskusov in objavljenih študij smo izbrali PAβN s koncentracijo 20 µg/ml in NMP s koncentracijo 80 µg/ml. Predpostavili smo, da inhibitor membranskih izlivnih črpalk poveča občutljivost mikroorganizma na žolčne soli oziroma detergente.

Bakterijsko odpornost na posamezno spojino smo določali s pomočjo vrednosti MIC posameznih izolatov brez dodatka inhibitorja (PAβN, NMP) in z njegovim dodatkom. Vloga inhibitorja je, da onemogoča izhajanje spojin iz celic, ter na ta način prispeva k boljšemu učinku teh spojin v celici. Iz razmerja vrednosti MIC brez inhibitorja in MIC z dodatkom inhibitorja dobimo podatek o učinku inhibitorja membranskih izlivnih črpalk na povečevanje občutljivosti določenega izolata na posamezno spojino.

Rezultati določanja MIC so prikazani grafično kot odstotek rasti glede na pozitivno kontrolo izmerjeno na istem izolatu in na isti ploščici. Rezultati so bili zbrani na enak način za vseh 20 testiranih izolatov, za grafično predstavitev določanja MIC pa smo izbrali izolate, kjer je učinek inhibitorja dobro izražen. Vrednost MIC je v praksi predstavljala najmanjša razredčitev na ploščici, ki je še bila manjša od dvakratne vrednosti praznega vzorca (relativna fluorescentna vrednost gojišča). Naslednja razredčitev na ploščici je že bila premajhna, da bi vplivala na rast in razmnoževanje celic. S štetjem kolonij na ploščah smo določili, da je bila njihova koncentracija v območju 10^4 - 10^5 CFU/ml in se je z zniževanjem koncentracije protimikrobne snovi povečevala. Vse vrednosti MIC so zbrane tudi v zbirnih preglednicah za posamezno spojino, in sicer izmerjene brez in z dodatkom inhibitorja PAβN oziroma NMP.

4.1 ODPORNOST BAKTERIJ *Campylobacter* NA ŽOLČNE SOLI IN DETERGENTE

V študijo določanja bakterijske odpornosti smo vključili 18 sevov rodu *Campylobacter* različnega izvora in 2 referenčna seva. Odpornost smo določali z žolčnimi solmi in detergentoma natrijevim deoksiholatom in natrijevim dodecil sulfatom. Dobljeni rezultati-MIC so predstavljeni v zbirni preglednici 7.

Preglednica 7: Zbirna preglednica vrednosti MIC (mg/ml, µg/ml) kot merila odpornosti sevov rodu *Campylobacter* na žolčne soli, natrijev deoksiholat in natrijev dodecil sulfat

IZOLAT			TESTIRANE SPOJINE		
Oznaka	Vrsta	Izvor	MIC ŽOLČNE SOLI (mg/ml)	MIC Na deoksiholat (mg/ml)	MIC Na dodecil sulfat (µg/ml)
GC 154	<i>C. coli</i>	Perutnina	>64	32	512
FC 8	<i>C. coli</i>	Perutnina	>64	>64	>512
FC 10	<i>C. coli</i>	Perutnina	64	64	256
137	<i>C. coli</i>	Perutnina	64	32	256
171	<i>C. coli</i>	Perutnina	16	16	512
140	<i>C. coli</i>	Perutnina	64	4	>512
M 37	<i>C. coli</i>	Perutnina	16	32	512
VC 7114	<i>C. coli</i>	Svinjina	16	2	512
VC 110722	<i>C. coli</i>	Svinjina	64	16	256
VC 110725	<i>C. coli</i>	Svinjina	16	64	512
VC 11076	<i>C. coli</i>	Svinjina	64	32	512
10162	<i>C. spp</i>	Humani	64	64	512
10522	<i>C. spp</i>	Humani	64	64	256
119/06	<i>C. coli</i>	Humani	>64	32	256
413/06	<i>C. jejuni</i>	Humani	64	128	512
2235	<i>C. coli</i>	Humani	64	8	512
809	<i>C. coli</i>	Voda	16	8	256
803	<i>C. coli</i>	Voda	64	64	>512
ATCC 33560	<i>C. jejuni</i>	Živalski iztrebki	64	64	512
ATCC 33559	<i>C. coli</i>	Živalski iztrebki	64	32	512

4.2 TESTIRANJE VPLIVA RAZLIČNIH KONCENTRACIJ INHIBITORJEV NA VREDNOST MIC KOT MERILO ODPORNOSTI SEVOV *Campylobacter* NA ŽOLČNE SOLI IN DETERGENTE

Zaradi širokega razpona uporabljenih koncentracij inhibitorjev, ki jih navaja literatura, smo najprej opravili testne poskuse z namenom določiti optimalno koncentracijo inhibitorja, ki bi učinkoval na izbrane izolate. Na osnovi dobljenih rezultatov, ki jih predstavljajo preglednice 8-10, smo se odločili za PAßN s koncentracijo 20 µg/ml in NMP s koncentracijo 80 µg/ml.

Preglednica 8: Zbirna preglednica vrednosti MIC (mg/ml) kot merila odpornosti sevov rodu *Campylobacter* na žolčne soli v prisotnosti oz. odsotnosti inhibitorjev PAßN in NMP (µg/ml) različnih koncentracij. Koncentracije posameznega inhibitorja (µg/ml) so navedene v preglednici

IZOLAT			MIC ŽOLČNE SOLI (mg/ml)				
Oznaka	Vrsta	Izvor	MIC	MIC _{PAßN 10}	MIC _{PAßN 20}	MIC _{NMP 60}	MIC _{NMP 80}
10162	<i>C. spp</i>	Humani	64	32	<1	32	2
VC 110722	<i>C. coli</i>	Svinjina	64	64	32	64	<4
ATCC 33559	<i>C. coli</i>	Živalski iztrebki	64	64	<2	64	<2

Preglednica 9: Zbirna preglednica vrednosti MIC (mg/ml) kot merila odpornosti sevov rodu *Campylobacter* na NaDC v prisotnosti oz. odsotnosti inhibitorjev PAßN in NMP (µg/ml) različnih koncentracij. Koncentracije posameznega inhibitorja (µg/ml) so navedene v preglednici

IZOLAT			MIC Na deoksiholat (mg/ml)				
Oznaka	Vrsta	Izvor	MIC	MIC _{PAßN 10}	MIC _{PAßN 20}	MIC _{NMP 60}	MIC _{NMP 80}
10522	<i>C. spp</i>	Humani	64	64	4	32	1
VC 11076	<i>C. coli</i>	Svinjina	32	16	<0,5	16	<1
171	<i>C. coli</i>	Perutnina	16	8	<1	16	<1

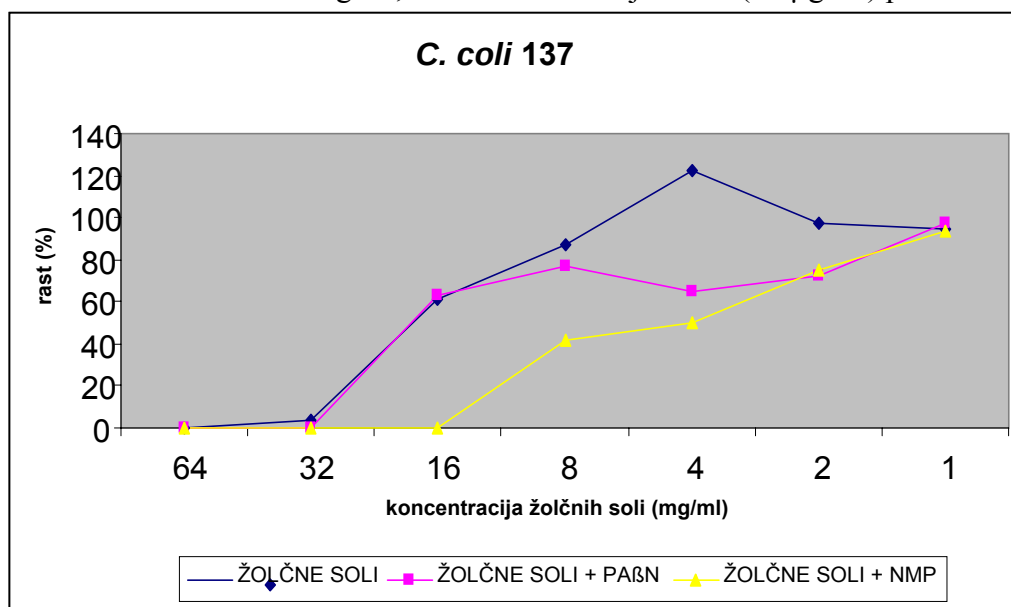
Preglednica 10: Zbirna preglednica vrednosti MIC (µg/ml) kot merila odpornosti bakterij rodu *Campylobacter* na SDS v prisotnosti oz. odsotnosti inhibitorjev PAßN in NMP (µg/ml) različnih koncentracij. Koncentracije posameznega inhibitorja (µg/ml) so navedene v preglednici

IZOLAT			MIC Na dodecil sulfat (µg/ml)				
Oznaka	Vrsta	Izvor	MIC	MIC _{PAßN 10}	MIC _{PAßN 20}	MIC _{NMP 60}	MIC _{NMP 80}
413/06	<i>C. jejuni</i>	Humani	512	64	8	16	<8
137	<i>C. coli</i>	Perutnina	256	128	<8	2	<8
803	<i>C. coli</i>	Voda	1024	256	<8	32	<8

4.3 ODPORNOST BAKTERIJ *Campylobacter* NA ŽOLČNE SOLI IN DETERGENTE BREZ IN Z DODATKOM INHIBITORJEV

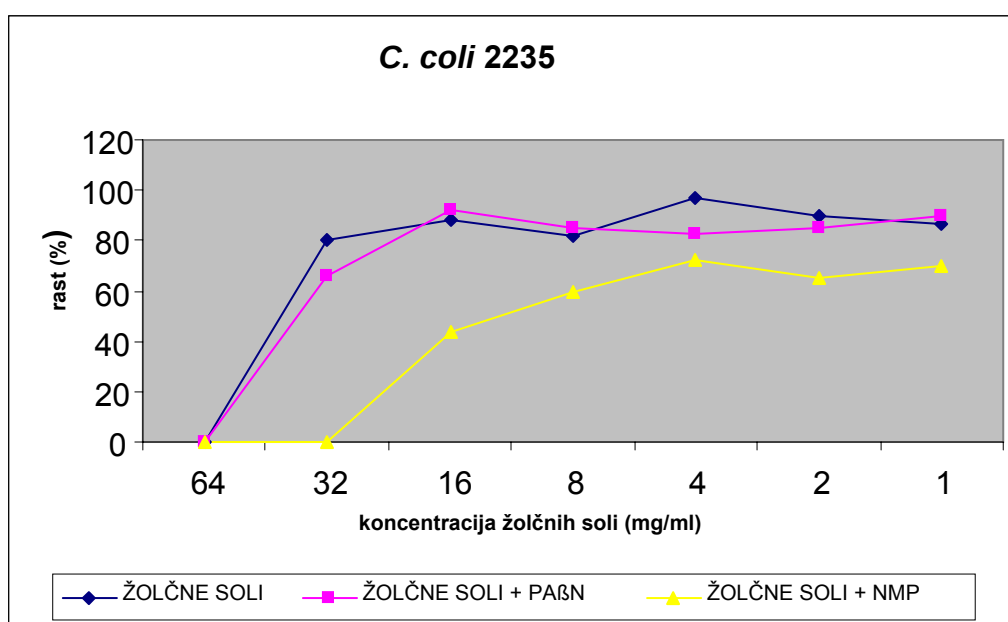
4.3.1 Žolčne soli

Vrednost MIC seva *C. coli* 137 je znašala 64 mg/ml. Dodatek inhibitorja PAßN (20 µg/ml) je zmanjšal vrednost MIC na 32 mg/ml, dodatek inhibitorja NMP (80 µg/ml) pa na 16 mg/ml.



Slika 16: Primer grafičnega določanja vrednosti MIC žolčnih soli pri sevu *C. coli* 137

Vrednost MIC seva *C. coli* 2235 je znašala 64 mg/ml. Dodatek inhibitorja PAßN (20 µg/ml) na zmanjšanje vrednosti MIC ni imel vpliva, dodatek inhibitorja NMP (80 µg/ml) pa je zmanjšal vrednost MIC na 32 mg/ml.



Slika 17: Primer grafičnega določanja vrednosti MIC žolčnih soli pri sevu *C. coli* 2235

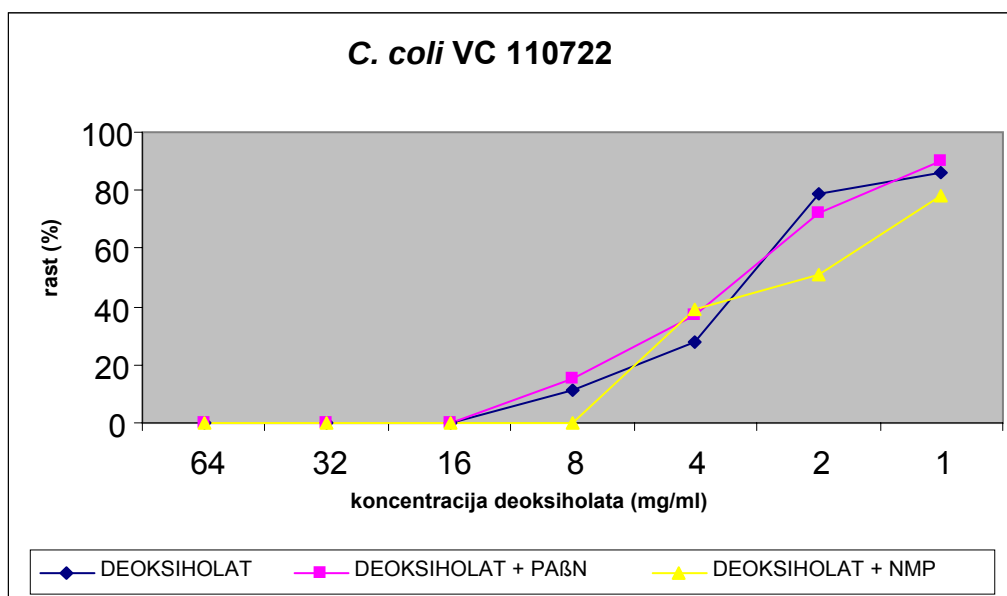
V študijo smo vključili 18 sevov rodu *Campylobacter* različnega izvora in 2 referenčna seva. Vrednosti MIC za žolčne soli v odsotnosti inhibitorja so zavzemale koncentracijska območja od 16 mg/ml do 64 mg/ml. Vzporedno smo spremljali bakterijsko odpornost na žolčne soli ob dodatku inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk PAβN s koncentracijo 20 µg/ml, oziroma NMP s koncentracijo 80 µg/ml. Vrednosti MIC žolčnih soli z dodatkom inhibitorja so se v večini primerov zmanjšale v primerjavi z vrednostjo MIC v odsotnosti inhibitorja. Dobljeni rezultati so predstavljeni v zbirni preglednici 11.

Preglednica 11: Zbirna preglednica vrednosti MIC (mg/ml) kot merila odpornosti sevov rodu *Campylobacter* na žolčne soli v prisotnosti oz. odsotnosti inhibitorjev PAβN (20 µg/ml) in NMP (80 µg/ml)

Izolat			ŽOLČNE SOLI		
Oznaka	Vrsta	Izvor	MIC (mg/ml)	MIC + PAβN (mg/ml)	MIC + NMP (mg/ml)
GC 154	<i>C. coli</i>	Perutnina	>64	64	<1
FC 8	<i>C. coli</i>	Perutnina	>64	16	<1
FC 10	<i>C. coli</i>	Perutnina	64	<2	<1
137	<i>C. coli</i>	Perutnina	64	32	16
171	<i>C. coli</i>	Perutnina	16	4	<2
140	<i>C. coli</i>	Perutnina	64	64	32
M 37	<i>C. coli</i>	Perutnina	16	16	8
VC 7114	<i>C. coli</i>	Svinjina	16	4	< 1
VC 110722	<i>C. coli</i>	Svinjina	64	32	<4
VC 110725	<i>C. coli</i>	Svinjina	16	4	<2
VC 11076	<i>C. coli</i>	Svinjina	64	1	1
10162	<i>C. spp</i>	Humani	64	<1	2
10522	<i>C. spp</i>	Humani	64	64	64
119/06	<i>C. coli</i>	Humani	>64	>64	32
413/06	<i>C. jejuni</i>	Humani	64	64	32
2235	<i>C. coli</i>	Humani	64	64	32
809	<i>C. coli</i>	Voda	16	<2	<2
803	<i>C. coli</i>	Voda	64	8	<1
ATCC 33560	<i>C. jejuni</i>	Živalski iztrebki	64	<2	<2
ATCC 33559	<i>C. coli</i>	Živalski iztrebki	64	64	<2

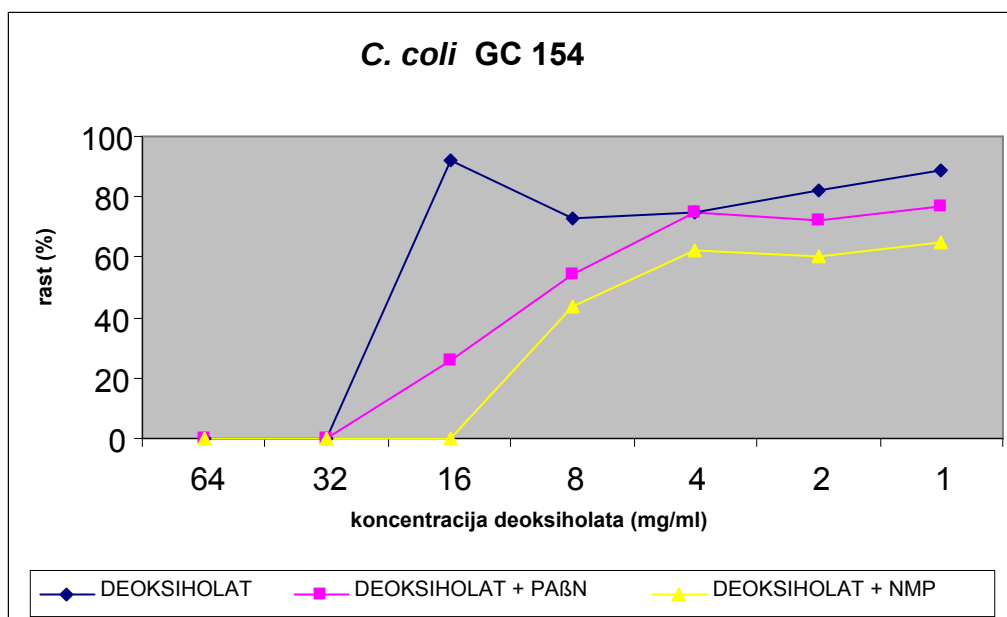
4.3.2 Natrijev deoksiholat

Vrednost MIC seva *C. coli* VC 110722 je znašala 16 mg/ml. Dodatek inhibitorja PAßN (20 µg/ml) na zmanjšanje vrednosti MIC ni imel vpliva, dodatek inhibitorja NMP (80 µg/ml) pa je zmanjšal vrednost MIC na 8 mg/ml.



Slika 18: Primer grafičnega določanja vrednosti MIC Na deoksiholata pri sevu *C. coli* VC 110722

Vrednost MIC seva *C. coli* GC 154 je znašala 32 mg/ml. Dodatek inhibitorja PAßN (20 µg/ml) na zmanjšanje vrednosti MIC ni imel vpliva, dodatek inhibitorja NMP (80 µg/ml) pa je zmanjšal vrednost MIC na 16 mg/ml.



Slika 19: Primer grafičnega določanja vrednosti MIC Na deoksiholata pri sevu *C. coli* GC 154

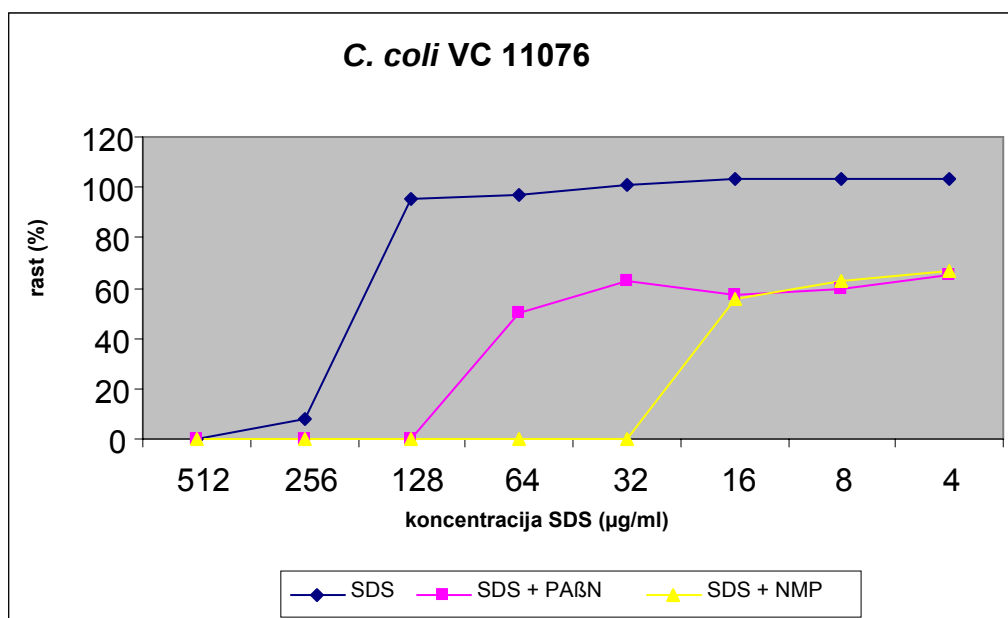
V študijo smo vključili 18 sevov *Campylobacter* različnega izvora in 2 referenčna seva. Vrednosti MIC za natrijev deoksiholat v odsotnosti inhibitorja so zavzemale koncentracijska območja od 2 mg/ml do 128 mg/ml. Vzporedno smo spremljali bakterijsko odpornost na natrijev deoksiholat ob dodatku inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk PAβN s koncentracijo 20 µg/ml oziroma NMP s koncentracijo 80 µg/ml. Vrednosti MIC natrijevega deoksiholata z dodatkom inhibitorja so se v večini primerov zmanjšale v primerjavi z vrednostjo MIC tega detergenta v odsotnosti inhibitorja. Dobljeni rezultati so predstavljeni v zbirni preglednici 12.

Preglednica 12: Zbirna preglednica vrednosti MIC kot merila odpornosti sevov rodu *Campylobacter* na natrijev deoksiholat v prisotnosti oz. odsotnosti inhibitorjev PAβN (20 µg/ml) in NMP (80 µg/ml)

Izolat			Na deoksiholat		
Oznaka	Vrsta	Izvor	MIC (mg/ml)	MIC + PAβN (mg/ml)	MIC + NMP (mg/ml)
GC 154	<i>C. coli</i>	Perutnina	32	32	16
FC 8	<i>C. coli</i>	Perutnina	>64	>64	<1
FC 10	<i>C. coli</i>	Perutnina	64	64	64
137	<i>C. coli</i>	Perutnina	32	<1	<1
171	<i>C. coli</i>	Perutnina	16	<1	<1
140	<i>C. coli</i>	Perutnina	4	4	2
M 37	<i>C. coli</i>	Perutnina	32	32	1
VC 7114	<i>C. coli</i>	Svinjina	2	<1	<1
VC 110722	<i>C. coli</i>	Svinjina	16	16	8
VC 110725	<i>C. coli</i>	Svinjina	64	8	2
VC 11076	<i>C. coli</i>	Svinjina	32	<0,5	<1
10162	<i>C. spp</i>	Humani	64	<0,5	<1
10522	<i>C. spp</i>	Humani	64	4	1
119/06	<i>C. coli</i>	Humani	32	32	<1
413/06	<i>C. jejuni</i>	Humani	128	128	<1
2235	<i>C. coli</i>	Humani	8	<0,5	<1
809	<i>C. coli</i>	Voda	8	<1	<1
803	<i>C. coli</i>	Voda	64	16	2
ATCC 33560	<i>C. jejuni</i>	Živalski iztrebki	64	16	<1
ATCC 33559	<i>C. coli</i>	Živalski iztrebki	32	32	<1

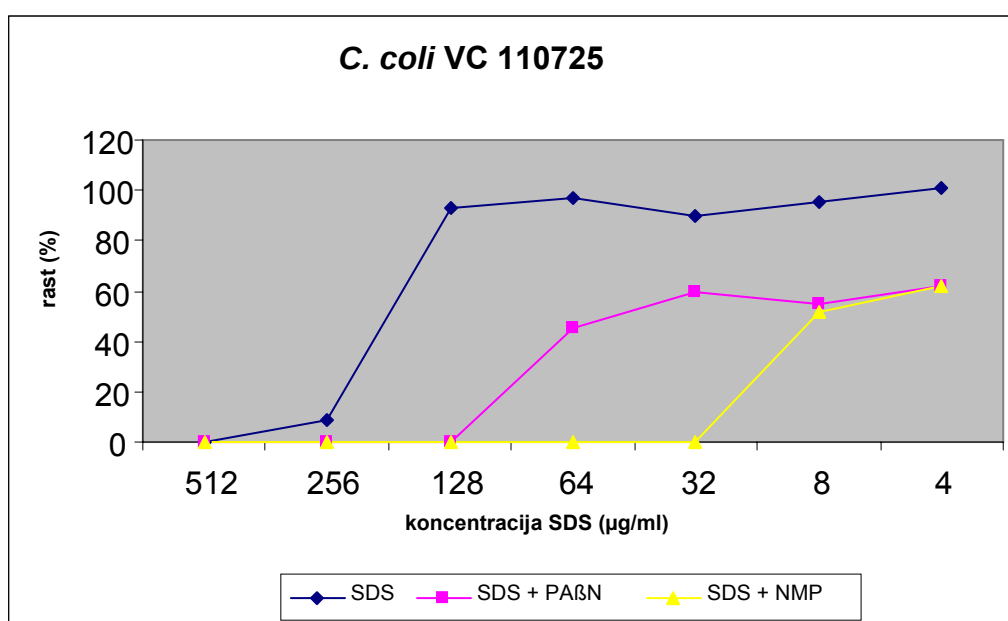
4.3.3 Natrijev dodecil sulfat

Vrednost MIC seva *C. coli* VC 11076 je znašala 512 $\mu\text{g/ml}$. Dodatek inhibitorja PAßN (20 $\mu\text{g/ml}$) je zmanjšal vrednost MIC na 128 $\mu\text{g/ml}$, dodatek inhibitorja NMP (80 $\mu\text{g/ml}$) pa na 32 $\mu\text{g/ml}$.



Slika 20: Primer grafičnega določanja vrednosti MIC SDS pri sevu *C. coli* VC 11076

Vrednost MIC izolata VC 110725 je znašala 512 $\mu\text{g/ml}$. Dodatek inhibitorja PAßN (20 $\mu\text{g/ml}$) je zmanjšal vrednost MIC na 128 $\mu\text{g/ml}$, dodatek inhibitorja NMP (80 $\mu\text{g/ml}$) pa na 32 $\mu\text{g/ml}$.



Slika 21: Primer grafičnega določanja vrednosti MIC SDS pri sevu *C. coli* VC 110725

V študijo smo vključili 18 sevov rodu *Campylobacter* različnega izvora in 2 referenčna seva. Vrednosti MIC za natrijev dodecil sulfat v odsotnosti inhibitorja so zavzele koncentracijska območja od 256 µg/ml do >512 µg/ml. Vzporedno smo spremljali bakterijsko odpornost na natrijev dodecil sulfat ob dodatku inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk PAβN s koncentracijo 20 µg/ml oziroma NMP s koncentracijo 80 µg/ml. Vrednost MIC natrijevega dodecil sulfata z dodatkom inhibitorja se je zmanjšala v primerjavi z vrednostjo MIC tega detergenta v odsotnosti inhibitorja. Dobljeni rezultati so predstavljeni v zbirni preglednici 13.

Preglednica 13: Zbirna preglednica vrednosti MIC (µg/ml) kot merila odpornosti sevov rodu *Campylobacter* na natrijev dodecil sulfat v prisotnosti oz. odsotnosti inhibitorjev PAβN (20 µg/ml) in NMP (80 µg/ml)

Izolat			Na dodecil sulfat		
Oznaka	Vrsta	Izvor	MIC (µg/ml)	MIC + PAβN (µg/ml)	MIC + NMP (µg/ml)
GC 154	<i>C. coli</i>	Perutnina	512	<4	<4
FC 8	<i>C. coli</i>	Perutnina	>512	<8	4
FC 10	<i>C. coli</i>	Perutnina	256	64	32
137	<i>C. coli</i>	Perutnina	256	<8	<8
171	<i>C. coli</i>	Perutnina	512	32	16
140	<i>C. coli</i>	Perutnina	>512	32	32
M 37	<i>C. coli</i>	Perutnina	512	<8	32
VC 7114	<i>C. coli</i>	Svinjina	512	16	8
VC 110722	<i>C. coli</i>	Svinjina	256	256	64
VC 110725	<i>C. coli</i>	Svinjina	512	128	32
VC 11076	<i>C. coli</i>	Svinjina	512	128	32
10162	<i>C. spp</i>	Humani	512	16	2
10522	<i>C. spp</i>	Humani	256	64	32
119/06	<i>C. coli</i>	Humani	256	16	16
413/06	<i>C. jejuni</i>	Humani	512	8	<8
2235	<i>C. coli</i>	Humani	512	64	16
809	<i>C. coli</i>	Voda	256	128	16
803	<i>C. coli</i>	Voda	>512	<8	8
ATCC 33560	<i>C. jejuni</i>	Živalski iztrebki	512	<8	64
ATCC 33559	<i>C. coli</i>	Živalski iztrebki	512	32	16

4.4 RELATIVNA UČINKOVITOST INHIBITORJEV PAßN IN NMP PRI ZMANJŠANJU ODPORNOSTI PROTI ŽOLČNIM SOLEM IN DETERGENTOM

Vsem 20 sevom smo izračunali relativno učinkovitost inhibitorjev PAßN in NMP pri zmanjšanju odpornosti proti žolčnim solem in detergentom. V preglednici 14 je za vsak sev testiran na navedene spojine, prikazan učinek posameznega inhibitorja na zmanjšanje odpornosti proti žolčnim solem in detergentoma.

Preglednica 14: Zbirna preglednica relativne učinkovitosti (U) inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk na zmanjšano odpornost na žolčne soli in oba detergenta

IZOLAT			ŽOLČNE SOLI		Na DEOKSIHOLAT		Na DODECIL SULFAT	
Oznaka	Vrsta	Izvor	U _{PABN}	U _{NMP}	U _{PABN}	U _{NMP}	U _{PABN}	U _{NMP}
GC 154	<i>C. coli</i>	Perutnina	>1	>64	1	2	>128	>128
FC 8	<i>C. coli</i>	Perutnina	>4	>64	1	>64	64	>128
FC 10	<i>C. coli</i>	Perutnina	>32	>64	1	1	4	8
137	<i>C. coli</i>	Perutnina	2	4	>32	>32	>32	>32
171	<i>C. coli</i>	Perutnina	4	>8	>16	>16	16	32
140	<i>C. coli</i>	Perutnina	1	2	1	2	>16	>16
M 37	<i>C. coli</i>	Perutnina	1	2	1	32	>64	16
VC 7114	<i>C. coli</i>	Svinjina	4	>16	>2	>2	32	64
VC 110722	<i>C. coli</i>	Svinjina	2	>16	1	2	1	4
VC 110725	<i>C. coli</i>	Svinjina	4	>8	8	32	4	16
VC 11076	<i>C. coli</i>	Svinjina	64	64	>64	>32	4	16
10162	<i>C. spp</i>	Humani	>64	32	>128	>64	32	256
10522	<i>C. spp</i>	Humani	1	1	16	64	4	8
119/06	<i>C. coli</i>	Humani	1	>2	1	>32	16	16
413/06	<i>C. jejuni</i>	Humani	1	2	1	>128	64	>64
2235	<i>C. coli</i>	Humani	1	2	>16	>8	8	32
809	<i>C. coli</i>	Voda	>8	>8	>8	>8	2	16
803	<i>C. coli</i>	Voda	8	>64	4	32	>64	>64
ATCC 33560	<i>C. jejuni</i>	Živalski iztrebki	>32	>32	4	>64	>64	8
ATCC 33559	<i>C. coli</i>	Živalski iztrebki	1	>32	1	>32	16	32

4.5 PRIMERJAVA RELATIVNE UČNIKOVITOSTI (U) INHIBITORJEV PABN IN NMP NA ZMANJŠANJE ODPORNOSTI NA ŽOLČNE SOLI IN ERITROMICIN

Na identičnih 18 izolatih različnega izvora smo po končanem testiranju naredili primerjavo relativne učinkovitosti posameznega inhibitorja na zmanjšanje odpornosti proti žolčnim solem in eritromicinu. Zanimalo nas je, če lahko na osnovi dobljenih rezultatov sklepamo na različno učinkovitost inhibitorjev na odpornost proti žolčnim solem, ki predstavljajo naravno obrambo telesa pred mikroorganizmi in eritromicinu, ki ga ob infekciji umetno vnašamo v telo. Rezultati so predstavljeni v zbirni preglednici 15.

Preglednica 15: Zbirna preglednica primerjave relativne učinkovitosti (U) inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk na zmanjšano odpornost na žolčne soli in eritromicin

IZOLAT			ŽOLČNE SOLI		ERITROMICIN	
Oznaka	Vrsta	Izvor	U _{PABN}	U _{NMP}	U _{PABN}	U _{NMP}
GC 154	<i>C. coli</i>	Perutnina	>1	>64	≥64	4
FC 8	<i>C. coli</i>	Perutnina	>4	>64	32	8
FC10	<i>C. coli</i>	Perutnina	>32	>64	64	8
137	<i>C. coli</i>	Perutnina	2	4	≥16	≥4
171	<i>C. coli</i>	Perutnina	4	>8	16	4
140	<i>C. coli</i>	Perutnina	1	2	16	4
M 37	<i>C. coli</i>	Perutnina	1	2	16	4
VC 7114	<i>C. coli</i>	Svinjina	4	>16	16	≥128
VC 110722	<i>C. coli</i>	Svinjina	2	>16	64	64
VC 110725	<i>C. coli</i>	Svinjina	4	>8	128	32
VC 11076	<i>C. coli</i>	Svinjina	64	64	16	16
10162	<i>C. spp</i>	Humani	>64	32	128	1
10522	<i>C. spp</i>	Humani	1	1	4	1
119/06	<i>C. coli</i>	Humani	1	>2	8	4
413/06	<i>C. jejuni</i>	Humani	1	2	4	4
2235	<i>C. coli</i>	Humani	1	2	32	32
809	<i>C. coli</i>	Voda	>8	>8	64	16
803	<i>C. coli</i>	Voda	8	>64	16	≥256
ATCC 33560	<i>C. jejuni</i>	Živalski iztrebki	>32	>32	/	/
ATCC 33559	<i>C. coli</i>	Živalski iztrebki	1	>32	/	/

/... NI PODATKA

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Razlogi in posledice prisotnosti odpornih izolatov kampilobaktrov pri pri ljudeh in živalih ter vpliv inhibitorjev na njihovo zmanjšanje

V zadnjih letih po svetu poročajo o naraščajoči odpornosti kampilobaktrov na različne protimikrobne snovi. Znanstveniki z različnih področij kot glavni razlog povečevanja odpornosti kampilobaktrov navajajo prekomerno uporabo antibiotikov v humani in veterinarski medicini in uporabo pospeševalcev rasti v intenzivni reji živali, ki so namenjene za prehrano ljudi. Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) in ameriška agencija za hrano in zdravila (FDA) sta začeli opozarjati na problem in pozivata k smotrni rabi antibiotikov. Smotrna uporaba antibiotikov je pomembna zato, ker so antibiotiki edine snovi, ki zdravijo hujše oblike infekcij s kampilobaktri (Quinn in sod., 2007).

V eksperimentalni del naloge smo vključili 20 izolatov različnega izvora, med katerimi sta bila 2 referenčna seva. Iz zbirke smo izbrali izolate odporne na eritromicin, saj je bilo na eritromicinu narejenih največ študij. Na istih izolatih sta vzporedno potekala dva eksperimenta, katerih namen je bil ugotoviti, kakšna je odpornost kampilobaktrov na žolčne soli in antibiotike, in v kakšni meri dodatek inhibitorja vpliva na zmanjšanje odpornosti. Pričakovali smo, da so izolati kampilobaktrov dobro prilagojeni na razmere v prebavilih in zato v večji meri visoko odporni na žolčne soli in detergente, oziroma vsaj srednje odporni. O odpornosti kampilobaktrov na žolčne soli so objavljene samo študije, ki potrjujejo prisotnost in vpliv črpalke CmeABC na povečano odpornost teh bakterij na žolčne soli. Na žolčnih solih je bilo narejenih premalo študij, da bi jih lahko razvrščali v različne razrede občutljivosti, tako kot denimo antibiotike. Večina avtorjev sicer poudarja, da so kampilobaktri in tudi druge Gram negativne bakterije dobro prilagojene na žolčne soli, širše študije na to temo pa do sedaj še niso bile objavljene (Chatterjee in sod., 2004; Lin in sod., 2003; Lin in sod., 2005b; Thanassi in sod., 1997).

V eksperimentalnem delu smo za določanje MIC vrednosti uporabili mikrodilucijsko metodo. Ta metoda se počasi uveljavlja, čeprav še ni priznana kot referenčna metoda. V večini študij bakterijske odpornosti na protimikrobne snovi se uporablja agar dilucijska metoda na ploščah (Mamelli in sod., 2003; Payot in sod., 2004) in metoda difuzije v agarju z diski ter E-testom (Ge in sod., 2004). Izbira metode je odločitev analitika, upoštevati pa mora naslednje dejavnike: fizikalno-kemijske lastnosti gojišča, lastnosti spojina, ki jih testiramo, lastnosti reagentov in barvil, ki jih dodajamo. Največji prednosti uporabe mikrodilucijske metode sta majhna poraba materiala in relativno enostavno ter hitro razredčevanje. Slabost te metode pa je, da zahteva veliko natančnost analitika pri dodajanju gojišč, reagentov in kulture v vdolbinice na ploščici. Poleg tega je MIC vrednost s prostim očesom težko določljiva. Živost bakterijskih celic smo spremljali s čitalcem mikrotitrskih ploščic preko merjenja fluorescence (luminiscence, absorbance).

V študijo odpornosti na žolčne soli smo vključili 18 izolatov kampilobaktrov različnega izvora in dva referenčna seva. Vrednosti MIC žolčnih soli v odsotnosti inhibitorjev so znašale od 16 do ≥ 64 mg/ml, vrednosti MIC žolčnih soli v prisotnosti inhibitorja PAßN in NMP od ≤ 1 do 64 mg/ml. Inhibitor PAßN s koncentracijo 20 µg/ml je zmanjšal MIC vrednost (povečal občutljivost) 65 % izolatov, inhibitor NMP s koncentracijo 80 µg/ml pa 95 % izolatov. NMP je bil v 75 % bolj učinkovit kot PAßN. V 5 % ni učinkoval nobeden od inhibitorjev. Na istih sevih so vrednosti MIC določali tudi Kramar in sod. (pripravljeno za objavo, 2009), ki pa so uporabili nižje koncentracije inhibitorjev, in sicer PAßN s koncentracijo 10 µg/ml in NMP s koncentracijo 60 µg/ml. Vrednosti MIC v odsotnosti inhibitorjev so znašale od 8 do 64 mg/ml, vrednosti MIC v prisotnosti inhibitorjev pa od 0,5 do 64 mg/ml. Inhibitor PAßN je bil učinkovit v 44 %, NMP v 50 %, v 37,5 % pa ni učinkoval nobeden od inhibitorjev. Iz primerjave rezultatov, kakor tudi iz preglednic 8-10 lahko sklepamo, da višja koncentracija inhibitorja bistveno vpliva na zmanjšanje vrednosti MIC, torej na povečanje občutljivosti kampilobaktrov. To potrjujeta tudi Kurinčič in sod. (2007) in Kramar in sod. (pripravljeno za objavo, 2009).

V študijo odpornosti na natrijev deoksiholat-NaDC smo prav tako vključili 18 izolatov kampilobaktrov različnega izvora in dva referenčna seva. Vrednosti MIC NaDC v odsotnosti inhibitorjev so znašale od 2 do ≥ 64 mg/ml, MIC NaDC v prisotnosti PAßN od $<0,5$ do ≥ 64 mg/ml, MIC NaDC v prisotnosti NMP pa od <1 do 64 mg/ml. Inhibitor PAßN s koncentracijo 20 µg/ml je zmanjšal MIC vrednost (povečal občutljivost) 55 % izolatov, inhibitor NMP s koncentracijo 80 µg/ml pa 95 % izolatov. NMP je bil v 60 % bolj učinkovit kot PAßN. V 5 % ni učinkoval nobeden od inhibitorjev. Kramar in sod. (pripravljeno za objavo, 2009) so določili vrednosti MIC na istih sevih v odsotnosti inhibitorjev v območju 1-64 mg/ml. Vrednosti MIC v prisotnosti inhibitorja PAßN so znašale 0,5-64 mg/ml, v prisotnosti NMP pa 1-64 mg/ml. Inhibitor PAßN je povečal občutljivost (zmanjšal MIC) v 75 %, inhibitor NMP pa 44 %. Inhibitor PAßN je bil 63 % bolj učinkovit kot NMP. V 13 % ni učinkoval nobeden od inhibitorjev.

V študijo odpornosti na natrijev dodecil sulfat-SDS smo tudi vključili 18 izolatov kampilobaktrov različnega izvora in dva referenčna seva. Vrednosti MIC SDS v odsotnosti inhibitorjev so znašale od 256 do ≥ 512 µg/ml, MIC SDS v prisotnosti inhibitorja PAßN od <4 do 256 µg/ml, MIC SDS v prisotnosti inhibitorja NMP pa od <4 do 64 µg/ml. Inhibitor PAßN s koncentracijo 20 µg/ml je zmanjšal MIC vrednost (povečal občutljivost) 95 % izolatov, inhibitor NMP s koncentracijo 80 µg/ml pa je povečal občutljivost vseh izolatov. NMP je bil v 60 % bolj učinkovit kot PAßN. Kramar in sod. (pripravljeno za objavo, 2009) so določili vrednosti MIC istih sevov v odsotnosti inhibitorjev, ki so se gibale v območju 256-1024 µg/ml. Vrednosti MIC v prisotnosti PAßN so znašale 32-256 µg/ml, vrednosti MIC v prisotnosti NMP pa 1-32 µg/ml. Inhibitor PAßN je zmanjšal MIC pri vseh sevih, inhibitor NMP pa v 94 %. Inhibitor NMP je bolj je zmanjšal vrednost MIC-povečal občutljivost sevov kot inhibitor PAßN.

V študiji odpornosti bakterij rodu *Campylobacter* na žolčne soli in detergente smo dokazali prisotnost MDR (angl. multi drug resistance) fenotipa pri vseh izolatih. Čeprav mejne vrednosti za žolčne soli in detergente še niso določene, smo sklepali na MDR fenotip na osnovi določenih visokih MIC vrednosti, ki smo jih pred izvedbo eksperimenta tudi pričakovali. V praksi se sicer uporablja spodnja meja vrednosti MIC za antibiotike. Najnižja

koncentracija antibiotika, ki še pomeni odpornost izolata na eritromicin je 4 µg/ml (Ambrožič, 2008).

Dejstvo, da smo določili MDR fenotip pri vseh izolatih nakazuje na vlogo membranske izlivne črpalke CmeABC pri kampilobaktirih. Izlivna črpalka očitno deluje proti več kemijsko sorodnim protimikrobnim snovem hkrati, o čemer poročajo tudi literaturni viri. MDR fenotip je določila tudi Ambrožič (2008) v svojem diplomskem delu na antibiotikih.

Vsi testirani izolati kažejo močno odpornost, kar smo tudi pričakovali. Vzrok za pojav odpornosti je naravna prilagoditev bakterij na ekstremno okolje, ki vlada v prebavilih, poleg tega pa tudi povečana uporaba antibiotikov v veterinarski in humani medicini, ki ima lahko za posledico povečano odpornost kampilobaktrov na ostale protimikrobne snovi.

5.1.2 Relativni učinek inhibitorjev na občutljivost sevov na žolčne soli in detergente

V zadnjih letih je možno zaslediti objave številnih študij, v katerih avtorji obravnavajo mehanizme, ki bakterijam, med drugim tudi kampilobaktrom, omogočajo povečano odpornost na različne protimikrobne snovi. Ko so ugotovili, da imajo ključno vlogo pri povečani bakterijski odpornosti membranske izlivne črpalke, so vse najnovejše študije namenjene njim, zlasti zato, ker so njihovo prisotnost dokazali pri številnih, taksonomsko različnih bakterijah in evkariontih.

Membranske izlivne črpalke na osnovi njihove zgradbe, načina delovanja in vrsti protimikrobne snovi, ki jo črpajo iz celice delimo v pet skupin. Prvi so sestavo in delovanje črpalk opisali Lin in sod. (2003). Ugotovili so, da membransko-izlivni sistem kampilobaktrov (črpalko CmeABC) sestavljajo trije različni proteini, ki se nahajajo v celični steni bakterij. Leta 2005 so Ge in sod. določili tudi sekvenco genoma, ki kodira zapis za sintezo posameznih proteinskih komponent membranske izlivne črpalke.

Relativne učinke inhibitorjev smo računali pri vseh izolatih. Literatura navaja (Kern in sod., 2006) delitev sevov glede na učinek inhibitorja v 2 skupini. Ločimo skupino z do vključno 4-kratno učinkovitostjo in skupino do vključno 16-kratno učinkovitostjo. Glede na kemijsko sorodno zgradbo žolčnih soli in detergentov pričakujemo, da imajo vse testirane spojine podoben vpliv na bakterije rodu *Campylobacter*.

Kern in sod. so v letu 2006 kot prvi začeli preizkušati dodatek inhibitorja NMP določenim antibiotikom. Preizkusili so ga na enterobakterijah in bakteriji *Acinetobacter baumannii*. Inhibitor NMP pa do sedaj znanih podatkih še ni bil testiran na kampilobaktirih.

5.1.2.1 Žolčne soli

Dodatek inhibitorja PAßN je v 65 % primerov vplival na zmanjšanje MIC vrednosti testiranih izolatov, torej je pripomogel k povečani občutljivosti kampilobaktrov na žolčne soli. Izjeme so sevi 140 in M 37 izolirana iz perutnine, humani sevi 10522, 119/06 in 413/06 ter referenčni sev ATCC 33559. PAßN je povečal občutljivost od 0 do ≥ 64 -krat, v povprečju 12-krat, največ pa >64 -krat pri humanem sevu 10162. Inhibitor NMP je učinkoval na vse izolate razen na humani 10522. V povprečju je povečal občutljivost 24-krat, največ pa >64 -krat, pri izolatih GC 154 in FC 8 iz perutnine.

5.1.2.2 Natrijev deoksiholat (NaDC)

Dodatek inhibitorja PAßN je v 55 % vplival na zmanjšanje MIC vrednosti testiranih izolatov na NaDC, torej pripomogel k zmanjšani odpornosti (povečani občutljivosti) kampilobaktrov na omenjeni detergent. Izjema so bili skoraj vsi perutninski sevi (GC 154, FC 8, FC 10, 140, M 37), humana seva 119/06 in 413/06, ter referenčni sev ATCC 33559. Dodatek inhibitorja PAßN je v povprečju povečal občutljivost sevov 15-krat, največ pa >128 -krat pri humanem sevu 10162. Inhibitor NMP je učinkoval na vse izolate z izjemo perutninskega izolata FC 10. V povprečju povečal občutljivost 32-krat, največ pa >128 -krat pri izolatu iz perutnine, FC 8. Žolčne soli in detergent NaDC sta zanimiva za direktno primerjavo, saj smo jih dodajali v istih koncentracijah. Iz rezultatov vidimo, da imata zelo podoben vpliv na izolate istega izvora. Na perutninska izolata 140, M 37 in humana 119/06 ter 413/06 inhibitor PAßN ne učinkuje, kar samo potrjuje dejstvo, kako visoko odporni so omenjeni izolati. Prav tako PAßN nima učinka na referenčni sev ATCC 33559.

5.1.2.3 Natrijev dodecil sulfat (SDS)

Dodatek inhibitorja PAßN je v 95 % zmanjšal MIC vrednosti testiranih izolatov na SDS, torej je pripomogel k povečani občutljivosti kampilobaktrov na omenjeni detergent. Izjema je sev VC 110722 izoliran iz svinjine. Dodatek inhibitorja PAßN je v povprečju povečal občutljivost sevov 32-krat, največ pa >128 -krat pri sevu GC 154, izoliranemu iz perutnine. Inhibitor NMP je učinkoval na vse izolate. V povprečju je povečal občutljivost 48-krat, največ pa >128 -krat pri sevih GC 154 in FC 8, izoliranih iz perutnine. Glede na uporabljene koncentracije lahko SDS direktno primerjamo z antibiotiki in njihovimi mejnimi vrednostmi. Vsi testirani sevi so na detergent visoko odporni ($MIC \geq 32 \mu\text{g/ml}$), dodatek inhibitorja PAßN število visoko odpornih sevov zmanjša za 50 %, NMP pa za 60 %.

Na povečano občutljivost (zmanjšano odpornost) večine testiranih izolatov na žolčne soli in detergenta NaDC in SDS ima večji vpliv inhibitor NMP. Iz tega lahko sklepamo, da sta mehanizma inhibitorjev različna, oziroma da ima membranska izlivna črpalka različna tarčna mesta za posamezen inhibitor. Z veliko gotovostjo lahko rečemo, da je iskanje novih inhibitorjev ključen korak k obvladovanju bakterijske odpornosti na protimikrobne snovi.

5.1.2.4 Primerjava relativne učinkovitosti inhibitorjev na zmanjšanje odpornosti na žolčne soli in eritromicin

Relativni učinek obeh inhibitorjev smo primerjali na žolčnih solih in eritromicinu. Zanimalo nas je, kakšna je razlika v vplivu inhibitorjev na žolčne soli, ki so metabolični produkt holesterola in eritromicina, ki ga umetno vnašamo v telo. Povprečna učinkovitost inhibitorja PAβN pri žolčnih solih je bila 12, pri visoko odpornih izolatih (HLR) na eritromicin pa 20. NMP je povprečno povečal občutljivost na žolčne soli 24-krat, na eritromicin pa 43-krat. Iz navedenih rezultatov lahko sklepamo, da oba inhibitorja bolj pripomoreta k povečani občutljivosti kampilobaktrov na antibiotike, kot na žolčne soli, kar kaže na to, da so kampilobaktri dobro prilagojeni na razmere v črevesju (Ambrožič, 2008).

5.1.3 Mehanizmi, vpleteni v navzkrižno odpornost sevov *Campylobacter*

Membranske izlivne črpalke na osnovi razlik v zgradbi, načinu delovanja in izčrpavanju specifičnih protimikrobnih snovi razvrščamo v pet večjih skupin (razredov). Prvi so membranske izlivne črpalke CmeABC, ki so značilne za kampilobakte identificirali Lin in sod. leta 2003. Piddock (2006) je v svoji raziskavi preučevala delovanje in zgradbo RND membransko-proteinskega sistema pri kampilobaktirih. Potrdila je, da je zgrajen iz treh različnih beljakovinskih struktur, ki se nahajajo v bakterijski celični steni. Ge in sod. (2005) pa so objavili točno sekvenco genoma, ki kodira zapis za sintezo posameznih proteinskih komponent membranske izlivne črpalke. Številni avtorji navajajo, da so bakterije z njihovo pomočjo zmožne iz svoje notranjosti izčrpavati številne (po kemijski zgradbi nesorodne) protimikrobne snovi, poleg žolčnih soli in detergentov tudi antibiotike, težke kovine in barvila (Lin in sod., 2003).

V eksperimentalnem delu smo potrdili odpornost bakterij rodu *Campylobacter* proti žolčnim solem in detergentom. Poleg tega smo potrdili tudi vpletenost izlivnih črpalk v mehanizem odpornosti. To dokazuje, da membranske izlivne črpalke CmeABC ne delujejo samo na eno vrsto protimikrobnih snovi, na kar nakazuje tudi literatura. Različne učinke posameznih inhibitorjev lahko pripišemo različnim vezavnim mestom ali celo različnim mehanizmom delovanja na ta vezavna mesta v celici. Nekateri avtorji so pojasnili navzkrižno odpornost s prekrivajočimi se vezavnimi mesti v ribosomski podenoti 50S (Gibreel in Taylor, 2006; Mahamoud, 2007).

5.2 SKLEPI

- o Z mikrodilucijsko metodo smo 20 izbranim sevom kampilobaktrov, odpornih na eritromicin, določili vrednosti MIC za žolčne soli in detergente natrijev deoksiholat (NaDC) in natrijev dodecil sulfat (SDS) ki so se gibale med 16 mg/ml in ≥ 64 mg/ml za žolčne soli, 2 mg/ml in ≥ 64 mg/ml za NaDC in 256 μ g/ml in ≥ 512 μ g/ml za SDS. S primerjavo vrednosti MIC testiranih spojin smo potrdili odpornost pri vseh testiranih izolatih.
- o Istim izbranim sevom smo določili vrednosti MIC ob prisotnosti subinhibitorne koncentracije inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk PA β N in NMP. Ugotovili smo, da imajo membransko izlivne črpalke pomembno vlogo pri povečani odpornosti na žolčne soli kot tudi na detergente. Inhibitorja PA β N in NMP sta različno zmanjšala občutljivost izolatov na žolčne soli in detergente. Učinek je bil odvisen od vrste in koncentracije inhibitorja, testiranega seva (izvor), oz. njegove odpornosti – potrdili smo vpletenost izlivnih črpalk v odpornost proti žolčnim solem in detergentom.
- o Iz analize dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da so membranske izlivne črpalke vpletene v odpornost sevov *Campylobacter* na žolčne soli in detergente. Za bolj specifične zaključke o mehanizmu delovanja so potrebne nadaljne raziskave, usmerjene predvsem v študije stresnih karakteristik in genoma kampilobaktrov.

6 POVZETEK

Kampilobaktri so med najpogostejšimi povzročitelji črevesnih infekcij tako pri domačih in divjih živalih kot človeku. Najbolj pogost vzrok okužbe s to bakterijo je uživanje kontaminiranih ali neustrezno toplotno obdelanih živil, predvsem perutnine. Tekom evolucije so kampilobaktri, podobno kot ostale bakterije, razvili številne obrambne mehanizme proti žolčnim solem in drugim protimikrobnim spojinam (detergenti, biocidi, antibiotiki). Tudi odpornost na žolčne soli je posledica postopnega prilagajanja bakterij na razmere v prebavilih. Zlasti črevesne bakterije so sposobne premagati velika nihanja razmer v prebavnem traktu (pH vrednost, osmolarnost, nizka koncentracija kisika, pomanjkanje hranil). Bolj zaskrbljujoče dejstvo pa je, da se v zadnjih letih povečuje odpornost bakterij tudi na antibiotike, edine spojine, ki se uporabljajo pri zdravljenju kampilobakterioz. Vzroki za to so pretirana uporaba antibiotikov v humani in veterinarski medicini. Zaradi navedenih dejstev in vedno večjega števila študij, ki podpirajo navedene podatke bo treba v prihodnje dati poudarek na bolj smotrni uporabi antibiotikov.

V nalogo smo vključili 20 živilskih in humanih izolatov *Campylobacter* spp., katerim smo z mikrodilucijsko metodo s pomočjo merjenja fluorescentnega signala določali minimalno inhibitorno koncentracijo MIC (to je tista koncentracija protimikrobne spojine, ki še inhibira bakterijsko metabolično aktivnost) v odsotnosti oziroma prisotnosti posameznega inhibitorja. Kot protimikrobne snovi smo uporabili žolčne soli in detergenta natrijev deoksiholat-NaDC in natrijev dodecil sulfat-SDS. Namen diplomskega dela je bil ugotoviti, ali in v kakšni meri inhibitorja izlivnih črpalk PAßN in NMP vplivata na delovanje izlivnih črpalk, ki so odgovorne za iznos protimikrobnih snovi iz celice in pojav odpornosti proti izbranim spojinam.

Po končanem eksperimentalnem delu smo določali vrednosti MIC za posamezne spojine. Potrdili smo, imajo membranske izlivne črpalke (zlasti CmeABC) velik vpliv na visoko odpornost kampilobaktrov na žolčne soli in detergente. Dokazali smo, da oba inhibitorja v večini primerov vplivata na povečano občutljivost testiranih izolatov na žolčne soli in detergente, vendar v različni meri. Vpliv inhibitorja je v veliki meri odvisen od njegove koncentracije, saj se z naraščanjem le te povečuje. Ugotovili smo tudi, da ima inhibitor NMP boljši učinek kot PAßN na večino žolčnih soli ter polovico testiranih detergentov, pri ostali polovici pa je učinek obeh inhibitorjev enak. To nakazuje na prisotnost različnih tarčnih in vezavnih mest za ta dva inhibitorja v sami črpalki in na njuno sposobnost prehoda skozi permeabilno membrano v celico.

Pri analiziranih izolatih smo določili odpornost na testirane spojine, kar posredno dokazuje, da membranske izlivne črpalke CmeABC niso vključene v izločanje samo ene vrste protimikrobne snovi, kar nam potrjuje tudi literatura.

7 VIRI

Akiba M., Lin J., Barton Y., Zhang Q. 2006. Interaction of CmeABC and CmeDEF in conferring antimicrobial resistance and maintaining cell viability in *Campylobacter jejuni*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57: 52-60

Ambrožič M. 2008. Vpliv inhibitorjev izlivnih črpalk na aktivnost makrolidnih antibiotikov proti bakterijam *Campylobacter* iz hrane, vode in kliničnih vzorcev. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 70 str.

Andlovic A. 2002. Kampilobakterji. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 217-220

Begley M., Gahan C.G.M., Hill C. 2005. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiology Reviews*, 29: 625-651

Bergmann R. 2008. Porines. Hamburg, Universität Hamburg
<http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/chimes/kanal/porin/eporin.htm> (15.08.2008): 1 str.

Black R.E., Levine M.M., Clements M.L., Hughes T.P., Blaser M.J. 1988. Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *Journal of Infectious Diseases*, 157: 472-479

Bohnert J.A., Kern W.V. 2005. Selected arylpiperazines are capable of reversing multidrug resistance in *Escherichia coli* overexpressing RND efflux pumps. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 2: 849-852

Cagliero C., Mouline C., Payot S., Cloeckaert A. 2005. Involvement of the CmeABC efflux pump in the macrolide resistance of *Campylobacter coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56: 948 - 950

Chatterjee A., Chaudhuri S., Saha G., Gupta S., Chowdhury R. 2004. Effect of bile on the cell surface permeability barrier and efflux system of *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology* 186, 20: 6809-6814

Cordemans D. 2008. *Campylobacter* rates highest in the world. The Epoch USA Inc., The Epoch Times
http://images.google.si/imgres?imgurl=http://en.epochtimes.com/news_images/2008-3-3-450px-campylobacter.jpg&imgrefurl=http://en.epochtimes.com/news/8-3-3/66963.html&h=400&w=300&sz=52&hl=sl&start=18&tbnid=OzAUXiDVOMo2cM:&tbnh=124&tbnw=93&prev=/images%3Fq%3Dcampylobacter%26gbv%3D2%26hl%3Dsl%26sa%3DG (15.08.2008): 1 str.

EFSA. 2007a. The Community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2006. Parma, EFSA— European Food Safety Authority
(http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale1178620753812_1178671312912.htm) (21.07.2008): 310 str.

EFSA. 2007b. Slovenia: Trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in humans, foodstuffs, animals and feedingstuffs in 2006. Parma, EFSA - European Food Safety Authority

(http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale1178620753812_1178676772406.htm)

(21.07.2008): 315 str.

Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2007: letno poročilo. Ljubljana, IVZ RS- Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije

(http://www.ivz.si/javne_datoteke/datoteke/798-Epidemiolosko_spremljanje_NB_2007.pdf)

(23.10.2008): 106 str.

Fernández-Leyes M.D., Messina P.V., Schulz P.C. 2007. Aqueous sodium dehydrocholate-sodium deoxycholate mixtures at low concentrations. *Journal of Colloid and Interface Science*, 314: 659-664

Ge B., McDermott P.F., White D.G., Meng J. 2005. Role of efflux pumps and topoisomerase mutations in fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49, 8: 3347-3354

Gunn J.S. 2000. Mechanisms of bacterial resistance and response to bile. *Microbes and Infection*, 2: 907-913

Hannula M., Hänninen M-L. 2008. Effect of putative efflux pump inhibitors and inducers of antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Journal of Medical Microbiology*, 57: 851-855

Holasova M., Karpiskova R., Karpiskova S., Babak V., Schlegelova J. 2007. Comparison of methods for the determination of antimicrobial resistance in *Campylobacter* spp. human and the food chain isolates. *Veterinarni Medicina*, 52, 4: 169-173

Jorgensen J.H., Ferraro M.J. 1998. Antimicrobial susceptibility testing: general principles and contemporary practices. *Clinical Infectious Diseases*, 26: 973-980

Kern W.V., Steinke P., Schumacher P., Schuster S., von Baum H., Bohnert J.A. 2006. Effect of 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine, a novel putative efflux pump inhibitor, on antimicrobial drug susceptibility in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57: 339-343

Ketley J.M. 1997. Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. *Microbiology*, 143: 5-21

King M.W., Marchesini S. 2008. Cholesterol and bile metabolism. Brescia, Università Degli Studi di Brescia, Facoltà di Medicina e Chirurgia

(http://images.google.si/imgres?imgurl=http://www.med.unibs.it/~marchesi/bile_salts.gif&imgrefurl=http://www.med.unibs.it/~marchesi/cholest.html&h=653&w=720&sz=14&hl=sl&start=6&tbnid=A5HzE7UuLodqKM:&tbnh=127&tbnw=140&prev=/images%3Fq%3Dbile%2Bsalts%26gbv%3D2%26hl%3Dsl%26sa%3Dg) (15.08.2008): 1 str.

Kotnik V. 2002. Antibiotiki in kemoterapevtiki. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 427-438

Kramar A., Kurinčič M., Smole Možina S. 2009. Effect of the efflux pump inhibitors on antimicrobial susceptibility in *Campylobacter jejuni* and *C. coli* from different sources. Pripravljeno za objavo

Kurinčič M., Botteldoorn N., Herman L., Smole Možina S. 2007. Mechanisms of erythromycin resistance of *Campylobacter* spp. Isolated from food, animals and humans. International Journal of Food Microbiology, 120: 186-190

Lin J., Akiba M., Sahin O., Zhang Q. 2005a. CmeR functions as a transcriptional repressor for the multidrug efflux pump CmeABC in *Campylobacter jejuni*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49, 3: 1067-1075

Lin J., Cagliero C., Guo B., Barton Y-W., Maurel M-C., Payot S., Zhang Q. 2005b. Bile salts modulate expression of the CmeABC multidrug efflux pump in *Campylobacter jejuni*. Journal of Bacteriology, 187, 21: 7417-7424

Lin J., Martinez A. 2006. Effect of efflux pump inhibitors on bile resistance and *in vivo* colonization of *Campylobacter jejuni*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 58, 5: 966-972

Lin J., Sahin O., Overbye Michel L., Zhang Q. 2003. Critical role of multidrug efflux pump CmeABC in bile resistance and *in vivo* colonization of *Campylobacter jejuni*. Infection and Immunity, 71, 8: 4250-4259

Lomovskaya O., Bostian K.A. 2006. Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic-A vision for applied use. Biochemical Pharmacology, 71: 910-918

Lomovskaya O., Warren M.S., Lee A., Gallazo J., Fronko R., Lee M., Blais J., Cho D., Chamberland S., Renau T., Leger R., Hecker S., Watkins W., Hoshino K., Ishida H., Lee V.J. 2001. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 45, 1: 105-116

Luber P., Bartelt E., Genschow E., Wagner J., Hahn H. 2003. Comparison of broth microdilution, E-test and agar dilution methods for antibiotic susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Journal of Clinical Microbiology, 43, 3: 1062-1068

Mahamoud A., Chevalier J., Alibert-Franco S., Kern W.V., Pages J-M. 2007. Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 59, 6: 1223-1229

Mamelli L., Amoros J.-P., Pagès J.-M., Bolla J.-M. 2003. A phenylalanine-arginine β -naphthylamide sensitive multidrug efflux pump involved in intrinsic and acquired resistance

of *Campylobacter* to macrolides. International Journal of Antimicrobial Agents, 22, 3: 237-241

Marquez B. 2005. Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. Biochimie, 87: 1137-1147

Martinez A., Lin J. 2006. Effect of an efflux pump inhibitor on the function of the multidrug efflux pump CmeABC and antimicrobial resistance in *Campylobacter*. Foodborne Pathogens and Disease, 3, 4: 393-402

McDermott P. F., Bodeis-Jones S.M., Fritsche T.R., Jones N.R., Walker J. D. 2005. Broth microdilution susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and the determination of quality control ranges for fourteen antimicrobial agents. Journal of Clinical Microbiology, 43: 6163-6168

Mishu Allos B. 2001. *Campylobacter jejuni* infections: Update on emerging issues and trends. Clinical Infectious Diseases, 32: 1201-1206

Moore J.E., Corcoran D., Dooley J.S.G., Fanning S., Lucey B., Matsuda M., McDowell D.A., Megraud F., Millar B.C., O'Mahony R., O'Riordan L., O'Rourke M., Rao J.R., Rooney P.J., Sails A., Whyte P. 2005. *Campylobacter*. Veterinary Research 36, 351-382

Okoli A.S., Wadstrom T., Mendz G.L. 2007. Bioinformatic study of bile responses in Campylobacterales. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 49: 101-123

Pagès J.-M., Masi M., Barbe J. 2005. Inhibitors of efflux pumps in Gram-negative bacteria. Trends in Molecular Medicine, 11, 8: 382-389

Pannek S., Higgins P.G., Steinke P., Jonas D., Akova M., Bohnert J.A., Seifert H., Kern W.V. 2006. Multidrug efflux inhibition in *Acinetobacter baumannii*: comparison between 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenyl-arginine- β -naphthylamide. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 57: 970-974

Paulsen I.T. 2003. Multidrug efflux pumps and resistance: regulation and evolution. Current Opinion in Microbiology, 6: 446-451

Piddock L.J.V. 2006. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. Clinical Microbiology Reviews, 19, 2: 382-402

Poole K. 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 56: 20-51

Proutly A.M., Brodsky I.E., Falkow S., Gunn J.S. 2004. Bile-salt-mediated induction of antimicrobial and bile resistance in *Salmonella typhimurium*. Microbiology, 150: 775-783

Pumbwe L., Piddock L.J.V. 2002. Identification and molecular characterisation of CmeB, a *Campylobacter jejuni* multidrug efflux pump. FEMS Microbiology Letters, 206: 185-189

Pumbwe L., Randall L.P., Woodward M.J., Piddock L.J.V. 2005. Evidence for multiple-antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* not mediated by CmeB or CmeF. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 4: 1289-1293

Quinn T., Bolla J.-M., Pagès J.-M. Fanning S. 2006. Antibiotic-resistant *Campylobacter*: could efflux pump inhibitors control infection? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59, 6: 1230-1236

Raphael B.H., Pereira S., Flom G.A., Zhang Q., Ketley J.M., Konkel M.E. 2005. The *Campylobacter jejuni* response regulator CbrR, modulates sodium deoxycholate resistance and chicken colonization. *Journal of Bacteriology*, 187, 11: 3662-3670

Riss T., Moravec R. 2003. Introducing CellTiter-Blue[®] cell viability assay. *Promega Notes*, 83: 10-13

Sáenz Y., Ruiz J., Zarazaga M., Teixidó M., Torres C., Vila J. 2004. Effect of the efflux pump inhibitor Phe-Arg- β -naphthylamide on the MIC values of the quinolones, tetracycline, and chloramphenicol, in *Escherichia coli* isolates of different origin. *Journal of Antimicrobial Therapy*, 53, 3:544-545

Schumacher P., Steinke P., Bohnert J.A., Akova M., Jonas D., Kern W.V. 2006. Effect of 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine, a novel putative efflux pump inhibitor, on antimicrobial drug susceptibility in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* other than *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57: 344-348

Sefton A. 2002. Mechanisms of antimicrobial resistance and their clinical relevance in the new millenium. *Drugs*, 62, 4:557-566

Selby D.J. 2008. The Gallbladder page

<http://images.google.si/imgres?imgurl=http://www.danieljselby.com/gb.jpg&imgrefurl=http://www.danieljselby.com/gallbladder.html&h=579&w=579&sz=63&hl=sl&start=5&tbnid=1kqbj3O-VRRqbM:&tbnh=134&tbnw=134&prev=/images%3Fq%3Dbiliary%2Bsystem%26gbv%3D2%26hl%3Dsl%26sa%3DG> (15.08.2008): 1 str.

Seme K. 2002. Mehanizmi bakterijske odpornosti proti antibiotikom. V: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 439-446

Sigma-Aldrich.2008a. Bile salts. St.Louis, Sigma-Aldrich Co.

(<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/TablePage/14572921>) (24.07.2008): 1 str.

Sigma- Aldrich. 2008b. L-Phenylalanine β -naphthylamide. St. Louis, Sigma-Aldrich Co.

(<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/P3762>) (24.07.2008): 1 str.

Sigma- Aldrich. 2008c. 1-(1-Naphthylmethyl) piperazine. St. Louis, Sigma-Aldrich Co.

(<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/ALDRICH/651699>)
(24.07.2008): 1 str.

Sigma-Aldrich. 2008d. Detergents & Surfactants. St. Louis, Sigma-Aldrich Co.
http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Biochemicals/BioUltra/Detergents_Surfactant.s.html?cm_mmc=wiki-social-surfactants-Surfactants (27.07.2008): 1 str.

Snelling W. J., Matsuda M., Moore J. E., Dooley J.S.G. 2005. Under the microscope: *Campylobacter jejuni*. Letters in Applied Microbiology, 41: 297-302

Sodium deoxycholate. 2008. European Bioinformatic Institute
<http://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:9177> (23.10.2008): 1 str.

Sodium dodecyl sulfate. 2008. Newcastle. University of Newcastle, The Centre for Cancer Education
(<http://cancerweb.ncl.ac.uk/cgi-bin/omd?sodium+dodecyl+sulfate>) (21.07.2008):1 str.

Sodium lauril sulfate. 2008.
<http://en.wikipedia.org/wiki/Image:SDS-2D-skeletal.png> (23.10.2008): 1 str.

Thanassi D. G., Cheng L.W., Nikaido H. 1997. Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 179, 8: 2512-2518

van Vliet A.H.M., Ketley J.M. 2001. Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. Journal of Applied Microbiology, 90: 45-56

Vigil A.L.M., Palou E., Parish M. E., Davidson P. M. 2005. Methods for activity assay and evaluation of results. V: Antimicrobials in food. Davidson P. M., Sofos J. N. Branen A.L. (eds.). New York, CRC Press, 659-680

Voliwiler W., Willson R.A., Larson A.M., Ostrow J.D. 2008. Bile salt metabolism and turnover. Washington, University of Washington, Division of Gastroenterology
http://images.google.si/imgres?imgurl=http://www.uwgi.org/gut/images/07_fig12.gif&imgrefurl=http://www.uwgi.org/gut/liver_07.asp&h=379&w=470&sz=50&hl=sl&start=1&tbnid=YQRzHEobEkdLRM:&tbnh=104&tbnw=129&prev=/images%3Fq%3Dbile%2Bsalts%26gbv%3D2%26ndsp%3D18%26hl%3Dsl%26sa%3DN (15.08.2008):1 str.

Wassenaar T.M., Blaser M.J. 1999. Pathophysiology of *Campylobacter jejuni* infection of humans. Microbes and Infection, 1: 1023-1033

Zloh M., Kaatz G.W., Gibbons S. 2004. Inhibitor of multidrug resistance (MDR) have affinity for MDR substrates. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 14: 881-885

ZAHVALA

Zahvaljujem se vsem, ki so mi v času študija stali ob strani in me vzpodbujali. Posebej bi se zahvalila:

Mentorici prof.dr. Sonji Smole Možina, ker mi je že med študijem približala mikrobiologijo ter za vse strokovne nasvete in veliko pomoč pri izdelavi diplomske naloge.

Recenzentki prof.dr. Veroniki Abram za skrben in natančen pregled diplomske naloge.

Mariji Kurinčič za pomoč in vzpodbudo pri praktičnem delu ter strokovne nasvete med pisanjem diplomske naloge.

Ani Kramar za koristne napotke med praktičnim delom in nasvete med pisanjem diplomske naloge.

Zahvala gre tudi Jani Avbelj, ki je vedno rada priskočila na pomoč v laboratoriju.

Najlepša hvala Ivici Hočevar za pregled diplomskega dela in za urejanje literaturnih virov ter Barbari Slemenik za prijaznost in pomoč pri iskanju literature med študijem.

Od srca se zahvaljujem tudi moji družini in fantu, ki so me med študijem finančno in moralno podpirali, prijateljem, ki so me spravljali v dobro voljo in sošolki Mateji za dneve, ki sva jih skupaj preživel v laboratoriju in v študijskih klopeh.