

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Valerija MAHORIČ

**UČINEK PROBIOTIČNIH KULTUR NA BAKTERIJE  
*Campylobacter jejuni* V CELIČNEM MODELU  
PRAŠIČJIH ČREVESNIH EPITELIJSKIH CELIC**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**EFFECT OF PROBIOTICS ON BACTERIA  
*Campylobacter jejuni*  
IN PIG SMALL INTESTINAL EPITHELIAL MODEL**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo v laboratoriju Katedre za mikrobiologijo, biokemijo, molekularno biologijo in biotehnologijo, Fakultete za kmetijstvo in biosistemske vede, Univerze v Mariboru.

Študijska komisija dodiplomskega študija živilske tehnologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Sonjo Smole Možina, za somentorico prof. dr. Avrelijo Cencič in za recenzentko prof. dr. Ireno Rogelj.

Mentorica: prof. dr. Sonja Smole Možina

Somentorica: prof. dr. Avrelija Cencič

Recenzentka: prof. dr. Irena Rogelj

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:           prof. dr. Sonja Smole Možina  
                  Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član:           prof. dr. Avrelija Cencič  
                  Univerza v Mariboru, Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede

Član:           prof. dr. Irena Rogelj  
                  Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Valerija Mahorič

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

- ŠD Dn  
DK UDK 579.22+579.24: 636.4.09:616.98(043)=163.6  
KG bakterije / *Campylobacter jejuni* / črevesne okužbe / adhezivnost / invazivnost / znotrajcelična preživljivost / probiotične bakterije / *Lactobacillus* / celični model / prašičjih črevesnih epitelijskih celic / celice CLAB / celice PSI cl.1 / živost celičnih kultur  
AV MAHORIČ, Valerija  
SA SMOLE MOŽINA, Sonja (mentorica) / CENCIČ, Avrelija (somentorica) / ROGELJ, Irena (recenzentka)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo  
LI 2009  
IN UČINEK PROBIOTIČNIH KULTUR NA BAKTERIJE *Campylobacter jejuni* V CELIČNEM MODELU PRAŠIČJIH ČREVESNIH EPITELIJSKIH CELIC  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP XV, 78 str., 3 pregl., 32 sl., 19 pril., 142 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Bakterija *Campylobacter jejuni* je med vodilnimi povzročitelji črevesnih obolenj pri človeku in živalih. Mehanizem infekcijskega delovanja kampilobaktrov pri človeku še ni povsem pojasnjen, tudi zaradi pomanjkanja ustreznih celičnih modelov. Prašičje črevesne epitelijske celice so lahko dober model za raziskave interakcij med bakterijami *C. jejuni* in človeškim črevesnim epitelijem. Med bakterijskimi virulentnimi dejavniki je sposobnost adhezije pomembna lastnost pri kolonizaciji črevesja. Za probiotične bakterije je znano, da zmanjšujejo možnost infekcije črevesja gostitelja s patogenimi bakterijami, saj nanje vplivajo s protimikrobnimi presnovki ter z njimi tekmujejo za hranila in vezavo na epitelijske celice črevesja. Namen dela je bil preveriti, če probiotične bakterije rodu *Lactobacillus* lahko zaščitijo prašičje črevesne epitelijske celice PSI cl.1 ter CLAB pred adhezijo in invazijo bakterije *C. jejuni* K49/4. Celični model PSI cl.1 se je izkazal kot bolj občutljiv za okužbo z bakterijo *C. jejuni* K49/4 in zato tudi bolj primeren model za študije interakcij gostitelj-patogen kot celični model CLAB. Nekateri izmed izbranih sevov probiotikov PCS 20, PCS 22, PCS 25 ter PCA 185 so pokazali učinek na zmanjšanje adhezije in invazije bakterije *C. jejuni* K49/4 po treh urah od ko-inkubacije na celični kulturi PSI cl.1. S tem smo ugotovili, da je pri sočasni inkubaciji epitelijskih celic z bakterijo *C. jejuni* K49/4 in posameznimi probiotičnimi sevi oviranje adhezije in/ali invazije kratkotrajno, sevno specifično in odvisno od uporabljenega celičnega modela.

## KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

- ND Dn  
DC UDC 579.22+579.24: 636.4.09:616.98(043)=163.6  
CX bacteria / *Campylobacter jejuni* / intestinal infections / adhesion / invasion / intracellular survival / probiotic bacteria / *Lactobacillus* / pig small intestinal epithelial model / CLAB cells / PSI cl.1 cells / cell culture viability  
AU MAHORIČ, Valerija  
AA SMOLE MOŽINA, Sonja (supervisor) / CENCIČ, Avrelija (co-advisor) / ROGELJ, Irena (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology  
PY 2009  
TI EFFECT OF PROBIOTICS ON BACTERIA *Campylobacter jejuni* IN PIG SMALL INTESTINAL EPITHELIAL MODEL  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO XV, 78 p., 3 tab., 32 fig., 19 ann., 142 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB The bacteria *Campylobacter jejuni* is among the leading causes of intestinal diseases in humans and animals. The bacterial infection mechanisms involved in humans have not been fully defined, also because of lack of suitable cell models. Pig intestinal epithelial cells can represent a relevant model for study interactions between *C. jejuni* and human intestinal epithelium. The ability of adhesion is one of the bacterial virulence mechanisms, which is important in intestinal colonization. Probiotics are known to reduce the possibility of enteric infection with pathogens, by making an impact on the pathogens with antimicrobial products, and by competing with them for binding sites or nutrients etc. The aim of this *in vitro* study was to examine the effect of probiotic *Lactobacillus* strains on the protective role against *C. jejuni* K49/4 adhesion and invasion to intestinal epithelial model cells PSI cl.1 and CLAB. PSI cl.1 cell culture model proved to be more sensitive to infection with bacteria *C. jejuni* K49/4 and also more convenient model for the study of pathogen-host cell interaction. Some of the selected strains of probiotics PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCA 185 have shown the effect on *C. jejuni* K49/4 adhesion and invasion into PSI cl.1 cells, after three hours of co-incubation. After simultaneous exposure of pig small intestinal epithelial model PSI cl.1 and CLAB to *C. jejuni* K49/4 and probiotics we found that ability to inhibit adhesion and/or invasion was short, and depending on both the probiotic strain and the cell model tested.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI).....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD) .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>IX</b>
<b>KAZALO PRILOG .....</b>	<b>XI</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>XIII</b>
<b>1       UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1   OPREDELITEV PROBLEMA IN NAMEN NALOGE .....	1
1.2   DELOVNI HIPOTEZI .....	3
<b>2       PREGLED OBJAV .....</b>	<b>4</b>
2.1   ZGODOVINA IN KLASIFIKACIJA KAMPILOBAKTROV .....	4
2.2   FIZIOLOŠKE IN GENETSKE ZNAČILNOSTI KAMPILOBAKTROV .....	4
2.3   EPIDEMIOLOGIJA .....	7
2.4   PATOGENEZA IN VIRULENTNI DEJAVNIKI.....	9
2.4.1   Gibljivost in kemotaksa .....	10
2.4.2   Adhezivnost in invazivnost .....	11
2.4.3   Translokacija .....	15
2.4.4   Toksičnosti .....	15
2.5   MIKROBNA ČREVESNA ZDRUŽBA.....	16
2.5.1   Mlečnokislinske bakterije .....	17
2.5.1.1   Rod <i>Lactobacillus</i> .....	17
2.5.1.2   Probiotične bakterije.....	18
2.6   MEHANIZMI PROBIOTIČNIH BAKTERIJ PRI OBRAMBI GOSTITELJA .....	18
2.6.1   Izločanje protimikrobnih snovi .....	19
2.6.2   Adhezivne sposobnosti probiotičnih bakterij in inhibicija adhezije patogenov .....	20
2.7   CELIČNE KULTURE.....	21
2.7.1   Celični cikel .....	21
2.7.2   Nekroza in apoptoza .....	21
2.7.3   Uporaba celičnih kultur .....	22
2.7.3.1   Celice PSI cl.1 in CLAB .....	23
<b>3       MATERIAL IN METODE .....</b>	<b>24</b>
3.1   POTEK POSKUSOV .....	24
3.2   MATERIALI .....	25
3.2.1   Bakterijski sevi in kultivacija .....	25
3.2.1.1 <i>Campylobacter jejuni</i> (K49/4).....	25

3.2.1.2 Probiotiki rodu <i>Lactobacillus</i> .....	25
<b>3.2.2 Celični model.....</b>	<b>25</b>
<b>3.2.3 Mikrobiološka gojišča .....</b>	<b>28</b>
3.2.3.1 Tekoče gojišče BHI .....	28
3.2.3.2 Trdno gojišče Karmali .....	28
3.2.3.3 Trdno gojišče MRS.....	28
3.2.3.4 Tekoče gojišče MRS.....	28
3.2.3.5 Gojišče za rast in gojenje celic DMEM .....	29
<b>3.2.4 Uporabljene kemikalije in laboratorijska oprema .....</b>	<b>29</b>
3.2.4.1 Kemikalije .....	29
3.2.4.2 Laboratorijska oprema .....	30
<b>3.3 METODE DELA.....</b>	<b>32</b>
<b>3.3.1 Delo z bakterijo <i>C. jejuni</i> K49/4 .....</b>	<b>32</b>
3.3.1.1 Revitalizacija in kultivacija bakterije <i>C. jejuni</i> K49/4.....	32
3.3.1.2 Začasno shranjevanje bakterije <i>C. jejuni</i> K49/4 .....	32
3.3.1.3 Določanje koncentracije bakterije <i>C. jejuni</i> K49/4 s štetjem kolonijskih enot na trdnem gojišču .....	32
3.3.1.4 Priprava bakterije <i>C. jejuni</i> K49/4 za nanos na celično kulturo prašičjih črevesnih epitelijskih celic.....	33
<b>3.3.2 Delo z bakterijami rodu <i>Lactobacillus</i> .....</b>	<b>34</b>
3.3.2.1 Revitalizacija in kultivacija probiotičnih bakterij.....	34
3.3.2.2 Trajno shranjevanje probiotičnih bakterij.....	34
3.3.2.3 Določanje števila probiotičnih bakterij z merjenjem optične gostote in s štetjem kolonijskih enot na trdnem gojišču.....	34
3.3.2.4 Priprava probiotičnih bakterij za nanos na celično kulturo prašičjih črevesnih epitelijskih celic .....	35
<b>3.3.3 Delo s celičnima kulturama prašičjih črevesnih epitelijskih celic PSI cl.1 in CLAB.....</b>	<b>35</b>
3.3.3.1 Revitalizacija in kultivacija celične kulture.....	35
3.3.3.2 Tripsinizacija celične kulture.....	35
3.3.3.3 Trajno shranjevanje celične kulture.....	36
3.3.3.4 Določanje števila celične kulture s hemacitometrom .....	36
3.3.3.5 Priprava celične kulture prašičjih črevesnih epitelijskih celic pred nanosom bakterij.....	37
<b>3.3.4 Spremljanje učinka probiotičnih bakterij na bakterijo <i>C. jejuni</i> K49/4 v celičnem modelu prašičjih črevesnih epitelijskih celic PSI cl.1 ter CLAB .....</b>	<b>38</b>
3.3.4.1 Vpliv probiotičnih bakterij na adhezijo, invazijo, znotrajcelično preživljivost in rast bakterije <i>C. jejuni</i> K49/4 na/v celičnem modelu .....	38
3.3.4.2 Določanje živosti celičnih kultur .....	40
<b>3.3.5 Statistična obdelava rezultatov.....</b>	<b>41</b>
3.3.5.1 Povprečna vrednost .....	41

3.3.5.2 Standardni odklon.....	41
<b>4 REZULTATI.....</b>	<b>42</b>
4.1 VPLIV PROBIOTIČNIH BAKTERIJ NA ADHEZIJO IN RAST BAKTERIJE <i>C. jejuni</i> K49/4 NA CELIČNEM MODELU PRAŠIČJIH ČREVESNIH EPITELIJSKIH CELIC .....	42
<b>4.1.1 Vpliv sevov rodu <i>Lactobacillus</i> (PCA 227, PCA 236, PCA 259, PCA 275) na adhezijo bakterije <i>C. jejuni</i> K49/4 na celicah PSI cl.1 .....</b>	<b>43</b>
<b>4.1.2 Vpliv sevov rodu <i>Lactobacillus</i> (PCA 227, PCA 236, PCA 259, PCA 275) na rast bakterije <i>C. jejuni</i> K49/4 na celicah PSI cl.1 .....</b>	<b>44</b>
<b>4.1.3 Vpliv sevov rodu <i>Lactobacillus</i> (PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCA 185) na adhezijo bakterije <i>C. jejuni</i> K49/4 na celicah PSI cl.1 in CLAB.....</b>	<b>45</b>
<b>4.1.4 Vpliv sevov rodu <i>Lactobacillus</i> (PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCA 185) na rast bakterije <i>C. jejuni</i> K49/4 na celicah PSI cl.1 in CLAB .....</b>	<b>46</b>
4.2 VPLIV PROBIOTIČNIH BAKTERIJ NA INVAZIJO BAKTERIJE <i>C. jejuni</i> K49/4 V CELIČNEM MODELU PRAŠIČJIH ČREVESNIH EPITELIJSKIH CELIC .....	49
<b>4.2.1 Vpliv sevov rodu <i>Lactobacillus</i> (PCA 227, PCA 236, PCA 259, PCA 275) na invazijo bakterije <i>C. jejuni</i> K49/4 v celicah PSI cl.1 .....</b>	<b>49</b>
<b>4.2.2 Vpliv sevov rodu <i>Lactobacillus</i> (PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCA 185) na invazijo bakterije <i>C. jejuni</i> K49/4 v celicah PSI cl.1 in CLAB .....</b>	<b>50</b>
4.3 VPLIV PROBIOTIČNIH BAKTERIJ NA ZNOTRAJCELIČNO PREŽIVLJIVOST BAKTERIJE <i>C. jejuni</i> K49/4 V CELIČNEM MODELU PRAŠIČJIH ČREVESNIH EPITELIJSKIH CELIC....	52
<b>4.3.1 Vpliv sevov rodu <i>Lactobacillus</i> (PCA 227, PCA 236, PCA 259, PCA 275) na znotrajcelično preživljivost bakterije <i>C. jejuni</i> K49/4 v celicah PSI cl.1.....</b>	<b>52</b>
<b>4.3.2 Vpliv sevov rodu <i>Lactobacillus</i> (PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCA 185) na znotrajcelično preživljivost bakterije <i>C. jejuni</i> K49/4 v celicah PSI cl.1 in CLAB .....</b>	<b>53</b>
4.4 ŽIVOST CELIČNE KULTURE PRAŠIČJIH ČREVESNIH EPITELIJSKIH CELIC .....	55
<b>4.4.1 Določanje živosti celične kulture z barvanjem s kristal vijoličnim barvilom.....</b>	<b>55</b>
4.4.1.1 Živost celične kulture CLAB.....	55
4.4.1.2 Živost celične kulture PSI cl.1 .....	56
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>57</b>
5.1 RAZPRAVA.....	57
<b>5.1.1 Vpliv sevov rodu <i>Lactobacillus</i> na adhezijo, invazijo, znotrajcelično preživljivost in rast bakterije <i>C. jejuni</i> K49/4 na/v celicah PSI cl.1 ter CLAB .....</b>	<b>57</b>
<b>5.1.2 Živost celičnih kultur .....</b>	<b>61</b>
5.2 SKLEPI .....	63
<b>6 POVZETEK.....</b>	<b>64</b>
<b>7 VIRI .....</b>	<b>65</b>

## ZAHVALA

## PRILOGE

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica1: Probiotične bakterije, uporabljene pri eksperimentalnem delu naloge.....	25
Preglednica2: DMEM (gojitveni medij) Gibco® .....	29
Preglednica3: Število dodane bakterije <i>C. jejuni</i> na epitelijske celice (MOI) .....	55

## KAZALO SLIK

Slika 1: Fotografija celice <i>Campylobacter jejuni</i> , posneta s transmisijskim elektronским mikroskopom (foto: Klančnik, 2006). ....	5
Slika 2: Viri in prenos okužbe z bakterijo <i>C. jejuni</i> (Young in sod., 2007). ....	8
Slika 3: Virulentni mehanizmi bakterij <i>C. jejuni</i> oz. interakcije med bakterijami <i>C. jejuni</i> in enterociti (Konkel in sod., 2001). ....	10
Slika 4: Imunski odgovor na infekcijo s <i>Campylobacter jejuni</i> pri ljudeh in piščancih (Young in sod., 2007). ....	14
Slika 5: Ugotavljanje učinka probiotičnih bakterij na adhezijo, invazijo ter znotrajcelično preživljivost in rast bakterije <i>C. jejuni</i> K49/4 na/v celičnem modelu.....	24
Slika 6: Fotografija celične kulture PSI cl.1, posneta z invertnim mikroskopom (100X povečava). ....	26
Slika 7: Fotografija celične kulture CLAB, posneta z invertnim mikroskopom (100X povečava). ....	27
Slika 8: Števna plošča Karmali z nacepljeno kulturo <i>C. jejuni</i> K49/4 .....	33
Slika 9: Hemacitometer .....	37
Slika 10: Fotografija mikrotitrsko ploščice po 24 urah od infekcije .....	38
Slika 11: Fotografija celične kulture CLAB po barvanju s kristal vijoličnim barvilom pod mikroskopom (100X povečava).....	40
Slika 12: Vpliv probiotikov (PCA 227, PCA 236, PCA 259, PCA 275) na adhezijo bakterije <i>C. jejuni</i> K49/4 na celicah PSI cl.1.....	43
Slika 13: Vpliv probiotikov (PCA 227, PCA 236, PCA 259, PCA 275) na število bakterije <i>C. jejuni</i> K49/4 na celicah PSI cl.1 po 10 urah inkubacije.....	44
Slika 14: Vpliv probiotikov (PCA 227, PCA 236, PCA 259, PCA 275) na število bakterije <i>C. jejuni</i> K49/4 na celicah PSI cl.1 po 24 urah inkubacije.....	44
Slika 15: Vpliv probiotikov (PCA 227, PCA 236, PCA 259, PCA 275) na število bakterije <i>C. jejuni</i> K49/4 na celicah PSI cl.1 po 48 urah inkubacije.....	44
Slika 16: Vpliv probiotikov (PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCA 185) na adhezijo bakterije <i>C. jejuni</i> K49/4 na celicah PSI cl.1.....	45
Slika 17: Vpliv probiotikov (PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCA 185) na adhezijo bakterije <i>C. jejuni</i> K49/4 na celicah CLAB.....	46
Slika 18: Vpliv probiotikov (PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCA 185) na število bakterije <i>C. jejuni</i> K49/4 na celicah PSI cl.1 po 10 urah inkubacije.....	46
Slika 19: Vpliv probiotikov (PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCA 185) na število bakterije <i>C. jejuni</i> K49/4 na celicah CLAB 10 urah inkubacije.....	47

---

Slika 20: Vpliv probiotikov (PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCA 185) na število bakterije <i>C. jejuni</i> K49/4 na celicah PSI cl.1 po 24 urah inkubacije .....	47
Slika 21: Vpliv probiotikov (PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCA 185) na število bakterije <i>C. jejuni</i> K49/4 na celicah CLAB po 24 urah inkubacije .....	47
Slika 22: Vpliv probiotikov (PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCA 185) na število bakterije <i>C. jejuni</i> K49/4 na celicah PSI cl.1 po 48 urah inkubacije .....	48
Slika 23: Vpliv probiotikov (PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCA 185) na število bakterije <i>C. jejuni</i> K49/4 na celicah CLAB po 48 urah inkubacije .....	48
Slika 24: Vpliv probiotikov (PCA 227, PCA 236, PCA 259, PCA 275) na invazijo bakterije <i>C. jejuni</i> K49/4 v celice PSI cl.1 .....	49
Slika 25: Vpliv probiotikov (PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCA 185) na invazijo bakterije <i>C. jejuni</i> K49/4 v celice PSI cl.1 .....	50
Slika 26: Vpliv probiotikov (PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCA 185) na invazijo bakterije <i>C. jejuni</i> K49/4 v celice CLAB .....	51
Slika 27: Vpliv sevov PCA 227 in PCA 236 na znotrajcelično preživljivost bakterije <i>C. jejuni</i> K49/4 v celicah PSI cl.1 .....	52
Slika 28: Vpliv sevov PCA 259 in PCA 275 na znotrajcelično preživljivost bakterije <i>C. jejuni</i> K49/4 v celicah PSI cl.1 .....	53
Slika 29: Vpliv sevov PCS 20 in PCS 22 na znotrajcelično preživljivost bakterije <i>C. jejuni</i> K49/4 v celicah PSI cl.1 .....	53
Slika 30: Vpliv sevov PCS 25 in PCA 185 na znotrajcelično preživljivost bakterije <i>C. jejuni</i> K49/4 v celicah PSI cl.1 .....	54
Slika 31: Živost celične kulture CLAB po 48 h okužbe z bakterijo <i>C. jejuni</i> K49/4 ( $0,1 < MOI < 1000$ ).....	55
Slika 32: Živost celične kulture PSI cl.1 po 24 h (levi stolpec) in 48 h (desni stolpec) okužbe z bakterijo <i>C. jejuni</i> K49/4 ( $1 < MOI < 1000$ ).....	56

## KAZALO PRILOG

Priloga A1: Koncentracija bakterije ( $\log_{10}$  CFU/ml) *C. jejuni* K49/4 s ko-inkubiranimi probiotiki PCA 227, PCA 236, PCA 259, PCA 275 na celični kulturi PSI cl.1

Priloga A2: Adhezija (%) bakterije *C. jejuni* K49/4 s ko-inkubiranimi probiotiki PCA 227, PCA 236, PCA 259, PCA 275 na celični kulturi PSI cl.1

Priloga B1: Koncentracija bakterije ( $\log_{10}$  CFU/ml) *C. jejuni* K49/4 s ko-inkubiranimi probiotiki PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCA 185 na celični kulturi PSI cl.1

Priloga B2: Adhezija bakterije (%) *C. jejuni* K49/4 s ko-inkubiranimi probiotiki PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCA 185 na celični kulturi PSI cl.1

Priloga C1: Koncentracija bakterije ( $\log_{10}$  CFU/ml) *C. jejuni* K49/4 s ko-inkubiranimi probiotiki PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCA 185 na celični kulturi CLAB

Priloga C2: Adhezija bakterije (%) *C. jejuni* K49/4 s ko-inkubiranimi probiotiki PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCA 185 na celični kulturi CLAB

Priloga D1: Koncentracija bakterije ( $\log_{10}$  CFU/ml) *C. jejuni* K49/4 s ko-inkubiranimi probiotiki PCA 227, PCA 236, PCA 259, PCA 275 v celični kulturi PSI cl.1 (z gentamicinom)

Priloga D2: Invazija bakterije (%) *C. jejuni* K49/4 s ko-inkubiranimi probiotiki PCA 227, PCA 236, PCA 259, PCA 275 v celični kulturi PSI cl.1

Priloga E1: Koncentracija bakterije ( $\log_{10}$  CFU/ml) *C. jejuni* K49/4 s ko-inkubiranimi probiotiki PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCA 185 v celični kulturi PSI cl.1 (z gentamicinom)

Priloga E2: Invazija bakterije (%) *C. jejuni* K49/4 s ko-inkubiranimi probiotiki PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCA 185 v celični kulturi PSI cl.1

Priloga F1: Koncentracija bakterije ( $\log_{10}$  CFU/ml) *C. jejuni* K49/4 s ko-inkubiranimi probiotiki PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCA 185 v celični kulturi CLAB (z gentamicinom)

Priloga F2: Invazija bakterije (%) *C. jejuni* K49/4 s ko-inkubiranimi probiotiki PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCA 185 v celični kulturi CLAB.

Priloga G1: Izmerjena absorbanca ( $\lambda=600$  nm) celične kulture CLAB po 48 urah od infekcije z bakterijo *C. jejuni* K49/4

Priloga H1: Izmerjena absorbanca ( $\lambda=600$  nm) celične kulture PSI cl.1 po 24 urah od infekcije z bakterijo *C. jejuni* K49/4

Priloga H2: Izmerjena absorbanca ( $\lambda=600$  nm) celične kulture PSI cl.1 po 48 urah od infekcije z bakterijo *C. jejuni* K49/4

Priloga I1: Živost celične kulture (%) PSI cl.1 po 24 in 48 urah od infekcije z bakterijo *C. jejuni* K49/4

Priloga I2: Živost celične kulture (%) CLAB po 48 urah od infekcije z bakterijo *C. jejuni* K49/4

Priloga J1: Povprečna koncentracija probiotičnih bakterij v inokulumu za poskus na celični kulturi  
PSI cl.1

Priloga J2: Povprečna koncentracija probiotičnih bakterij v inokulumu za poskus na celični kulturi  
CLAB

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	absorbanca
BHI bujon	Brain Heart Infusion bujon
<i>C. jejuni</i> K49/4	<i>Campylobacter jejuni</i> , izolat iz piščančjega mesa
Celice Caco-2	celice humanega adenokarcinoma debelega črevesa
Celice CHO	celice izolirane iz ovarija kitajskega hrčka
Celice CLAB	celice izolirane iz tankega črevesa prašiča
Celice HeLa	celice humanega karcinoma cerviksa
Celice Hep-2	celice humanega karcinoma jeter
Celice HT-29	celice humanega adenokarcinoma na debelem črevesu
Celice INT 407	humane embrionalne črevesne epitelijske celice
Celice K1	celice izolirane iz ovarija kitajskega hrčka
Celice LMH	epitelijske celice piščančjega hepatocelularnega karcinoma
Celice MDCK	epitelijske celice ledvic odraslega psa
Celice PSI cl.1	celice izolirane iz tankega črevesa prašiča
Celice T84	celice humanega karcinoma kolona
Celice Vero	celice ledvic afriške zelene opice
CFU	število kolonijskih enot (angl. colony forming units)
dH <sub>2</sub> O	destilirana voda
D-vrednost	Je čas (v minutah), potreben za zmanjšanje prvotnega števila mikroorganizmov za 90 %
DMEM	Eagle-ovo modificirano gojišče za celice (angl. Dulbecco's modified Eagle's medium)
DMEM Adv	Eagle-ovo modificirano gojišče za celice z dodanimi antibiotiki, L-glutaminom in serumom
DMSO	dimetilsulfoksid
EDTA	etylendiamin tetraetanojska kislina
Fn	Fibronektin
FBS	serum govejega zarodka (angl. fetal bovine serum)
GBS	Guillan-Barrèov sindrom
GIT	gastrointestinalni trakt
kbp	kilobazni pari
KV	kristal vijolično barvilo
<i>L. gasseri</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>

---

<i>L. pentosus</i>	<i>Lactobacillus pentosus</i>
<i>L. plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
MA	mikroaerofilna atmosfera (3 % kisika, 10 % ogljikovega dioksida, 87 % dušika)
MKB	mlečnokislinske bakterije
MOI	izraža število dodanih bakterij na epitelijsko celico (angl. multiplicity of infection)
MRS	gojišče De Man-Rogosa-Sharpe za gojenje MKB
NaCl	natrijev klorid
nm	nanometer
SCS	supernatant z izločki laktobacilov (angl. spent culture supernatant)
TER	transepitelijska električna upornost (angl. transepithelial electrical resistence)
VNBC	živo, vendar nekultivabilno stanje celic (angl. viable but not culturable)

## 1 UVOD

### 1.1 OPREDELITEV PROBLEMA IN NAMEN NALOGE

*Campylobacter jejuni* je pogost povzročitelj črevesnih okužb pri človeku širom po svetu. Povzroča kampilobakteriozo, to je okužba gastrointestinalnega trakta, katere značilnosti so driska, vročina, abdominalne bolečine, slabost in bruhanje. Bolezen ponavadi traja od 5 do 7 dni, po okužbi so možni tudi občasni zapleti, kot so nevromuskularne motnje (Ketley, 1997; Nachamkin in sod., 1998). Bakterije so komenzali prebavil ptic. Človeška okužba je ponavadi posledica zaužitja neustrezno termično obdelanega okuženega piščančjega mesa, do katerega pride največkrat zaradi fekalne kontaminacije med zakolom, neustrezne higiene ali navzkrižne kontaminacije živilskih proizvodov. Okužimo se lahko tudi s surovim mlekom, kontaminirano vodo, preko hišnega ljubljenčka in drugih virov (Ketley, 1997).

Mehanizem infekcijskega delovanja *C. jejuni* je pri človeku še relativno slabo pojasnjen, vključuje pa vezavo (adhezijo) na črevesni epitelij, vstopanje (invazijo) v gostiteljsko celico in izločanje toksinov (Ketley, 1997; Müller in sod., 2007). Pomemben virulenten dejavnik patogeneze je sposobnost vezave *C. jejuni* na epitelijske celice gastrointestinalnega (GIT) trakta ljudi (Woolridge in Ketley, 1997). Raziskave enteritisa pri živalih, okuženih z bakterijami *Campylobacter* kažejo, da je ključnega pomena za patogenezo vstopanje (invazija) bakterij v črevesne epitelijske celice (Szymanski in sod., 1995).

Problem pri zdravljenju črevesnih okužb predstavlja tudi vedno večja uporaba antimikrobnih učinkovin med vzrejo živali, saj zoonotične bakterije postopoma razvijajo odpornost proti antibiotikom. Stopnja odpornosti pri bakterijah *Campylobacter* variira glede na različne protimikrobne učinkovine in glede na lokacijo v svetu. To predstavlja splošno nevarnost zaradi morebitnega neuspešnega zdravljenja kampilobakterioze v prihodnosti (Shin in Lee, 2007).

Epitelijske celice črevesja predstavljajo veliko in aktivno tkivo, ki je v stalnem kontaktu s črevesno mikrobnou združbo, drugimi mikrobi in hrano. Delujejo kot fizična prepreka, ki ščiti gostitelja pred vdorom potencialno nevarnih mikroorganizmov, njihovih produktov in

antigenov iz hrane (Servin, 2004). Zaradi vnosa patogenih bakterij, antigenov iz hrane in drugih škodljivih substanc pride do razdora normalne črevesne mikrobne združbe in posledično do črevesne disfunkcije (Fooks in Gibson, 2002). Za bakterije *C. jejuni* je znano, da po zaužitju preidejo zgornja prebavila in se naselijo v črevesni sluznici (Ketley, 1997). V epitelijskih celicah izzovejo določene reakcije imunskega odziva ali celo njihovo smrt (Kopecko in sod., 2001).

Dosedanje raziskave so pokazale, da zaužitje različnih sevov bakterij iz rodu *Lactobacillus* pozitivno vpliva na mikrobično ravnotežje v črevesju, ščiti organizem pred invazijo črevesnih patogenov in pred različnimi črevesnimi boleznimi (Holzapfel in sod., 1998). Žive mikroorganizme, ki po zaužitju v zadostnih količinah koristno vplivajo na zdravje gostitelja, imenujemo probiotiki. Njihovo osnovno delovanje je stabilizacija črevesne mikroflore, zato imajo probiotiki vsak dan pomembnejšo vlogo v raziskavah o vplivu na izboljšanje zdravja ljudi. Spreminjanje črevesne mikroflore s t.i. funkcionalno hrano ima pozitiven učinek na zdravje ljudi, ker probiotiki delujejo na različnih ravneh črevesne obrambe (Rogelj, 2001; Avonts in sod., 2004).

Pripenjanje probiotikov na črevesni epitelij je povezano s stimulacijo imunskega odziva, odločilno za nadaljnjo kolonizacijo ter prvi pogoj za uravnavanje ravnotežja črevesne mikroflore. Tekmovanje s patogenimi organizmi za vezavna mesta in kolonizacijo na črevesno sluznico je zaščitni mehanizem, s katerim probiotiki varujejo gostitelja pred vdorom patogenov iz hrane (Collado in sod., 2007a). Sevi probiotičnih bakterij, ki imajo sposobnost adhezije na epitelij, so dalj časa v prebavnem traktu in imajo večje metabolne ter imunomodularne učinke na gostitelja (Saarela in sod., 2000).

Študije interakcij med črevesnimi epitelijskimi celicami in bakterijami *in vivo* so zahtevne, zato se pogosto uporabljajo *in vitro* celični modeli s črevesnimi celičnimi linijami, kot so Caco-2, INT407, T84 in drugi (Hu in Kopecko, 1999; Monteville in Konkel, 2002; Tsai in sod., 2005). Oviranje adhezije, kompetitivno izključevanje in premestitev enteropatogenov na vezavnih mestih črevesnih celičnih kultur so že dokazani učinki laktobacilov *in vitro* (Tsai in sod., 2005; Bogovič Matijašić in sod., 2006; Gueimonde in sod., 2006; Botić in sod., 2007; Collado in sod., 2007a).

V diplomski nalogi smo ugotavljali, če lahko epitelijske črevesne celice zaščitimo pred škodljivimi učinki *C. jejuni* K49/4. Ugotavljali smo, v kolikšni meri se bakterije *C. jejuni* K49/4 lahko vežejo na celični model prašičjih črevesnih epitelijskih celic PSI cl.1 ter CLAB in/ali v njih prehajajo. Sev *C. jejuni* K49/4 je sposoben adhezije in invazije na/v celični kulturi Caco-2 in makrofage J477 (Mihaljević in sod., 2007; Šikić, 2007). Želeli smo ugotoviti, če lahko s sočasno inkubacijo živih probiotičnih bakterij rodu *Lactobacillus* preprečimo adhezijo in/ali invazijo *C. jejuni* na/v prašičje črevesne epitelijske celice PSI cl.1 ter CLAB. Hkrati nas je zanimalo, če lahko s sočasno inkubacijo probiotičnih kultur preprečimo ali zmanjšamo znotrajcelično razmnoževanje kampilobaktrov v celicah in rast bakterije *C. jejuni* na celicah.

## 1.2 DELOVNI HIPOTEZI

- Bakterije *C. jejuni* se vežejo na prašičje črevesne epitelijske celice *in vitro* in vanje uspešno prehajajo;
- Sočasna inkubacija bakterije *C. jejuni* K49/4 in posameznih sevov rodu *Lactobacillus* zmanjšuje virulentnost (adhezijo, invazijo, znotrajcelično preživelost in rast na celicah) bakterije *C. jejuni* na/v celičnih modelih *in vitro*.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 ZGODOVINA IN KLASIFIKACIJA KAMPILOBAKTROV

Sprva so kampilobakte uvrščali med bakterije rodu *Vibrio*, saj je bil mikroorganizem, poznan kot *Vibrio fetus*, odgovoren za spontane abortuse goveda in ovac. Bakterije so se razlikovale od ostalih vrst rodu *Vibrio* v rasti pri atmosferski koncentraciji kisika in metabolizmu sladkorjev. Šele leta 1963 sta Sebald in Veron bakterije "Vibrio" uvrstila v nov rod z imenom *Campylobacter*. Trajalo je vse do leta 1972, ko sta Dekeyser in Butzler izolirala vrsto *Campylobacter jejuni* iz krvi in blata mlade ženske s hemoragičnim enterokolitisom (Snelling in sod., 2005), z uporabo filtracijske tehnike na krvnem agarju in dodatki antibiotikov.

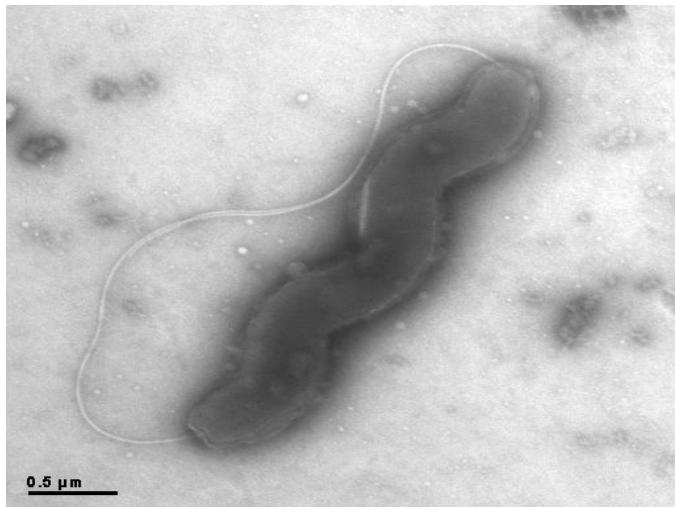
Rod *Campylobacter* obsega 15 vrst bakterij, od tega jih je bilo že 12 opisanih v zvezi z boleznimi pri ljudeh. Termofilne vrste *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari* in *Campylobacter upsaliensis* so opisane najpogosteje in povezane s črevesnimi boleznimi (Snelling in sod., 2005). Črevesne okužbe povzročajo le giblji sevi, ki so se sposobni pritrditi na črevesno sluznico. Glavna povzročitelja okužb sta *C. jejuni*, ki predstavlja 80 % - 85 % vseh okužb in *C. coli*, ki predstavlja 10 % - 15 % vseh okužb (Park, 2002; Moore in sod, 2005).

### 2.2 FIZIOLOŠKE IN GENETSKE ZNAČILNOSTI KAMPILOBAKTROV

Ime rodu *Campylobacter* je izpeljanka iz grške besede "kampylos", ki v grščini pomeni ukrivljen (Keener in sod., 2004).

Bakterije rodu *Campylobacter* so morfološko tanke od 1,5-6,0  $\mu\text{m}$  dolge in od 0,2-0,5  $\mu\text{m}$  široke, po Gramu negativne, spiralno ukrivljene palčke z zašiljenimi konci (Ketley, 1997). So mikroaerofilne bakterije in rastejo najbolje pri temperaturi od 37 do 42 °C (Konkel in sod., 2001). Imajo encima oksidaza in katalaza, ne metabolizirajo sladkorjev in so nesporogene (Snelling in sod., 2005). Običajno imajo polarno flagelo na eni ali na obeh straneh celice, kar domnevno prispeva k spiralni morfologiji in gibljivosti (Ketley, 1997). Ker ne fermentirajo ogljikovih hidratov, pretvarjajo energijo iz aminokislin in iz intermediatov cikla trikarboksilnih kislin (Snelling in sod., 2005).

Na temelju somatskega O antigena so kampilobaktri razdeljeni na več kot 90 serotipov in na temelju kapsularnega in flagelarnega antigena na 50 različnih serotipov (Radšel-Medvešček, 2002).



Slika 1: Fotografija celice *Campylobacter jejuni*, posneta s transmisijским elektronskim mikroskopom (foto: Klančnik, 2006).

Vrsti *C. jejuni* in *C. coli* rasteta najbolje pri 42 °C in zahtevata koncentracijo kisika ( $O_2$ ) med 3-15 % in koncentracijo ogljikovega dioksida ( $CO_2$ ) med 3-5 % (Ketley, 1997). Vrsta *C. jejuni* se od vrste *C. coli* razlikuje v tem, da hidrolizira hipurat, nima encimov lipaze in lecitinaze, ne raste pri vrednosti pH nižji od 4,9 in pri temperaturi pod 30 °C (Snelling in sod., 2005).

Kljub občutljivosti termotolerantnih bakterij rodu *Campylobacter* na okolske strese kot so hlajenje, zamrzovanje, segrevanje, kisanje in sušenje (Martínez-Rodrigues in sod., 2004), je preživetje bakterij *C. jejuni* daljše pri nizkih temperaturah hladilnika (4 °C) in višjih koncentracijah natrijevega klorida (NaCl) (Alter in sod., 2006) ter v vlažnem okolju ali pri nižjih koncentracijah kisika (npr. modificirana atmosfera) (Federighi in sod., 1999). Dokazano je, da so bakterije *C. jejuni* najbolj odporne proti okoljskim stresom v eksponentni fazi rasti, nato ji sledita zgodnja stacionarna faza in stacionarna faza rasti (Kelly in sod., 2001).

Stres vpliva na fiziologijo in morfologijo bakterij *C. jejuni*. Ketley je v svojem članku iz leta 1997 zapisal, da kampilobaktri pod posebnimi pogoji, v stacionarni fazi rasti ali, če so

izpostavljeni atmosferski koncentraciji kisika, preidejo v okroglo ali kokoidno obliko. Sprememba oblike je povezana s prehajanjem iz žive in kultivabilne faze v živo, vendar ne kultivabilno fazo (VBNC). Domnevamo, da je to stanje prilagoditev bakterij, da preživijo v neugodnem okolju (Ketley, 1997). Izsledki nekaterih kasnejših eksperimentalnih raziskav pa navajajo, da mehanizem preživetja v domnevno VBNC (angl. viable but not culturable) stanju bakterij vrste *C. jejuni* še ni popolnoma pojasnjen in da korelacije med kultivabilnostjo in celično morfologijo ni (Keener in sod., 2004).

S poskusi *in vivo*, na en dan starih zdravih miškah in piščancih, oralno okuženih z VBNC bakterijami *C. jejuni* so dokazali, da so kampilobaktri sposobni ponovne kultivabilnosti med prehajanjem skozi živalski prebavni trakt (Cappelier in sod., 1999). Z nadaljnji raziskavami so odkrili, da bakterije *C. jejuni* vstopijo v VBNC obliko kot odgovor na stradanje (Cappelier in sod., 2000, Klančnik in sod., 2008) in da je VBNC degenerirana oblika celic, posledica oksidativnega stresa, kot tudi transformacije celic iz spiralne v kokoidno obliko (Trachoo, 2003). Kakorkoli, kampilobaktri imajo sposobnost, da se dinamično prilagodijo in preživijo stresne okoliščine. Pod stresnimi okoliščinami (stradanje, temperatura, oksidativni stres) prehajajo iz spiralne v kokoidno obliko, ki ponavadi spremlja transformacijo celic v živo, vendar ne kultivabilno stanje (VBNC) ali pridobijo navzkrižno odpornost, kar predstavlja dodatno tveganje v živilsko predelovalni verigi (Klančnik in sod., 2008).

Pasterizacija (Corry in sod., 2007) in kloriranje vode (Park in sod., 2002) uničita celice *C. jejuni*, kot tudi koncentracija NaCl nad 2 % pri optimalni temperaturi rasti (42 °C) in 24-urni inkubaciji (Doyle in Roman, 1982). Kampilobakte inaktivira vročina, D-vrednost pri temperaturi 60 °C je manj kot 1 minuta. Zamrzovanje in ponovno odtajevanje zmanjšuja populacijo kampilobaktrov (Keener in sod., 2004).

Bakterije vrste *Campylobacter jejuni* imajo relativno majhen genom (1,6-1,7 Mbp) z adeninom in timinom (AT) bogato DNA, delež gvanina in citozina (GC) pa obsega 29-40 mol % (Snelling in sod., 2005). Morda se majhna velikost genoma odraža v tem, da za rast potrebujejo kompleksen medij, nimajo sposobnosti fermentacije ogljikovih hidratov ter razgradnje kompleksnih snovi (Ketley, 1997).

Gibljivost vrsti *C. jejuni* omogočata dva polarna bička. Organizem vsebuje dve kopiji genov za biček. Ekspresija teh genov je kontrolirana z dvema unikatnima promotorjema (Szymanski in sod., 1995; Murphy in sod., 2006). S kloniranjem določenega segmenta DNA so ugotovili, da večina izolatov vsebuje dva sorodna gena *flaA* in *flaB*, približno enake velikosti (1,7 kbp). Mutageneza posameznega gena je pokazala, da v odsotnosti gena *flaA* gen *flaB* kodira nefunkcionalen kratek biček, s prišekanim vrhom (Ketley, 1997; Parkhill in sod., 2000).

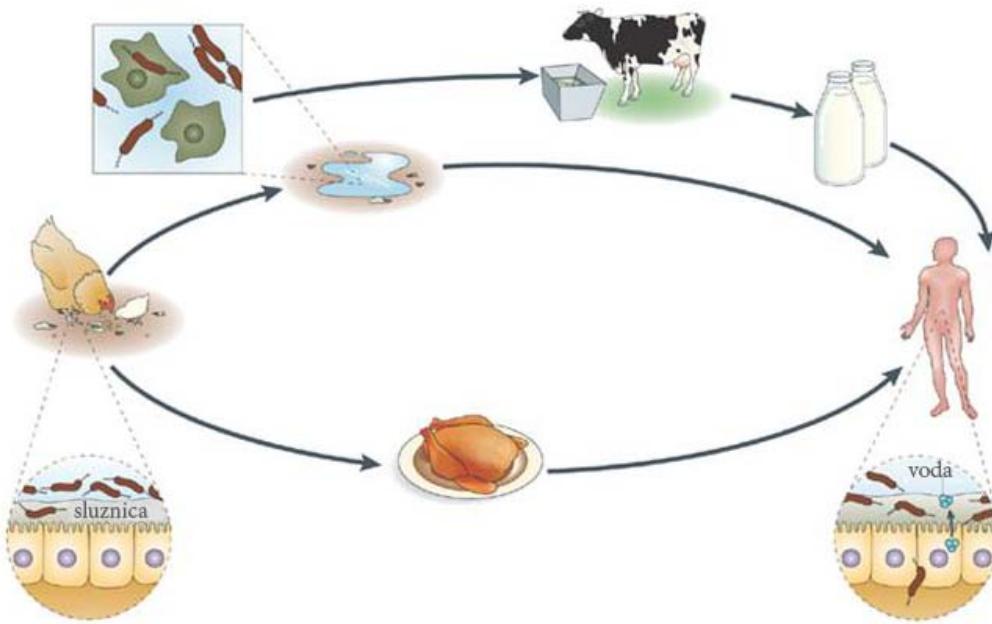
Gen *CadF* kodira zunanji membranski protein velikosti 37-kDa, ki pospešuje vezavo bakterij na fibronektin (Fn) (Konkel in sod., 1999a).

Vrsta *C. jejuni* nima ključnega regulatorja stresnega odziva, ki ga imajo druge po Gramu negativne bakterije. Pri npr. *E. coli* je stresni odziv reguliran s sigma dejavnikom  $\sigma^s$ , ki je produkt gena *Rpos* in kontrolira izražanje več kot 50 genov (Park, 2002). Pri kampilobakterih celični odgovor ni reguliran s tipičnim regulatornim mehanizmom, ki vključuje gen *Rpos*, odgovoren za preživetje celic v stacionarni fazi in pri izpostavljenosti različnim okoljskim stresom, temveč je povezan z izločanjem zunajceličnih komponent, ki sodelujejo pri stresnem odzivu in so specifične glede na fazo rasti (Murphy in sod., 2003).

### 2.3 EPIDEMIOLOGIJA

Kampilobakterioza spada med zoonoze - to so bolezni, ki se prenašajo iz živali na človeka, bodisi z neposrednim prenosom ali pa z zaužitjem kontaminiranega živila. V zadnjih letih v industrializiranih državah kampilobakterioze predstavljajo najpogostejo bakterijsko okužbo pri ljudeh. V Sloveniji sta na prvem oziroma na drugem mestu po pogostosti okužb s kontaminirano hrano prav tako salmoneloza in kampilobakterioza (EFSA 2007a, b).

Bakterije rodu *Campylobacter* so komenzali v črevesju pri različnih sesalcih in ptičih; živini (svinje, ovce, govedo), domačih živalih (psi, mačke in konji), perutnini (piščanci, purani, race, gosi) in divjih živalih (zajci, podgane, divji prašiči, fazani, prepelice) (Park, 2002; Newell in Davison, 2003). Najbolj pogost gostitelj so ptice, verjetno zaradi njihove višje telesne temperature (Skirrow, 1977). Vrsta *Campylobacter jejuni* prevladuje med govedom in komercialno vzrejenimi piščanci (brojlerji), pri prašičih pa prevladuje vrsta *C. coli* (Shin in Lee, 2007; Maridor in sod., 2008).



Slika 2: Viri in prenos okužbe z bakterijo *C. jejuni* (Young in sod., 2007).

Ekološki cikel vrste *C. jejuni* vključuje vodo, živali in živila (Konkel in sod., 2001). Kampilobaktri lahko preživijo v površinski in pitni vodi, v fecesu, mleku ter urinu od 3 do 5 tednov pri temperaturi okrog 4 °C (Blaser in sod., 1980; Diergaardt in sod., 2004).

Primarni izvor okužbe je zaužitje mikrobiološko kontaminirane hrane živalskega izvora (Park, 2002), ki se kontaminira v klavnicih med predelavo (Lengsfeld in sod., 2007). Glavni vzrok sporadičnih primerov okužbe z vrsto *C. jejuni* je rokovanje in uživanje kontaminirane perutnine (Hendrixson in DiRita, 2004), navzkrižna kontaminacija živil in uživanje nezadostno toplotno obdelanega perutninskega mesa (Park in sod., 2002). Ostali možni viri okužb pa so še nepasterizirano mleko, neklorirana pitna voda, lupinarji (ostrige) in zelenjava (Federighi in sod., 1999). Analize prikazujejo, da je med 68-98 % piščančjega mesa kontaminiranega z živimi *C. jejuni* (Hendrixson in DiRita, 2004). Človek se lahko okuži tudi z neposrednim stikom z okuženimi živalmi ali njihovimi iztrebki (Ketley, 1997).

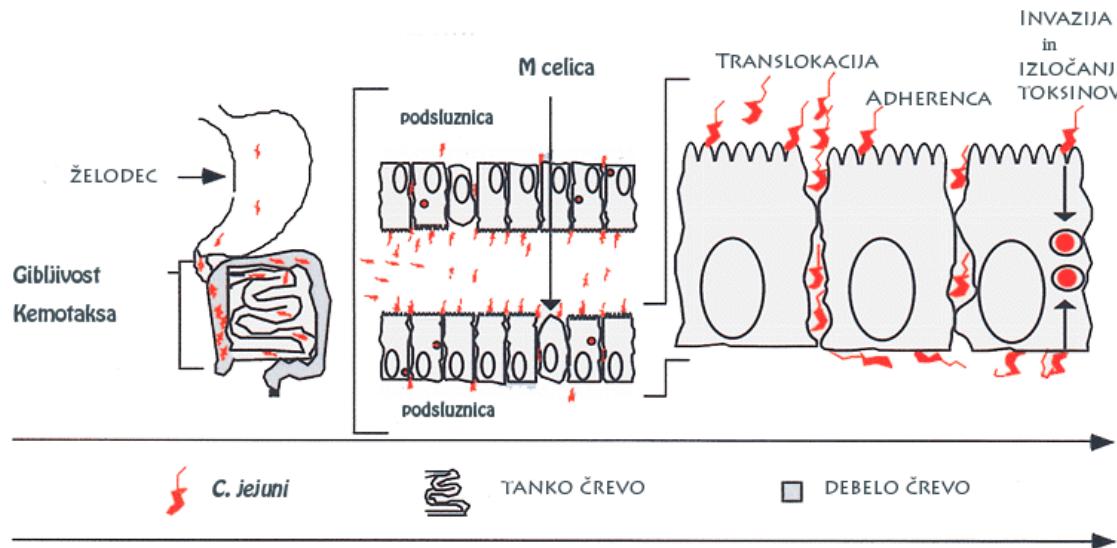
Največ obolenj s kampilobaktri je v poletnih mesecih (Snelling in sod., 2005), v obliki epidemije, še večkrat pa nastopajo sporadični primeri (Frost, 2001). Zbolevajo vse starostne skupine, večinoma pa otroci v državah v razvoju (Wassenaar in Blaser, 1999). Težji simptomi bolezni se pojavljajo pri otrocih, starejših ljudeh in ljudeh z oslabelim imunskim

sistemom (Crushell in sod., 2004). Okužbe z bakterijami *Campylobacter* lahko minejo same od sebe (potekajo brez simptomov) in ponavadi ne potrebujejo zdravljenja (Skirrow, 1977). Pri bolnikih z motnjami v imunskemu sistemu lahko take infekcije povzročijo bakteriemijo, katere umrljivost je večja od 30 odstotkov (Pasternack, 2002).

Pogostost humane okužbe z bakterijami rodu *Campylobacter* je zaradi nizke infekcijske doze med 100 in 500 bakterij (Solomon in Hoover, 1999; Diergaardt in sod., 2004). Pri ljudeh infekcija z bakterijami *Campylobacter* navadno povzroči kolitis (vnetje debelega črevesa) in drisko (Friis in sod., 2005). Vročino spremljajo splošne težave, kot so utrujenost, glavobol, bolečine v mišicah in slabost, ki se razvijejo 12-48 ur pred driskom (Yan in sod., 2005). Inkubacija traja 1 do 7 dni. V nekaterih primerih lahko vodi infekcija do resnih posledic, najbolj pogost je Guillain-Barré sindrom, vrsta nevromuskularne paralize (Müller in sod., 2007) in Miller Fisher sindrom (Federighi in sod., 1999). Asimptomatske infekcije, vodeno drisko in dizenterični tip bolezni so prav tako odkrili pri ljudeh. V raziskavah *in vitro* so ugotovili, da so sevi *C. jejuni*, ki so povezani z dizenteričnim tipom bolezni, bolj invazivni in citotoksični, kot ostale vrste rodu *Campylobacter* (Nadeau in sod., 2003). Vrsta *C. jejuni* je vodilni povzročitelj bakterijskih okužb s hrano in povzročitelj t.i. potovalne driske. Kampilobakte so izolirali pri bolnikih še nekaj tednov po tem, ko so izginili klinični simptomi (Ketley, 1997).

#### 2.4 PATOGENEZA IN VIRULENTNI DEJAVNIKI

Kampilobaktri vstopijo v črevesje gostitelja tako, da preidejo oviro, ki jo predstavlja kislo okolje želodca in kolonizirajo najprej tanko, kasneje pa prehajajo v debelo črevo (Guerry, 2007). Že nekaj časa je znano, da z direktnim uničenjem epitelijskih celic, invazijo v epitelijske celice in s sproščanjem toksinov, onemogočijo normalno absorptivnost črevesja (Ketley, 1997). Vendar so virulentni mehanizmi kampilobakterioze slabo pojasnjeni. Vključujejo gibljivost, kemotakso, vezavo (adhezijo) na črevesne celice, sposobnost kolonizacije, vstopanje (invazijo) in epitelijsko translokacijo (premestitev), znotrajcelično preživetje in izločanje toksinov (Ketley, 1997; Wassenaar in Blaser, 1999). Poleg dodatne vloge polisaharidne kapsule pa je bila nedavno odkrita tudi še nerazjasnjena vloga bičkov pri izločanju neflagelarnih proteinov in njihove zgradbe pri kolonizaciji črevesa in regulaciji ostalih virulentnih dejavnikov kampilobaktrov (Guerry, 2007).



Slika 3: Virulentni mehanizmi bakterij *C. jejuni* oz. interakcije med bakterijami *C. jejuni* in enterociti (Konkel in sod., 2001).

#### 2.4.1 Gibljivost in kemotaksa

Gibljivost omogoča bakterijam *C. jejuni* transport skozi črevesje, pritrditev na črevesno sluznico, kolonizacijo (van Vliet in Ketley, 2001), invazijo v gostiteljsko celico in tkivni tropizem (Szymanski in sod., 1995). Bakterije *C. jejuni* imajo enega ali dva polarna bička, ki jim omogočata unikaten in usmerjen način gibanja (Szymanski in sod., 1995).

Učinkovita kolonizacija tkiva je povezana s kemotakso, t.j. usmerjenim gibanjem celic v smeri kemoatraktantov. Kampilobaktri imajo mehanizme, ki zaznajo kemijski gradient in so sposobni gibanja v smeri naraščajočega kemijskega gradiента (Ketley, 1997). Prav tako kombinacija bička in spiralno-vijačne oblike celice omogočata kampilobaktrom veliko gibljivost v viskoznem mediju črevesne vsebine (Szymanski in sod., 1995).

Kemoatraktanti bakterij *Campylobacter jejuni* so mucini, L-fukoza, aminokisline: L-serin, L-aspartat, L-cistein, L-glutamat ter organske kisline: piruvat, sukcinat, fumarat, citrat, malat,  $\alpha$ -ketoglutarat (Hugdahl in sod., 1988), medtem ko so kemorepelenti žolčne kisline (van Vliet in Ketley, 2001).

#### 2.4.2 Adhezivnost in invazivnost

Za kolonizacijo in napredovanje bolezni je najprej potreben direkten kontakt med zunanjimi membranskimi proteini bakterije in gostiteljevimi celičnimi receptorji. Adhezija na gostiteljsko celico preprečuje bakterijam, da bi jih peristaltika in pretok črevesne vsebine odplavila iz gostitelja (Scibelli in sod., 2007).

Bakterijski adhezini so proteinske površinske strukture bakterije, ki omogočajo vezavo (adherenco) bakterij na površino celice. Najbolj raziskan adhezin pri vrsti *C. jejuni* je zunajni membranski protein CadF (*Campylobacter adhesin to fibronectin [Fn]*) (Konkel in sod., 1999a), ki sodeluje pri vezavi in invaziji bakterij na/v gostiteljsko celico. Indirektno povezuje bakterije *Campylobacter* s fibronektinom (Fn), pospešuje interakcije med bakterijo in gostiteljsko celico in olajša kolonizacijo. Gen *cadF*, ki kodira ta protein je dobro ohranjen med različnimi vrstami rodu *Campylobacter*, razlike v nukleotidnem zaporedju so majhne (Mamelli in sod., 2006). Mutant gena *cadF* se ni zmožen povezati s Fn in kolonizirati piščančijih črevesnih epitelijskih celic (Ziprin in sod., 1999).

Lipoprotein JlpA (*jejuni lipoprotein A*) se nahaja na površini bakterije in se med interakcijo z epitelijsko celico veže na celični molekularni šaperon Hsp90 $\alpha$  (angl. heat shock protein 90) (Jin in sod., 2003).

Na laboratorijskih miših so dokazali, da je 28 kDa periplazemski/membranski protein PEB1 adhezin. Kodiran je z genom *peb1A* in mutanti gena *peb1A* imajo značilno zmanjšano adhezivnost, invazivnost in sposobnost kolonizacije (Pei in sod., 1998; Prokhorova in sod., 2006).

Druge molekule bakterij *C. jejuni*, ki sodelujejo kot adhezini, so še: flagelin (Wassenaar in sod., 1991; Prokhorova in sod., 2006), lipopolisaharid (LPS), glavni zunajni membranski protein PorA (MOMP) (Zhang in sod., 2000; Albert in sod., 2007) in P95 (Kelle in sod., 1998).

Biček, kot najbolj raziskan virulenten dejavnik pri patogenezi, ima vlogo pri gibanju, adheziji (Konkel in sod., 2000) in internalizaciji (Grant in sod., 1993), penetraciji v gostiteljske epitelijske celice in nadaljnji širitvi po tkivu (Wassenaar in sod., 1991). Mutanti primarnega strukturnega gena *flaA* niso sposobni kolonizirati 3 dni starih

piščancev in ne invadirajo v humane epitelijske celice *in vitro* (Snelling in sod., 2005). Kontradiktorno s tem so Hänel in sod. (2004) z metodo PCR določili 8 različnih tipov gena *flaA* pri 11 različnih sevih *C. jejuni*. Enak tip gena *flaA* so identificirali pri sevu, ki ne kolonizira, kot pri sevu, ki kolonizira. Pri vseh treh vrstah, ki ne kolonizirajo tkiva, je bil najden drugačen tip gena *flaA*. Zato je avtor zaključil, da ni korelacije med kolonizacijo, invazijo in tipom gena *flaA* (Hänel in sod., 2004).

Dostop globje v tkivo in varovanje znotrajceličnih bakterij pred imunskim odzivom gostitelja omogoča bakterijam invazivnost v gostiteljske celice (Scibelli in sod., 2007). Črevesne epitelijske celice, invadirane s kampilobaktri, postanejo nabrekle in okrogle, pojavijo se spremembe v regulaciji ionskega transporta zaradi izločanja citotoksina, enterotoksina ali hemolizina. Biopsija črevesnega tkiva in vzporedni eksperimentalni modeli animalnih celičnih kultur so pokazali podobne posledice invazije bakterij *C. jejuni* (Babakhani in sod., 1993), kot sta nekroza epitelijskega tkiva ter infiltracija bakterijskih celic v nevtrofilce in monocite (Friis in sod., 2005).

Proteini, ki sodelujejo pri invaziji bakterij *C. jejuni* v gostiteljsko celico, so različni od tistih, ki omogočajo adhezijo. Dokaz za to je *C. jejuni* mutant gena *peb1* adhezina, ki značilno za 50-100 % zmanjša adhezijo bakterij na celično kulturo, invazijo pa samo za 15 % (Pei in sod., 1998).

Monteville in Konkel (2002) sta raziskovala invazivnost seva 81-176, kot virulenten dejavnik v polarizirani celični kulturi T84 (humane kancerogene celice debelega črevesa) in ugotovila, da bakterije *C. jejuni* invadirajo enterocite najprej na bazolateralni strani celice, kamor pridejo med tesnimi stiki celic in s pomočjo proteinov (Monteville in Konkel, 2002). Invazivnost vrste *C. jejuni* se povečuje med prehajanjem organizma skozi črevesne celice in izgublja s številnim precepljanjem (pasažami) bakterij iz enega gojišča na drugo *in vitro* (Babakhani in sod., 1993). Invazivnost bakterij *C. jejuni* v celični model humanih epitelijskih celic je sevno specifična (Konkel in Joens, 1989; Ketley 1997).

Žolčne soli, evkariantske celice ali njihove komponente ter medij z dodanim serumom v stiku z bakterijami *C. jejuni* sprožijo sintezo proteinov »de novo« (Konkel in sod., 1999b; Rivera-Amill in sod., 2001; van Vliet in Ketley, 2001), ki pospešujejo prevzem in internalizacijo bakterij v gostiteljsko celico (Monteville in Konkel, 2002).

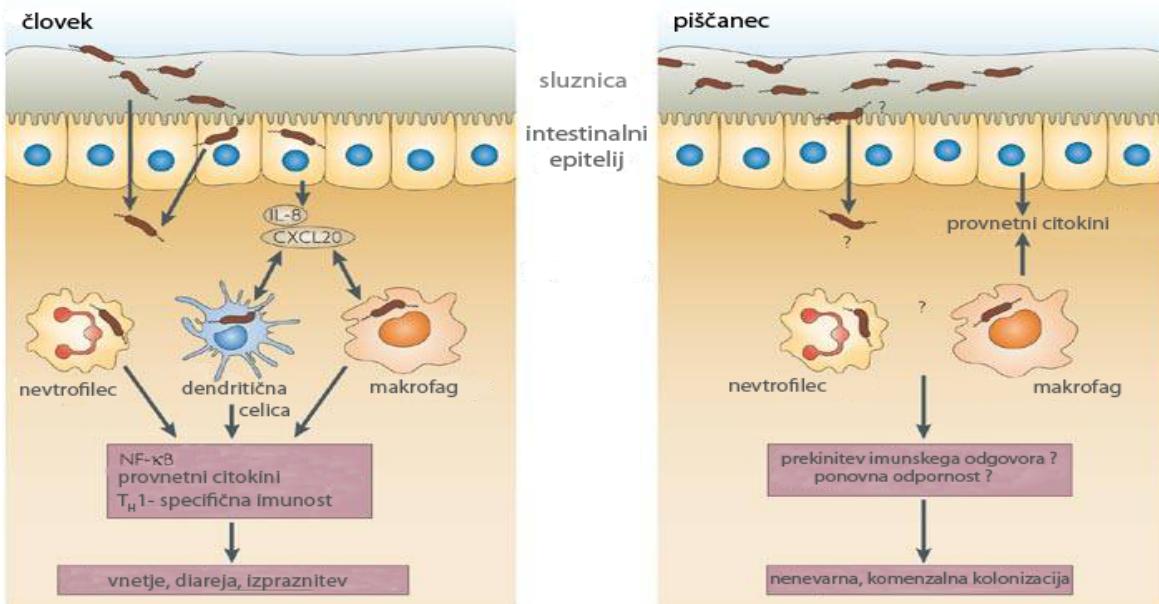
Odkrili so, da bakterije *C. jejuni* med koinkubacijo z evkariontskimi celicami sintetizirajo »de novo« vsaj 8 proteinov (Konkel in sod., 1999b), med njimi tako imenovane Cia proteine (*Campylobacter invasion antigens*) (Rivera-Amill in sod., 2001).

Za uspešno vdiranje v epitelijske celice je potrebno izražanje gena *ciaB* (*Campylobacter invasion antigen B*), ki kodira protein CiaB in gena *pldA*, ki je povezan fosfolipazno aktivnostjo bakterij (Konkel in sod., 1999b; Monteville in Konkel, 2002). Protein CiaB se med okužbo enterocitov translocira v citoplazmo gostiteljske celice. Da je eden izmed virulentnih dejavnikov kampilobaktrov, dokazujejo Hänel in sod. (2004), ki so odkrili medsebojno odvisnost med sposobnostjo kolonizacije bakterij *C. jejuni* in invazijo le-teh v celice Caco-2. Mutanti genov *ciaB* ne izločajo proteinov CiaB (Konkel in sod., 1999b) in ne kolonizirajo piščančjega črevesja (Hänel in sod., 2004).

Z molekularno karakterizacijo invazivnih izolatov bakterij *Campylobacter* so nedavno odkrili tudi pozitivno povezavo med invazivnostjo in prisotnostjo gena *iamA* (*invasion associated gen*) (Carvalho in sod., 2001; Müller in sod., 2006).

Konkel in sod. (1992) so ugotovili, da se v zgodnji fazi invazije kampilobaktri nahajajo pretežno na obrobu gostiteljske celice in se s časovnim podaljševanjem inkubacije znotraj celice premikajo. Po 4 urah od okužbe epitelijskih celic s *C. jejuni* je več kot 50 % znotrajceličnih bakterij v bližini jedra gostiteljske celice (Konkel in sod., 1992). Znotrajcelično preživetje bakterijam *Campylobacter* omogočajo antioksidativni obrambni sistemi. Mednje spadata encima superoksid dismutaza in katalaza, ki sta pri kampilobaktrih kodirana z genoma *sodB* in *katA* (Pesci in sod., 1994; Purdy in Park, 1994).

N-glikozilacija je značilna za evkariotsko modifikacijo proteinov, vendar so nekateri prokarionti sposobni proizvesti glikozilirane proteine. Domnevno prisotnost glikana na površini *C. jejuni* igra pomembno vlogo pri adheziji in invaziji na enterocite (Szymanski in sod., 2002; Ishiwata in sod., 2006). Močno glikozilirani so tudi flagelini, kar je povezano s sposobnostjo tvorbe mikrokolonij na črevesnih epitelijskih celicah in s tem s kolonizacijo (Guerry, 2007).



Slika 4: Imunski odgovor na infekcijo s *Campylobacter jejuni* pri ljudeh in piščancih (Young in sod., 2007).

Adhezija in invazija bakterij *C. jejuni* na/v humane črevesne epitelijske celice spodbudi izločanje ključnega mediatorja imunskega sistema, kemotaktičnega citokina interlevkina 8 (IL-8) na bazolateralni strani celic, ki stimulira celice imunskega odziva (Wassenaar in Blaser, 1999). Ta spodbudi dendritične celice, sproži migracijo nevtrofilcev in monocitov, ki fagocitirajo bakterije in nadaljnjo izločanje provnetnih citokinov, aktivacijo celic T<sub>H</sub> ter aktivacijo nuklearnega faktorja kapa B (NF-κB). Pri piščancih kampilobaktri prebivajo v sluznici črevesja. *In vitro* poskusi so pokazali, da lahko bakterije *C. jejuni* stimulirajo izločanje provnetnih citokinov in makrofagov, vendar s tem pri gostitelju ne privede do vnetne driske. Neznani dejavniki bodisi blažijo imunski odziv ali ga preusmerjajo. Invazija bakterij *C. jejuni* v črevesni epithelij pri piščancih ni znana (Young in sod., 2007).

Bakterije *C. jejuni* so sposobne adhezije in invazije na/v humane celične kulture: INT 407 (humane embrionalne črevesne epitelijske celice) (Monteville in sod., 2003), T84 (celice iz karcinoma debelega črevesa človeka) (Monteville in Konkel, 2002), Caco-2 (celice humanega adenokarcinoma debelega črevesa) (Brás in Ketley, 1999), HeLa (celice humanega karcinoma cerviksa) (Pei in sod., 1998), Hep-2 (celice humanega karcinoma jeter) (Konkel in Joens, 1989), kot tudi na nehumane celične kulture: LMH (epitelijske celice piščančjega hepatocelularnega karcinoma) (Konkel in sod., 2007), CHO (Albert in

sod., 2007), K1 (celice iz ovarija kitajskega hrčka), MDCK (epitelijske celice ledvic odraslega psa) in Vero (celice ledvic afriške zelene opice).

#### 2.4.3 Translokacija

Črevesni epitelij je primarna ovira pred invazivnimi patogenimi bakterijami, ki so sposobne translokacije skozi celice (Monteville in Konkel, 2002). Za študij mikrobnega učinka na membransko permeabilnost, mehanizme transcitoze in celične invazije se uporablajo polarizirane celične kulture (Friis in sod., 2005).

Bakterije se prebijajo iz apikalne na bazolateralno stran enterocitov po dveh poteh. Transcelularno (skozi celico) in paracelularno (med celicami) (Brás in Ketley, 1999), kar povzroči razdor tesnih stikov celic in padec transepitelijске električne upornosti (TER, angl. transepithelial electrical resistance). TER je merilo za propustnost tesnih stikov celic in integriteto monosloja. Razdor medceličnih kontaktov zmanjša TER, kar se uporablja kot merilo za povečano epitelijsko prepustnost (Klingberg in sod., 2005). Bakterije *C. jejuni* lahko prečkajo monosloj polarizirane celične kulture Caco-2 brez upada TER (Everest in sod., 1992).

Mehanizem translokacije je odvisen od funkcionalnosti bička in sinteze proteinov »de novo«, kar so dokazali z neinvazivnima mutantoma *Cia* in *CadF*, ki sta bila sposobna translokacije skozi T84 humano celično kulturo (Monteville in Konkel, 2002).

#### 2.4.4 Toksini

Bakterijski toksini so virulentni dejavniki, ki okvarjajo celice gostitelja. Bakterije rodu *Campylobacter* izdelujejo dve skupini toksinov, ki se delita glede na način delovanja: enterotoksini in citotoksini (Wassenaar, 1997). Izločanje toksinov je neodvisno od invazivnosti bakterij, saj tako invazivne kot ne-invazivne vrste izločajo toksine (Müller in sod., 2006).

Bakterije *C. jejuni* izločajo več vrst enterotoksinov: CLT (angl. cholera-like toxin) toksin (Ketley, 1997), ki je soroden toksinu vibrija kolere in termolabilen enterotoksin (TL), soroden enterotoksinu *E. coli* (Wassenaar, 1997). Enterotoksini so sekretorni proteini, ki se vežejo na celične receptorje, vstopijo v celico in zvišajo celični ciklični AMP (cAMP).

Dvig koncentracije cAMP v enterocitu pospeši aktivni transport elektrolitov in vode v lumen črevesa (Wassenaar, 1997). Enterotoksini delujejo lokalno na črevesno sluznico in so vzrok vodene driske pri otrocih ter potovalne driske (Ketley, 1997).

Druga skupina toksinov so citotoksini (proteini), ki ubijajo tarčne celice (Wassenaar, 1997). Najbolj raziskani za tvorbo citotoksinov so geni *cdtA-C*. Med toksini je najbolj raziskan toksin CDT (angl. Cytolethal Distending Toxin), ostali so še Šiga toksinu podoben toksin (angl. shiga-like toxin), hemolitični citotoksini in hepatotoksin (Wassenaar, 1997).

Lipopolisaharid v zunanjji membrani bakterij ima endotoksično delovanje. Endotoksin – lipid A, ki je del lipopolisaharida (LPS) celične stene po Gramu negativnih bakterij, deluje toksično potem, ko se sprosti iz propadlih bakterijskih celic (Andlovic, 2002).

## 2.5 MIKROBNA ČREVESNA ZDРUŽBA

Prebavila vsakega posameznika predstavljajo poseben ekosistem, ki se razprostira na cca 200 m<sup>2</sup> površine sluznice prebavil (Holzapfel in sod., 1998). Proces naselitve prebavnega trakta z mikroorganizmi različnih vrst kmalu po rojstvu je unikatna za vsakega posameznika. Značilen je simbiotski odnos med mikroorganizmi, ki naseljujejo prebavila in epitelijskimi celicami. Mikrobeno združbo odraslega človeka sestavljajo avtohtone vrste in začasni kolonizatorji, ki jih pridobimo iz zunanjega okolja. Sestavljena je iz 400-1000 vrst, od tega jih 60 % ni kultivabilnih zunaj gastrointestinalnega okolja v pogojih *in vitro*. Pripadniki te mikrobne združbe so izoblikovali mehanizme, s katerimi uspešno naseljujejo prebavila in sodelujejo pri obrambi epitelija pred škodljivimi mikroorganizmi ter drugimi snovmi. Prisotni so prokariontski in evkariontski mikroorganizmi, vendar prevladujejo bakterije (Holzapfel in sod., 1998; Noverr in Huffnagle, 2004).

V želodcu in začetnem delu tankega črevesa (duodenum, jejunum) je koncentracija mikroorganizmov nizka, do 10<sup>5</sup> CFU/ ml črevesne vsebine. Prevladujejo predvsem aerobni in mikroaerofilni mikroorganizmi. Proti koncu tankega črevesa (ileum) število mikroorganizmov postopno narašča vse do 10<sup>10</sup> - 10<sup>11</sup> CFU/ml črevesne vsebine v debelem črevesu. Prevladujejo fakultativni anaerobni in anaerobni organizmi (Saarela in sod., 2002;

Isolauri in sod., 2004). V največji koncentraciji so anaerobne bakterije rodov *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Clostridium* in *Lactobacillus* (Noverr in Huffnagle, 2004; Servin, 2004).

Spremembe GIT, ki so povezane s staranjem, načinom prehrane, različnimi dietami, uporabo zdravil, delovanjem imunskega sistema gostiteljev ter antigenov iz hrane, vplivajo na zmanjšanje števila črevesne mikroflore. Črevesna združba je pomembna za ohranjanje človekovega zdravja, saj oskrbuje telo z energijo in hranili ter ščiti pred kolonizacijo patogenih organizmov.

### 2.5.1 Mlečnokislinske bakterije

Mlečnokislinske bakterije (MKB) so po Gramu pozitivne, nesporulirajoče, fakultativno anaerobne ali mikroaerofilne palčke in koki. Energijo pridobivajo izključno s fosforilacijo na nivoju substrata, s fermentativnim tipom metabolizma. Večina pridobiva energijo z razgradnjo ogljikovih hidratov. Fermentacijski produkt homofermentativnih MKB je mlečna kislina, heterofermentativne MKB pa zraven te proizvajajo še acetat, etanol in CO<sub>2</sub>. Metabolizem je različen zaradi prisotnosti encima aldolaze pri homofermentativnih in encima fosfoketolaze pri heterofermentativnih bakterijah (Madigan in sod., 2000). Mlečnokislinske bakterije naseljujejo prebavila, genitalije ter dihala ljudi in živali. Pogosto se uporabljam pri proizvodnji živil in krmil, ker zavirajo rast patogenih bakterij in kvarljivcev živil, zraven tega pa značilno oblikujejo senzorične lastnosti fermentiranih živil (Wessels in sod., 2004).

Skupina mlečnokislinskih bakterij, ki se nahajajo v živilih, zajema rodove *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* in *Weissella* (Stiles in Holzapfel, 1997).

#### 2.5.1.1 Rod *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus* spada med najpomembnejše mlečnokislinske bakterije, ki so hkrati najpomembnejša skupina industrijsko uporabljenih bakterij v živilstvu. So po Gramu pozitivne dolge ali kokoidne, negibljive in nesporogene palčke. So aerotolerantni anaerobi. Prehransko so zahtevni, saj poleg fermentabilnih sladkorjev potrebujejo mnoge rastne dejavnike, kot so aminokisline, vitamini in organske baze (Adamič in sod., 2003).

Laktobacili so heterogena mikrobna združba s homo/heterofementativnim tipom metabolizma, ki ima 135 vrst in 27 podvrst. Vsebnost G+C variira med 35-55 % (Bernardeau in sod., 2007).

#### 2.5.1.2 Probiotične bakterije

Definicija probiotikov se je postopno spreminja z naraščanjem razumljivosti mehanizmov, s katerimi učinkujejo na zdravje ljudi. Fuller je leta 1989 definiral probiotike kot žive mikrobne dodatke krmi, ki s pozitivnim učinkom vplivajo na črevesno mikrobnno ravnovesje živalskega gostitelja (Ouwehand in sod., 1999). Novejša definicija organizacij ILSI (International Life Science Institut), FAO (Food and Agriculture Organization) in WHO (World Health Organization) je, da so probiotiki živi mikrobeni prehranski dodatki, ki zaužiti v zadostnih količinah, koristno učinkujejo na zdravje gostitelja. Beseda probiotik izvira iz grškega izraza »pro bios«, kar pomeni »za življenje« in se uporablja za označevanje mikroorganizmov, ki imajo ugoden vpliv na ljudi in živali (Salminen in sod., 1998).

Probiotične bakterije, ki se uporabljajo v prehrani človeka, so ponavadi sevi rodov *Bifidobacterium* in *Lactobacillus*, izolirani iz človeka. Sposobne so vplivati na ravnotežje mikroflore in s tem posredno na zdravje gostitelja (Wessels in sod., 2004). Različne študije probiotičnih sevov so pokazale koristen učinek probiotikov pri zdravljenju akutnega in kroničnega vnetja črevesja, Crohnove bolezni, laktozne intolerance, kužnih drisk, zaprtja, raka na debelem črevesu ter pri preprečevanju okužb sečil, nadzoru driske zaradi uživanja antibiotikov, zdravljenju okužb med nosečnostjo idr. (Saarela in sod., 2002; Bernardeau in sod., 2007).

### 2.6 MEHANIZMI PROBIOTIČNIH BAKTERIJ PRI OBRAMBI GOSTITELJA

Najpomembnejši mehanizmi delovanja probiotikov so: tekmovanje s patogenimi bakterijami za hranila, presnavljanje hrani do hlapnih maščobnih kislin in kemijsko modificiranih žolčnih kislin, tekmovanje s patogenimi bakterijami za receptorska mesta (Fooks in Gibson, 2002), antagonistične lastnosti (izločanje protimikrobnih snovi ali kompetitivno izključevanje), antimutagene in antikancerogene lastnosti, imunomodulatorni

učinki na gostitelja (Saarela in sod., 2000) ter sposobnost agregacije s patogenimi organizmi (Collado in sod., 2007b).

Sposobnost tekmovanja za limitirajoča hranična je pomemben dejavnik za vse bakterije v debelem črevesu, ker določa sestavo mikrobne združbe. Razpoložljivost hraničnih pada tekom prebavne cevi, število laktobacilov in bifidobakterij pa kljub temu narašča (Biblioni in sod., 1999).

### 2.6.1 Izločanje protimikrobnih snovi

Večina danes znanih probiotičnih bakterij, pripada mlečnokislinskim bakterijam. Mlečnokislinske bakterije proizvajajo različne protimikrobine snovi, ki onemogočajo rast patogenov in kvarljivcev živil (Daeschel 1989; Herreros in sod., 2005). Razdelimo jih na komponente z nizko molekulsko maso, to so organske kisline, vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), ogljikov dioksid ( $CO_2$ ), diacetil (2,3-butandion) in komponente z veliko molekulsko maso, to so bakteriocini (Ammor in sod., 2006).

Organski kislini (mlečna in ocetna), ki sta končna produkta katabolizma ogljikovih hidratov, znižujeta vrednost pH in tako zavirata rast potencialnih bakterijskih patogenov (Hudault in sod., 1997; Daeschel, 1989). Mlečna kislina deluje na celično membrano patogenih, po Gramu negativnih bakterij tako, da zveča propustnost zunanje membrane. Posledično lahko druge protimikrobine snovi lažje vstopijo v celico, zaradi tega se poveča občutljivost patogenov (Alakomi in sod., 2000). Količina in tip organskih kislin, proizvedenih med fermentacijo, sta odvisni od vrste MKB, rastnih faktorjev in sestave združbe MKB.

Bakteriocini so specifični inhibitorni proteini, ki delujejo baktericidno proti bakterijam iste vrste, sorodne vrste in na številne druge vrste, ki niso sorodne bakteriji proizvajalki (Todoriki in sod., 2001; Bogovič Matijašić in sod., 2007). Vplivajo na ionsko ravnotežje in prepustnost membrane za anorganske fosfate (Ennahar in sod., 2000). So ribosomalno sintetizirani proteini ali proteinski kompleksi, ki jih razvrščamo v tri glavne skupine : (I) lantibiotiki, (II) nelantibiotiki in (III) toplotno občutljivi nelantibiotiki. Danes največ opisanih bakteriocinov uvrščamo v II skupino, ki združuje majhne, toplotno stabilne in

membransko aktivne nelantibiotike. Bakteriocini II skupine so razdeljeni v 6 skupin (Van Belkum in Stiles, 2000).

Drugi metabolni produkti, ki pomembno prispevajo k protimikrobnemu delovanju, so vodikov peroksid, ki ga proizvajajo bakterije rodu *Lactobacillus* spp. in je nespecifičen protimikrobni obrambni mehanizem, kratkoverižne maščobne kisline, ki znižujejo vrednost pH in delujejo antagonistično proti drugim organizmom (Fooks in Gibson, 2002) ter površinsko aktivne snovi, ki blokirajo vezavo patogenih bakterij na epitelijske celice (Gan in sod., 2002).

### **2.6.2 Adhezivne sposobnosti probiotičnih bakterij in inhibicija adhezije patogenov**

Pomembna lastnost probiotičnih bakterij so njihove adhezivne sposobnosti in naselitev prebavil, saj lahko tako dalj časa spodbujajo imunski sistem gostitelja, učinkujejo s svojimi metabolnimi produkti in preprečujejo vezavo nekaterih patogenov (Saarela in sod., 2000). Tekmovanje s patogenimi organizmi za adhezijo in naselitev črevesne sluznice je zaščitni mehanizem probiotikov (Collado in sod., 2007a).

Adhezivnost omogoča vezavo probiotikov na črevesno sluznico, kompetitivno izključevanje patogenov oz. drugih bakterij, nadaljnjo kolonizacijo in stimulacijo imunskega odziva (Forestier in sod., 2001). Adhezija probiotičnih bakterij na črevesno sluznico je tudi eden izmed selekcijskih kriterijev za probiotike (Beachey, 1981; Saarela in sod., 2000).

Tkvne kulture so najbolj pogost *in vitro* model za študij adhezije probiotikov in drugih mikroorganizmov na črevesno površino. Med njimi so velikokrat uporabljene celične linije Caco-2 in HT-29. Celice se diferencirajo in so zelo podobne človeškim celicam tankega črevesa (Toumola in Salminen, 1998). Razlika je v tem, da so v črevesju enterociti pokriti s slojem sluzi, ki je pomemben dejavnik pri kolonizaciji in ni nujno, da se probiotiki vežejo na črevesno sluznico enako učinkovito, kot na modelne celične kulture.

Po mnenju nekaterih vezava probiotikov na črevesni epitelij ni nujen pogoj za zaščito pred patogenimi bakterijami (Bibiloni in sod., 1999). Dokazujejo, da imajo neadhezivne probiotične bakterije *in vitro/in vivo*, kljub temu pozitiven učinek na gostitelja, ker

zmanjšujejo adhezijo patogenih bakterij z izločanjem metabolitov *in situ* (Ouwehand in sod., 1999).

Določeni sevi mlečnokislinskih bakterij imajo pozitiven učinek na inhibicijo adhezije in invazije enteropatogenov na črevesne epitelijske celice *in vitro* (Lee in sod., 2000). Pozitivni učinek na zmanjšanje adhezije in/ali invazije patogenih mikroorganizmov kot so salmonela, listerija in ešerihija kažejo žive in s toploto inaktivirane *L. acidophilus* LB v *in vitro* pogojih (Coconnier in sod., 1993). Nekateri laktobacili ovirajo le invazijo patogenov v celice, ne vplivajo pa na njihovo preživetje in adhezijo. Dokazano *in vitro* uporaba živih laktobacilov *L. rhamnosus* ovira invazijo enterohemoragične *E. coli*, ne pa adhezije (Hirano in sod, 2003).

## 2.7 CELIČNE KULTURE

### 2.7.1 Celični cikel

Evkariotske celice, ki jih vzugajamo v celičnih kulturah, se delijo približno na 24 ur, vendar se dolžina cikla razlikuje glede na vrsto celic. Celični cikel oz. celično delitev sestavljajo štirje usklajeni procesi: celična rast, podvojitev DNA, sinteza proteinov, pomembnih za celično delitev in delitev celice (Cooper, 2000).

Celični cikel v splošnem delimo na obdobje interfaze, ko celica raste in se pripravlja na delitev in obdobje delitve, ki mu pravimo M faza. Celice večino časa preživijo v interfazi. V interfazi pride do dekondenzacije kromosomov, celične rasti in do podvojitve DNA, kar je pogoj za začetek mitoze. Podvojitev dednega materiala je ločnica, ki interfazo razdeli na tri obdobja : G1, S in G2 faza. V G1 fazi celice rastejo in so metabolno najbolj aktivne, v S fazi poteka sinteza DNA, potem pa se začne G2 faza, kjer se nadaljuje celična rast in začne sinteza proteinov. Četrto obdobje celičnega cikla je M faza, ki ji rečemo mitoza. V M fazi poteče delitev jedra in delitev citoplazme in iz ene dobimo dve ločeni celici (Veranič in sod., 2000).

### 2.7.2 Nekroza in apoptoza

Število celic *in vitro* je odvisno od razmerja med delitvami in odmiranjem celic. Poznamo dva načina odmiranja celic. Prvi je nekroza, ki jo povzročijo različni fiziološki dejavniki in

navadno nastopi ob ekstremnih spremembah okolja, v katerem celice gojimo (sprememba pH, sprememba temperature, prisotnost toksičnih spojin). Med nekrozo se pojavijo poškodbe celične membrane, kar privede do vdiranja vode in ionov v celico. Celični organeli nabreknejo in v končni fazи pride do lize celične vsebine v zunajcelični prostor (Veranič, 2000).

Apoptoza je način odmiranja celic, ki se imenuje tudi celični samomor ali programirana celična smrt in je genetsko natančno vodena. Apoptozi prepoznamo po značilnih morfoloških in biokemijskih spremembah, ki se razlikujejo od celice v nekrozi. To so: zgoščanje citoplazme, fragmentacija jedra, kondenzacija jedrnega kromatina, porušitev mitohondrijskega membranskega potenciala, denaturacija in fragmentacija DNK. V končni fazи pride do razpada celice na apoptotska telesa, ki jih v *in vivo* sistemu odstranijo fagociti s fagocitozo (Zakeri in Ahuja, 1997).

### 2.7.3 Uporaba celičnih kultur

Z uporabo celičnih kultur v raziskovanju se lahko izognemo nehumanim poskusom na živalih in ljudeh. Prednost sesalskih celičnih kultur v primerjavi z eksperimenti *in vivo* je izvajanje poskusa v kontroliranih pogojih (konstantnost in stabilnost celične linije, manjša možnost infekcije), nižji stroški in manj etično sporni poskusi (Freshney, 2000).

Poskusi lahko potekajo na različnih celičnih linijah, ki omogočajo lažje razumevanje celičnih procesov, proizvodnjo sekundarnih metabolitov, evkariontskih proteinov (Wurm, 1999), spremljanje ekspresije citokinov (Hickey in sod., 2000), adhezije, invazije in translokacije bakterij (Brás in Ketley, 1999; Monteville in sod., 2003) idr.

Raziskave o patogenih učinkih *C. jejuni* so narejene na različnih celičnih linijah. Za študij adhezije na gostiteljsko celico *in vitro* se največkrat uporablja celični liniji Caco-2 (Šikić, 2007) in INT407, pri izvajanjу *in vitro* invazije v celice pa INT407, HeLa, T-84, HT-29 in Caco-2 (Woolridge in Ketley, 1997; Konkel in sod., 2003; Šikić, 2007). Epitelijske celice intestinalnega izvora so se pokazale kot bolj sprejemljiv model za študij invazije kampilobaktrov v primerjavi z neintestinalnimi celicami (Mooney in sod., 2003).

Celična linija humanih kancerogenih črevesnih epitelijskih celic Caco-2 se najpogosteje uporablja kot modelni sistem za študije črevesnega epitelijskega transporta. Pri študiji interakcij črevesnih patogenov z epitelijskimi celicami je zaželjeno, da imajo celice strukturne in funkcionalne lastnosti diferenciranih enterocit. Celične kulture epitelijskih celic črevesja se pritrди na podlago in rastejo kot monosloj. Celična linija Caco-2 se v fazi konfluentne rasti spontano diferencira v absorpcijskim celicam (enterocitom) podobne celice. Znak diferenciacije je vzpostavitev polarnosti celic, ki jo opazimo po prisotnih mikrovilnih na apikalni strani celic in po dobro vidnih tesnih stikih med celicami. Funkcionalno prepoznamo diferenciacijo po aktivnosti različnih encimov na apikalni strani celic: alkalna fosfataza, invertaza-izomaltaza, ornitin dekarboksilaza, idr. (Hidalgo in sod., 1989; Freshney, 2000; Fajdiga, 2006).

#### 2.7.3.1 Celice PSI cl.1 in CLAB

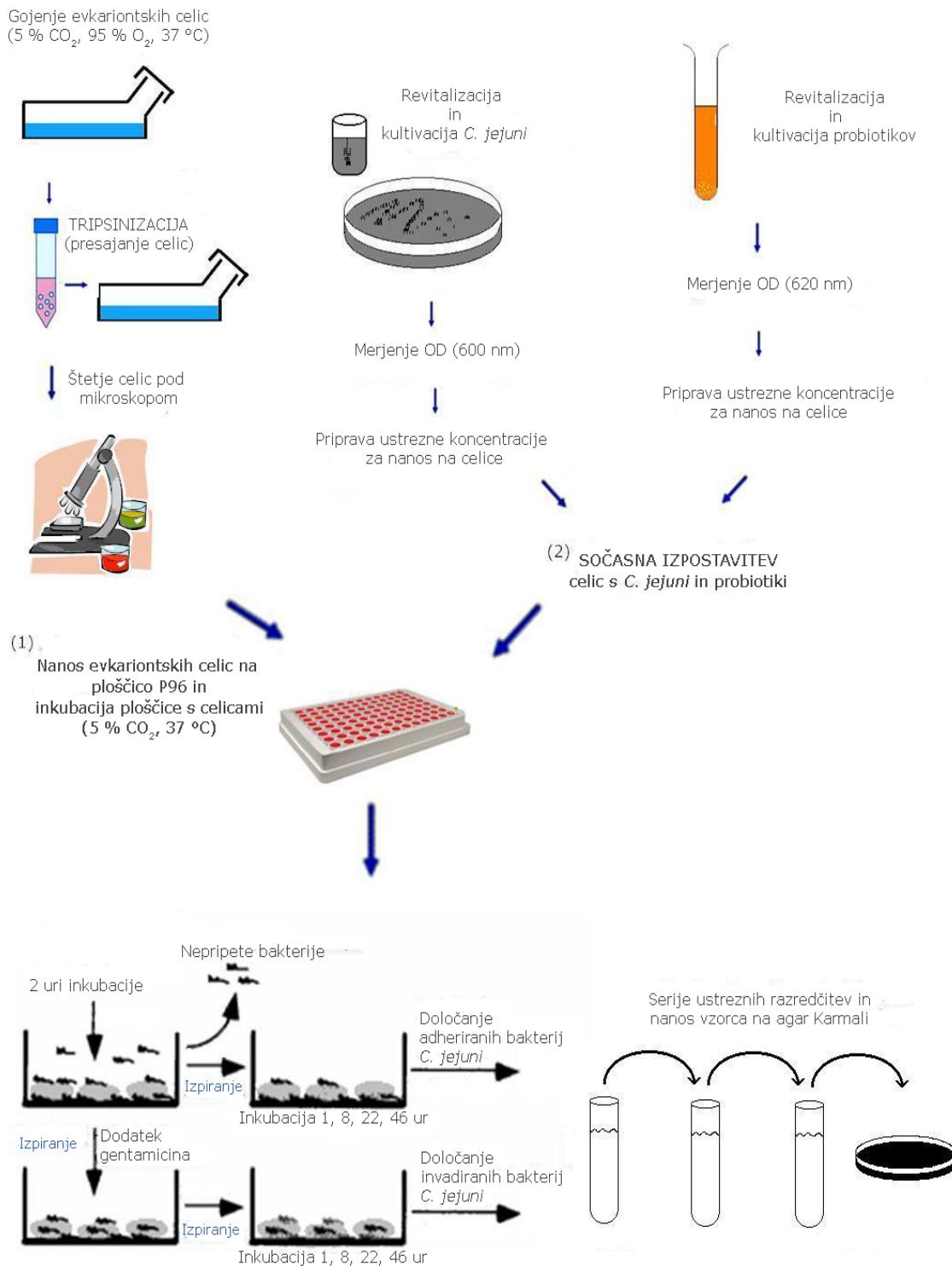
Oba uporabljeni celični modeli PSI cl.1 ter CLAB sta bila izolirana iz istega vzorca tankega črevesa prašiča, v Laboratoriju Katedre za mikrobiologijo, biokemijo, molekularno biologijo in biotehnologijo, Fakultete za kmetijstvo in biosistemske vede, Univerze v Mariboru (Gradišnik in sod., 2006). Oba modela sta adherentna, se pritrdirita na podlago in rasteta kot enosloj.

Pri celicah PSI cl.1 so ugotovili šibko prisotnost encima alkalne fosfataze v celicah, dokazali so izražanje citokeratinov 5-18 in navzočnost posameznih kemijskih substanc – ogljikovih hidratov (PAS reakcija). Z merjenjem transepitelne elektične upornosti (TER) so dokazali, da so celice PSI cl.1 visoko diferencirane, saj pri gojenju celic na poroznih filtrihi enosloj tvori tesne stike med celicami in postane električno aktiven. Celice CLAB pa izražajo strukturne lastnosti enterocita.

Dober celični model *in vitro* mora izpolnjevati osnovne zahteve: ohraniti mora značilnosti izhodiščnega tkiva, da so dobjeni rezultati lahko primerljivi z *in vivo* razmerami, biti mora razpoložljiv in enostaven za uporabo ob visokih zmogljivostih testiranja. Prednost prašičjih črevesnih epitelijskih celic PSI cl.1 pred najpogosteje uporabljenimi celičnimi linijami (Caco-2, HT-29, HeLa) za študije interakcij gostitelj-patogen je v tem, da niso kancerogene in tudi zato bolj podobne zdravim črevesnim celicam *in vivo*.

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 POTEK POSKUSOV



Slika 5: Ugotavljanje učinka probiotičnih bakterij na adhezijo, invazijo ter znotrajcelično preživljivost in rast bakterije *C. jejuni* K49/4 na/v celičnem modelu.

## 3.2 MATERIALI

### 3.2.1 Bakterijski sevi in kultivacija

#### 3.2.1.1 *Campylobacter jejuni* (K49/4)

Pri poskusih smo uporabili bakterijski sev *Campylobacter jejuni* K49/4, izoliran iz piščančjega mesa, identificiran in shranjen pri -80 °C v bujonu BHI z dodatkom glicerola in defibrilirane konjske krvi (Klančnik, 2006).

#### 3.2.1.2 Probiotiki rodu *Lactobacillus*

Probiotične bakterije, ki smo jih uporabili v poskusih, izhajajo iz mikrobiološke zbirke laboratorijskih Katedre za mikrobiologijo, biokemijo, molekularno biologijo in biotehnologijo Fakultete za kmetijstvo in biosistemske vede, Univerze v Mariboru. Njihov izvor so različni mlečni izdelki, kot je razvidno iz preglednice 1. Celice so bile trajno shranjene z zamrzovanjem z dodatkom glicerola (Kemika, 35 % (v/v)) pri -70 °C. Pred poskusom smo zamrznjene bakterije revitalizirali s kultivacijo v 5 ml bujona MRS (Fluka BioChemika) v anaerobni atmosferi ob uporabi AnaeroGen<sup>TM</sup> vrečk (Oxoid).

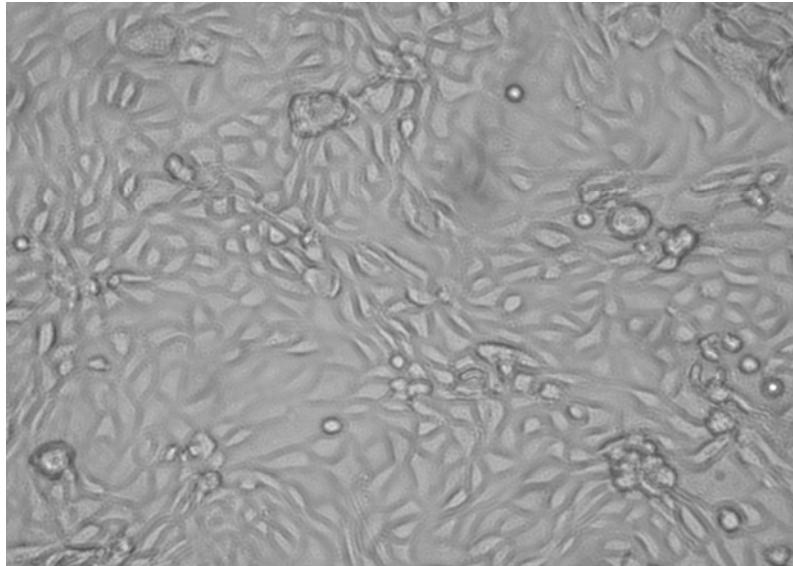
Preglednica 1 : Probiotične bakterije, uporabljene pri eksperimentalnem delu naloge

SEV PROBIOTIČNIH BAKTERIJ	OZNAKA	IZVOR
<i>L. gasseri</i>	PCA 185	Feta sir
<i>L. pentosus</i>	PCA 227	Neznan
<i>L. plantarum</i>	PCA 236	»Kasseri« sir
<i>L. plantarum</i>	PCA 259	»Xynotri« sir
<i>L. plantarum</i>	PCA 275	Sir
<i>L. plantarum</i>	PCS 20	Sir
<i>L. plantarum</i>	PCS 22	Sir
<i>L. plantarum</i>	PCS 25	Sir

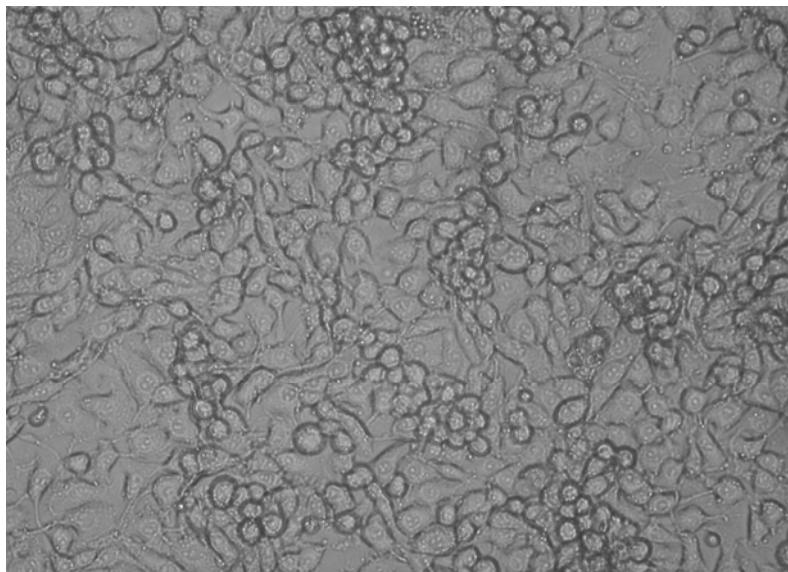
### 3.2.2 Celični model

Poskus smo izvedli na sesalskem celičnem modelu prašičjih črevesnih epitelijskih celic PSI cl.1. in CLAB. Celice smo gojili v definiranem mediju za gojenje celičnih kultur DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco), kateremu smo dodali 100 µg/ml streptomicina (Sigma, ZDA), 100 UI/ml penicilina (Fluka BioChemika) ter 2 mM L-glutamina (Sigma) in mu pred uporabo dodali še 10 % (v/v) sterilnega seruma FBS (serum govejega zarodka, Biowhittaker). Celice smo gojili v gojitvenih posodicah (Corning and Costar) pri 37 °C, aerobni atmosferi s 5 % CO<sub>2</sub>.

Celice se pritrdijo na dno gojitvene posodice, zato smo jih med gojenjem in nadaljnjo uporabo za poskus presadili s postopkom tripsinizacije ob uporabi 0,25 % tripsina (Sigma) in dodatkom 0,5 mM EDTA.



Slika 6: Fotografija celične kulture PSI cl.1, posneta z invertnim mikroskopom (100X povečava).



Slika 7: Fotografija celične kulture CLAB, posneta z invertnim mikroskopom (100X povečava).

Število celic smo določali s hemacitometrom (Malassez) ob predhodnem barvanju celic z 0,1 % tripanskim modrilom (Merck).

### **3.2.3 Mikrobiološka gojišča**

#### **3.2.3.1 Tekoče gojišče BHI**

Osnovni medij: BHI CM225 (Oxoid) obogatitveno gojišče smo uporabili za shranjevanje in kultivacijo infektivne bakterije *C. jejuni* K 49/4.

Priprava: V 1000 ml destilirane vode smo raztopili 39 g medija BHI in sterilizirali v avtoklavu (121 °C, 15 min in 1,1 bar) in hranili do uporabe pri 4 °C.

#### **3.2.3.2 Trdno gojišče Karmali**

Gojišče CM739 (Oxoid) smo uporabljali za revitalizacijo, precepljanje in za določanje kultivabilnosti bakterije *C. jejuni* K49/4.

Priprava: 21,5 g osnovnega medija smo raztopili v 500 ml dH<sub>2</sub>O in avtoklavirali (121 °C in 1,1 bar, 15 min). Po sterilizaciji smo medij v vodni kopeli ohladili na 50 °C in aseptično dodali 1 stekleničko selektivnega dodatka SR0167 (Oxoid). Dobro premešanega smo razlili v sterilne petrijevke in hranili do uporabe pri 4 °C.

#### **3.2.3.3 Trdno gojišče MRS**

Agar MRS 69964 (Fluka BioChemika) smo uporabljali za določanje kultivabilnosti probiotičnih bakterij.

Priprava: 61,0 g agarja MRS smo raztopili v 1000 ml dH<sub>2</sub>O ter sterilizirali (15 min, 121 °C in 1,1 bar). Po sterilizaciji smo medij ohladili, ga aseptično razlili v petrijeve plošče in shranili do uporabe pri 4 °C.

#### **3.2.3.4 Tekoče gojišče MRS**

Bujon MRS 69966 (Fluka BioChemika) smo uporabljali za revitalizacijo in kultivacijo probiotičnih bakterij.

Priprava: 51 g medija MRS smo raztopili v 1000 ml dH<sub>2</sub>O in sterilizirali v avtoklavu (121 °C, 15 min, pri 1,1 bar).

### 3.2.3.5 Gojišče za rast in gojenje celic DMEM

Gojišče DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco) je predpripravljen definiran medij za gojenje celičnih kultur. Gojišče za celice že vsebuje vitamine, aminokisline, anorganske soli in pH indikator, je brez antibiotikov, seruma ter L-glutamina, zato smo ga pred uporabo dopolnili.

Preglednica 2 : DMEM (gojitveni medij) Gibco®

Sestava	g/l
D- glukoza	4,50
Natrijev piruvat	0,11
Neesencialne aminokisline	+
L-glutamin	-

Priprava: Za pripravo ustreznega gojitvenega medija (DMEM Adv) smo gojišču DMEM dodali 100 UI/ml penicilina, 100 µg/ml streptomicina ter 2mM L-glutamina.

### 3.2.4 Uporabljene kemikalije in laboratorijska oprema

#### 3.2.4.1 Kemikalije

- FBS (Biowhittaker)
- Gentamicin (80 mg / 2 ml, raztopina za injiciranje, Lek)
- Glicerol (Kemika)
- 70 % Etanol (izhodiščni etanol 99,8 % (v/v), (Fluka))
- 0,1 % Kristal vijolično barvilo v 20 % (v/v) etanolu (Fluka)
- L – glutamin (Sigma)
- 10 % Oacetna kislina
- 0,1 % Tripansko modro barvilo (Merck)
- Penicilin (Sigma)
- Streptomicin (Fluka BioChemika)
- Tripsin 0,25 % raztopina z dodatkom EDTA (0,5mM) (Sigma)

- Fiziološka raztopina : 0,85 g NaCl smo raztopili v 50 ml dH<sub>2</sub>O, izmerili pH, nevtralizirali z 3 M NaOH do pH 7,2 in dopolnili z dH<sub>2</sub>O do oznake. Raztopino smo sterilizirali (121 °C, 15 min, 1,1 bar) in shranili do uporabe pri 4 °C.

### 3.2.4.2 Laboratorijska oprema

- anaerobni lonec (AnaeroJar Base, Ag0026A, Oxoid)
- anaerobne vrečke (AnaeroGen<sup>TM</sup>, Oxoid)
- avtoklav (Kambič)
- avtomatske pipete (Finnpipete, Thermo scietific)
- centrifuga Centric 3000 R (Tehtnica)
- čitalec mikrotitrskie ploščice (Labsystems Multiscan MS)
- CO<sub>2</sub> inkubator (Binder GmbH)
- cepilna zanka
- digitalni fotoaparat (Coolpix 995, Nikon)
- gojivne posodice za gojenje celic s površinami 25 cm<sup>2</sup> in 150 cm<sup>2</sup> (Corning and Costar)
- hemacitometer (Malassez / 0,200 mm, Assistant)
- hladilnik (Gorenje)
- inkubator (Binder)
- invertni mikroskop (Nikon)
- kuhalnik
- laboratorijska tehntica (Sartorius)
- mikrobiološka komora – laminarij M12 (Iskra PIO)
- mikrotitrskie ploščice – polistirenske, 96-luknjičaste - P96 (TPP)
- mikroaerofilne vrečke (CampyGen,Oxoid)
- merilni valji kapacitet 100 ml, 500 ml in 1000 ml
- multikanalna pipeta (Thermo)

- nastavki za pipete (ml), mikrocentrifugirke (Thermo)
- parafilm
- pečica za suho sterilizacijo in sušenje (Binder GmbH)
- petrijevke (NUNC Tm)
- plastične centrifugirke kapacitet 15 ml in 50ml (TPP)
- plinski gorilnik
- steklene čaše kapacitet 800 ml, 1000 ml
- sistem za ultrafiltracijo medijev (250 ml filter System, Corning)
- vibro-mix mešalo (Tehnica)
- zamrzovalna omara (Candy)
- zamrzovalna omara za ultra nizke temperature (Ult freezer, Thermo)
- vodna kopel WB-30 (Kambič)

### 3.3 METODE DELA

#### 3.3.1 Delo z bakterijo *C. jejuni* K49/4

##### 3.3.1.1 Revitalizacija in kultivacija bakterije *C. jejuni* K49/4

Bakterijski sev, shranjen pri -80 °C v tekočem gojišču BHI z dodatkom 10 % (v/v) glicerola in defibrilirane konjske krvi (Oxoid), smo s cepilno zanko nanesli na površino selektivnega trdnega gojišča Karmali z dodatkom za selektivnost *Campylobacter* Selective Supplement (SR0167E, Oxoid). Plošče smo mikroaerofilno inkubirali 24-48 ur, pri 42 °C v anaerobnih loncih (Oxoid). Za pripravo ustrezne atmosfere (5 % O<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub>, 85 % N<sub>2</sub>) smo uporabili vrečke CampyGen (Oxoid).

##### 3.3.1.2 Začasno shranjevanje bakterije *C. jejuni* K49/4

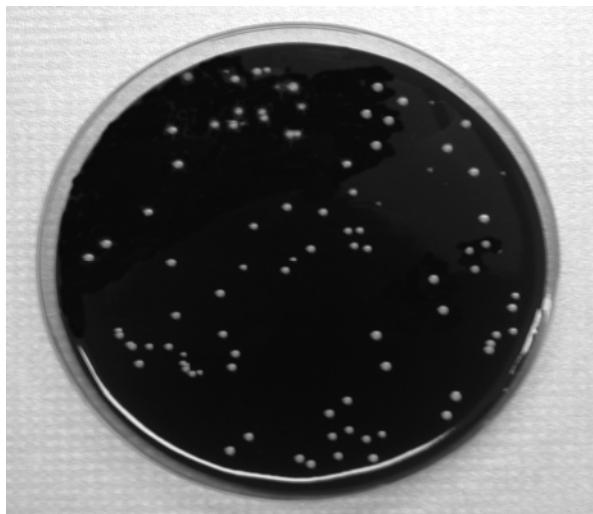
Med poskusom smo v eksponentni fazi rasti iz tekočega obogatitvenega gojišča BHI odpipetirali 9 ml bakterijske suspenzije skupaj z 1 ml glicerola, v 15 ml plastenke. Vsebino plastenk smo dobro premešali, odpipetirali po 1 ml bakterijske suspenzije v sterilne mikrocentrifugirke ter prenesli v zamrzovalno omaro na - 20 °C.

##### 3.3.1.3 Določanje koncentracije bakterije *C. jejuni* K49/4 s štetjem kolonijskih enot na trdnem gojišču

Število živih, za reprodukcijo sposobnih mikrobnih celic lahko določimo s štetjem kolonij na agarskih ploščah. Kultivabilnost bakterije *C. jejuni* K49/4 smo določali na začetku poskusa, vzporedno z merjenjem optične gostote, da smo določili dejansko začetno koncentracijo kampilobaktrov v inokulumu in med poskusom po 3 h, 10 h, 24 h in 48 h od izpostavitve celične kulture bakterijam. Iz mikrotitrskih ploščic smo po lizi celične kulture odpipetirali po 0,1 ml vzorca, pripravili serijske razredčitve po Koch-u v fiziološki raztopini in ga nacepili na agar Karmali. Po 24-48 urni inkubaciji pri 42 °C v mikroaerofilni atmosferi smo prešteli kolonije na števnih ploščah in izračunali povprečno koncentracijo bakterije, spremenljivka N, v izhodnem vzorcu, z enačbo (1):

$$N [CFU / ml] = \text{število kolonij} \cdot R \quad \dots(1)$$

R ...faktor razredčitve



Slika 8: Števna plošča Karmali z nacepljeno kulturo *C. jejuni* K49/4

### 3.3.1.4 Priprava bakterije *C. jejuni* K49/4 za nanos na celično kulturo prašičjih črevesnih epitelijskih celic

Bakterijsko kulturo smo pripravili kot je opisano v poglavju 3.3.1.1. S cepilno zanko smo kolonije prenesli v plostenke s 40 ml tekočega gojišča BHI in mikroaerofilno inkubirali 9 h pri 42 °C, do eksponentne faze rasti (Klančnik in sod., 2006). Za poskus smo orientacijsko določili zaželeno število bakterijske kulture, z merjenjem optične gostote (OD = 600 nm). Namnoženo kulturo smo centrifugirali pri 2400 obr./min, 10 min. Supernatant smo odlili in bakterije resuspendirali v alikvotnem volumnu gojišča DMEM brez seruma in brez antibiotikov. Tako pripravljeno bakterijsko suspenzijo smo uporabili za nanos na mikrotitrsko ploščico, s predhodno nanešeno celično kulturo.

Vzporedno z merjenjem optične gostote smo pripravili serijske razredčitve po Koch-u v fiziološki raztopini, nacepili po 0,1 ml na trdno gojišče in inkubirali 24–48 ur, pri 42 °C v mikroaerofilni atmosferi. Po inkubaciji smo presteli kolonije na števnih agarskih ploščah Karmali in tako določili dejansko začetno koncentracijo kampilobaktrov v mililitru inokuluma.

### 3.3.2 Delo z bakterijami rodu *Lactobacillus*

#### 3.3.2.1 Revitalizacija in kultivacija probiotičnih bakterij

Probiotične bakterije, zamrznjene pri -70 °C, smo s cepilno zanko nacepili v 5 ml tekočega gojišča MRS (Fluka BioChemika) in v anaerobnih loncih inkubirali 24 h pri 37 °C.

Po 12-24 urni kultivaciji smo kulturo bakterij dobro premešali, določili koncentracijo (poglavlje 3.3.2.3) in pripravili ustrezne suspenzije za nanos na celično kulturo.

#### 3.3.2.2 Trajno shranjevanje probiotičnih bakterij

Čeznočne kulture bakterij *Lactobacillus* smo po kultivaciji resuspendirali v tekočem gojišču MRS, odpipetirali 850 µl suspenzije skupaj z 450 µl sterilnega glicerola v sterilne mikrocentrifugirke, dobro premešali in shranili v zamrzovalni omari pri -80 °C.

#### 3.3.2.3 Določanje števila probiotičnih bakterij z merjenjem optične gostote in s štetjem kolonijskih enot na trdnem gojišču

Namnoženo kulturo probiotičnih bakterij v hranljivem bujonu MRS smo dobro premešali, in določili koncentracijo z merjenjem optične gostote (OD = 620 nm). Meritve smo izvedli v več paralelkah, za kontrolo smo uporabili svež bujon MRS. Z enačbo (2) smo izračunali število bakterij, ki smo ga potrebovali za poskus in je veljala za standardno umeritveno krivuljo (interna umeritvena krivulja laboratorija). Z enačbo (3) smo nato izračunali volumen probiotičnih bakterij, podan s spremenljivko M, ki smo jih pripravili za poskus. Volumen (M) smo določili glede na število vzorcev in glede na zaželeno začetno koncentracijo probiotičnih bakterij v poskusu:

$$N \text{ [bakt. / ml]} = [OD_{susp} - OD_{kontr.}] \cdot 3 \cdot 10^8 \quad \dots(2),$$

kjer spremenljivka N podaja število bakterij v 1 ml suspenzije;

$$M \text{ [ml]} = c_1 \text{ [bakt. / ml]} / N \text{ [bakt. / ml]} \quad \dots(3),$$

kjer spremenljivka  $c_1$  podaja zaželeno koncentracijo probiotičnih bakterij v poskusu in spremenljivka M, t.j. volumen suspenzije probiotičnih bakterij.

Dejansko število probiotičnih bakterij, uporabljenih v poskusu, smo ugotovili z indirektno metodo s štetjem kolonijskih enot na trdnem gojišču. Suspenzijo probiotikov,

(spremenljivka M) smo ustreznno razredčili v 0,9 % NaCl, nacepili na agar MRS (Fluka BioChemika) in v anaerobnih loncih inkubirali 24 - 48 h pri 37 °C. Kasneje smo prešteli kolonije (CFU) in rezultate podali kot koncentracijo bakterij na mililiter. Log<sub>10</sub> (CFU/ml) je znašal med 7,89-9,53 (Prilogi J1, J2).

### 3.3.2.4 Priprava probiotičnih bakterij za nanos na celično kulturo prašičjih črevesnih epitelijskih celic

Po izračunu števila bakterij smo odpipetirali ustrezen volumen bakterijske suspenzije v 15 ml centifugirko in dopolnili z gojiščem DMEM brez seruma in brez antibiotikov. Suspenzijo smo centrifugirali pri 2400 obr./min, 10 min, supernatant odlili in celice resuspendirali v alikvotnem volumnu DMEM brez seruma in brez antibiotikov ter jih tako pripravili za nanos na 96-luknjičasto ploščico s predhodno nanešeno celično kulturo.

## 3.3.3 Delo s celičnima kulturama prašičjih črevesnih epitelijskih celic PSI cl.1 in CLAB

### 3.3.3.1 Revitalizacija in kultivacija celične kulture

Gojenje evkariontskih celic je zahteven proces, pri katerem je zelo pomembno sterilno okolje in delo. Celično kulturo smo gojili v gojitvenih posodicah (Costar and Corning) za gojenje evkariontskih celic v gojišču DMEM Adv z dodatkom 10 % FBS, v inkubatorju pri 37 °C, v aerobni atmosferi s 5 % CO<sub>2</sub>.

S klasičnimi tehnikami spremeljanja karakteristik celic PSI cl.1 in CLAB z invertnim mikroskopom smo vsakodnevno dobili podatke o celični razraščenosti (konfluenci) in živosti (viabilnosti). Gojišče smo menjali ob spremembi barve gojitvenega medija iz rdečega v rjavo-rumeno (padec vrednosti pH zaradi kopičenja presnovnih produktov), v roza barvo (dvig vrednosti pH, bazično okolje), ali če smo pod invertnim mikroskopom opazili veliko plavajočih odmrlih celic v mediju.

### 3.3.3.2 Tripsinizacija celične kulture

Celice smo gojili, dokler nismo opazili 100 % konfluence (popolne prerasti dna gojitvene posodice). Presajanje celic poteka s postopkom tripsinizacije. Tripsin je encim, ki celice odlepi z dna gojitvene posodice.

Ko so se celice namnožile in prerastle površino posodice, smo odlili izrabljeno gojišče in celice sprali z 1 ml 0,25 % tripsina z dodanim 0,5 mM EDTA-jem. V gojitvene posodice smo odpipetirali 1ml tripsina in inkubirali 5-10 min pri 37 °C, da so se celice v celoti odlepile od površine. Delovanje tripsina smo ustavili z 9 ml gojišča DMEM Adv. Suspenzijo celic smo v celoti odpipetirali v 15 ml centrifugirke in centrifugirali pri 800 obr./min, 5 min, pri sobni temperaturi. Supernatant smo odlili, dodali ekvivalenten volumen gojišča DMEM Adv brez seruma, celice resuspendirali in vrnili v gojitvene posodice 2 ml suspenzije celic, dopolnili z gojiščem DMEM Adv in 5 % FBS. Vse kemikalije smo predhodno termostatirali na 37 °C.

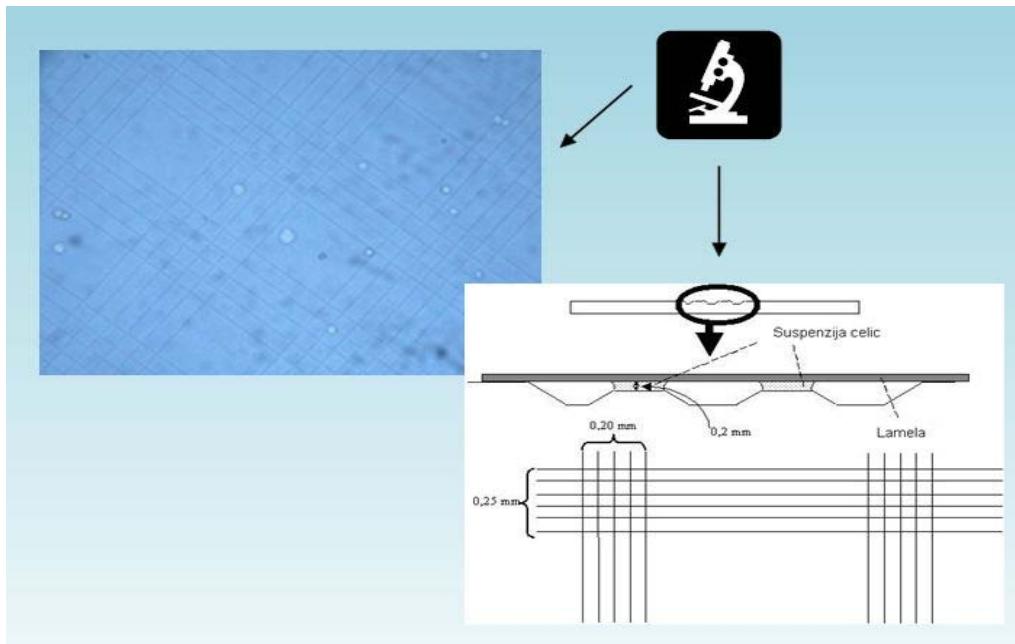
#### 3.3.3.3 Trajno shranjevanje celične kulture

Celice smo v gojitveni posodici vzgojili do 100 % konfluence, tripsinizirali in suspenzijo centrifugirali (5 min, 800 obr./min, pri sobni temperaturi). Supernatant smo odstranili in v sediment celic dodali 950 µl FBS in 50 µl dimetilsulfoksidu (DMSO). Mešanico smo prenesli v epruvetke za zamrzovanje, po enouri inkubaciji na + 4 °C smo epruvetke prenesli v zamrzovalnik (- 70 °C) ter po enotedenski inkubaciji v tekoči dušik (-196 °C).

#### 3.3.3.4 Določanje števila celične kulture s hemacitometrom

Koncentracija celične kulture pri poskusu je bila  $6 \cdot 10^6$  celic na 96-luknjičasto ploščico. Za pripravo suspenzije ustreznega volumna in koncentracije celične kulture smo celice prešteli po vsaki tripsinizaciji.

Iz suspenzije smo sterilno odpipetirali 100 µl vzorca in ga resuspendirali v mikrocentrifugirki z 900 µl 0,1 % tripanskega modrila. V žleb hemacitometra (Malassez) smo odpipetirali 100 µl obarvane celične suspenzije ter prešteli celice v definiranem območju znane globine pod mikroskopom.



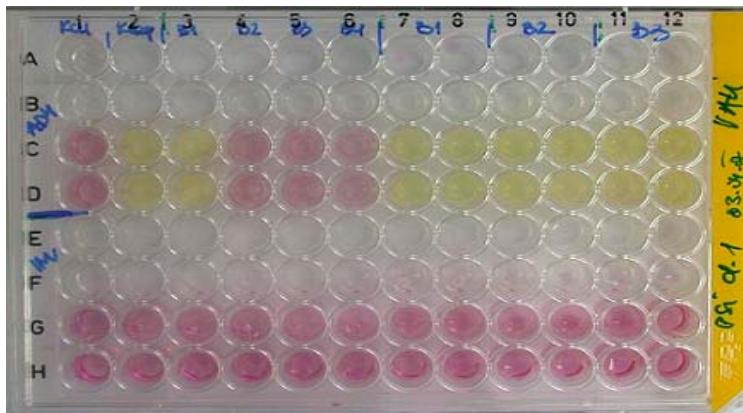
Slika 9: Hemacitometer

Število celic/ml suspenzije smo izračunali s pomočjo enačbe (4):

$$\text{št. celic}/\text{ml} = \frac{\text{število preštetih celic} \cdot 10^1 \cdot 10^5}{25} \quad \dots(4)$$

### 3.3.3.5 Priprava celične kulture prašičjih črevesnih epitelijskih celic pred nanosom bakterij

Po določitvi koncentracije celic smo odpipetirali ustrezen volumen celične suspenzije v plastenko in dodali gojišče DMEM Adv s 5 % FBS do končnega volumena 11 ml. V vsako luknjico mikrotitrsko ploščice smo odpipetirali 100 µl pripravljene koncentracije celic in ploščico inkubirali 24 ur v inkubatorju s 5 % CO<sub>2</sub> – 95 % O<sub>2</sub> pri 37 °C. Pred nanosom bakterij smo pod mikroskopom preverili, če so se celice pritrstile na dno luknjic in ustvarile enosloj.



Slika 10: Fotografija mikrotitrsko ploščice po 24 urah od infekcije

### 3.3.4 Spremljanje učinka probiotičnih bakterij na bakterijo *C. jejuni* K49/4 v celičnem modelu prašičjih črevesnih epitelijskih celic PSI cl.1 ter CLAB

Vse poskuse smo izvajali v 96-luknjičastih ploščicah, uporabljeni volumni bakterijskih suspenzij so bili 100 µl. Celično kulturo smo pripravili kot je opisano v poglavju 3.3.3.5. Bakterije smo pripravili po postopku, kot je opisan v poglavju 3.3.1.4 za kampilobakte ter v poglavju 3.3.2.4 za probiotične bakterije.

#### 3.3.4.1 Vpliv probiotičnih bakterij na adhezijo, invazijo, znotrajcelično preživljivost in rast bakterije *C. jejuni* K49/4 na/v celičnem modelu

Adhezijo, rast na celicah, invazijo in znotrajcelično preživljivost, smo določali na mikrotitrskih ploščicah ob predhodnem nanosu celične kulture  $6 \cdot 10^6$  celic na 96-luknjičasto ploščico. Pred nanosom bakterij smo enoslojem celic odstranili medij in dodali po 100 µl pripravljenih suspenzij posameznih bakterij v gojišču DMEM. Za ugotavljanje učinka probiotičnih bakterij, smo na celično kulturo sočasno nanesli suspenzijo infektivne bakterije *C. jejuni* K49/4 v eksponentni fazi rasti (poglavlje 3.3.1.4) in suspenzije posameznih probiotičnih bakterij rodu *Lactobacillus* (poglavlji 3.3.2.3 in 3.3.2.4). Da smo bakterijam omogočili popolno adhezijo in invazijo, smo ploščico inkubirali 2 uri pri 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, nato smo inficirano celično kulturo 3-krat sprali z gojiščem DMEM in s tem odstranili nepripete bakterije.

Mikrotitrsko ploščice, na katerih smo določali adhezijo bakterije *C. jejuni*, smo dalje inkubirali v osnovnem gojišču DMEM. Po eni uri smo celično kulturo lizirali, pripravili ustrezne suspenzije bakterije *C. jejuni* in določili kultivabilnost, kot je opisano v poglavju

3.3.1.3. Adhezijo (%) oz. število pripetih bakterij, smo izračunali kot razmerje med koncentracijo bakterije *C. jejuni* ( $\log_{10}$  CFU/ml), glede na dejansko koncentracijo kampilobaktrov v inokulumu, zmanjšano za koncentracijo invadiranih bakterij.

Za ugotavljanje rasti bakterije *C. jejuni* na celicah, smo mikrotitrsko ploščico po spiranju nepripetih bakterij, dalje inkubirali v gojišču DMEM v časovnih presledkih do 48 ur. Nato smo celice lizirali in določili število kampilobaktrov. Rast na celicah (%), smo izračunali kot razmerje med koncentracijo bakterije *C. jejuni* ( $\log_{10}$  CFU/ml) v želenem času (10 h, 24 h, 48 h), glede na dejansko koncentracijo kampilobaktrov v inokulumu, zmanjšano za koncentracijo znotrajceličnih bakterij v želenem času.

Pri določanju invazije bakterije *C. jejuni* K49/4, smo mikrotitrsko ploščico po spiranju dalje inkubirali v gojišču DMEM z dodatkom gentamicina (koncentracija gentamicina 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Z gentamicinom smo ubili zunajcelične bakterije. Gentamicin je antibiotik s širokim spektrom delovanja in je baktericiden za večino po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterijskih vrst že v nizkih koncentracijah, pri katerih ne prodre v evkariontske celice (Friis in sod., 2005). Po uri inkubacije smo enosloje celic lizirali, pripravili ustrezne suspenzije in določili kultivabilnost *C. jejuni*, kot je opisano v poglavju 3.3.1.3. Rezultate smo podali kot invazijo (%), ki smo jo izračunali kot razmerje med koncentracijo kultivabilnih bakterij ( $\log_{10}$  CFU/ml), glede na dejansko koncentracijo kampilobaktrov v inokulumu.

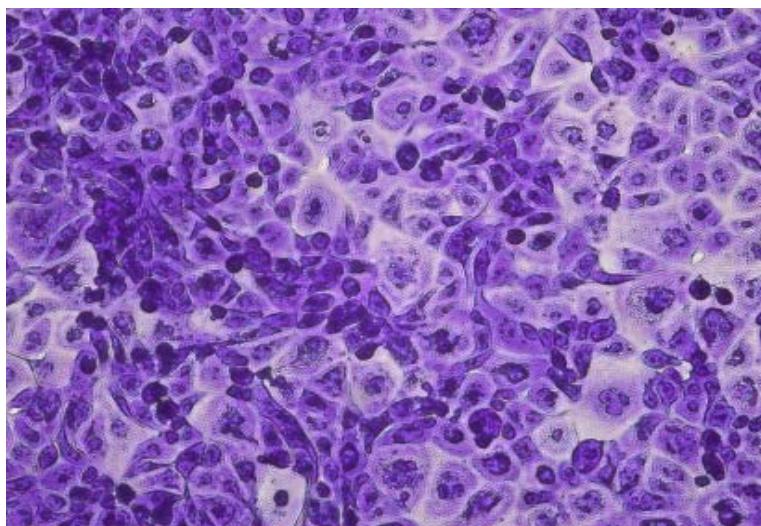
Hkrati smo pri določanju invazije določali tudi znotrajcelično razmnoževanje kampilobaktrov, ki predstavlja del rezultatov in je podana kot znotrajcelična preživljivost bakterije *C. jejuni* ( $\log_{10}$  CFU/ml). Mikrotitrsko ploščico smo po spiranju nepripetih bakterij inkubirali v gojišču DMEM z gentamicinom, v časovnih presledkih do 48 ur. Nato smo celice lizirali in določili število kampilobaktrov. Rezultate smo podali kot vrednost  $\log_{10}$  CFU/ml, v odvisnosti od časa inkubacije.

Kontrolo je predstavljala bakterija *C. jejuni*, kateri nismo dodali probiotičnih bakterij.

### 3.3.4.2 Določanje živosti celičnih kultur

Da bi ugotovili, če bakterija *C. jejuni* K49/4 vpliva na celične modele različno, smo celice PSI cl.1 ter CLAB izpostavili kampilobaktrom in ugotavliali njihovo živost, pri različnih razmerjih števila bakterije glede na število črevesnih epitelijskih celic (MOI). Vrednost MOI izraža razmerje med povzročitelji infekcije (bakterije, virusi, idr..) in tarčnimi celicami, oziroma podaja število bakterij v inokulumu glede na število celic v enosloju (Friis in sod., 2005). Po 24 h oz. 48 h urah infekcije celic z bakterijo *C. jejuni* K49/4 smo odstranili kultivacijski medij iz luknjic, v vsako luknjico mikrotitrsko ploščice nanesli zadostno količino 0,1 % kristal vijoličnega barvila v 20 % etanolu in pustili delovati 5 min, pri 20 °C. Po petih minutah smo zunajcelično barvilo temeljito sprali pod tekočo vodo in ploščico pustili na sobni temperaturi 24 ur, da se je posušila. Ostanek barvila, pritrjenega na celice, smo raztopili v 10 % ocetni kislini in pustili delovati 1h, nato smo izmerili absorbanco (A) pri valovni dolžini  $\lambda = 595$  nm. Rezultate za živost evkariontskih celic smo podali kot % glede na število neinficiranih celic (kontrola) in izračunali s pomočjo enačbe (5):

$$\text{živost cel. kulture } (\%) = \frac{A [\text{vzorec}]}{A [\text{kontrola}]} \cdot 100 \quad \dots(5)$$



Slika 11: Fotografija celične kulture CLAB po barvanju s kristal vijoličnim barvilom pod mikroskopom (100X povečava)

### 3.3.5 Statistična obdelava rezultatov

#### 3.3.5.1 Povprečna vrednost

Pri štetju celic in določanju kultivabilnosti smo meritve izvedli v dveh ponovitvah. Pri določanju celične viabilnosti smo meritve opravili v 5 vzorcih. Rezultate meritve smo podali kot povprečno vrednost, ki smo jo izračunali s pomočjo enačbe (6) (Košmelj, 2001):

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} \quad \dots(6)$$

#### 3.3.5.2 Standardni odklon

Za oceno variabilnosti rezultatov smo uporabili standardni odklon (SD) po enačbi (7) (Košmelj, 2001):

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}} \quad \dots(7)$$

n ... število vzorcev

X<sub>i</sub> ... vrednost i-te meritve

## 4 REZULTATI

Delovni hipotezi, da se bakterije *Campylobacter jejuni* vežejo na prašičje črevesne epitelijske celice ter vanje uspešno prehajajo in da bakterije rodu *Lactobacillus* zmanjšajo virulentnost bakterij, smo potrjevali s celičnim modelom prašičjih črevesnih epitelijskih celic.

Adhezijo, rast na celicah, invazijo in znotrajcelično preživljivost bakterije *C. jejuni* K49/4 smo ugotavljali preko kultivabilnosti, živost celične kulture pa smo ugotavljali z barvanjem celic s kristal vijoličnim barvilm. Rezultate smo statistično ovrednotili ter jih predstavili v preglednicah in slikah. Eksperimentalni del naloge je bil opravljen med decembrom 2006 in januarjem 2008.

### 4.1 VPLIV PROBIOTIČNIH BAKTERIJ NA ADHEZIJO IN RAST BAKTERIJE *C. jejuni* K49/4 NA CELIČNEM MODELU PRAŠIČJIH ČREVESNIH EPITELIJSKIH CELIC

Preverili smo, če se bakterija *C. jejuni* K49/4 veže na prašičje črevesne epitelijske celice PSI cl.1 ter CLAB. Adhezijo in rast na epitelijskih celicah, izolata iz piščančjega mesa *C. jejuni* K49/4 in učinek probiotikov na zmanjšanje adhezije in rasti, smo ugotavljali s sočasno inkubacijo živih probiotičnih bakterij rodu *Lactobacillus*. Izbrano celično kulturo smo za 2 uri izpostavili različnim probiotičnim bakterijam in sevu *C. jejuni* K49/4. Po spiranju nevezanih bakterij smo celično kulturo z bakterijami dalje inkubirali v različnih časovnih intervalih (1 h, 8 h, 22 h in 46 h). Nato smo celično kulturo lizirali in presteli število kolonijskih enot bakterije *C. jejuni*, ki so se vezale na celice.

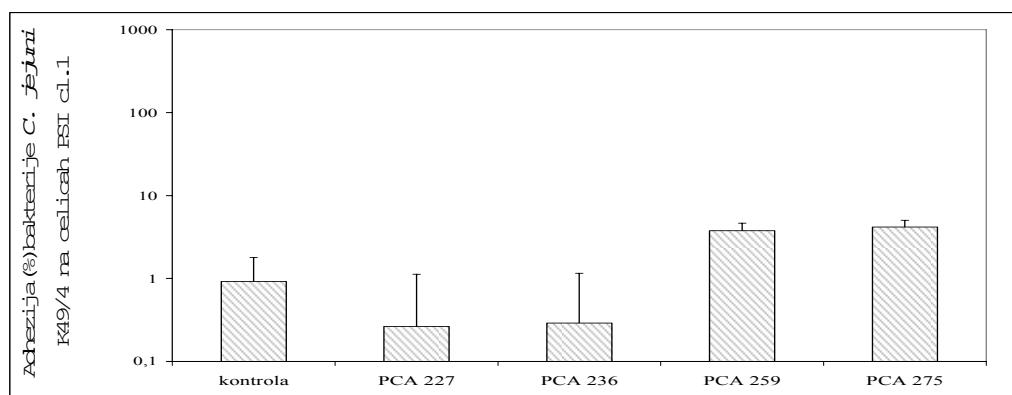
Vsi testirani sevi probiotičnih bakterij (neprikazani rezultati) in sev *C. jejuni* K49/4 so se vezali na izbrana celična modela. Kultivabilnost kampilobaktrov smo določali s štetjem kolonij na števnih agarskih ploščah Karmali, adhezijo pa smo preračunali iz dobljenih podatkov. Vsi poskusi so bili narejeni v paralelkah.

Rezultati na spodnjih slikah (stolpični diagrami) prikazujejo adhezijo (število vezanih bakterij) in rast kampilobaktrov na epitelijskih celicah, ki je preračunana glede na dejansko začetno koncentracijo bakterije *C. jejuni* K49/4 v inokulumu. Prikazani so v odstotkih in

predstavljeni glede na kontrolo po merjenih časovnih intervalih inkubacije (po 3, 10, 24, 48 urah) bakterij s celicami. Kontrola predstavlja adhezijo bakterije *C. jejuni* K49/4 brez probiotikov. Pričakovali smo, da bakterije rodu *Lactobacillus* zmanjšujejo adhezijo kampilobaktrov in vplivajo na kasnejšo rast bakterije *C. jejuni* na celicah.

#### 4.1.1 Vpliv sevov rodu *Lactobacillus* (PCA 227, PCA 236, PCA 259, PCA 275) na adhezijo bakterije *C. jejuni* K49/4 na celicah PSI cl.1

V prvi seriji poskusov nas je zanimalo, če probiotične bakterije *L. plantarum* (PCA 236, PCA 259, PCA 275) in *L. pentosus* (PCA 227) preprečujejo oz. ovirajo adhezijo bakterije *C. jejuni* K49/4 s sočasno inkubacijo posameznih sevov, na celičnem modelu PSI cl.1. Povprečna koncentracija seva *C. jejuni* K49/4 v inokulumu je bila  $9,66 \log_{10}$  (CFU/ml), koncentracija probiotičnih bakterij, pa je bila med  $8,45$  in  $9,53 \log_{10}$  (CFU/ml) (Prilogi J1, J2).

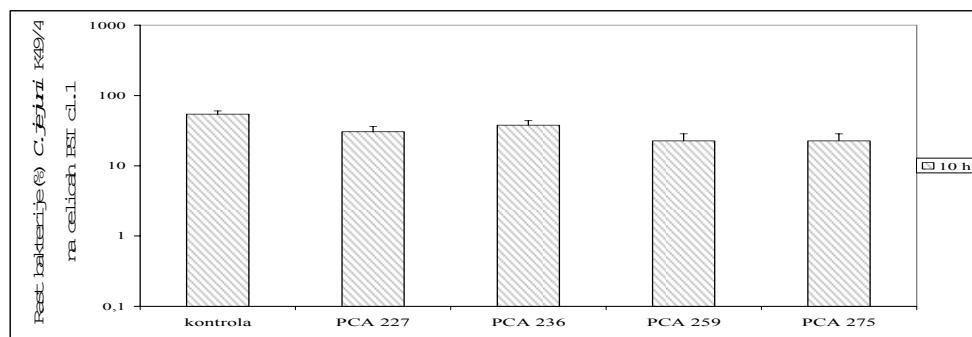


Slika 12: **Vpliv probiotikov (PCA 227, PCA 236, PCA 259, PCA 275) na adhezijo bakterije *C. jejuni* K49/4 na celicah PSI cl.1.** Celice PSI cl.1 smo za 2 uri izpostavili mešanici *C. jejuni* in probiotikov. Po dveh urah smo sprali nevezane bakterije, dalje inkubirali v gojišču DMEM še 1 uro, nato smo celice lizirali in prešteli število kampilobaktrov, ki se je vezalo na celice PSI cl.1.

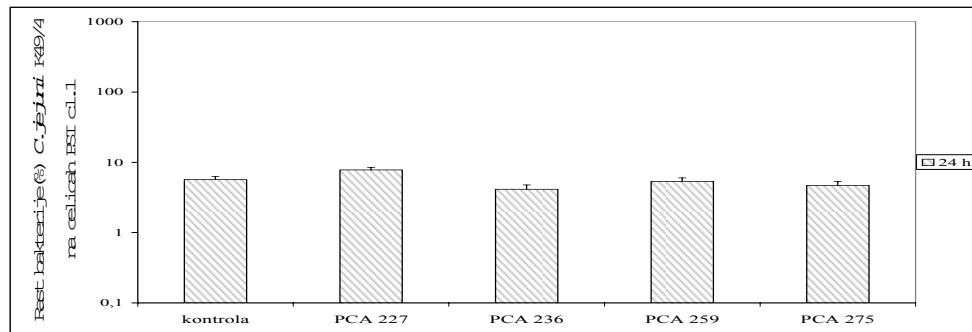
Po 3 urah od izpostavitve celic bakterijam (Slika 12, Prilogi A1 in A2) je kontrolni vzorec izkazoval približno 1 % adhezijo. Sočasno inkubirana seva *L. pentosus* PCA 227 in *L. plantarum* PCA 236 sta znižala delež vezane bakterije *C. jejuni* na celice v primerjavi s kontrolo, medtem ko sta seva *L. plantarum* PCA 259 in *L. plantarum* PCA 275 stimulirala adhezijo bakterije *C. jejuni*.

#### 4.1.2 Vpliv sevov rodu *Lactobacillus* (PCA 227, PCA 236, PCA 259, PCA 275) na rast bakterije *C. jejuni* K49/4 na celicah PSI cl.1

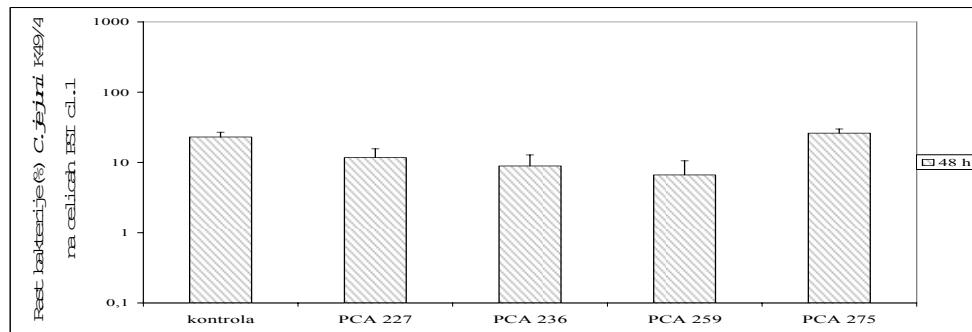
Po predhodni 2-urni ko-inkubaciji probiotičnih bakterij in bakterije *C. jejuni* na celice ter vezavi *C. jejuni* na celice smo ugotavljali, kakšna sta rast in razmnoževanje bakterije na celicah v različnih časovnih presledkih do 48 ur.



Slika 13: Vpliv probiotikov (PCA 227, PCA 236, PCA 259, PCA 275) na število bakterije *C. jejuni* K49/4 na celicah PSI cl.1 po 10 urah inkubacije. Celice PSI cl.1 smo za 2 uri izpostavili mešanici *C. jejuni* in probiotikov. Po dveh urah smo nevezane bakterije sprali in dalje inkubirali v gojišču DMEM še 8 ur.



Slika 14: Vpliv probiotikov (PCA 227, PCA 236, PCA 259, PCA 275) na število bakterije *C. jejuni* K49/4 na celicah PSI cl.1 po 24 urah inkubacije. Celice PSI cl.1 smo za 2 uri izpostavili mešanici *C. jejuni* in probiotikov. Po dveh urah smo sprali nevezane bakterije in dalje inkubirali v gojišču DMEM še 22 ur.

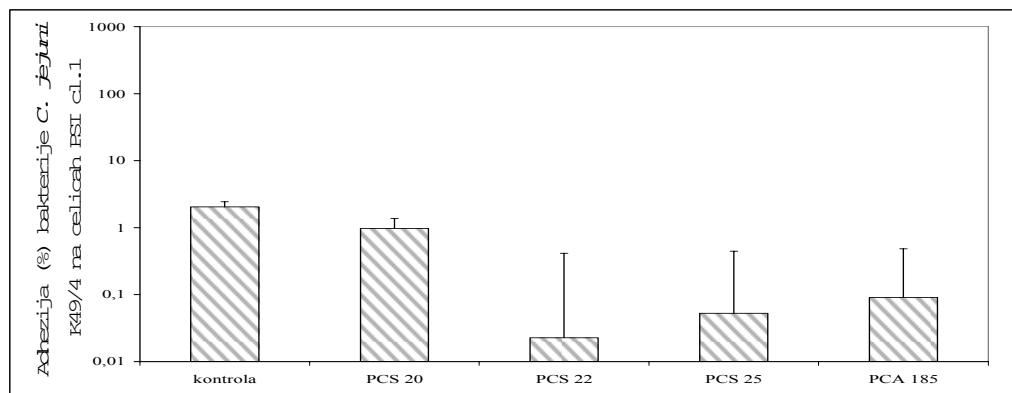


Slika 15: Vpliv probiotikov (PCA 227, PCA 236, PCA 259, PCA 275) na število bakterije *C. jejuni* K49/4 na celicah PSI cl.1 po 48 urah inkubacije. Celice PSI cl.1 smo za 2 uri izpostavili mešanici *C. jejuni* in probiotikov. Po dveh urah smo sprali nevezane bakterije in dalje inkubirali v gojišču DMEM še 46 ur.

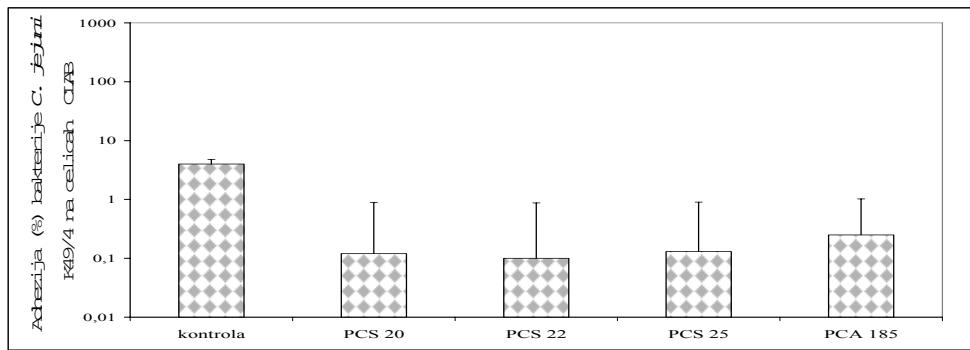
Slike 13, 14 in 15 kažejo, da se je bakterija *C. jejuni* K49/4 po vezavi na celično kulturo razmnoževala. Povečano število kampilobaktrov pri 10 urah inkubacije je verjetno posledica logaritemske faze rasti bakterije na celicah, medtem ko nadaljnje podaljševanje inkubacije kaže najprej rahel upad rasti (24 ur) in ponovno povečanje (48 ur). Iz slik bi lahko tudi sklepali, da so posamezni sevi *L. plantarum* PCA 227, *L. plantarum* PCA 236 ter *L. plantarum* PCA 259 po vezavi bakterije *C. jejuni* na celice, vplivali na rast kampilobaktrov na celicah (Priloga A1).

#### 4.1.3 Vpliv sevov rodu *Lactobacillus* (PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCA 185) na adhezijo bakterije *C. jejuni* K49/4 na celicah PSI cl.1 in CLAB

V tem poglavju je predstavljena primerjava med adhezijo (%) bakterije *C. jejuni* K49/4, inokulirane samostojno ali skupaj s probiotičnimi sevi bakterij *L. plantarum* (PCS 20, PCS 22, PCS 25) ter z vrsto *L. gasseri* (PCA 185) na dveh celičnih modelih, t.j. PSI cl.1 ter CLAB. Povprečna koncentracija bakterije *C. jejuni* K49/4 v inokulumu, ki smo ga uporabili za infekcijo celične kulture PSI cl.1 je bila  $9,52 \log_{10}$  (CFU/ml), za celično kulturo CLAB  $9,78 \log_{10}$  (CFU/ml), koncentracija probiotičnih bakterij pa je bila med 7,89 in  $8,37 \log_{10}$  (CFU/ml) pri celični kulturi PSI cl.1 in med 7,92 in  $8,38 \log_{10}$  (CFU/ml), pri celični kulturi CLAB (Prilogi J1, J2).



Slika 16: Vpliv probiotikov (PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCA 185) na adhezijo bakterije *C. jejuni* K49/4 na celicah PSI cl.1. Celice PSI cl.1 smo za 2 uri izpostavili mešanici *C. jejuni* in probiotikov. Po dveh urah smo sprali nevezane bakterije, dalje inkubirali v gojišču DMEM še 1 uro, nato smo celice lizirali in prešeli število kampilobaktrov, ki se je vezalo na celice PSI cl.1.

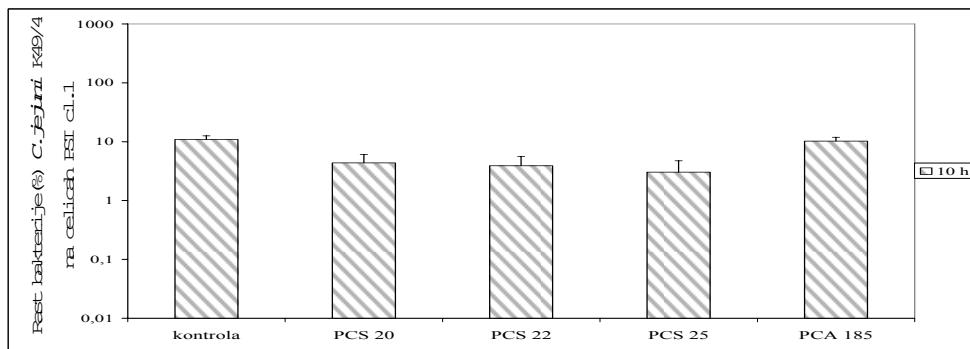


Slika 17: **Vpliv probiotikov (PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCA 185) na adhezijo bakterije *C. jejuni* K49/4 na celicah CLAB.** Celice CLAB smo za 2 uri izpostavili mešanici *C. jejuni* in probiotikov. Po dveh urah smo sprali nevezane bakterije, dalje inkubirali v gojišču DMEM še 1 uro, nato smo celice lizirali in prešteli število kampilobaktrov, ki se je vezalo na celice CLAB.

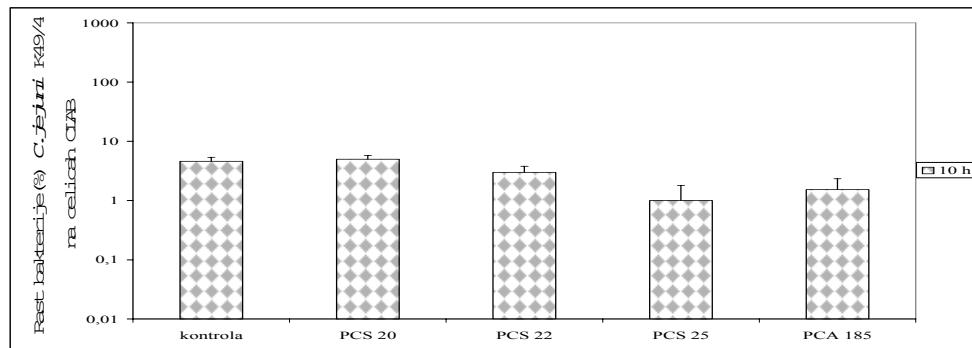
Slike 16 in 17 prikazujeta, da so vse probiotične bakterije ovirale adhezijo *C. jejuni* K49/4 na celice PSI cl.1 ter CLAB. Adhezija kontrolnega vzorca na celični kulturi PSI cl.1 je znašala povprečno 2,04 %, adhezija mešanic kampilobaktrov in posameznih probiotikov, pa je bila med 0,02 % in 0,97 % (Slika 16, Prilogi B1 in B2). Na celicah CLAB je adhezija kontrolnega vzorca znašala povprečno 4 %, mešanic pa med 0,1 % in 0,25 % (Prilogi C1, C2 in Slika 17). Kot najbolj učinkovita pri zaviranju adhezije kampilobaktrov sta se izkazala seva *L. plantarum* PCS 22 in PCS 25.

#### 4.1.4 Vpliv sevov rodu *Lactobacillus* (PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCA 185) na rast bakterije *C. jejuni* K49/4 na celicah PSI cl.1 in CLAB

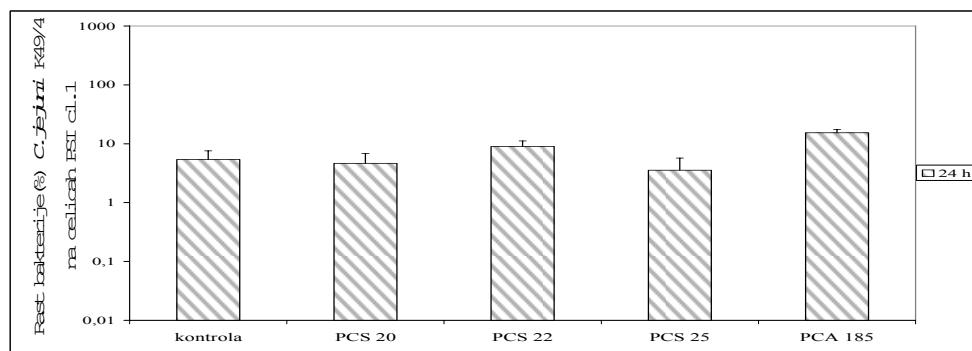
Po vezavi bakterije *C. jejuni* na celice smo preverili rast bakterije na obeh testiranih celičnih kulturah do 48 ur od okužbe celic.



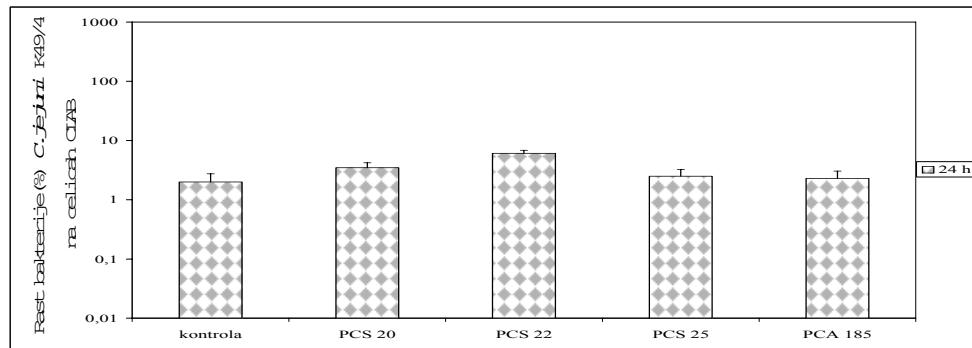
Slika 18: **Vpliv probiotikov (PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCA 185) na število bakterije *C. jejuni* K49/4 na celicah PSI cl.1 po 10 urah inkubacije.** Celice PSI cl.1 smo za 2 uri izpostavili mešanici *C. jejuni* in probiotikov. Po dveh urah smo sprali nevezane bakterije in dalje inkubirali v gojišču DMEM še 8 ur.



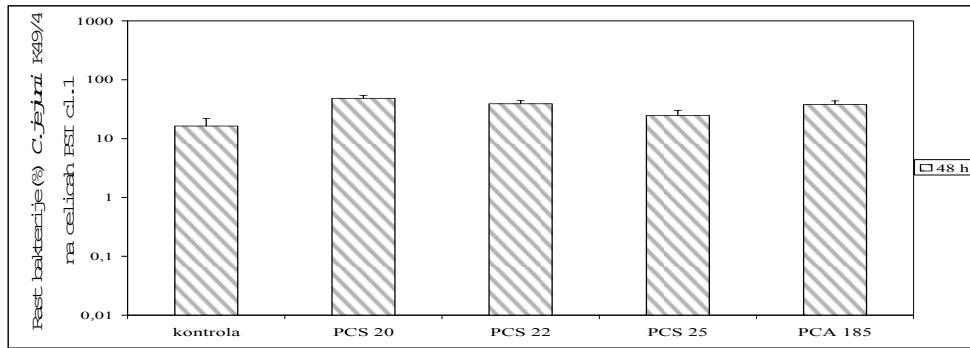
Slika 19: Vpliv probiotikov (PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCA 185) na število bakterije *C. jejuni* K49/4 na celicah CLAB po 10 urah inkubacije. Celice CLAB smo za 2 uri izpostavili mešanici *C. jejuni* in probiotikov. Po dveh urah smo sprali nevezane bakterije in dalje inkubirali v gojišču DMEM še 8 ur.



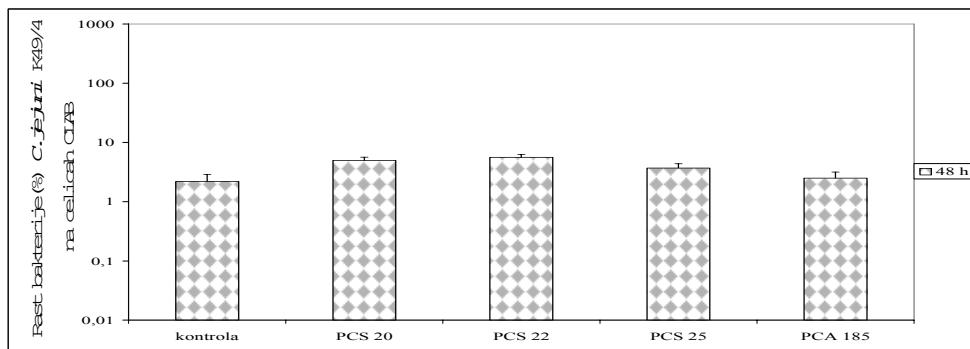
Slika 20: Vpliv probiotikov (PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCA 185) na število bakterije *C. jejuni* K49/4 na celicah PSI cl.1 po 24 urah inkubacije. Celice PSI cl.1 smo za 2 uri izpostavili mešanici *C. jejuni* in probiotikov. Po dveh urah smo sprali nevezane bakterije in dalje inkubirali v DMEM še 22 ur.



Slika 21: Vpliv probiotikov (PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCA 185) na število bakterije *C. jejuni* K49/4 na celicah CLAB po 24 urah inkubacije. Celice CLAB smo za 2 uri izpostavili mešanici *C. jejuni* in probiotikov. Po dveh urah smo sprali nevezane bakterije in dalje inkubirali v DMEM še 22 ur.



Slika 22: **Vpliv probiotikov (PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCA 185) na število bakterije *C. jejuni* K49/4 na celicah PSI cl.1 po 48 urah inkubacije.** Celice PSI cl.1 smo za 2 uri izpostavili mešanici *C. jejuni* in probiotikov. Po dveh urah smo sprali nevezane bakterije in dalje inkubirali v DMEM še 46 ur.



Slika 23: **Vpliv probiotikov (PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCA 185) na število bakterije *C. jejuni* K49/4 na celicah CLAB po 48 urah inkubacije.** Celice CLAB smo za 2 uri izpostavili mešanici *C. jejuni* in probiotikov. Po dveh urah smo sprali nevezane bakterije in dalje inkubirali v DMEM še 46 ur.

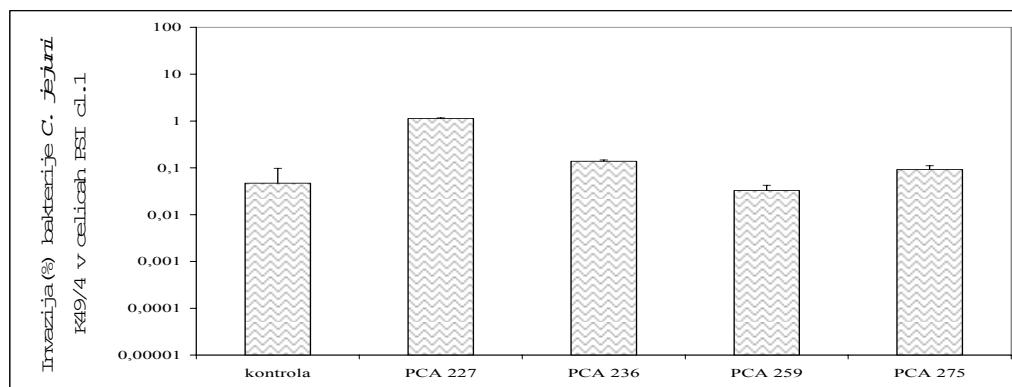
Slike 18-23 kažejo, da je predhodna 2-urna sočasna izpostavitev celic PSI cl.1 oz. CLAB probiotikom in bakteriji *C. jejuni* K49/4 vplivala na kasnejšo rast bakterije *C. jejuni* na celicah. Po adheziji bakterije na celično kulturo in nadaljnji inkubaciji je bila vidna intenzivna rast bakterije *C. jejuni* na celicah. Menimo, da je prišlo do razmnoževanja že vezanih kampilobaktrov (Prilogi B1, C1). Po 10 urah inkubacije je bila rast bakterije *C. jejuni* najboljša v kontrolnem vzorcu, po 24 urah pa razlik med kontrolo in ostalimi poskusi ni bilo več zaznati.

## 4.2 VPLIV PROBIOTIČNIH BAKTERIJ NA INVAZIJO BAKTERIJE *C. jejuni* K49/4 V CELIČNEM MODELU PRAŠIČJIH ČREVESNIH EPITELIJSKIH CELIC

Sočasno z določanjem adhezije smo določali tudi invazijo bakterije *C. jejuni* K49/4. Preverili smo, če lahko s 2-urno predhodno sočasno inkubacijo izbranih probiotičnih bakterij, zmanjšamo oz. preprečimo invazijo *C. jejuni* K49/4 v prašičje črevesne epitelijske celice. Iz celic smo sprali nevezane bakterije in celično kulturo dalje inkubirali v gojitvenem mediju DMEM z gentamicinom še 1 uro. Število znotrajcelične bakterije *C. jejuni* smo določili preko kultivabilnosti, s štetjem kolonij na agarju Karmali. Invazijo kampilobaktrov smo preračunali glede na začetno koncentracijo bakterije *C. jejuni* K49/4 v inokulumu. Rezultati na spodnjih slikah prikazujejo izračunane vrednosti paralelnih poskusov. Prikazani so v odstotkih in predstavljeni glede na kontrolo.

### 4.2.1 Vpliv sevov rodu *Lactobacillus* (PCA 227, PCA 236, PCA 259, PCA 275) na invazijo bakterije *C. jejuni* K49/4 v celicah PSI cl.1

V prvi seriji poskusov smo ugotavljali vpliv bakterij *L. pentosus* (PCA 227) in *L. plantarum* (PCA 236, PCA 259, PCA 275) na invazijo bakterije *C. jejuni* v celice PSI cl.1. Začetna koncentracija bakterije *C. jejuni* v inokulumu je znašala 9,66 log (CFU/ml), koncentracija probiotičnih bakterij pa je bila med 8,45 in 9,53 log (CFU/ml).



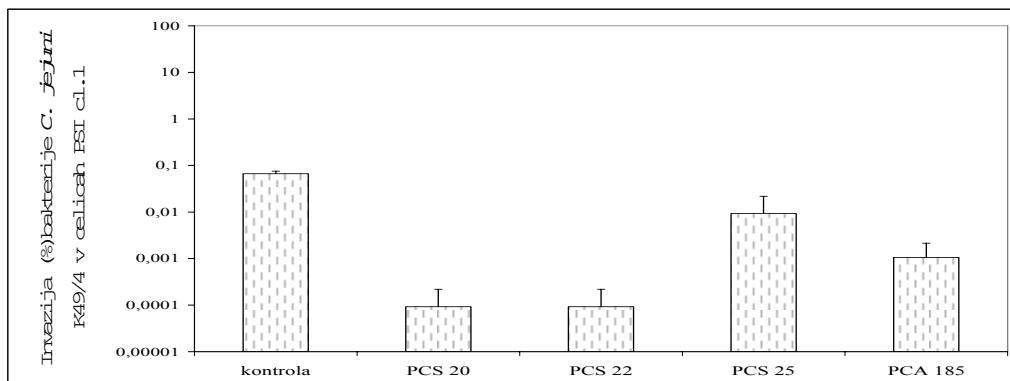
Slika 24: Vpliv probiotikov (PCA 227, PCA 236, PCA 259, PCA 275) na invazijo bakterije *C. jejuni* K49/4 v celice PSI cl.1. Celice PSI cl.1 smo za 2 uri izpostavili mešanici *C. jejuni* in probiotikov. Po dveh urah smo sprali nevezane bakterije, dalje inkubirali v gojišču DMEM z gentamicinom še 1 uro, nato smo celice lizirali in prešteli število kampilobaktrov, ki je vstopilo v celice PSI cl.1.

Slika 24 kaže, da smo po treh urah od okužbe celicah že zaznali bakterijo *C. jejuni* K49/4. Predhodna 2 - urna sočasna inkubacija probiotičnih sevov bakterij PCA 236, PCA 259,

PCA 275, PCA 227 in bakterije *C. jejuni* ni ovirala invazije kampilobaktrov (Prilogi D1 in D2).

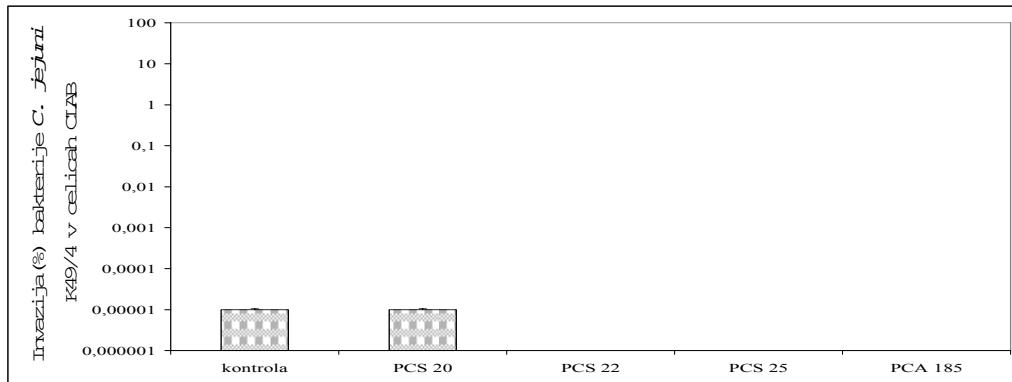
#### 4.2.2 Vpliv sevov rodu *Lactobacillus* (PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCA 185) na invazijo bakterije *C. jejuni* K49/4 v celicah PSI cl.1 in CLAB

Morebitno preprečevanje invazije bakterije *C. jejuni* K49/4 smo ugotavljali tudi s koinkubiranimi probiotičnimi sevi bakterij *L. plantarum* (PCS 20, PCS 22, PCS 25) ter sevom *L. gasseri* (PCA 185). Primerjava med invazijo bakterije *C. jejuni* K49/4, inokulirano samostojno ali skupaj s probiotičnimi bakterijami v dveh celičnih kulturah PSI cl.1 ter CLAB, so predstavljeni na Slikah 25 - 26. Koncentracija bakterije *C. jejuni* K49/4 v inokulumu na celični kulturi PSI cl.1 je bila 9,52 log (CFU/ml), koncentracija probiotičnih bakterij je bila med 7,89 in 8,37 log (CFU/ml), medtem ko je bila koncentracija kampilobaktrov na celični kulturi CLAB 9,78 log (CFU/ml) ter koncentracija probiotikov med 7,92 in 8,38 log (CFU/ml).



Slika 25: Vpliv probiotikov (PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCA 185) na invazijo bakterije *C. jejuni* K49/4 v celice PSI cl.1. Celice PSI cl.1 smo za 2 uri izpostavili mešanici *C. jejuni* in probiotikov. Po dveh urah smo sprali nevezane bakterije, dalje inkubirali v gojišču DMEM z gentamicinom še 1 uro, nato smo celice lizirali in prešteli število kampilobaktrov, ki je vstopilo v celice PSI cl.1.

Slika 25 kaže, da so vsi posamezni sevi probiotičnih bakterij zmanjšali invazijo bakterije *C. jejuni* K49/4 v primerjavi s kontrolo. Najbolj učinkovita pri oviranju invazije sta bila seva *L. plantarum* PCS 20 in *L. plantarum* PCS 22, pri katerih smo zaznali minimalno invazijo kampilobaktrov (Prilogi E1 in E2).



**Slika 26: Vpliv probiotikov (PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCA 185) na invazijo bakterije *C. jejuni* K49/4 v celice CLAB.** Celice CLAB smo za 2 uri izpostavili mešanici *C. jejuni* in probiotikov. Po dveh urah smo sprali nevezane bakterije, dalje inkubirali v gojišču DMEM z gentamicinom še 1 uro, nato smo celice lizirali in prešteli število kampilobaktrov, ki je vstopilo v celice CLAB.

V primerjavi z invazijo bakterije *C. jejuni* v celični kulturi CLAB je bilo število kampilobaktrov, ki je vstopilo v celice pri kontroli in mešanici kampilobaktrov s sevom *L. plantarum* PCS 20 minimalno. Pri ostalih sevih *L. gasseri* PCA 185 ter *L. plantarum* PCS 20 in PCS 22 nismo zaznali invazije bakterije *C. jejuni* (Slika 26, Prilogi F1 in F2).

Kot kažejo Slike 24-26 (Priloge D1, D2, E1, E2, F1, F2), sočasna izpostavitev celic probiotičnim sevom bakterij PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCA 185 in kampilobaktrom vpliva na invazijo bakterij *C. jejuni* v celičnih kulturah PSI cl.1 in/ali CLAB.

Sklepamo lahko, da probiotične bakterije niso ovirale invazije bakterije *C. jejuni* v celice CLAB, ampak je minimalno število zaznanih znotrajceličnih bakterij v celicah posledica neobčutljivosti celične kulture za invazijo kampilobaktrov.

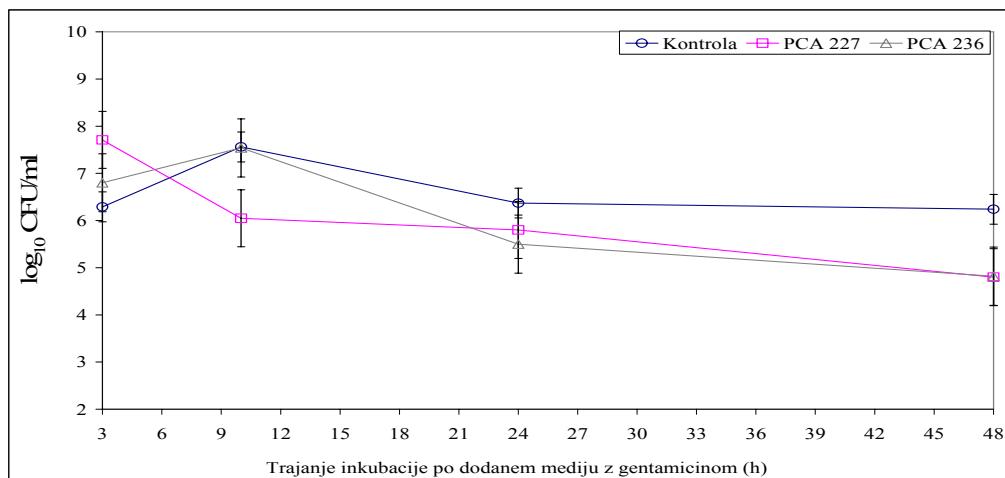
#### 4.3 VPLIV PROBIOTIČNIH BAKTERIJ NA ZNOTRAJCELIČNO PREŽIVLJIVOST BAKTERIJE *C. jejuni* K49/4 V CELIČNEM MODELU PRAŠIČJIH ČREVESNIH EPITELIJSKIH CELIC

Hkrati z invazijo smo spremljali tudi znotrajcelično preživljivost kampilobaktrov v celicah. Ugotavljali smo ali obstajajo indikacije s poskusi na celičnih kulturah, če bi lahko s predhodno sočasno inkubacijo živih probiotičnih bakterij in bakterije *C. jejuni* K49/4 vplivali na nadaljnje razmnoževanje *C. jejuni* v celicah. Celično kulturo smo sočasno izpostavili kampilobaktrom in probiotičnim bakterijam za 2 uri. Po spiranju nevezanih bakterij smo celično kulturo z invadirano bakterijo *C. jejuni* dalje inkubirali v gojišču DMEM z gentamicinom. V časovno določenih intervalih smo epitelijske celice lizirali in določili število bakterij v celicah.

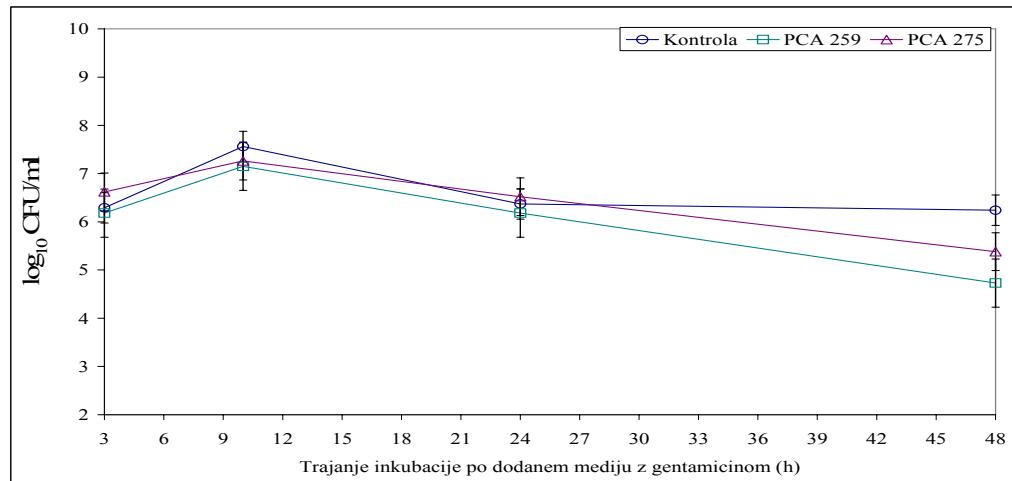
##### 4.3.1 Vpliv sevov rodu *Lactobacillus* (PCA 227, PCA 236, PCA 259, PCA 275) na znotrajcelično preživljivost bakterije *C. jejuni* K49/4 v celicah PSI cl.1

Preverili smo učinek probiotičnih sevov *L. pentosus* (PCA 227) in *L. plantarum* (PCA 236, PCA 259, PCA 275) na znotrajcelično preživljivost bakterije *C. jejuni* K49/4. Krivulje na spodnjih slikah prikazujejo rezultate 48-urne inkubacije z invadiranimi kampilobaktri.

Slike 27 in 28 (Prilogi D1, D2) kažeta, da predhodna sočasna izpostavitev celic probiotičnim bakterijam in kampilobaktrom vpliva na koncentracijo znotrajceličnih bakterij *C. jejuni*.



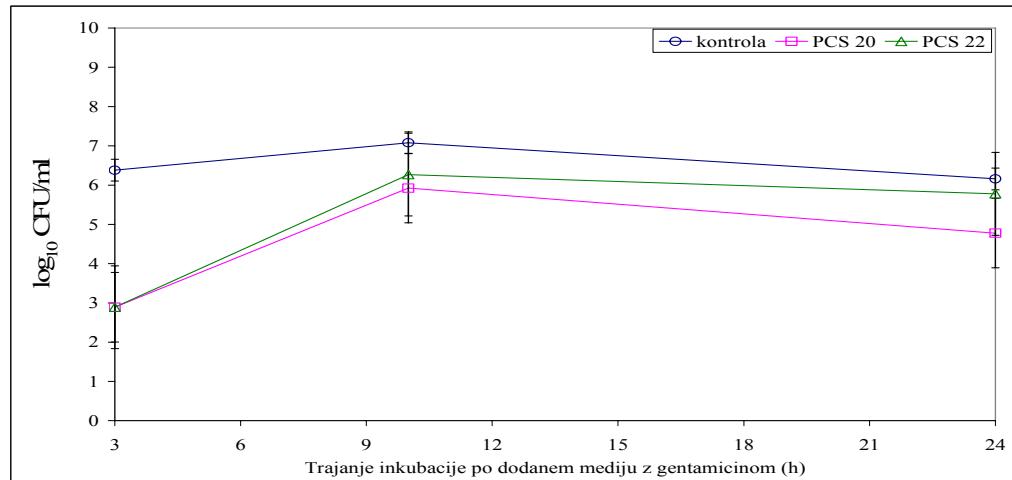
Slika 27: Vpliv sevov PCA 227 in PCA 236 na znotrajcelično preživljivost bakterije *C. jejuni* K49/4 v celicah PSI cl.1.



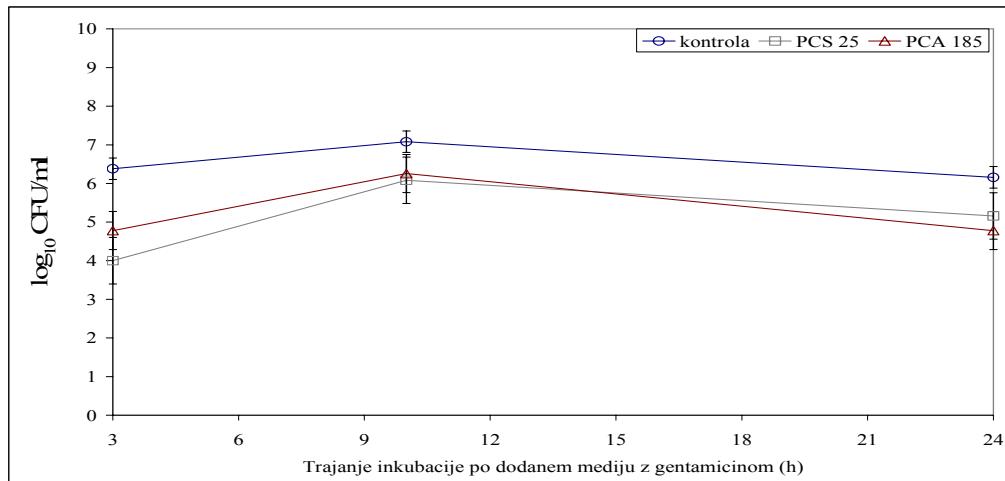
Slika 28: Vpliv sevov PCA 259 in PCA 275 na znotrajcelično preživljivost bakterije *C. jejuni* K49/4 v celicah PSI cl.1.

#### 4.3.2 Vpliv sevov rodu *Lactobacillus* (PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCA 185) na znotrajcelično preživljivost bakterije *C. jejuni* K49/4 v celicah PSI cl.1 in CLAB

Zanimalo nas je, če lahko z drugimi probiotičnimi bakterijami *L. plantarum* (PCS 20, PCS 22, PCS 25) ter sevom *L. gasseri* (PCA 185) vplivamo na znotrajcelično preživljivost kampilobakterov v celicah PSI cl.1 in CLAB. Krivulje na spodnjih slikah prikazujejo 24-urno inkubacijo celic z invadiranimi bakterijami *C. jejuni*.



Slika 29: Vpliv sevov PCS 20 in PCS 22 na znotrajcelično preživljivost bakterije *C. jejuni* K49/4 v celicah PSI cl.1



Slika 30: Vpliv sevov PCS 25 in PCA 185 na znotrajcelično preživljivost bakterije *C. jejuni* K49/4 v celicah PSI cl.1

Slike 29 in 30 kažeta (Prilogi D1, D2), da je predhodna 2-urna sočasna izpostavitev celic PSI cl.1 probiotičnim bakterijam in kampilobaktrom omogočila hitrejše razmnoževanje bakterije *C. jejuni* v celicah do 10 ur od okužbe celic, v primerjavi s kontrolo. Predvidevamo, da so probiotične bakterije z metaboliti zaščitile celice PSI sl.1 pred poškodbami, zato se je lahko bakterija *C. jejuni* nemoteno podvojevala.

V celicah CLAB smo zaznali minimalno koncentracijo bakterije *C. jejuni* K49/4 samo po 3 urah (Prilogi F1, F2) od okužbe celic z bakterijami in še to le pri kontrolnem vzorcu in sočasno inkubiranem sevu PCS 20. Z nadaljnjam podaljševanjem inkubacije do 24 ur pa ni bilo več mogoče zaznati kultivabilnih znotrajceličnih kampilobaktrov v nobenem vzorcu.

## 4.4 ŽIVOST CELIČNE KULTURE PRAŠIČJIH ČREVESNIH EPITELIJSKIH CELIC

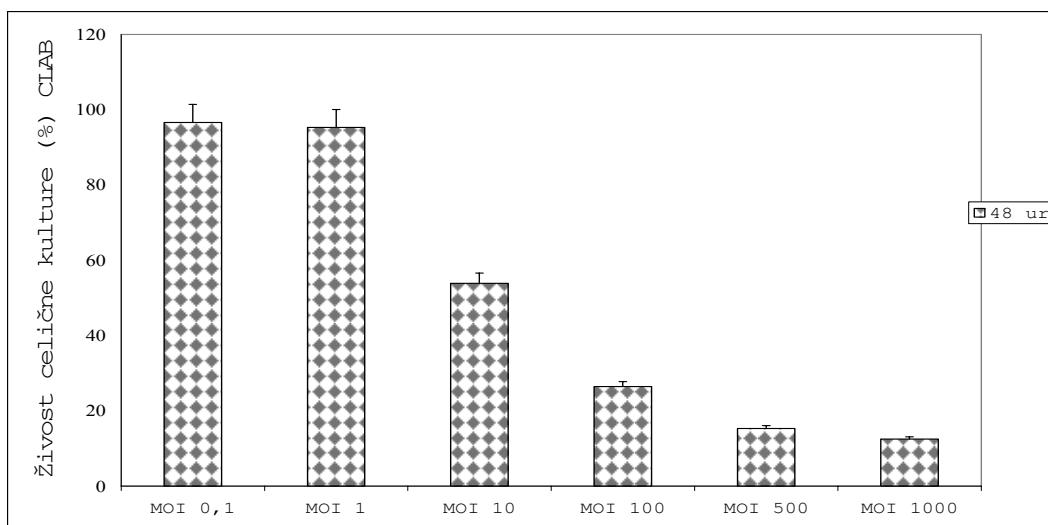
### 4.4.1 Določanje živosti celične kulture z barvanjem s kristal vijoličnim barvilm

Vpliv bakterije *C. jejuni* K49/4 na živost celične kulture smo kvantitativno določili z uporabo kristal vijoličnega barvila in vrednotenjem razvite barve z merjenjem absorbance pri valovni dolžini  $\lambda = 595$  nm. Število dodanih kampilobaktrov je bilo od  $6 \cdot 10^5$  do  $6 \cdot 10^9$  na posamezen poskus, s čimer smo dosegli različna razmerja bakterijskih celic glede na epitelijske celice (Preglednica 3). Kontrolni vzorec je bila neinficirana celična kultura. Rezultati so prikazani v odstotkih in izračunani glede na kontrolo (Slike 31 in 32). Prikazane so povprečne vrednosti petih paralelnih poskusov (Prilogi H1, H2).

Preglednica 3 : Število dodane bakterije *C. jejuni* na epitelijske celice (MOI)

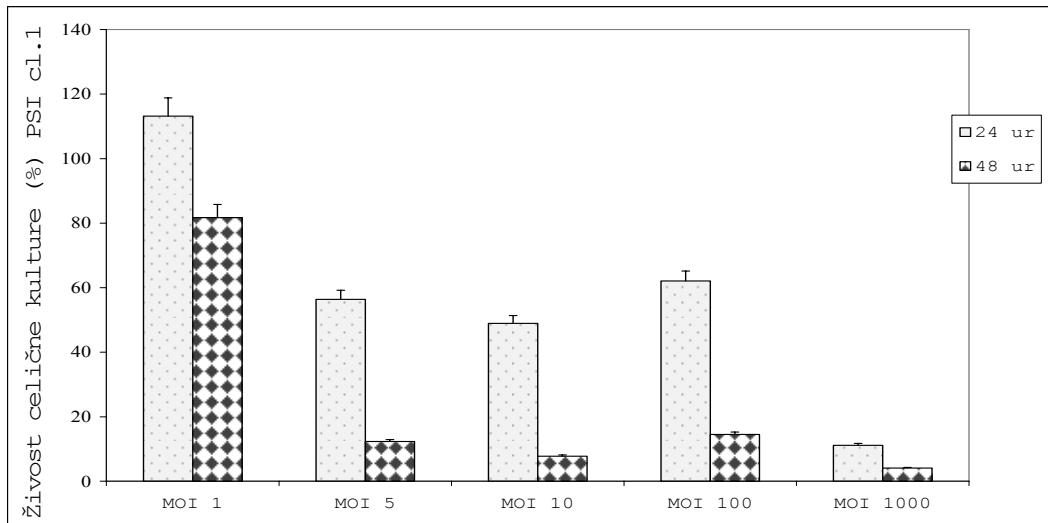
MOI	Število epitelijskih celic	Število bakterije <i>C. jejuni</i> K49/4
MOI 0,1	$6 \cdot 10^6$	$6 \cdot 10^5$
MOI 1	$6 \cdot 10^6$	$6 \cdot 10^6$
MOI 5	$6 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^7$
MOI 10	$6 \cdot 10^6$	$6 \cdot 10^7$
MOI 100	$6 \cdot 10^6$	$6 \cdot 10^8$
MOI 500	$6 \cdot 10^6$	$30 \cdot 10^8$
MOI 1000	$6 \cdot 10^6$	$6 \cdot 10^9$

#### 4.4.1.1 Živost celične kulture CLAB



Slika 31: Živost celične kulture CLAB po 48 h okužbe z bakterijo *C. jejuni* K49/4 ( $0,1 < \text{MOI} < 1000$ ).

#### 4.4.1.2 Živost celične kulture PSI cl.1



Slika 32: Živost celične kulture PSI cl.1 po 24 h (levi stolpec) in 48 h (desni stolpec) okužbe z bakterijo *C. jejuni* K49/4 ( $1 < \text{MOI} < 1000$ ).

Na podlagi tega poskusa smo ugotavljali optimalno razmerje med koncentracijo bakterij in številom epitelijskih celic (MOI). Živost celične kulture se je zmanjševala s podaljševanjem inkubacije bakterij s celicami in z večanjem števila dodane bakterije *C. jejuni* na celice CLAB pri MOI 0,1 do MOI 1000 (Slika 12, Priloga I1, I2).

Slika 32 kaže, da se je z večanjem števila kampilobaktrov, dodanih na celice PSI cl.1, zmanjševala živost med MOI 1 in MOI 10. Pri MOI 100 smo opazili ponovno zvečanje živih celic, nato pa je pri večjem razmerju MOI 1000 upadla. Pri celični kulturi CLAB smo v primerjavi s celično kulturo PSI cl.1 (MOI 1 – 1000) opazili višjo stopnjo živosti.

Rezultati kažejo, da ima bakterija *C. jejuni* pri vrednosti MOI 10 citotoksičen učinek na celice PSI cl.1, medtem ko po 48 urah od okužbe ne zmanjšajo živosti celične kulture CLAB pod 50 % (Slike 31 in 32). Ta rezultat je dodaten dokaz za večjo občutljivost celic PSI cl.1 za okužbo z bakterijo *C. jejuni* K49/4 od celic CLAB, kar smo povzeli že iz rezultatov, prikazanih v poglavju 4.1.2 in 4.2.2.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

V skladu z delovnima hipotezama (poglavlje 1.3) smo ugotavljali, ali se bakterije *C. jejuni* vežejo na modelne prašičje črevesne epitelijske celice, vanje uspešno prehajajo in/ali izbrani sevi probiotičnih bakterij rodu *Lactobacillus* zmanjšajo adhezijo in/ali invazijo, znotrajcelično preživljivost in rast na celicah kampilobaktrov na/v uporabljenih celičnih modelih.

Za model epitelijskih črevesnih celic smo izbrali celični liniji PSI cl. ter CLAB. Oba izbrana celična modela sta bila pridobljena iz tankega črevesa prašiča (Gradišnik in sod., 2006). Celice PSI cl.1 izražajo lastnosti celic Liberkühnove kripte tankega črevesa, medtem ko celice CLAB izražajo lastnosti epitelijskih celic tankega črevesja (enterocit) strukturno. Pri vseh poskusih smo uporabljali diferencirane celice in preučevali vpliv izbranih probiotičnih bakterij *L. gasseri* PCA 185, *L. pentosus* PCA 227, *L. plantarum* PCA 236, *L. plantarum* PCA 259, *L. plantarum* PCA 275, *L. plantarum* PCS 20, *L. plantarum* PCS 22, *L. plantarum* PCS 25 na adhezijo in/ali invazijo, znotrajcelično preživljivot in rast izolata iz piščančjega mesa *C. jejuni* K49/4 na/v izbranih celičnih modelih. Ta sev smo izbrali zato, ker je že bila dokazana njegova adhezija in invazija na celičnih kulturah celic Caco-2 in mišjih makrofagih (Mihaljević in sod., 2007; Šikić Pogačar in sod., 2009).

Zelo malo je znanega o delovanju probiotikov na mehanizme patogeneze bakterij *C. jejuni*, zato se v razpravi opiram predvsem na raziskave vpliva probiotičnih kultur na druge črevesne patogene. Poleg tega se uporabljajo različni celični modeli, načini infekcije ipd., zato raziskave marsikdaj niso primerljive.

#### 5.1.1 Vpliv sevov rodu *Lactobacillus* na adhezijo, invazijo, znotrajcelično preživljivost in rast bakterije *C. jejuni* K49/4 na/v celicah PSI cl.1 ter CLAB

Pri vdoru patogenih bakterij v črevesje pride do interakcij med molekulami na površini bakterij in gostiteljevimi receptorji. Nekateri avtorji domnevajo, da je učinkovitost oviranja adhezije patogenih bakterij na epitelijske celice, ki je predpogoj za nadaljnjo kolonizacijo

in/ali invazijo le-teh v celice, odvisna od testiranega seva probiotikov, koncentracije probiotične kulture v inokulumu in od sposobnosti adhezije probiotikov (Forestier in sod., 2001). Pomembna lastnost probiotičnih kultur so njihove adhezivne sposobnosti in naselitev prebavil, saj lahko tako dalj časa spodbujajo imunski sistem gostitelja, učinkujejo s svojimi metabolnimi produkti in preprečujejo vezavo nekaterih patogenov (Saarela in sod., 2000). Adhezija omogoča probiotikom vezavo na črevesno sluznico, kompetitivno izključevanje patogenov oz. drugih bakterij, nadaljnjo kolonizacijo in stimulacijo imunskega odziva (Forestier in sod., 2001). Adhezija probiotičnih bakterij na črevesno sluznico je tudi eden izmed selekcijskih kriterijev za probiotike (Beachey, 1981; Saarela in sod., 2000). Probiotiki, ki imajo adhezivne sposobnosti, tekmujejo s patogeni za vezavna mesta na epitelijskih celicah črevesja.

Drugi avtorji pa so dokazali, da tudi neadhezivni probiotiki zmanjšujejo adhezijo patogenih bakterij *in vitro* (Tuomola in Salminen, 1998). Tudi oralno zaužiti probiotiki z nizko sposobnostjo vezave na celične kulture vplivajo na skrajšanje rotavirusne diareje *in vivo* (Ouwehand in sod., 1999).

V diplomskem delu smo preverili sposobnost vezave probiotičnih sevov na izbrane celične modele in ugotovili, da so bili vsi izbrani sevi adhezivni (neprikazani rezultati). Probiotične bakterije, ki imajo adhezivne sposobnosti, tekmujejo s patogeni za vezavna mesta na epitelijskih celicah črevesja, hkrati pa boljše adhezivne sposobnosti probiotikov omogočajo epitelijskim celicam večjo zaščito pred vstopanjem patogenov v celice.

Če primerjamo učinkovitost testiranih probiotičnih sevov na preprečevanje adhezije bakterije *C. jejuni* K49/4 v tem diplomskem delu, je bil učinek očiten pri koinkubaciji s sevi PCA 227, PCA 236, PCS 20, PCS 22, PCS 25 in PCA 185, (Poglavlji 4.1.1, 4.1.2) na celih PSI cl.1. Poskusi so ponovno potrdili, da je vpliv posameznih sevov rodu *Lactobacillus* na oviranje adhezije bakterije *C. jejuni* na izbran celični model sevno specifičen. Oviranje adhezije bakterije *C. jejuni* je bilo odvisno od ko-inkubiranega seva probiotika (Priloge A-F). Rezultati so primerljivi z rezultati, ki so jih dobili Gueimonde in sod. (2006) in Collado in sod. (2007a). Slednji avtorji so ugotovili, da probiotiki vplivajo na adhezijo patogenih bakterij. Lahko jo ovirajo ali pa tudi stimulirajo. Čeprav biološka značilnost povečanja adhezije patogenov ni znana, bi lahko bila dejavnik tveganja. Vpliv

na adhezijo je morda povezan s specifičnimi adhezini in receptorji na celicah, za katere probiotične bakterije in patogeni tekmujejo (kompetitivna inhibicija). Pomembna je tudi ugotovitev Forestier in sod. (2001), ki so s ko-inkubacijo seva *L. casei rhamnosus* (Lcr35) dokazali protiadhezivno učinkovitost proti različnim enteričnim patogenom *E. coli* (ETEC H10407), *E. coli* (EPEC 2348/69), *K. pneumoniae* LM21. Zaključili so, da probiotiki lahko prostorsko ovirajo dostop patogenom do celičnih receptorjev. Oviranje patogenih bakterij pri vezavi na celične receptorje lahko zmanjša nadaljnjo kolonizacijo, morebitno invazijo v celice in kompletно spremeni potek patogeneze.

Pri določanju invazije bakterije *C. jejuni* smo po 3 urah od okužbe že zaznali kampilobakte v celicah in ugotovili, da lahko z določenimi sevi zmanjšamo invazijo kampilobaktrov v celice, v primerjavi s kontrolo. Pri ugotavljanju učinka probiotikov na invazijo so najbolj izstopali sevi PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCA 185. Morda probiotiki prostorsko ovirajo vstop bakterije *C. jejuni* v celice, čeprav je že pripeta na ustrezne receptorje celic. Novejše raziskave navajajo, da ko-agregacijske sposobnosti probiotičnih vrst omogočajo probiotikom, da tvorijo pregrade, ki preprečujejo naselitev patogenih bakterij. Collado in sod. (2007b) so ugotovili, da sta imela oba testirana probiotična seva *L. rhamnosus* GG in *B. Lactis* Bb12 sposobnost ko-agregacije s patogeni, po 20 urah inkubacije. To lahko domnevno prispeva k zmanjšanju adhezije in/ali invazije patogenov na/v celice črevesne epitelijske celice. Vsi ti dokazi utemeljujejo uporabo laktobacilov pri preprečevanju okužb v zgodnji fazi, saj zavirajo adhezijo patogenov s kompetitivno izključitvijo in posledično tudi invazijo v enterocite.

Medsebojna primerjava adhezije in invazije bakterij *C. jejuni* na/v celice PSI cl.1 ter CLAB je pokazala, da sta bili adhezija in invazija večji na/v celicah PSI cl.1. Glede na to, da so poskusi potekali pod enakimi pogoji, lahko sklepamo, da je celična kultura CLAB manj občutljiva za okužbo z bakterijami *C. jejuni* (Priloge B, C, E in F). Tudi Gueimonde in sod. (2006) so ugotovili, da se adhezija laktobacilov *L. casei* TMC 0409, *L. acidophilus* TMC 0356, *L. rhamnosus* LA-2 in patogenov *C. difficile* ATCC 9689, *E. sakazakii* ATCC 29544, *S. enterica* serovar Typhimurium ATCC 29631, *E. coli* NTCT 8603 in *L. monocytogenes* ATCC 15313 na človeško črevesno sluznico in Caco-2 celični model razlikuje. Adhezija na človeško črevesno sluznico je manjša kot na celični model Caco-2.

V poskusu uporabljeni celični kulturi sta bili različni, zato smo imeli na celicah PSI cl.1 več pripetih in znotrajceličnih bakterij *C. jejuni* kot na/v celicah CLAB.

Med poskusom smo ugotavljali tudi morebiten vpliv probiotičnih bakterij na znotrajcelično preživljivost in rast bakterije *C. jejuni* na/v celicah. Rezultati so pokazali, da je koncentracija kampilobaktrov na in v celich naraščala do 10 ur inkubacije, najverjetneje so se bakterije med tem časom začele intenzivno podvojevati. Po tem času je pri nekaterih vzorcih število bakterije *C. jejuni* na in v celicah začelo upadati, pri drugih pa rasti. Sklepamo lahko, da smo s predhodno 2-urno sočasno inkubacijo posameznih sevov probiotičnih bakterij in *C. jejuni* vplivali na kasnejšo rast kampilobaktrov na /v celicah.

Kljub temu, da so nekateri probiotiki ovirali invazijo bakterije *C. jejuni* v celice, niso vplivali na adhezijo. Iz dobljenih rezultatov lahko povzamemo, da različne probiotične bakterije različno vplivajo na adhezijo in/ali invazijo bakterije *C. jejuni* K49/4. Eden izmed vzrokov za oviranje adhezije in/ali invazije bakterij v celicah so lahko tudi protimikrobne snovi, ki jih probiotiki pri sočasni inkubaciji z drugimi bakterijami izločajo v okolje. Bernet in sod. (1994) so ugotovili, da je sočasna inkubacija *S. typhimurium* in *L. acidophilus* LA1 in SCS-LA1 (angl. spent culture supernatant) omejila adhezijo in invazijo salmonele na/v Caco-2 celice. Inhibicija se je povečala z večanjem koncentracije dodanih laktobacilov. Z nadaljnji študijami so ugotovili, da laktobacili brez SCS-LA1 ne preprečujejo adhezije in invazije. Predpostavlja, da ima vpliv na adhezijo in/ali invazijo protimikrobna snov iz LA1-SCS (Bernet Camard in sod., 1997).

Ugotovili smo tudi, da je adhezija bakterije *C. jejuni* na celicah bistveno večja od invazije v celice, torej je le določen odstotek pripetih bakterij sposoben vstopiti v črevesne epitelijske celice. Zaščitna vloga probiotičnih bakterij proti povzročiteljem bolezni prebavil in vpletene te vloge v mehanizme patogeneze se še odkrivajo. Nekateri avtorji še navajajo, da adhezijo in/ali invazijo na/v črevesne celice lahko ovira tudi izločanje površinsko aktivnih snovi določenih bakterij rodu *Lactobacillus* (Reid, 1999).

Naši rezultati kažejo, da imajo probiotične bakterije PCS 20, PCS 22 ter PCS 25 potencialne sposobnosti za zaščito celic PSI cl.1 pred negativnimi učinki *C. jejuni*. Sklepamo lahko, da bi imeli ti sevi probiotičnih bakterij podobne učinke na človeške črevesne epitelijske celice, kar bi bilo potrebno potrditi z nadaljnji raziskavami.

V laboratoriju podjetja Danisco so s protimikrobnim testiranjem probiotičnih bakterij *L. plantarum* PCS 20 in *L. plantarum* PCS 22 že dokazali protimikrobno aktivnost sevov proti bakterijam rodu *Campylobacter*. Molekularni mehanizmi preprečevanja patogeneze *C. jejuni* so še vedno neznani. Potrebne bi bile tudi dodatne raziskave, da bi ugotovili, če imajo različne kombinacije probiotičnih bakterij večji učinek na zmanjšanje adhezije in/ali invazije, kot posamezni probiotični sevi.

### 5.1.2 Živost celičnih kultur

Informacije o celičnih karakteristikah (živosti) so pomembne zato, ker z njimi vrednotimo citotoksične vplive kemikalij in drugih snovi na celično kulturo. Pri barvanju celic s KV barvilom se absorbanca pobarvanih celic ne ujema s številom živih celic, ko kultura doseže konfluentnost. Rezultati pogosto variirajo, ko celice prerastejo dno luknjice gojitvene posodice. V nekaterih primerih adherirane celice, četudi mrtve, opazimo kot viabilne, zaradi nespecifičnega testa barvanja s KV. Kljub pomanjkljivostim pa je test enostaven in daje ponovljive rezultate (Chiba in sod., 1997).

Spremljali smo delež živih epitelijskih celic po okužbi z bakterijo *C. jejuni* K49/4. Infekcijo smo izvedli z različnimi razmerji (MOI = 0,1 – 1000) bakterij in epitelijskih celic, nato smo celice pobarvali s kristal vijoličnim (KV) barvilom. Živost celičnih kultur PSI cl.1 in CLAB smo medsebojno primerjali po 48 urni sočasni inkubaciji celic s kampilobaktri, v primerjavi s kontrolnimi celicami (neinficirana celična kultura). Ker je bil citotoksičen vpliv seva *C. jejuni* K49/4 na celično kulturo PSI cl.1 večji od vpliva na celice CLAB, je ta poskus samo dodaten dokaz, da so različni celični modeli različno občutljivi na okužbe z bakterijami.

Posredno smo s tem poskusom odkrili vpliv različnih koncentracij bakterije *C. jejuni* v inokulumu na živost celičnih kultur. Na celicah PSI cl.1 je bilo zmanjšanje živosti izrazito že pri nizkem razmerju MOI (Prilogi I1 in I2). Predvidevamo, da bakterija *C. jejuni* po invaziji v celico sprožijo citotoksičen celični odgovor. Tudi nekateri drugi avtorji so opazili optimalno invazijo bakterij *Campylobacter*, že pri nizkih uporabljenih koncentracijah inokuluma oz. pri nizkem MOI (Hu in Kopecko, 1999; Mooney in sod., 2003; Friis in sod., 2005).

S poskusi citotoksičnega vpliva bakterij *C. jejuni* na celice smo dokazali, da je celična kultura PSI cl.1 bolj občutljiva za okužbo z bakterijami *C. jejuni* kot celična kultura CLAB in zato je tudi bolj primerna za študije interakcij bakterij s celičnimi modeli epitelijskih črevesnih celic.

## 5.2 SKLEPI

Iz dobljenih rezultatov raziskave lahko podamo naslednje sklepe:

- Bakterija *Campylobacter jejuni* K49/4 se veže na prašičje črevesne epitelijske celice PSI cl.1 *in vitro* in vanje tudi prehaja.
- Celični model črevesnih epitelijskih celic PSI cl.1 je bolj občutljiv na okužbo z bakterijo *C. jejuni* od celičnega modela CLAB.
- Učinki sočasno inkubiranih probiotičnih bakterij rodu *Lactobacillus* na zmanjšanje adhezije in invazije seva *C. jejuni* K49/4 na/v prašičjih črevesnih epitelijskih celicah PSI cl.1 in CLAB so sevno specifični in kratkotrajni.

Diplomsko delo smo izvedli v okviru projekta “PathogenCombat”.

## 6 POVZETEK

Prebavila človeka so zapleten ekosistem, kjer prihaja do zelo pomembnih interakcij med epitelijskimi celicami in mikrobeno združbo. Črevesni epitelij je prva obramba gostitelja in je dnevno izpostavljen množici nevarnih snovi od kemikalij, imunskih molekul, raznih oblik stresa, potencialno škodljivih mikrobov do njihovih produktov. Okužba črevesnih epitelijskih celic s *C. jejuni* pri ljudeh lahko povzroči vnetje črevesa, ki se v redkih primerih lahko razvije v avtoimunsko obliko bolezni, ki napada živčno mišični sistem. Tako imenovana kampilobakterioza pa spada v sam vrh nalezljivih okužb, povzročenih s kontaminirano hrano. Pomembno vlogo pri okužbi imajo virulentni mehanizmi *C. jejuni*, ki omogočajo vezavo bakterij na celične receptorje gostitelja. Temu sledi kolonizacija in razmnoževanje ter drugi mehanizmi, ki sodelujejo pri vstopanju bakterij v celice in izločanju toksinov. To povzroči poškodbe epitelija. Vse več strokovnjakov se ukvarja z raziskovanjem učinka določenih živil oz. njenih sestavin na zdravje potrošnika. Eni izmed teh so probiotiki, definirani kot živi mikroorganizmi, ki ob zaužitju v zadostni količini naselijo črevesje in pozitivno delujejo na zdravje gostitelja z učinki, ki presegajo učinke osnovnih hranil. Namen naloge je bil preveriti, če probiotične bakterije rodu *Lactobacillus* lahko zaščitijo črevesne epitelijske celice pred negativnimi vplivi bakterije *C. jejuni* K49/4 na modelu prašičjih črevesnih epitelijskih celic *in vitro*. Ugotovili smo, da imajo določeni sevi probiotičnih bakterij inhibitoren učinek na bakterijo *C. jejuni*. Sev *L. plantarum* PCA 236 je oviral adhezijo bakterije *C. jejuni* in tudi vplival na kasnejšo rast bakterije na celicah PSI cl.1. Sev *L. gasseri* PCA 185 ter sevi *L. plantarum* (PCS 20, PCS 22, PCS 25) so zmanjšali adhezijo in invazijo kampilobaktrov v celice PSI cl.1. Sev *L. plantarum* PCA 259 po 3 urah sočasne inkubacije ni oviral adhezije kampilobaktra, je pa zmanjšal invazijo v celice. Pri sočasnji izpostavitvi celic CLAB bakterijam *C. jejuni* in probiotikom *L. plantarum* (PCS 20, PCS 22, PCS 25) ter *L. gasseri* PCA 185 smo ugotovili oviranje adhezije in zaznali le minimalno število znotrajceličnih *C. jejuni*. Sklepamo, da je celični model CLAB manj občutljiv na infekcije patogenih bakterij kot celični model PSI cl.1, čeprav sta izolirana iz istega tkiva. Celični model PSI cl. je bolj primeren za študije interakcij gostitelj-patogen. To smo dokazali tudi z ugotavljanjem živosti celičnih kultur. Glede na rezultate so smiselne nadaljnje raziskave učinka različnih probiotičnih kultur na bakterije *C. jejuni* in njihove virulenčne lastnosti na celičnem modelu PSI cl.1.

## 7 VIRI

Adamič J., Smole Možina S., Jeršek B. 2003. Vloga in pomen mikroorganizmov v živilih in taksonomija. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 1-45.

Alakomi H-L., Skyttä E., Saarela M., Matilla-Sandholm T., Latva-Kala K., Helander I.M. 2000. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting outer membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2001-2005.

Albert M.J., Haridas S., Steer D., Dhaunsi G.S., Smith A.I., Adler B. 2007. Identification of a *Campylobacter jejuni* protein that cross-react with cholera toxin. *Infection and Immunity*, 75: 3070-3073.

Alter T., Bori A., Hamed A., Ellerbroek L., Fehlhaber K. 2006. Influence of inoculation levels and processing parameters on the survival of *Campylobacter jejuni* in German style fermented turkey sausages. *Food Microbiology*, 23: 701-707.

Ammor S., Tauveron G., Dufour E., Chevallier I. 2006. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility – screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control*, 17: 454-461.

Andlović A. 2002. Kampilobakterji. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 217-224.

Avonts L., Van Uytven E., De Vuyst L. 2004. Cell growth and bacteriocin production of probiotic *Lactobacillus* strains in different media. *International Diary Journal*, 14: 947-955.

Babakhani F.K., Bradley G.A., Joens L.A. 1993. Newborn piglet model for campylobacteriosis. *Infection and Immunity*, 61: 3466-3475.

Beachey E.H. 1981. Bacterial adherence: adhesin – receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *Journal of Infectious Diseases*, 143: 325-345.

Bernardeau M., Vernoux J.P., Henri-Dubernet S., Guéguen M. 2007. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactobacillus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126: 278-285.

- Bernet M.F., Brassart D., Nesser J.R., Servin A.L. 1994. *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut*, 35: 483-489.
- Bernet-Camard M.F., Liévin V., Brassart D., Nesser J.R., Servin A.L., Hudault S. 1997. The human *Lactobacillus acidophilus* strain LA1 secretes a nonbacteriocin antibacterial substance(s) active in vitro and in vivo. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 2747-2753.
- Biblioni R., Pérez P.F., De Antoni G.L. 1999. Will a high adhering capacity in a probiotic strain guarantee exclusion of pathogens from intestinal epithelia? *Anaerobe*, 5: 519-524.
- Blaser M.J., Hardesty H.L., Powers B., Wand W-L.L. 1980. Survival of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* in biological milieus. *Journal of Clinical Microbiology*, 11: 309-313.
- Bogovič Matijašić B., Narat M., Zorič M. 2003. Adhesion of two *Lactobacillus gasseri* probiotic strains on Caco-2 cells. *Food Technology and Biotechnology*, 41: 83-88
- Bogovič Matijašić B., Narat M., Zorič Petrel M., Rogelj I. 2006. Ability of *Lactobacillus gasseri* K7 to inhibit *Escherichia coli* adhesion *in vitro* on Caco-2 cells and *ex-vivo* on pigs' jejunal tissue. *International Journal of Food Microbiology*, 107: 92-96.
- Bogovič Matijašić B., Koman Rajšp M., Perko B., Rogelj I. 2007. Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in cheese by *Lactobacillus gasseri*. *International Dairy Journal*, 17: 157-166.
- Botić T., Klingberg T.D., Weingartl H., Cencič A. 2007. A novel eukaryotic cell culture model to study antiviral activity of potential probiotic bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 115: 227-234.
- Brás A.M., Ketley J.M. 1999. Transcellular translocation of *Campylobacter jejuni* across human polarised epithelial monolayers. *FEMS Microbiology Letters*, 179: 209-215.
- Cappelier J.M., Magras C., Jouve J.L, Federighi M. 1999. Recovery of viable but non-culturable *Campylobacter jejuni* cells in two animal models. *Food Microbiology*, 16: 375-383.
- Carvalho A.C.T., Ruiz-Palacios G.M., Ramos-Cervantes P., Cervantes L.E., Jiang X., Pickering L.K. 2001. Molecular characterization of invasive and noninvasive

*Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates. Journal of Clinical Microbiology, 39: 1353-1359.

Chiba K., Kawakami K., Tohyama K. 1997. Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. Toxicology *in vitro*, 12: 251-258.

Coconnier M-H., Bernet M-F., Kerneis S., Chauvire G., Servin A.L., 1993. Inhibition of adhesion of enteroinvasive pathogens in human intestinal Caco-2 by *Lactobacillus acidophilus* strain LB decreases bacterial invasion. FEMS Microbiology Letters, 110: 299-306.

Collado M.C., Meriluoto J., Salminen S. 2007a. *In vitro* analysis of probiotic strain combinations to inhibit pathogen adhesion to human intestinal mucus. Food Research International, 40: 629-636.

Collado M.C., Meriluoto J., Salminen S. 2007b. Measurement of aggregation properties between probiotics and pathogens: *In vitro* evaluation of different methods. Journal of Microbiological Methods, 71: 71-74.

Cooper G.M. 2000. The cell: a molecular approach. 2<sup>nd</sup> ed. Washington DC, ASM Press: 571-607.

Corry J.E.L., James S.J., Purnell G., Barbedo-Pinto C.S., Chochois Y., Howell M., James C. 2007. Surface pasteurisation of chicken carcasses using hot water. Journal of Food Engineering, 79: 913-919.

Crushell E., Harty S., Sharif F., Bourke B. 2004. Enteric *Campylobacter*: Purging its secrets. International Pediatric Research Foundation, 55: 3-12.

Daeschel M.A. 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. Food Technolgy, 43: 164–166.

Diergaardt S.M., Venter S.N., Spreeth A., Theron J., Brözel. 2004. The occurrence of campylobacters in water sources in South Africa. Water Research, 38: 2589-2595.

Doyle M.P., Roman D.J. 1982. Response of *Campylobacter jejuni* to sodium chloride. Applied and Environmental Microbiology, 43: 561-565.

de Melo M., Pechère J-C. 1990. Identification of *Campylobacter jejuni* surface proteins that bind to eucaryotic cells *in vitro*. Infection and Immunity, 58: 1749-1756

EFSA. 2006. Campylobacteriosis overtakes salmonellosis as the most reported animal infection transmitted to humans in the EU. Palermo, EFSA - European Food Safety Authority

[http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa\\_locale-1178620753812\\_1178620787477.htm](http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1178620787477.htm)

(marec 2009): 1str.

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. Palermo, EFSA - European Food Safety Authority

[http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/DocumentSet/Zoon\\_report\\_2006\\_en,0.pdf?ssbinary=true](http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/DocumentSet/Zoon_report_2006_en,0.pdf?ssbinary=true) (april 2009): 6 str.

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

[http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/DocumentSet/Slovenia\\_2007.pdf?ssbinary=true](http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/DocumentSet/Slovenia_2007.pdf?ssbinary=true) (april 2009): 203 str.

Ennahar S., Sashihara T., Sonomoto K., Ishizaki A. 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. FEMS Microbiology Reviews, 24: 85-106.

Everest P.H., Goossens H., Butzler J.P., Lloyd D., Knutton S., Ketley J.M., Williams P.H. 1992. Differentiated Caco-2 cells as a model for enteric invasion by *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. Journal of Medical Microbiology, 37: 319–325.

Fajdiga S. 2006. Vpliv sevov iz rodov *Salmonella* in *Lactobacillus* na raven izražanja interleukina 8 in proteina toplotnega stresa 70 v celicah Caco-2. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 123 str.

Federighi M., Magras C., Pilet M.F., Woodward D., Johnson W., Juglau F., Jouve J.L. 1999. Incidence of thermotolerant *Campylobacter* in foods assessed by NF ISO 10272 standard: results of a two-year study. Food Microbiology, 16: 195-204.

Fooks L.J, Gibson G.R. 2002. *In vitro* investigations of effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens. FEMS Microbiology Ecology, 39: 67-75.

- Forestier C., De Champs C., Vatoux C., Joly B. 2001. Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Research in Microbiology*, 152: 167-173.
- Freshney R.L. 2000. Culture of animal cells: A manual basic technique. 4<sup>th</sup> ed. New York, Wiley-Liss: 577 str.
- Friis L.M., Pin C., Pearson B.M., Wells J.M. 2005. *In vitro* cell culture methods for investigating *Campylobacter* invasion mechanisms. *Journal of Microbiological Methods*, 61: 145-160.
- Frost J.A. 2001. Current epidemiological issues in human campylobacteriosis. *Journal of Applied Microbiology*, 90: 85S-95S.
- Gan B.S., Kim J., Reid G., Cadieux P., Howard J.C. 2002. *Lactobacillus fermentum* RC-14 inhibits *Staphylococcus aureus* infection of surgical implants in rats. *Journal of Infectious Diseases*, 185: 1369-1372.
- Gradišnik L., Filipič B., de Vaureix C., Lefevre F., La Bonnardiere C., Cencic A. 2006. Establishment of a functional cell culture model of the pig small intestine. *Altex*, 23: 94.
- Grant C.C.R., Konkel M.E., Witold Cieplak J.R., Tompkins L.S. 1993. Role of flagella in adherence, internalization, and translocation of *Campylobacter jejuni* in nonpolarized and polarized epithelial cells. *Infection and Immunity*, 61: 1764-1771.
- Gueimonde M., Jalonen L., He F., Hiramatsu M., Salminen S. 2006. Adhesion and competitive inhibition and displacement of human enteropathogens by selected lactobacilli. *Food Research International*, 39: 467-471.
- Guerry P. 2007. *Campylobacter* flagella: not just motility. *Trends in Microbiology*, 15: 456-461.
- Hänel I., Müller J., Mülle W., Schulze F. 2004. Correlation between invasion of Caco-2 eukaryotic cells and colonization ability in the chick gut in *Campylobacter jejuni*. *Veterinary Microbiology*, 101: 75-82.
- Hendrixson D.R., DiRita V.J. 2004. Identification of *Campylobacter jejuni* genes involved in commensal colonization of the chick gastrointestinal tract. *Molecular Microbiology*, 52: 471-484.

- Herreros M.A., Sandoval H., González L., Castro J.M., Fresno J.M., Tornadijo M.E. 2005. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armando cheese (a Spanish goats' milk cheese). *Food Microbiology*, 22: 455-459.
- Hickey T.E., McVeigh A.L., Scott D.A., Michielutti R.E., Bixby A., Carroll S.A., Bourgeois A.L., Guerry P. 2000. *Campylobacter jejuni* Cytolethal Distending Toxin mediates release of interleukin-8 from intestinal epithelial cells. *Infection and Immunity*, 68: 6535-6541.
- Hidalgo I.J., Raub T.J., Borchardt R.T. 1989. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*, 96: 736-49.
- Hirano J., Yoshida T., Sugiyama T., Koide N., Mori I., Yokochi T. 2003. The effect of *Lactobacillus rhamnosus* on enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection of human intestinal cells *in vitro*. *Microbial Immunity*, 47: 405-409.
- Holzapfel W.H., Haberer P., Snel J., Schillinger U., Huis in't Veld J.H.J. 1998. Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 41: 85-101.
- Hu L., Kopecko D.J. 1999. *Campylobacter jejuni* 81-176 associates with microtubules and dynein during invasion of human intestinal cells. *Infection and Immunity*, 67: 4171-4182.
- Hudault S., Liévin V., Bernet-Camard M-F., Servin A.L. 1997. Antagonistic activity exerted *in vitro* and *in vivo* by *Lactobacillus casei* (Strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 infection. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 513-518.
- Hugdahl M.B., Beery J.T., Doyle M.P. 1988. Chemotactic behavior of *Campylobacter jejuni*. *Infection and Immunity*, 56: 1560-1566.
- Ishiwata A., Ohta S., Ito Y. 2006. A stereoselective 1,2-cis glycosylation toward the synthesis of a novel N-linked glycan from the Gram-negative bacterium, *Campylobacter jejuni*. *Carbohydrate Research*, 341: 1557-1573.
- Isolauri E., Salminen S., Ouwehand A.C. 2004. Probiotics. *Best Practice & Clinical Gastroenterology*, 18: 299-313.
- Jin S., Song Y.C., Emili A., Sherman P.M., Chan V.L. 2003. JlpA of *Campylobacter jejuni* interacts with surface-exposed heat shock protein 90 $\alpha$  and triggers signaling pathways

leading to the activation of NF-κB and p38 MAP kinase in epithelial cells. *Cellular Microbiology*, 5: 165-174.

Keener K.M., Bashor M.P., Sheldon B.W., Katharou S. 2004. Comprehensive review of *Campylobacter* and poultry processing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3: 105–116.

Kelle K., Pagés J-M., Bolla J-M. 1998. A putative adhesin gene cloned from *Campylobacter jejuni*. *Research in Microbiology*, 149: 723-733.

Kelly A.F., Park S.F., Bovill R., Mackey B.M. 2001. Survival of *Campylobacter jejuni* during stationary phase: evidence for the absence of a phenotypic stationary-phase response. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2248–2254.

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

Klančnik A. 2006. Odziv bakterij *Campylobacter jejuni* na temperaturni in oksidativni stres. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni podiplomski študij biotehnologije : 136 str.

Klančnik A., Zorman T., Smole Možina S. 2008. The effect of low temperature, starvation and oxidative stress on physiology of *Campylobacter jejuni* cells. *Croatica Chemica Acta*, 81: 41-46.

Klingberg T.D., Pedersen M.H., Cencič A., Budde B.B., 2005. Application of measurements of transepithelial electrical resistance of intestinal epithelial monolayers to evaluate probiotic activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 7528-7530.

Konkel M.E., Joens L.A. 1989. Adhesion to and invasion of HEp-2 cells by *Campylobacter* spp. *Infection and Immunity*, 57: 2984–2990.

Konkel M.E., Hayes S.F., Joens L.A., Cieplak Jr W. 1992. Characteristics of the internalization and intracellular survival of *Campylobacter jejuni* in human epithelial cell cultures. *Microbial Pathogenesis*, 13: 357-370.

Konkel M.E., Gray S.A., Kim B.J., Garvis S.G., Yoon J. 1999a. Identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* based on the *cadF* virulence gene and its product. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 510-517.

- Konkel M.E., Kim B.J., Rivera-Amill V., Garvis S.G. 1999b. Bacterial secreted proteins are required for the internalization of *Campylobacter jejuni* into cultured mammalian cells. *Molecular Microbiology*, 32: 691-701.
- Konkel M.E., Joens L.A., Mixter P.F. 2000. Molecular characterization of *Campylobacter jejuni* virulence determinants. V: *Campylobacter*. 2<sup>nd</sup> ed. Nachamkin I., Blaser M.J. (eds.). Washington DC, American Society of Microbiology: 217–240.
- Konkel M.E., Monteville M.R., Rivera-Amill V., Joens L.A. 2001. The pathogenesis of *Campylobacter jejuni*-mediated enteritis. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 2: 55-71.
- Konkel M.E., Monteville M.R., Klena J.D., Joens L.A. 2003. *In vitro* and *In vivo* models used to study *Campylobacter jejuni* virulence properties. V: *Microbial food safety in animal agriculture: current topics*. Torrence E.M., Isaacson R.E. (eds.). Iowa, Iowa State Press: 195-199.
- Konkel M.E., Christensen J.E., Singh Dillon A., Lane A.B., hare-sanford R., Schaberg D.M., Larson C.L. 2007. *Campylobacter jejuni* strains compete for colonization in broiler chicks. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 2297-2305.
- Kopecko D.J., Hu L., Zaal J.M. 2001. *Campylobacter jejuni* – microtubule dependent invasion. *Trends in Microbiology*, 9: 3666-3672.
- Košmelj K. 2001. Uporabna statistika. Ljubljana, Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani: 249 str.
- Lee Y.K., Lim C.Y., Teng W.L., Ouwehand A.C., Tuomola E.M., Salminen S. 2000. Quantitve approach in the study of adhesion of lactic acid bacteria to intestinal cells and their competition with enterobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 3692-3697.
- Lengsfeld C., Faller G., Hensel A. 2007. Okra polysaccharides inhibit adhesion of *Campylobacter jejuni* to mucosa isolated from poultry *in vitro* but not *in vivo*. *Animal Feed Science and Technology*, 135: 113-125.
- Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2000. Brock biology of microorganisms. 9<sup>th</sup> ed. Upper Saddle River, NJ, Prentice-Hall, Pearson Education International: 504 str.

- Mamelli L., Pagés J-M., Konkel M.E., Bolla J-M. 2006. Expression and purification of native and truncated forms of CadF, an outer membrane protein of *Campylobacter*. International Journal of Biological Macromolecules, 39: 135-140.
- Maridor Ml.L., Denis M., Lalande F., Beaurepaire B., Cariolet R., Fraval P., Federighi M., Seegers H., Belloc C. 2008. Experimental infection of specific pathogen-free pigs with *Campylobacter*: excretion in faeces and transmission to non-inoculated pigs. Veterinary Microbiology, 131: 309-313.
- Martínez-Rodrigues A., Kelly A.F., Park S.F., Mackay B.M. 2004. Emergence of variants with altered survival properties in stationary phase cultures of *Campylobacter jejuni*. International Journal of Food Microbiology, 90: 321-329.
- Mihaljević R.R., Šikić M., Klančnik A., Brumini G., Možina S.S., Abram M. 2007. Environmental stress factors affecting survival and virulence of *Campylobacter jejuni*. Microbial Pathogenesis, 43: 120–125.
- Monteville M.R., Konkel M.E. 2002. Fibronectin-facilitated invasion of T84 eukaryotic cells by *Campylobacter jejuni* occurs preferentially at the basolateral cell surface. Infection and Immunity, 70: 6665-6671.
- Monteville M.R., Yoon J.E., Konkel M.E. 2003. Maximal adherence and invasion of INT 407 cells by *Campylobacter jejuni* requires the CadF outer-membrane protein and microfilament reorganization. Microbiology, 149: 153– 165.
- Mooney A., Byrne C., Clyne M., Johnson-Henry K., Sherman P., Bourke B. 2003. Invasion of human epithelial cells by *Campylobacter upsaliensis*. Cellular Microbiology, 5: 835-847.
- 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.
- Murphy C., Carroll C., Jordan K.N. 2003. Identification of a novel stress resistance mechanism in *Campylobacter jejuni*. Journal of Applied Microbiology, 95: 704-708.
- Murphy C., Carroll C., Jordan K.N. 2006. Environmental survival mechanisms of the food borne pathogen *Campylobacter jejuni*. Journal of Applied Microbiology, 100: 623-632.

- Müller J., Schulze F., Müller W., Hänel I. 2006. PCR detection of virulence-associated genes in *Campylobacter jejuni* strains with differential ability to invade Caco-2 cells and to colonize the chick gut. *Veterinary Microbiology*, 113: 123-129.
- Müller A., León-Kempis M. del R., Dodson E., Wilson K.S., Wilkinson A.J. Ketley D.J. 2007. A bacterial virulence factor with a dual role as an adhesin and a solute-binding protein: The crystal structure at 1,5 Å resolution of the PEB1 protein from food-borne human pathogen *Campylobacter jejuni*. *Journal of Molecular Biology*, 372: 160-171.
- Nachamkin I., Allos B.M., Ho T. 1998. *Campylobacter* species and Guillain-Barré syndrome. *Clinical Microbiology Reviews*, 11: 555 - 567.
- Nadeau E., Messier S., Quessy S. 2003. Comparison of *Campylobacter* isolates from poultry and humans: association between *in vitro* virulence properties, biotypes, and pulsed-field gel electrophoresis clusters. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 6316-6320.
- Newell D.G, Davison H.C. 2003. *Campylobacter*: control and prevention. V: Microbial food safety in animal agriculture: current topics. Torrence E.M., Isaacson R.E. (eds.). Iowa, Iowa State Press: 211.
- Noverr M.C., Huffnagle G.B. 2004. Does the microbiota regulate immune responses outside the gut? *Trends in Microbiology*, 12: 562-568.
- Ouwehand A.C., Kirjavainen P.V., Shortt C., Salminen S. 1999. Probiotics: mechanisms and established effects. *International Diary Journal*, 9: 43-52.
- Park S. F. 2002. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 74: 177-188.
- Park H., Hung Y-C., Brackett R.E. 2002. Antimicrobial effect of electrolysed water for inactivating *Campylobacter jejuni* during poultry washing. *International Journal of Food Microbiology*, 72: 77-83.
- Parkhill J., Wren B.W., Mungall K., Ketley J.M., Churcher C., Basham D., Chillingworth T., Davies R.M., Feltwell T., Holroyd S., Jagels K., Karlyshev A.V., Moule S., Pallen M.J., Penn C.W., Quail M.A., Rajandream M.A., Rutherford K.M., van Vliet A.H.M., Whitehead S., Barrell B.G. 2000. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature*, 403: 665-668.

- Pasternack M.S. 2002. Impact and management of *Campylobacter* in human medicine — US perspective. International Journal of Infectious Diseases: 6, Suppl. 3: S37–S43.
- Pei Z., Buruoa C., Gringon B., Baqar S., Huang X-Z., Kopecko D.J., Bourgeois A.L., Fauchere J-L, Blaser M.J. 1998. Mutation in the *peb1A* locus of *Campylobacter jejuni* reduces interactions with epithelial cells and intestinal colonization of mice. Infection and Immunity, 66: 938-943.
- Pesci E.C., Cottle D.L., Pickett C.L. 1994. Genetic, enzymatic, and pathogenic studies of the iron superoxide dismutase of *Campylobacter jejuni*. Infection and Immunity, 62: 2678-2694.
- Prokhorova T.A., Nielsen P.N., Petersen J., Kofoed T., Crawford J.S., Morsczeck C., Boysen A., Schrotz-King P. 2006. Novel surface polypeptides of *Campylobacter jejuni* as traveller's diarrhoea vaccine candidates discovered by proteomics. Vaccine, 24: 6446-6455.
- Purdy D., Park S.F. 1994. Cloning, nucleotide sequence, and characterization of a gene encoding superoxide dismutase from *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Microbiology, 140: 1203-1208.
- Radšel-Medvešček A. 2002. Kampilobakterioza. V: Infekcijske bolezni. Marolt-Gomišček M., Radšel-Medvešček A. (ur). Ljubljana, Tangram: 109.
- Reid G. 1999. The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. Applied and Environmental Microbiology, 9: 3763-3766.
- Rivera-Amill V. Kim B.J., Seshu J., Konkel M. E. 2001. Secretion of the virulence-associated *Campylobacter* invasion antigens from *Campylobacter jejuni* requires a stimulatory signal. Journal of Infectious Diseases, 183: 1607-1616.
- Rogelj I. 2001. Probiotiki v vlogi prehranskih dopolnil in zdravil. V: Prehranska dopolnila - zdravila ali hrana. Mlinarič A., Kristl J. (ur). Ljubljana, Fakulteta za farmacijo: 105-115.
- Saarela M., Mogensen G., Fondén R., Mättö J., Mattila-Sandholm T. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. Journal of Biotechnology, 84: 197-215.

- Saarela M., Lähteenmäki L., Crittenden R., Salminen S., Mattila-Sandholm T. 2002. Gut bacteria and health foods – the European perspective. International Journal of Food Microbiology, 78: 99-117.
- Salminen S., von Wright A., Morelli L., Marteau P., Brassart D., de Vos W. M., Fondén R., Saxelin M., Collins K., Mogensen G., Birkeland S-T., Mattila-Sandholm T. 1998. Demonstration of safety of probiotics – a review. International Jouranl of Food Microbiology, 44: 93-106.
- Scibelli A., Roperto S., Manna L., Pavone L.M., Tafuri S., Della Morte R., Staiano N. 2007. Engagement of integrins as a cellular route of invasion by bacterial pathogens. Veterinary Journal, 173: 482-491.
- Servin A.L. 2004. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. FEMS Microbiology Reviews, 28: 405-440.
- Shin E., Lee Y. 2007. Antimicrobial resistance of 114 porcine isolates of *Campylobacter coli*. International Journal of Food Microbiology, 118: 223-227.
- Skirrow M.B. 1977. *Campylobacter enteritis*: a »new« disease. British Medical Journal, 2: 9-11.
- Snelling W.J., Matsuda M., Moore J.E., Dooley J.S., G. 2005. Under the microscope: *Campylobacter jejuni*. Letters in AppliedApplied Microbiology, 41: 297-302.
- Solomon E.B., Hoover D.G. 1999. *Campylobacter jejuni*: a bacterial paradox. Journal of Food Safety, 19: 121-136.
- Stiles M.E., Holzapfel W.H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. International Journal of Food Microbiology, 36: 1-29.
- Szymanski C.M., King M., Haardt M., Armstrong G. D. 1995. *Campylobacter jejuni* motility and invasion of Caco-2 Cells. Infection and Immunity, 63: 4295-4300.
- Szymanski C.M., Burr D.H., Guerry P. 2002. *Campylobacter* protein glycosylation affects host cell interactions. Infection and Immunity, 70: 2242-2244.
- Šikić M. 2007. Vpliv bakterijskega stresa na adhezivnost, invazivnost ter znotrajcelično preživelost in rast bakterij *Campylobacter* v celičnem modelu makrofagov J774 in celic Caco-2. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 108 str.

- Šikić Pogačar M., Rubeša Mihaljević R., Klančnik A., Brumini G., Abram M., Smole Možina S. 2009. Survival and stress exposed *Campylobacter jejuni* in the murine macrophage J774 cell line. International Journal of Food Microbiology, 129: 68-73.
- Todoriki K., Mukai T., Sato S., Toba T. 2001. Inhibition of adhesion of food-borne pathogens to Caco-2 cells by *Lactobacillus* strains. Journal of Applied Microbiology, 91: 154-159.
- Trachoo N. 2003. *Campylobacter jejuni* : An emerging pathogen. Songklanakarin Journal of. Science and Technology, 25: 141-157
- Tsai C.C., Hsieh H-Y., Chiu H-H., Lai Y-Y., Liu J-H., Yu B., Tsen H-Y. 2005. Antagonistic activity against *Salmonella* infection in vitro and in vivo for two *Lactobacillus* strains from swine and poultry. International Journal of Food Microbiology, 12: 185-194.
- Tuomola E. M., Salminen S. J. 1998. Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. International Journal of Food Microbiology, 41: 45-51.
- van Belkum M.J., Stiles M.E. 2000. Nonlantibiotic antibacterial peptides from lactic acid bacteria. Natural Product Reports, 17: 323-335.
- van Vliet A.H., Ketley J.M. 2001. Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. Journal of Applied Microbiology, 90: 45S-56S.
- Veranič P., Pšeničnik M., Romih R., Sterle M., Kralj M. 2000. Osnove celične biologije z navodili za vaje. 4. izd. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 53-58.
- Wassenaar T.M., Bleumink-Pluym N.M.C., van der Zeijst B.A.M. 1991. Inactivation of *Campylobacter jejuni* flagelin genes by homologous recombination demonstrates that *flaA* but not *flaB* is required for invasion. EMBO Journal, 10: 2055-2061.
- Wassenaar T.M. 1997. Toxin production by *Campylobacter* spp. Clinical Microbiology Reviews, 10: 466-476.
- Wassenaar T.M., Blaser M.J. 1999. Pathophysiology of *Campylobacter jejuni* infections of humans. Microbes and Infection, 1: 1023-1033.
- Wessels S., Axelsson L., Hansen E.B., De Vuyst L., Laulund S., Lähteenmäki L., Lindgren S., Mollet B., Salminen S., von Wright A. 2004. The lactic acid bacteria, the food chain, and their regulation. Trends in Food Science and Technology, 15: 498-505.

Woolridge K.G, Ketley J.M. 1997. *Campylobacter*-host cell interactions. Trends in Microbiology, 5:96-102.

Wurm F.M. 1999. Chinese hamster ovary cells, recombinant protein production. V: Encyclopedia of bioprocess technology. Vol.1. Fermentation, biocatalysis nad bioseparation. Flickinger M.C., Drew S.W. (eds). New York, Yohn Wiley and Sons: 570-580.

Yan S.S., Pendrak M.L., Foley S.L., Powers J.H. 2005. *Campylobacter* infection and Guillain-Barré syndrome: public health concerns from a microbial food safety perspective. Clinical and Applied Immunology Reviews, 5: 285-305.

Young K.T., Davis L.M., DiRita V.J. 2007. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. Nature Reviews Microbiology, 5: 665-679.

Zakeri Z.F., Ahuja H.S. 1997. Cell death/apoptosis: normal, chemically induced, and teratogenic effect. Mutation Research, 396: 149-161.

Zhang Q., Meitzler J.C., Huang S., Morishita T. 2000. Sequence polymorphism, predicted secondary structures, and surface-exposed conformational epitopes of *Campylobacter* major outer membrane protein. Infection and Immunity, 58: 5679-5689.

Ziprin R.L., Young C.R., Stanker L.H., Hume M.E., Konkel M.E. 1999. The absence of cecal colonization of chicks by a mutant of *Campylobacter jejuni* not expressing bacterial fibronectin-binding protein. Avian Diseases, 43: 586-58.

## ZAHVALA

Mentorici prof. dr. Sonji Smole Možina in somentorici prof. dr. Avreliji Cencič za vse nasvete in posvete, pripombe, opombe, strokoven pregled, predloge, potrpežljivost in spodbudo pri izdelavi in pisanju diplomskega dela. Hvala za vse!

Prof. dr. Ireni Rogelj se zahvaljujem za temeljit, strokoven in kritičen pregled diplome.

Vsem zaposlenim v laboratoriju Katedre za mikrobiologijo, molekularno biologijo, biokemijo in biotehnologijo, Fakultete za kmetijstvo in biosistemske vede, Univerze v Mariboru, kjer sem opravljala poskus, še posebej Lidiji Gradišnik za pomoč.

Prijatelji in vsi ostali, ki ste mi pomagali tako ali drugače, me spodbujali in/ali ob izdelavi moje diplome trpeli!

Mami Danici in bratu Blažu se zahvaljujem za kritike in vzpodbudo tekom življenja.

Perotu za nesebično ljubezen, podporo in »pomoč«, pri praktičnem delu diplome!

## PRILOGE

**Priloga A1:** Koncentracija bakterije ( $\log_{10}$  CFU/ml) *C. jejuni* K49/4 s ko-inkubiranimi probiotiki PCA 227, PCA 236, PCA 259, PCA 275 na celični kulturi PSI cl.1.

Čas inkubacije po izpostavitvi epitelijskih celic bakterijam	Kontrola	PCA 227 <sup>a</sup>	PCA 236 <sup>b</sup>	PCA 259 <sup>c</sup>	PCA 275 <sup>d</sup>
3 h	7,62	7,08	7,12	8,24	8,28
10 h	8,84	8,61	8,69	8,53	8,53
24 h	8,41	8,55	8,27	8,39	8,33
48 h	9,02	8,73	8,61	8,48	9,08

a 2-urna ko-inkubacija *C. jejuni* K49/4 in *L. pentosus* - PCA 227

b 2-urna ko-inkubacija *C. jejuni* K49/4 in *L. plantarum* - PCA 236

c 2-urna ko-inkubacija *C. jejuni* K49/4 in *L. plantarum* - PCA 259

d 2-urna ko-inkubacija *C. jejuni* K49/4 in *L. plantarum* - PCA 275

**Priloga A2:** Adhezija (%) bakterije *C. jejuni* K49/4 s ko-inkubiranimi probiotiki PCA 227, PCA 236, PCA 259, PCA 275 na celični kulturi PSI cl.1.

	Kontrola	PCA 227 <sup>a</sup>	PCA 236 <sup>b</sup>	PCA 259 <sup>c</sup>	PCA 275 <sup>d</sup>
Adhezija (%)	0,92	0,26	0,29	3,77	4,17

a 2-urna ko-inkubacija *C. jejuni* K49/4 in *L. pentosus* - PCA 227

b 2-urna ko-inkubacija *C. jejuni* K49/4 in *L. plantarum* - PCA 236

c 2-urna ko-inkubacija *C. jejuni* K49/4 in *L. plantarum* - PCA 259

d 2-urna ko-inkubacija *C. jejuni* K49/4 in *L. plantarum* - PCA 275

Povprečna koncentracija bakterije *C. jejuni* K49/4 v inokulumu je znašala  $9,66 \log_{10}$  (CFU/ml).

**Priloga B1:** Koncentracija bakterije ( $\log_{10}$  CFU/ml) *C. jejuni* K49/4 s ko-inkubiranimi probiotiki PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCA 185 na celični kulturi PSI cl.1.

Čas inkubacije po izpostavitvi epitelijskih celic bakterijam	Kontrola	PCS 20 <sup>a</sup>	PCS 22 <sup>b</sup>	PCS 25 <sup>c</sup>	PCA 185 <sup>d</sup>
3 h	7,83	7,51	5,88	6,24	6,48
10 h	8,56	8,16	8,11	8,00	8,53
24 h	8,25	8,18	8,47	8,07	8,71
48 h	8,73	9,20	9,11	8,91	9,10

a 2-urna ko-inkubacija *C. jejuni* K49/4 in *L. plantarum* - PCS 20

b 2-urna ko-inkubacija *C. jejuni* K49/4 in *L. plantarum* - PCS 22

c 2-urna ko-inkubacija *C. jejuni* K49/4 in *L. plantarum* - PCS 25

d 2-urna ko-inkubacija *C. jejuni* K49/4 in *Lb. gasseri* - PCA 185

**Priloga B2:** Adhezija bakterije (%) *C. jejuni* K49/4 s ko-inkubiranimi probiotiki PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCA 185 na celični kulturi PSI cl.1.

	Kontrola	PCS 20 <sup>a</sup>	PCS 22 <sup>b</sup>	PCS 25 <sup>c</sup>	PCA 185 <sup>d</sup>
Adhezija (%)	2,04	0,97	0,02	0,05	0,09

a 2-urna ko-inkubacija *C. jejuni* K49/4 in *L. plantarum* - PCS 20

b 2-urna ko-inkubacija *C. jejuni* K49/4 in *L. plantarum* - PCS 22

c 2-urna ko-inkubacija *C. jejuni* K49/4 in *L. plantarum* - PCS 25

d 2-urna ko-inkubacija *C. jejuni* K49/4 in *Lb. gasseri* - PCA 185

Povprečna koncentracija bakterije *C. jejuni* K49/4 v inokulumu je znašala 9,52 log (CFU/ml).

**Priloga C1:** Koncentracija bakterije ( $\log_{10}$  CFU/ml) *C. jejuni* K49/4 s ko-inkubiranimi probiotiki PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCA 185 na celični kulturi CLAB.

Čas inkubacije po izpostavitvi epitelijskih celic bakterijam	Kontrola	PCS 20 <sup>a</sup>	PCS 22 <sup>b</sup>	PCS 25 <sup>c</sup>	PCA 185 <sup>d</sup>
3 h	8,38	6,88	6,78	6,88	7,18
10 h	8,44	8,48	8,26	7,78	7,96
24 h	8,01	8,32	8,56	8,18	8,14
48 h	8,12	8,48	8,53	8,35	8,18

a 2-urna ko-inkubacija *C. jejuni* K49/4 in *L. plantarum* - PCS 20

b 2-urna ko-inkubacija *C. jejuni* K49/4 in *L. plantarum* - PCS 22

c 2-urna ko-inkubacija *C. jejuni* K49/4 in *L. plantarum* - PCS 25

d 2-urna ko-inkubacija *C. jejuni* K49/4 in *Lb. gasseri* - PCA 185

**Priloga C2:** Adhezija bakterije (%) *C. jejuni* K49/4 s ko-inkubiranimi probiotiki PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCA 185 na celični kulturi CLAB.

	Kontrola	PCS 20 <sup>a</sup>	PCS 22 <sup>b</sup>	PCS 25 <sup>c</sup>	PCA 185 <sup>d</sup>
Adhezija (%)	4,00	0,13	0,10	0,13	0,25

a 2-urna ko-inkubacija *C. jejuni* K49/4 in *L. plantarum* - PCS 20

b 2-urna ko-inkubacija *C. jejuni* K49/4 in *L. plantarum* - PCS 22

c 2-urna ko-inkubacija *C. jejuni* K49/4 in *L. plantarum* - PCS 25

d 2-urna ko-inkubacija *C. jejuni* K49/4 in *Lb. gasseri* - PCA 185

Povprečna koncentracija bakterije *C. jejuni* K49/4 v inokulumu je znašala 9,78 log (CFU/ml).

**Priloga D1:** Koncentracija bakterije ( $\log_{10}$  CFU/ml) *C. jejuni* K49/4 s ko-inkubiranimi probiotiki PCA 227, PCA 236, PCA 259, PCA 275 v celični kulturi PSI cl.1 (z gentamicinom).

Čas inkubacije po izpostavitvi epitelijskih celic bakterijam	Kontrola	PCA 227 <sup>a</sup>	PCA 236 <sup>b</sup>	PCA 259 <sup>c</sup>	PCA 275 <sup>d</sup>
3 h	6,29	6,94	6,80	6,18	6,62
10 h	7,56	6,05	7,54	7,15	7,26
24 h	6,37	5,80	5,50	6,18	6,52
48 h	6,24	4,80	4,82	4,73	5,38

a 2-urna ko-inkubacija *C. jejuni* K49/4 in *L. pentosus* - PCA 227

b 2-urna ko-inkubacija *C. jejuni* K49/4 in *L. plantarum* - PCA 236

c 2-urna ko-inkubacija *C. jejuni* K49/4 in *L. plantarum* - PCA 259

d 2-urna ko-inkubacija *C. jejuni* K49/4 in *L. plantarum* - PCA 275

**Priloga D2:** Invazija bakterije (%) *C. jejuni* K49/4 s ko-inkubiranimi probiotiki PCA 227, PCA 236, PCA 259, PCA 275 v celični kulturi PSI cl.1.

	Kontrola	PCA 227 <sup>a</sup>	PCA 236 <sup>b</sup>	PCA 259 <sup>c</sup>	PCA 275 <sup>d</sup>
Invazija (%)	0,0428	0,1908	0,1382	0,0329	0,0921

a 2-urna ko-inkubacija *C. jejuni* K49/4 in *L. pentosus* - PCA 227

b 2-urna ko-inkubacija *C. jejuni* K49/4 in *L. plantarum* - PCA 236

c 2-urna ko-inkubacija *C. jejuni* K49/4 in *L. plantarum* - PCA 259

d 2-urna ko-inkubacija *C. jejuni* K49/4 in *L. plantarum* - PCA 275

**Priloga E1:** Koncentracija bakterije ( $\log_{10}$  CFU/ml) *C. jejuni* K49/4 s ko-inkubiranimi probiotiki PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCA 185 v celični kulturi PSI cl.1 (z gentamicinom).

Čas inkubacije po izpostavitvi epitelijskih celic bakterijam	Kontrola	PCS 20 <sup>a</sup>	PCS 22 <sup>b</sup>	PCS 25 <sup>c</sup>	PCA 185 <sup>d</sup>
3 h	6,38	2,89	2,89	4,00	5,00
10 h	7,08	5,92	6,27	6,08	6,26
24 h	6,16	4,78	5,78	5,16	4,78

a 2-urna ko-inkubacija *C. jejuni* K49/4 in *L. plantarum* - PCS 20

b 2-urna ko-inkubacija *C. jejuni* K49/4 in *L. plantarum* - PCS 22

c 2-urna ko-inkubacija *C. jejuni* K49/4 in *L. plantarum* - PCS 25

d 2-urna ko-inkubacija *C. jejuni* K49/4 in *Lb. gasseri* - PCA 185

**Priloga E2:** Invazija bakterije (%) *C. jejuni* K49/4 s ko-inkubiranimi probiotiki PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCA 185 v celični kulturi PSI cl.1.

	Kontrola	PCS 20 <sup>a</sup>	PCS 22 <sup>b</sup>	PCS 25 <sup>c</sup>	PCA 185 <sup>d</sup>
Invazija (%)	0,06667	0,00009	0,00009	0,00924	0,00106

a 2-urna ko-inkubacija *C. jejuni* K49/4 in *L. plantarum* - PCS 20

b 2-urna ko-inkubacija *C. jejuni* K49/4 in *L. plantarum* - PCS 22

c 2-urna ko-inkubacija *C. jejuni* K49/4 in *L. plantarum* - PCS 25

d 2-urna ko-inkubacija *C. jejuni* K49/4 in *Lb. gasseri* - PCA 185

**Priloga F1:** Koncentracija bakterije ( $\log_{10}$  CFU/ml) *C. jejuni* K49/4 s ko-inkubiranimi probiotiki PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCA 185 v celični kulturi CLAB (z gentamicinom).

Čas inkubacije po izpostavitvi epitelijskih celic bakterijam	Kontrola	PCS 20 <sup>a</sup>	PCS 22 <sup>b</sup>	PCS 25 <sup>c</sup>	PCA 185 <sup>d</sup>
3 h	2,78	2,78	0,00	0,00	0,00
10 h	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
24 h	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

a 2-urna ko-inkubacija *C. jejuni* K49/4 in *L. plantarum* - PCS 20

b 2-urna ko-inkubacija *C. jejuni* K49/4 in *L. plantarum* - PCS 22

c 2-urna ko-inkubacija *C. jejuni* K49/4 in *L. plantarum* - PCS 25

d 2-urna ko-inkubacija *C. jejuni* K49/4 in *Lb. gasseri* - PCA 185

**Priloga F2:** Invazija bakterije (%) *C. jejuni* K49/4 s ko-inkubiranimi probiotiki PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCA 185 v celični kulturi CLAB.

	Kontrola	PCS 20 <sup>a</sup>	PCS 22 <sup>b</sup>	PCS 25 <sup>c</sup>	PCA 185 <sup>d</sup>
Invazija (%)	0,00001	0,00001	0	0	0

a 2-urna ko-inkubacija *C. jejuni* K49/4 in *L. plantarum* - PCS 20

b 2-urna ko-inkubacija *C. jejuni* K49/4 in *L. plantarum* - PCS 22

c 2-urna ko-inkubacija *C. jejuni* K49/4 in *L. plantarum* - PCS 25

d 2-urna ko-inkubacija *C. jejuni* K49/4 in *Lb. gasseri* - PCA 185

**Priloga G1:** Izmerjena absorbanca ( $\lambda=600$  nm) celične kulture CLAB po 48 urah od infekcije z bakterijo *C. jejuni* K49/4.

MOI					
<b>0,1</b>	0,878	1,040	1,000	0,803	0,712
<b>1</b>	0,907	0,850	0,984	0,741	0,960
<b>10</b>	0,475	0,498	0,548	0,465	0,527
<b>100</b>	0,238	0,373	0,268	0,166	0,189
<b>500</b>	0,171	0,155	0,166	0,127	0,095
<b>1000</b>	0,098	0,136	0,126	0,140	0,083
<b>kontrola</b>	0,948	1,059	0,739	0,965	0,937

**Priloga H1:** Izmerjena absorbanca ( $\lambda=600$  nm) celične kulture PSI cl.1 po 24 urah od infekcije z bakterijo *C. jejuni* K49/4.

MOI					
<b>1</b>	1,438	1,834	1,849	1,785	1,844
<b>5</b>	0,632	0,811	0,763	0,844	0,734
<b>10</b>	0,703	0,883	0,905	0,957	0,912
<b>100</b>	0,855	0,977	0,850	1,116	1,000
<b>1000</b>	0,186	0,190	1,226	0,105	0,155
<b>kontrola</b>	1,397	1,679	1,652	1,536	1,457

**Priloga H2:** Izmerjena absorbanca ( $\lambda=600$  nm) celične kulture PSI cl.1 po 48 urah od infekcije z bakterijo *C. jejuni* K49/4.

MOI					
<b>1</b>	1,705	1,853	1,839	1,915	1,457
<b>5</b>	0,208	0,379	0,350	0,240	0,144
<b>10</b>	0,128	0,191	0,224	0,169	0,124
<b>100</b>	0,241	0,368	0,338	0,324	0,288
<b>1000</b>	0,087	0,084	0,087	0,082	0,099
<b>kontrola</b>	1,723	2,283	2,349	2,378	1,996

**Priloga I1:** Živost celične kulture (%) PSI cl.1 po 24 in 48 urah od infekcije z bakterijo *C. jejuni* K49/4.

MOI	Živost (%)	
	24 ur	48 ur
1	113	82
5	56	12
10	49	8
100	62	15
1000	11	4
kontrola	100	100

**Priloga I2:** Živost celične kulture (%) CLAB po 48 urah od infekcije z bakterijo *C. jejuni* K49/4.

MOI	Živost (%)
	48 ur
0,1	83
1	93
10	57
100	27
500	15
1000	9
kontrola	100

**Priloga J1:** Povprečna koncentracija ( $\log_{10}$  CFU/ml) probiotičnih bakterij v inokulumu za poskus na celični kulturi PSI cl.1.

Probiotični sev	Log <sub>10</sub> (CFU/ml)
PCA 227	8,45
PCA 236	9,53
PCA 259	8,71
PCA 275	9,47
PCS 20	8,19
PCS 22	7,89
PCS 25	7,91
PCA 185	8,37

**Priloga J2:** Povprečna koncentracija probiotičnih ( $\log_{10}$  CFU/ml) bakterij v inokulumu za poskus na celični kulturi CLAB.

Probiotični sev	Log <sub>10</sub> (CFU/ml)
PCS 20	7,92
PCS 22	8,39
PCS 25	8,38
PCA 185	8,38