
ONDERZOEK NAAR PROBIOTICA MET
BETREKKING TOT INFECTIEZIEKTEN
IN HET *CITROBACTER RODENTIUM*
MUISMODEL

Iris Dijkstra
S1900528

Begeleider: Dr. P. de Vos

**Wat is het effect van de behandeling met verschillende probiotica in
het *Citrobacter rodentium* muismodel en wat kan dit betekenen voor
overeenkomstige humane infectieziekten?**

RIJKSUNIVERSITEIT GRONINGEN
FACULTEIT WISKUNDE EN NATUURWETENSCHAPPEN
MAJOR BIOMEDISCHE WETENSCHAPPEN
CURSUS PATHOFYSIOLOGIE BACHERLORSRIPTIE
UNIVERSITAIR MEDISCH CENTRUM GRONINGEN NEDERLAND

09-07-2012

VOORWOORD

Om de bachelor Biologie met de majorvariant Biomedische Wetenschappen aan de Faculteit Wiskunde en Natuurwetenschappen van de Rijksuniversiteit Groningen volledig af te sluiten, werd ten slotte een bachelorscriptie geschreven in de vorm van een literatuuronderzoek. In het kader van de voorafgaande bachelor cursus Pathofysiologie Research werd het vrij gekozen onderwerp gekoppeld aan pathofysiologie. De auteur bedankt Dr. Paul de Vos voor zijn enthousiaste begeleiding tijdens het literatuuronderzoek en voor zijn en Dr. Marijke Faas' feedback op de scriptie.

SAMENVATTING

Enteropathogene Escherichia coli (EPEC) en *enterohemorragische Escherichia coli (EHEC)* zijn belangrijke bacteriële pathogenen in het maag-darmkanaal van de mens en onderzoek naar preventie of behandeling van de geassocieerde ziektebeelden is daarom essentieel. Het *Citrobacter rodentium (C. rodentium)* muismodel wordt gebruikt om *EPEC* en *EHEC* te bestuderen vanwege overeenkomstige eigenschappen, verwantschap en praktisch injectiegebruik. *C. rodentium*, *EPEC* en *EHEC* worden gerekend tot de “Attaching”/“Effacing” (A/E) pathogeenfamilie. Het doorbreken van de mucosale epitheelbarrière door deze pathogenen, wordt geassocieerd met het pathofysiologische proces van verschillende darmziekten zoals infectieuze diarree, hyperplasie en colitis.

In het maag-darmkanaal is er sprake van een symbiotische interactie tussen gastheer en microbiotica. Microbiotica zijn essentieel voor het behouden van de epitheelbarrière en spelen een rol bij het induceren van de mucosale immuunreactie. Bij infectie van *C. rodentium*, *EPEC* of *EHEC* worden aangeboren en adaptieve immuunreacties geïnduceerd. Het *C. rodentium* muismodel wordt gebruikt om de effecten van verschillende probiotica op de bacteriële infectie te onderzoeken. Probiotica worden beschouwd als een potentieel belangrijk middel om ontstekingsreacties in het maag-darmkanaal van de gastheer te reguleren. Verschillende studies wezen uit dat het toedienen van het probioticum *Lactobacillus acidophilus (L. acidophilus)*, sporen van het probioticum *Bacillus subtilis (B. subtilis)* en het probioticamengsel *Lactobacillus rhamnosus (L. rhamnosus)* en *L. acidophilus* een positief effect heeft op de preventie van de bacteriële infectie in het *C. rodentium* muismodel. De infectie met de parasitaire worm *Heligomosomoides polygyrus (H. polygyrus)* gelijktijdig met de *C. rodentium* infectie heeft dit beschermende effect niet, maar stimuleert juist het pathofysiologische proces. Positieve resultaten in *C. rodentium* muismodelstudies duiden het belang aan van onderzoek naar gebruik van probiotica bij humane patiënten. De toepassing van probioticagebruik zou een essentiële aanvulling zijn om wereldwijd *EPEC* en *EHEC* infecties te voorkomen en/of te behandelen in de toekomst.

INHOUDSOPGAVE

Voorwoord.....	2
Samenvatting.....	3
Inhoudsopgave.....	4
Inleiding.....	5
1 Microbiotica en infecties algemeen	6
1.1 Microbiotica	6
1.2 Maag-darmkanaal	6
2.3 Mucosale immuunreactie	7
2 Pathogenen en infectie pathofysiologie.....	9
2.1 Bacteriële pathogenen <i>EPEC</i> en <i>EHEC</i>	9
2.2 Muismodel <i>C. rodentium</i>	10
3 Immunologie en infectie.....	12
3.1 Aangeboren immuunreactie.....	12
3.2 Adaptieve immuunreactie.....	13
3.3 Versterking immuunsysteem.....	14
4 Probiotica en <i>C. rodentium</i>	16
4.1 Probiotica en darminfecties.....	16
4.2 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	16
4.3 <i>Bacillus subtilis</i>	17
4.4 <i>Lactobacillus rhamnosis</i> en <i>L. acidophilus</i>	19
4.5 Parasitaire wormen	20
Discussie en conclusie.....	23
Literatuurlijst.....	25

INLEIDING

Enteropathogene Escherichia coli (EPEC) en *enterohemorragische Escherichia coli (EHEC)* zijn bacteriële pathogenen in het maag-darmkanaal van de mens. *EPEC* infectie leidt tot hoge ziekte- en sterftcijfers bij kinderen wereldwijd, maar met name in ontwikkelingslanden. *EHEC* is één van de belangrijkste humane pathogenen in Noord-Amerika, Europa en Japan die via het voedsel wordt overgedragen (Luo *et al.*, 2000).

EPEC en *EHEC* zijn dus belangrijke humane pathogenen en onderzoek naar preventie of behandeling van de geassocieerde ziektebeelden is daarom essentieel. *EPEC* en *EHEC* zijn niet gemakkelijk te infecteren in laboratoriummuizen, daarom is er een *in vivo* muismodel ontwikkeld. Het *Citrobacter rodentium* (*C. rodentium*) muismodel wordt gebruikt om onder andere infecties met *EPEC* en *EHEC* te bestuderen. De afgelopen jaren is er een ware explosie geconstateerd van studies die het *C. rodentium* muismodel gebruiken. Meer dan de helft van alle artikelen ooit over *C. rodentium* geschreven zijn in de afgelopen jaren gepubliceerd (Borenshtein *et al.*, 2008).

Een evenwichtige microbiotica in het maag-darmkanaal is belangrijk voor het voorkomen van darmstoornissen en bacteriële infecties als *EPEC* en *EHEC*. Om deze reden is er steeds meer belangstelling voor de ontwikkeling van probiotische producten met levende bacteriën die de doorgang in het maag-darmkanaal overleven om vervolgens een positief effect uit te oefenen op de humane gezondheid (D'Arienzo *et al.*, 2006). Het *C. rodentium* muismodel wordt gebruikt om de effecten van verschillende probiotica op een bacteriële infectie te onderzoeken.

Het gebruik van probiotica is niet iets recent, de eerste officieel erkende probiotische producten voor humaan gebruik kwamen op de markt in de late jaren '50. Maar pas sinds de laatste jaren is de wetenschappelijke belangstelling toegenomen in vooruitstrevend onderzoek naar probiotica met betrekking tot preventie van infectieziekten (D'Arienzo *et al.*, 2006). Probiotica worden beschouwd als een potentieel belangrijk middel om ontstekingsreacties in het maag-darmkanaal van de gastheer te reguleren (Chen *et al.*, 2005B) en pathogene infecties als *EPEC* en *EHEC* te onderdrukken of verminderen (D'Arienzo *et al.*, 2006). Het *C. rodentium* muismodel is een goed onderzoeksmodel om te bestuderen of een bacteriële infectie inderdaad onderdrukt wordt of afneemt na behandeling van bepaalde probiotica.

In deze scriptie zal met behulp van de volgende subvragen het onderwerp onderzoek naar probiotica met betrekking tot infectieziekten in het *C. rodentium* muismodel worden uitgediept. De subvragen luiden: Welke verband wordt er in het algemeen gezien tussen microbiotica en infecties? Welke pathofysiologie veroorzaken bacteriële infecties als *EPEC* en *EHEC* en waarom is het *C. rodentium* muismodel hierbij zo'n goed onderzoeksmodel? Welke immuunreacties zijn betrokken bij een *C. rodentium* infectie? En welk onderzoek is er gedaan naar probiotica die een mogelijk positief effect hebben bij een bacteriële infectie in het *C. rodentium* muismodel? In deze scriptie zal de literatuur over het *C. rodentium* muismodel met betrekking tot de kolonisatie, pathogenese, immuniteit en preventie besproken worden.

Vraagstelling:

Wat is het effect van de behandeling met verschillende probiotica in het *C. rodentium* muismodel en wat kan dit betekenen voor overeenkomstige humane infectieziekten?

1 MICROBIOTICA EN INFECTIES ALGEMEEN

1.1 MICROBIOTICA

Het humane lichaam wordt gekoloniseerd door een enorm scala aan micro-organismen. De micro-organismen kunnen uit bacteriën, archaea, protisten of virussen bestaan. Gezamenlijk worden zij de microbiotica genoemd (Xu & Gordon, 2003). De microbiotica worden ook wel de endogene microflora genoemd (D'Arienzo *et al.*, 2006). Zij kunnen de gastheer koloniseren aan alle oppervlakten binnen of buiten het lichaam, bijvoorbeeld in de mondholte, huid, voortplantingsorganen, luchtwegen en het maag-darmkanaal (Xu & Gordon, 2003).

Dit samenleven van twee ongelijksoortige organismen is een symbiotische interactie, waarvan beide partijen voordeel hebben. De microbiotica vormen een eerste lijn van afweer tegen pathogene organismen en voorzien de gastheer van essentiële producten, zoals vitamines, aminozuren en organische zuren. Daartegenover bewijst de gastheer de microbiotica een wederdienst door te zorgen voor een evenwichtige leefomgeving door middel van stabiele omstandigheden van temperatuur, pH, osmolariteit en voedselvoorziening (Falk *et al.*, 1998, Hooper *et al.*, 1998).

Er zijn ongeveer tien keer zoveel microbiotica in het lichaam aanwezig dan het aantal humane cellen. Dat wil zeggen dat er ongeveer 1×10^{14} aantal bacteriën tegenover 1×10^{13} aantal lichaamscellen aanwezig zijn in een mens (Xu & Gordon, 2003). Het aantal bacteriën in het humane lichaam is dus groot, daarnaast is het aantal verschillende soorten bacteriën in het lichaam ook groot. De bacteriële kolonies zijn zeer complex en genetisch divers (Bailey, 2012). De schattingen van de diversiteit lopen sterk uiteen in de literatuur. De waarden liggen tussen een paar honderd en meer dan 30.000 aantal bacteriële soorten. De meeste schattingen geven echter aan dat er tussen de vijfhonderd en duizend aantal bacteriële soorten in een humaan lichaam aanwezig zijn als microbiotica (Xu & Gordon, 2003).

1.2 MAAG-DARMKANAAL

De belangrijkste microbiotica zijn de bacteriën die leven in het maag-darmkanaal van de gastheer (Xu & Gordon, 2003). Het maag-darmkanaal wordt gekoloniseerd door een enorm scala aan micro-organismen, waarvan bekend is dat vele van deze microbiotica gunstige effecten hebben op de gastheer (Bailey *et al.*, 2010). De endogene microflora in de darm voert onder andere belangrijke metabolische functies uit zoals fermentatie van onverteerbare voedingsstoffen in eenvoudige suikers en opname van voedingsstoffen en korte-keten vetzuren (Festi *et al.*, 2011).

In de dikke darm leven veel microbiotica per oppervlakte, de bacteriële dichtheid in het lichaam is daar het grootst. In de dikke darm leven zij in een grote en stabiele kolonie. Deze bacteriële kolonie is gevormd na selectie van verschillende microben voor wie het meest geschikt en het best aangepast waren voor de omgevingsniche in de dikke darm (Huffnagle, 2010). Het aantal bacteriën is zo groot en stabiel geworden na deze selectie, omdat de kolonie zo goed als bestand is tegen veranderingen (Allison & Martiny, 2008). Stabiele bacteriële kolonies in het maag-darmkanaal hebben voordelige en versterkende effecten op de gezondheid van de gastheer (Bailey, 2012). Deze microbiotica hebben invloed op de gevoeligheid voor infectie en de werking van het immuunsysteem van de gastheer (Bailey, 2012).

Toch zijn er wel factoren, zoals voeding (Turnbaugh *et al.*, 2008), gebruik van antibiotica (Antonopoulos *et al.*, 2009) of blootstelling aan verschillende soorten stressoren (Bailey *et al.*, 2010), die voor (kortstondige) veranderingen zorgen in de bacteriële kolonies. Verandering in de structuur en samenstelling van microbiële kolonies in de darmen, oftewel dysbiose, wordt geassocieerd met negatieve gevolgen voor de gezondheid en darmpathologie (Bailey, 2012, Festi *et al.*, 2011) en de pathogenese van een aantal maag-darmkanaalziekten (Antonopoulos *et al.*,

2009). Stress-geïnduceerde veranderingen in de bacteriële kolonies kunnen leiden tot toename van de gevoeligheid voor infecties in het maag-darmkanaal. (Bailey, 2012).

2.3 MUCOSALE IMMUUNREACTIE

De epitheellaag van het maag-darmkanaal, de mucosale epitheellaag, is constant in interactie met grote aantallen microben. Deze microben kunnen antigenen, uit de omgeving of voeding, of de eigen microbiotica zijn. De microbiotica zijn commensale bacteriën die van nature aanwezig zijn in het maag-darmkanaal en vreedzaam samenleven met de gastheer. Ze kunnen gunstige en beschermende effecten hebben op hun omgeving (Goto & Kiyono, 2012). De microbiotica hebben een fysiologische rol om de gezondheid van de gastheer in stand te houden. De endogene microflora in de darmen is essentieel voor het behoud van de mucosale epitheelbarrière. Dit is de barrière tussen het darmlumen en het cellulaire darmweefsel. Het doorbreken van de mucosale epitheelbarrière, wordt geassocieerd met het pathofysiologische proces van verschillende darmziekten (Festi *et al.*, 2011).

De mucosale epitheelbarrière bestaat uit een monolaag darmepitheelcellen. De darmepitheelcellen produceren spijsverteringsenzymen, nemen voedingsstoffen op en vormen de eerste fysieke en immunologische bescherming tegen binnendringende pathogenen. Ook vormen de darmepitheelcellen een niche voor de commensale bacteriën. De fysiologische homeostase van de darmepitheelcellen wordt onderhouden door verschillende biologische processen, zoals apoptose, autofagie en de omgang met endoplasmatisch reticulum stress. Wanneer deze biologische processen door genetische of omgevingsfactoren verstoord worden, kan pathogenese van inflammatoire darmziekten ontwikkelen en ontstaat darmpathofysiologie (Goto & Kiyono, 2012).

De darmepitheelcellen herkennen en kunnen interacties aangaan met de eigen microbiotica (Goto & Kiyono, 2012). De microbiotica spelen een rol bij het induceren van de mucosale immuunreactie. De natuurlijke microbiotica in de darmen hebben invloed op de ontwikkeling van lymfweefsel, afscheiding van antilichamen zoals Immunoglobuline (Ig) A en productie van antimicrobiële peptiden. Bij dysbiose, verandering van de natuurlijke kolonisatie van microbiotica in de darmen, neemt de doorlaatbaarheid van de mucosale epitheelbarrière toe, wordt de mucosale immuunreactie verstoord, metabole functies gehinderd en kan darmpathofysiologie ontstaan (fig. 1) (Festi *et al.*, 2011).

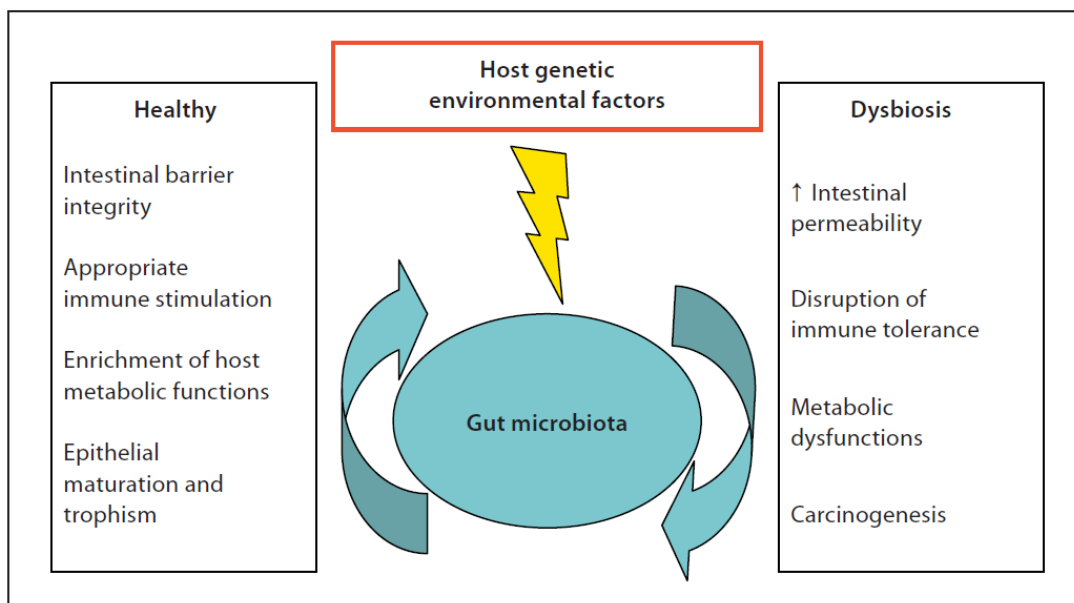


Fig. 1: Een schematische weergave van de beschermende functie van microbiotica in een gezonde gastheer (links) en de pathologische gevolgen van dysbiose in een zieke gastheer (rechts) (Festi *et al.*, 2011).

Naast dat de darmepitheelcellen een fysieke barrière zijn voor binnendringende pathogenen, spelen de epitheelcellen dus ook een centrale rol in het ontwikkelen en onderhouden van de fysiologische en immunologische homeostase in de darmen. De darmepitheellaag beschermt de gastheer tegen infecties door middel van instructies te geven aan het mucosale immuunsysteem. Op deze manier kan er een balans ontstaan tussen het wel en niet activeren van het immuunsysteem en het in stand houden van de darmhomeostase. Het mucosale immuunsysteem reguleert de homeostase van de microbiota in de darmen door immunologische componenten te produceren, zoals IgA. Deze productie wordt gemedieerd door de darmepitheelcellen (Goto & Kiyono, 2012).

De darmepitheelcellen zijn in staat om antigenen te detecteren en reguleren de immuunreactie door middel van uitscheiding van anti-microbiële moleculen. Om al deze functies uit te kunnen voeren zijn de epitheelcellen gedifferentieerd in verschillende typen epitheelcellen met hun eigen specialisatie. Op deze manier bestaat de darmepitheelbarrière onder andere uit Peyer's Patch M-cellen, Paneth cellen, enterocyten, slijmbekercellen (Goblet cellen), endocriene cellen en zuilvormige epitheelcellen die gezamenlijk met verschillende afweercellen een immunologisch netwerk vormen om de darmhomeostase te onderhouden (fig. 2). Peyer's Patch M-cellen zijn gespecialiseerd in het herkennen van antigenen en nemen het pathogeen op waardoor vervolgens een mucosale immuunreactie wordt geïnduceerd met behulp van dendritische cellen. De Paneth cellen produceren anti-microbiële moleculen zoals α -defensine en de enterocyten scheiden IgA uit in het darmlumen. Deze immunologische factoren remmen de uitbreiding van de bacteriële infectie in het maag-darmkanaal (Goto & Kiyono, 2012).

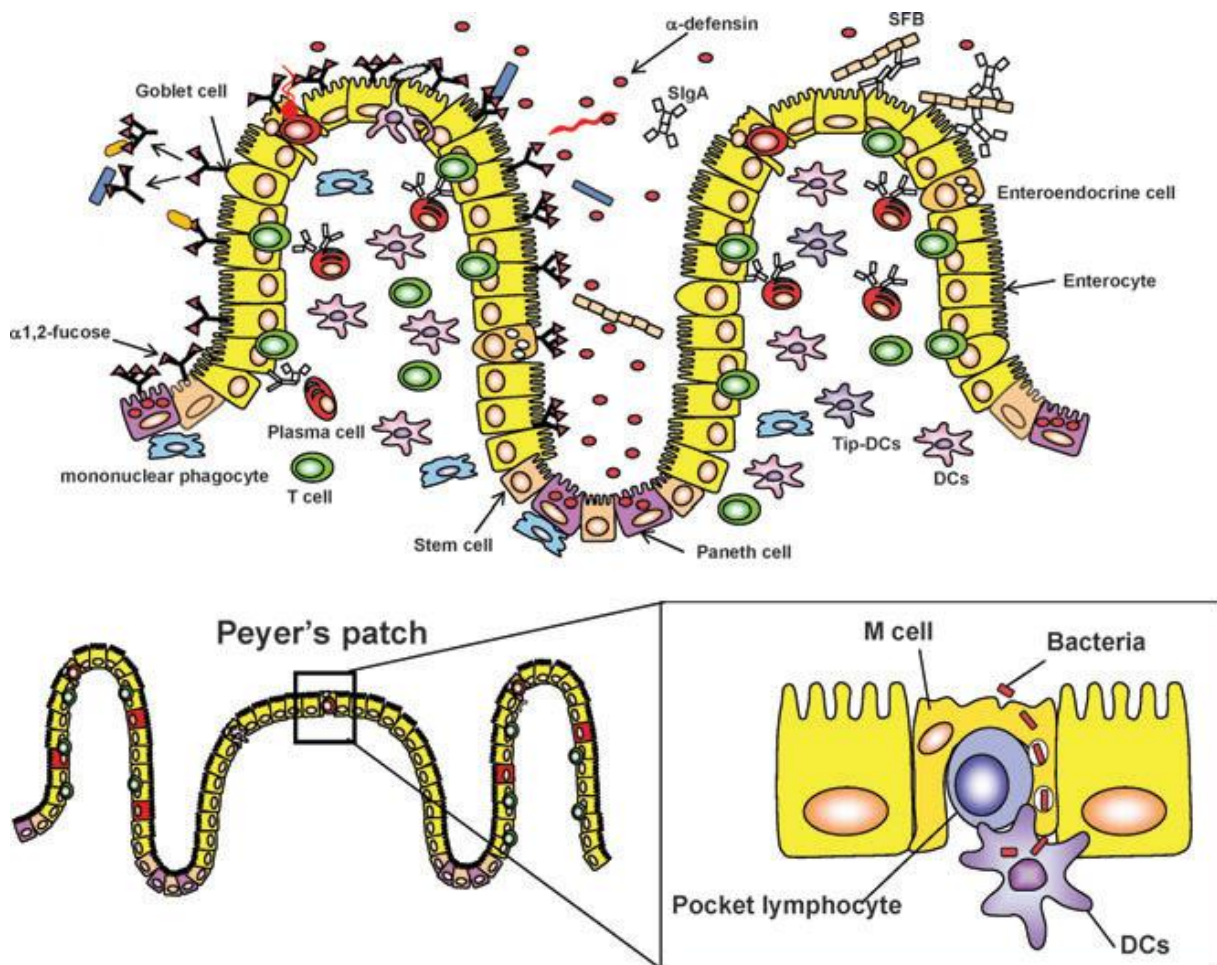


Fig. 2: Schematische weergave van de mucosale immuunreactie en darmhomeostaseregulatie bij een bacteriële infectie geïnduceerd door verschillende immunologische factoren. SFB = gesegmenteerde filamenteuze bacteriën, DC = dendritische cellen, Tip-DC = TNF- α en iNOS producerende dendritische cellen (Goto & Kiyono, 2012).

2 PATHOGENEN EN INFECTIE PATHOFYSIOLOGIE

2.1 BACTERIËLE PATHOGENEN *EPEC* EN *EHEC*

Pathogenen zijn ziekteverwekkers die een infectie bij hun gastheer veroorzaken. Infecties veroorzaakt door bacteriële pathogenen, bijvoorbeeld *EPEC* en *EHEC*, behoren tot de belangrijkste oorzaken van ernstige diarree bij kinderen (Chen *et al.*, 2005A, Johnson-Henry *et al.*, 2005, Wiles *et al.*, 2004). Dit is nog steeds een grote wereldwijde bedreiging voor de gezondheid van kinderen (Chen *et al.*, 2005A) en vormt een belangrijk risico voor de humane gezondheid in ontwikkelingslanden (Chen & Frankel, 2005). Infectie met *EHEC* veroorzaakt hemorragische colitis (dikke darmontsteking met bloedingen) en hemolytisch-uremisch syndroom waarbij hemolytische anemie (vernietiging van de rode bloedcellen), uremie (acuut nierfalen) en trombocytopenie (laag aantal bloedplaatjes) optreden (Blaser, 2004).

EPEC was de eerste gram-negatieve *Escherichia coli* (*E. coli*) bacteriestam die geassocieerd werd met humane ziekten in de jaren '40 en '50. In 1945 werd het pathogeen voor het eerst ontdekt door de onderzoeker John Bray. Het mechanisme hoe *EPEC* het ziektebeeld met diarree veroorzaakt bleef echter enkele decennia een raadsel. Pas in de late jaren '80 werd er grote vooruitgang geboekt omtrent het ontrafelen van de mechanismen achter de *EPEC* pathogenese (Chen & Frankel, 2005). *EPEC* hecht aan en infecteert het darmepitheel van zijn gastheer wat de ernstige diarree veroorzaakt (fig. 3) (Chen & Frankel, 2005, Khan *et al.*, 2006). De infectie veroorzaakt een darmontsteking, waarbij een onderliggend mechanisme van ontstekingsreacties in gang wordt gezet (Khan *et al.*, 2006).

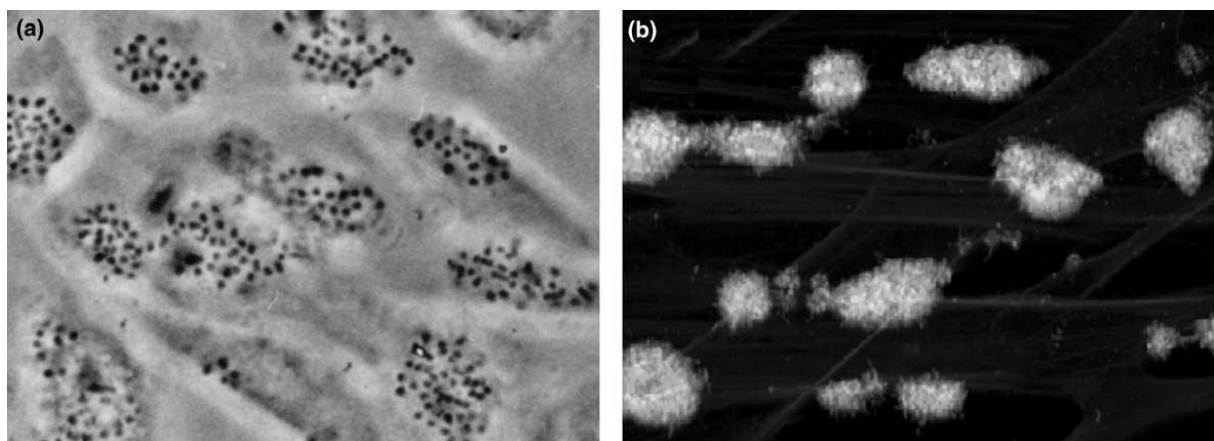


Fig. 3: *EPEC* infectie in het darmepitheel van de gastheer; de gelocaliseerde hechting van *EPEC* bacteriën aan gekweekte epitheelcellen (A) en de clustering van *EPEC* bacteriën in microkolonies gemedieerd door "bundle-forming pilus" (BFP) zichtbaar op een immunokleuring met BFP-specifiek polyclonaal konijn-antiserum (B) (Chen & Frankel, 2005, figuren zijn eigendom van Stuart Knutton).

De gevoeligheid voor de infectie en/of het vermogen om de infectie onder controle te krijgen, kunnen per gastheerindividue verschillen (Chen *et al.*, 2005A). De pathogene eigenschappen van *EPEC* en *EHEC* leiden tot een verstoring van de epitheelbarrière en stimuleren een immunologische ontstekingsreactie (Chen *et al.*, 2005B). Infectie van *EPEC* of *EHEC* leidt tot vermindering van de transepitheliale elektrische weerstand (TER) van de gepolariseerde monolagen van het darmepitheel. Hierdoor is de epitheelbarrière verstoord en de permeabiliteit van de darm van de gastheer veranderd (Philpott *et al.*, 1998). De immunologische mucosale (afweer van de slijmvliezen) ontstekingsreactie van de gastheer op de bacteriële infectie bestaat onder andere uit het uitscheiden van interleukine (IL) -8 (Zhou *et al.*, 2003) en het induceren van een T-helper 1 (Th1) type cellulaire immuunreactie (Johnson-Henry *et al.*, 2005). De immuunstatus van de gastheer speelt hierbij een belangrijke rol. Die

conditie kan beïnvloed worden door gelijktijdige concurrerende infecties en/of omgevingsfactoren waardoor de gevoeligheid voor een bacteriële infectie per individu per moment kan verschillen (Chen *et al.*, 2005A).

2.2 MUISMODEL *C. RODENTIUM*

C. rodentium is een natuurlijk voorkomende pathoog dat zich aangepast heeft aan zijn gastheer de laboratoriummuis. *C. rodentium* heeft overeenkomstige eigenschappen met de humane pathogenen *EPEC* en *EHEC* (fig. 4) (Borenshtein *et al.*, 2008, D'Arienzo *et al.*, 2006, Luperchio *et al.*, 2000). Het pathoog *C. rodentium* infecteert de dikke darmepitheelcellen van de muis, wat diarree, colitis (ontsteking van de dikke darm), epitheelhyperplasie (celtoename in epitheelweefsel), mucosale zwelling en een oneffen epitheeloppervlak veroorzaakt (Chen *et al.*, 2005B, D'Arienzo *et al.*, 2006, Khan *et al.*, 2006).

C. rodentium, *EPEC* en *EHEC* worden gerekend tot de “Attaching”/“Effacing” (A/E) pathoogfamilie (Borenshtein *et al.*, 2008, Croxen & Finlay, 2010, D'Arienzo *et al.*, 2006, Luo *et al.*, 2000, Luperchio *et al.*, 2000, Wiles *et al.*, 2004). Deze classificatie berust op het vermogen van de pathogenen om zich aan het darmepitheel van de gastheer te hechten, dan de borstelzoom van de lokale microvilli kapot te maken met behulp van een lesie, om vervolgens zogenaamde “pedestals” structuren te ontwikkelen. “Pedestals” zijn met actine-gevulde membraanuitsteeksels die ontstaan na de epitheelhechting van het pathoog. Deze manier van infectie is uniek en essentieel voor A/E pathogenen zoals *EPEC* en *EHEC* en activeert verschillende moleculaire en immunologische processen in de darmepitheellaag (fig. 5) (Croxen & Finlay, 2010, D'Arienzo *et al.*, 2006, Lebeis *et al.*, 2007, Luo *et al.*, 2000, Wiles *et al.*, 2004).

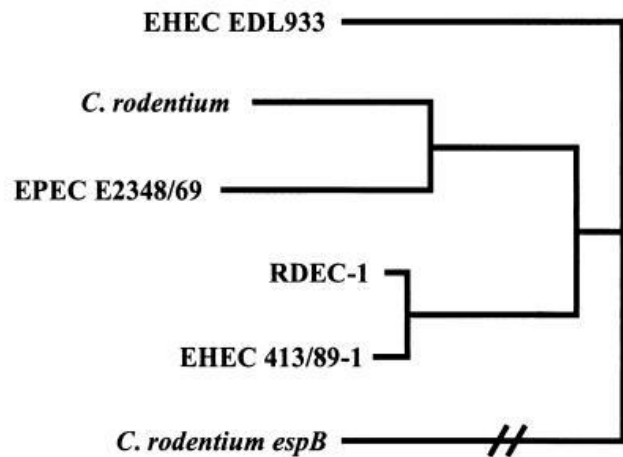


Fig. 4: Een schematische uitlijning van de verwantschap tussen *C. rodentium*, *EPEC* en *EHEC*. Het blijkt dat *C. rodentium* de meeste overeenkomstige eigenschappen heeft met de humane *EPEC* stam E2348/69 (Luperchio *et al.*, 2000).

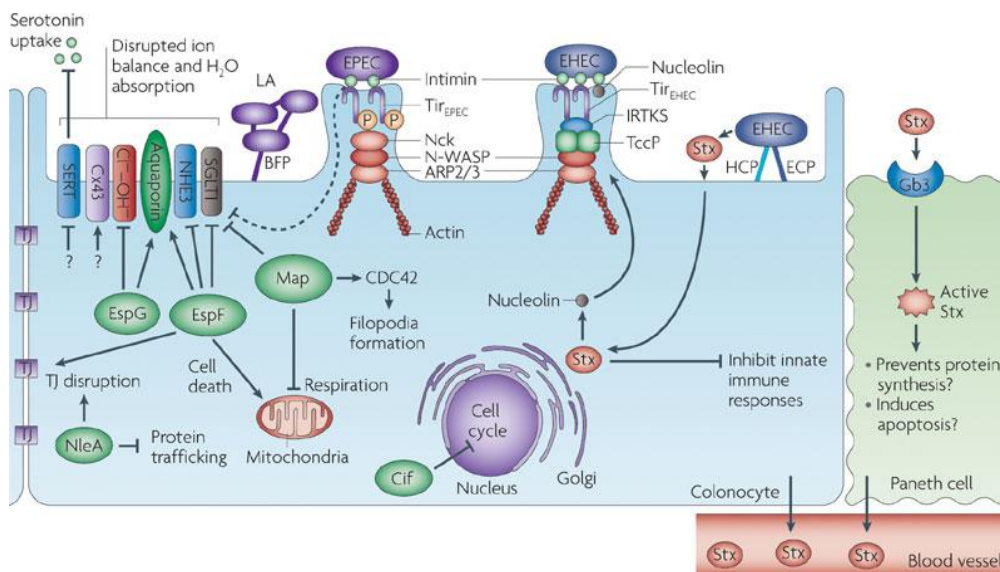


Fig. 5: Schematische weergave van het invasieproces gedurende een infectie met de A/E pathogenen *EPEC* en *EHEC* waarbij zogenaamde “pedestals” gevormd worden waardoor de darmepitheelbarrière van de gastheer doorbroken wordt (Croxen & Finlay, 2010).

Vorming van “pedestals” wordt geassocieerd met het doorbreken van de epitheelbarrière, wat leidt tot ontwikkeling van darmziekte (Lebeis *et al.*, 2007, Luo *et al.*, 2000). Na de vorming van “pedestals” (fig. 6, stap a) scheidt *C. rodentium* ook nog factoren uit om het doorbreken van de barrière te vergemakkelijken en toegang te krijgen tot de basolaterale oppervlakte van de darmen (fig. 6, stap b) (Lebeis *et al.*, 2007).

EPEC en *EHEC* zijn belangrijke pathogenen specifiek voor de mens, maar vergeleken met *C. rodentium* is het niet gemakkelijk om laboratoriummuizen te injecteren met *EPEC* of *EHEC* (Borenshtein *et al.*, 2008). Zowel *EPEC* als *EHEC* komen amper voor als natuurlijke pathogenen in muizen, maar infecteren wel mensen en huisdieren (Mundy *et al.*, 2005). *C. rodentium* is de enige bekende A/E pathogeen in muizen en kan dus dienen als een klein diermodel voor *EPEC* en *EHEC* infecties door de overeenkomstige eigenschappen en verwantschap (Chen *et al.*, 2005B, Mundy *et al.*, 2005). Om deze redenen wordt *C. rodentium* infectie in muizen wereldwijd gebruikt om pathogenese met betrekking tot *EPEC* en *EHEC* te bestuderen. Nog een goede reden om het *C. rodentium* muismodel te gebruiken, is dat de bacterie hoofdzakelijk een infectie induceert die zich beperkt tot het darmlumen (Mundy *et al.*, 2005). Hierdoor kan dit *in vivo* muismodel helpen bij het beter begrijpen van de mucosale ziekterespons, immuniteit en de pathofysiologie in het maag-darmkanaal. (Borenshtein *et al.*, 2008).

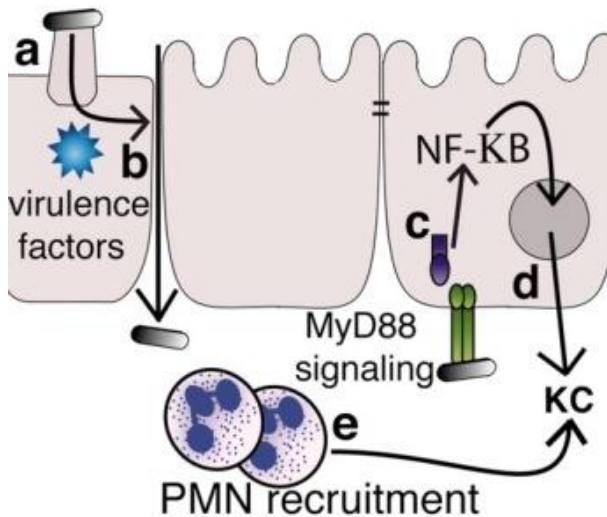


Fig. 6: Model voor infectie en verspreiding van *C. rodentium* in het darmepitheel waarna de TLR-siginaaltransductie in gang wordt gezet (Lebeis *et al.*, 2007).

3 IMMUNOLOGIE EN INFECTIE

3.1 AANGEBOREN IMMUUNREACTIE

Bij infectie van de pathogenen *EPEC* en *EHEC* wordt het aangeboren immuunsysteem van de gastheer in gang gezet. De bacteriën *EPEC* en *EHEC* zijn gram-negatief. Daardoor activeren zij de Toll-like receptor type 4 (TLR4), de aangeboren immuunsysteemreceptor voor het bacteriële lipopolysaccharide. De rol van de TLR4 bij de immuunreactie in het maag-darmkanaal wordt nog nauwelijks begrepen, maar in de studie van Khan *et al.* in 2006 werd de rol van de TLR4 bij infectie van *C. rodentium* in muismodellen voor het eerst goed geïdentificeerd (Khan *et al.*, 2006).

In de studie van Khan *et al.* in 2006 werden zogenaamde TLR4-deficiëntie C3H/HeJ muizen vergeleken met TLR4-expressie C3H/HeOuJ muizen, beide geïnfecteerd met verschillende infectiedoses *C. rodentium*. Een vermindering van de infectiedosis bleek de overleving van de TLR4-deficiëntie muizen drastisch te verlengen. Terwijl deze vermindering slechts een bescheiden invloed had op de overleving van de TLR4-expressie muizen. In de studie werden ook zogenaamde TLR4-deficiëntie C57BL/10ScNJ muizen met TLR4-expressie C57BL/10J muizen vergeleken, twee minder gevoelige stammen, beide geïnfecteerd met *C. rodentium*. De TLR4-deficiëntie muizen bleken minder pathofysiologie te ontwikkelen en ook het sterftecijfer nam af vergeleken met de TLR4-expressie muizen (Khan *et al.*, 2006).

In de studie van Lebeis *et al.* in 2007 werd de rol van het eiwit MyD88 in muismodellen geïdentificeerd. MyD88 is een TLR adapter-eiwit en draagt bij aan de aangeboren immuunreactie en darmontsteking bij infectie van *C. rodentium*. Bacteriën worden gedetecteerd door de TLR die werkt via MyD88 en “nuclear factor-kappa B” (NF-κB) (fig. 6, stap c). In de studie werden zogenaamde MyD88-deficiëntie (MyD88^{-/-}) muizen vergeleken met Wildtype (WT) C57BL/6 muizen die wel MyD88 tot expressie brachten, beide geïnfecteerd met *C. rodentium*. De MyD88-deficiëntie muizen bleken na de infectie te lijden aan bacteriëmie (bacteriën in de bloedbaan), gangreneuze mucosale necrosis (weefseldood in het slijmvlies na onvoldoende bloedtoevoer), hevige colitis en sterfte. De MyD88-afhankelijke TLR-sigtaaltransductie bleek de WT gastheer na de *C. rodentium* infectie te beschermen tegen deze ernstige pathologie en sterfte. De overlevingskansen lagen significant hoger bij deze MyD88-expressie muizen (fig. 7) (Lebeis *et al.*, 2007).

Wanneer het antigeen *C. rodentium* de TLR4 activeert wordt NF-κB, een eiwit dat DNA transcriptie controleert, snel geïnduceerd waardoor er translocatie van NF-κB plaatsvindt naar de kern in de gastheercel (fig. 6, stap c). De cellulaire respons tegen het bacteriële antigeen is dan in gang gezet. De inductie van de TLR4 draagt bij deze immuunreactie mee aan de chemokine-expressie van “macrophage inflammatory protein-2” (MIP-2) en “monocyte

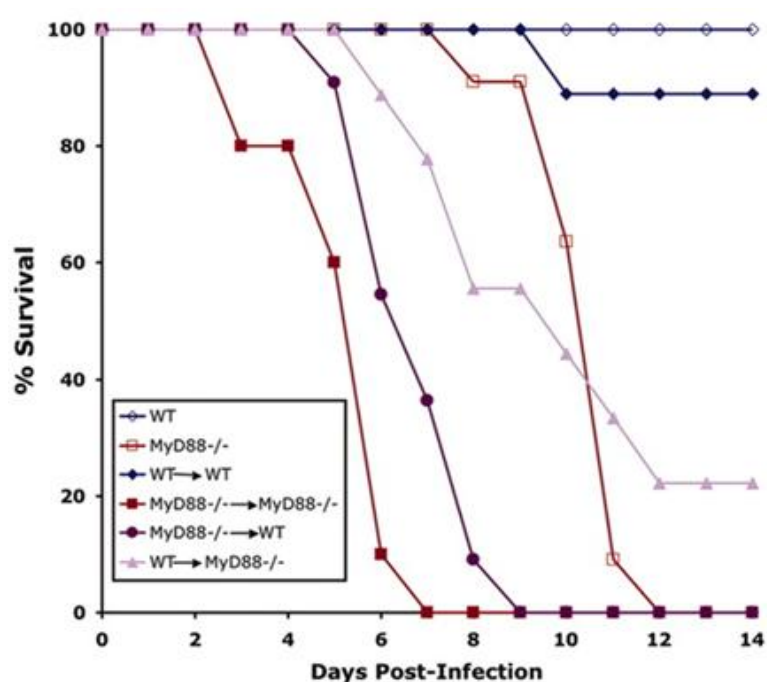


Fig. 7: Overlevingscurves van MyD88-deficiëntie (MyD88^{-/-}) muizen vergeleken met Wildtype (WT) C57BL/6 muizen na *C. rodentium* infectie (Lebeis *et al.*, 2007).

chemoattractant protein-1" (MCP-1) en infiltratie van inflammatoire cellen zoals macrofagen en neutrofielen in de geïnfecteerde darmen (Khan *et al.*, 2006).

De immuunreactie is TLR4-afhankelijk, waardoor er in de studie van Khan *et al.* in 2006 bij de geïnfecteerde TLR4-deficiënte muizen minder ontsteking en weefselpathologie werd geconstateerd. Bij de TLR4-deficiënte muizen werd ook minder infectieverspreiding van *C. rodentium* gezien in de dikke darm, aangezien de duur van de infectie niet beïnvloed werd door een ontstekingsreactie. Het wijst er op dat de TLR4-afhankelijke immuunreactie tegen een pathogeen van de A/E familie niet beschermend is voor de gastheer, maar uiteindelijk bijdraagt aan de ontwikkeling van ziekte en darmpathologie tijdens de infectie (Khan *et al.*, 2006).

Er werd voor het eerst aangetoond in de studie van Lebeis *et al.* in 2007 dat MyD88 een essentiële rol speelt bij overleving en immuniteit na infectie. De reactie van het aangeboren immuunsysteem, geassocieerd met ontsteking, bleek in eerste instantie schadelijk, maar het zou ook belangrijke bescherming bieden als de adaptieve immuunreactie wordt geïnduceerd. De MyD88-afhankelijke signaaltransductie is noodzakelijk voor het beperken van de mucosale schade, zodat het adaptieve immuunsysteem het pathogeen efficiënt kan opruimen (Lebeis *et al.*, 2007).

Volgens de studie van Lebeis *et al.* in 2007 induceert de MyD88-afhankelijke TLR-siginaaltransductie drie verschillende processen. Ten eerste de reparatie van het darmepitheel, waardoor de beschermende barrière in stand wordt gehouden en toegang van bacteriën naar de lamina propria (bindweefsel onder het darmepitheel) wordt beperkt. Het tweede proces dat in gang wordt gezet is de productie van chemokines, zoals "keratinocyte-derived chemokine" (KC), nadat de bacteriën gedetecteerd zijn door de TLR die werkt via MyD88 en NF-κB (fig. 6, stap d). De chemokines zorgen ervoor dat polymorfnucleaire neutrofielen (PMN) worden aangetrokken naar de plaats van infectie zodat bacteriën aangevallen kunnen worden (fig. 6, stap e). Het derde proces is de activering van het adaptieve immuunsysteem, zodat de infectie met behulp van antilichamen opgeruimd kan worden. De signaaltransductie van de aangeboren immuunreactie heeft op deze drie manieren volgens de studie van Lebeis *et al.* in 2007 een beschermende rol bij darminfecties veroorzaakt door A/E pathogenen (Lebeis *et al.*, 2007).

3.2 ADAPTIEVE IMMUUNREACTIE

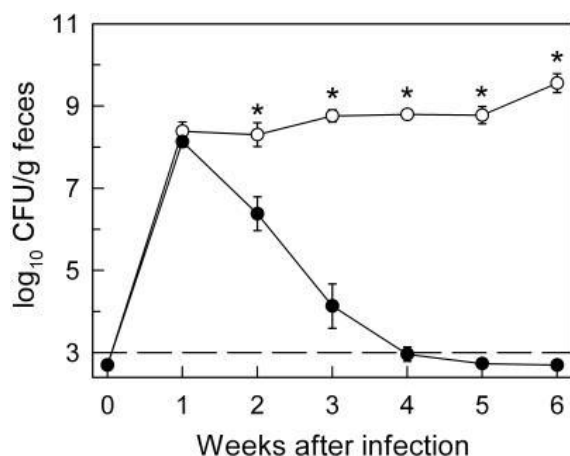


Fig. 8: Het totale aantal *C. rodentium* bacteriën (CFU/g) in de feces van B-cel-deficiënte-muizen (○) vergeleken met C57BL/6 controlemuizen (●) na *C. rodentium* infectie (Maaser *et al.*, 2004).

Wanneer muizen geïnfecteerd worden met orale toediening van *C. rodentium* wordt naast het aangeboren immuunsysteem ook het adaptieve immuunsysteem in gang gezet. In de studie van Maaser *et al.* in 2004 werden muizen met de afwezigheid van B-cellen, antilichamen IgA of IgM, de Ig receptor (pIgR) of de "J-chain" (eiwitcomponent van IgA of IgM) met elkaar en met C57BL/6 controlemuizen vergeleken (Maaser *et al.*, 2004).

De B-cel-deficiënte-muizen reageerden anders op de infectie vergeleken met de controlemuizen. De controlemuizen konden de infectie opruimen na drie tot vier weken, terwijl de B-cel-deficiënte-muizen de infectie uiteindelijk niet onder controle kregen (fig. 8). De controlemuizen leden twee weken na de infectie aan hyperplasie en mucosale ontsteking in de dikke en blinde darm. Daartegenover

hadden de B-cel-deficiënte-muizen na twee weken minder mucosale weefselveranderingen, maar leden de muizen na zes weken wel aan ernstige epitheelhyperplasie inclusief zweren en mucosale ontsteking (Maaser *et al.*, 2004).

De muizen met afwezigheid van de antilichamen IgA of IgM, de pIgR of de “J-chain” reageerden niet anders op de infectie dan de controlemuizen, de infectie van *C. rodentium* werd op een normale manier opgeruimd. Er kon geconcludeerd worden dat de B-cel-functie niet gereguleerd wordt door IgA, IgM, pIgR of de “J-chain”. In de studie werd ook geconstateerd dat een systematische toediening van immuunsera het totale aantal bacteriën *C. rodentium* aanzienlijk vermindert bij de controlemuizen en de pIgR-deficiënte-muizen. Bij verminderde aanwezigheid van het antilichaam IgG werd dit effect opgeheven. IgG bleek noodzakelijk te zijn om de infectie van *C. rodentium* op te ruimen (Maaser *et al.*, 2004).

De neonatale Fc receptor (FcRn) voor de binding met het antilichaam IgG speelt een belangrijke rol in de regulatie van de IgG-concentraties en het transport van IgG over de epitheelbarrière. In de studie van Yoshida *et al.* in 2006 werd de selectieve expressie van de FcRn in het epitheel geassocieerd met het uitscheiden van IgG in het darmlumen van muizen. De FcRn kan IgG uitscheiden en absorberen, waardoor het antigeen in contact wordt gebracht met de verschillende onderdelen van het immuunsysteem. Op deze manier reguleren IgG en FcRn samen de mucosale adaptieve immuunreactie om de infectie van het epitheel-geassocieerde pathogeen *C. rodentium* op te ruimen (Yoshida *et al.*, 2006).

In de studie van Simmons *et al.* in 2003 werden controle C57B1/6 muizen vergeleken met zogenaamde “recombination activating gene-1” (RAG1)-deficiënte-muizen (muizen met de afwezigheid van B- en T-cellen), beide oraal geïnfecteerd met *C. rodentium*. De controlemuizen konden de infectie opruimen na drie tot vier weken. Bij de RAG1-deficiënte-muizen was het totale aantal bacteriën *C. rodentium* daarentegen aanhoudend hoog, waardoor er ernstige colitis ontstond gedurende de infectie. De RAG1-deficiënte-muizen waren erg gevoelig voor de *C. rodentium* infectie (Simmons *et al.*, 2003).

Simmons *et al.* bestudeerden in 2003 ook muizen met verminderde aantallen CD4+ T-cellen (anti-CD4) of met verminderde aantallen CD8+ T-cellen (anti-CD8). De anti-CD4 muizen waren erg gevoelig voor de *C. rodentium* infectie en ontwikkelden daarbij ernstige colitis vergeleken met de anti-CD8 muizen. De muizen met verminderde aantallen CD4+ T-cellen bleken ook verminderde immuunreactie van IgG en IgA te reguleren tegen *C. rodentium* (Simmons *et al.*, 2003). De immuunfunctie en productie van IgG bleek T-cel-afhankelijk te zijn, omdat de *C. rodentium* infectie fataal was voor de CD4+ T-cel-deficiënte-muizen. Wanneer in de studie van Bry en Brenner in 2004 immuunserum IgG werd toegediend aan geïnfecteerde muizen zonder CD4+ T-cellen, was dat voldoende om de muizen te beschermen tegen een fatale infectie (Bry & Brenner, 2004).

In de studie van Simmons *et al.* in 2003 werden de controle C57B1/6 muizen ook vergeleken met zogenaamde μ MT-muizen (muizen met de afwezigheid van B-cellen). Deze μ MT-muizen waren ook erg gevoelig voor de *C. rodentium* infectie. Het toedienen van immuunsera aan de geïnfecteerde muizen kon hun immuniteit herstellen. Toediening van reeds immune B-cellen, niet van naïeve B-cellen, voorzag de μ MT-muizen van variabele immuniteit. De B-cel gereguleerde immuunreactie speelt een centrale rol in de opruiming van een *C. rodentium* infectie in dit muismodel (Simmons *et al.*, 2003).

Geconcludeerd kon worden dat de muizen B-cellen (Maaser *et al.*, 2004, Simmons *et al.*, 2003) en het antilichaam IgG nodig hebben om de infectie van *C. rodentium* te overleven (Maaser *et al.*, 2004). De FcRn speelt hierbij een belangrijke rol om IgG over het darmepitheel van de gastheer te transporteren en de immuunreactie te reguleren (Yoshida *et al.*, 2006). De productie van de antilichamen IgA en IgM is bij het opruimen van de *C. rodentium* infectie niet noodzakelijk (Maaser *et al.*, 2004). De CD4+ T-cellen spelen ook een centrale rol in de immuniteit van de *C. rodentium* infectie in het muismodel (Bry & Brenner, 2004, Simmons *et al.*, 2003).

3.3 VERSTERKING IMMUUNSYSTEEM

Microbiotica spelen een hoofdrol in de stress-geïnduceerde immuunversterking van de gastheer. In figuur 9 is een schematische weergave van het mechanisme te zien wanneer antibiotica in de darmen beïnvloed worden door stress-geïnduceerde veranderingen wat effect heeft op de

mucosale en systematische immuunreactie. Blootstelling aan fysiologische stress, door bijvoorbeeld glucocorticoïden of catecholamines, activeert een endocriene reactie die de homeostatische interacties tussen gastheer en microbiotica verstoort. Deze homeostatische interacties treden op tijdens periodes van rust en hebben de functie om de microbiële kolonies te behouden en de inductie van mucosale ontstekingsreacties te beperken. Wanneer deze homeostatische interacties verstoord worden, kan de gevoeligheid van de gastheer voor darmpathogenen zoals *C. rodentium* toenemen en ontstaat er een ontstekingsreactie. Verstoorde interacties tussen gastheer en microbiotica worden ook gezien als oorzaak van veranderingen in de mucosale immuunreactie van chemokines en cytokines bij darmepitheelcellen (Bailey, 2012).

Blootstelling aan stress kan er ook voor zorgen dat de mucosale mestceldegranulatie (exocytose van chemische stoffen, zoals histamine) in de darmen toeneemt. Dit beïnvloedt de systematische immuunreactie, omdat de degranulatie van de mestcellen resulteert in verhoogde doorlaatbaarheid van de darmepitheelbarrière. De chemische stoffen geëxocytiseerd door de mestcellen verstoren de "tight junction" eiwitten tussen de darmepitheelcellen en verhogen op deze manier de permeabiliteit van de darmen. Wanneer de epitheelbarrière is afgenomen, migreren de levende microbiotica en/of de bacteriële producten zoals peptidoglycanen van het darmlumen over de darmbarrière naar de inwendige circulatie van het lichaam. Hier beïnvloeden zij de systematische aangeboren immuunreactie door monocyten/macrofagen uit de milt te induceren voor een versterkt vermogen van de immuunreactie tegen antigenen. Er wordt verondersteld dat deze priming van macrofagen het resultaat is van directe effecten van microbiële producten of van de effecten van andere microbiotica-geassocieerde factoren (fig. 9) (Bailey, 2012).

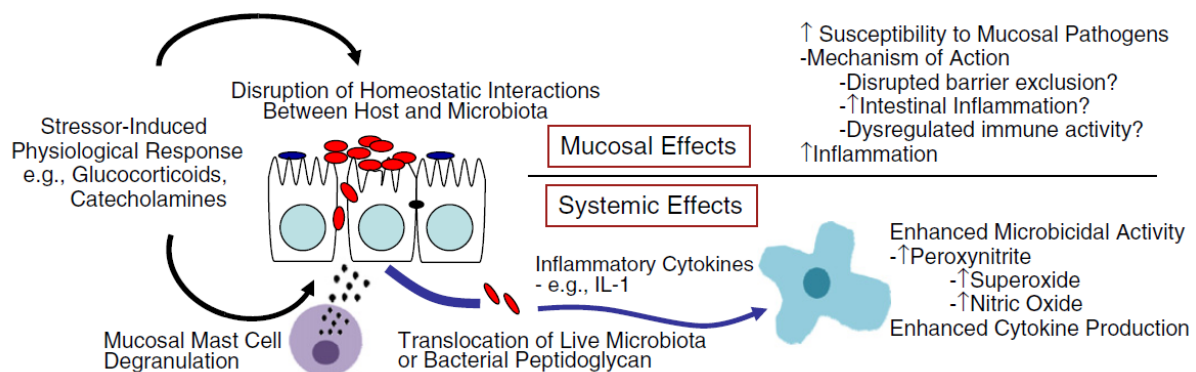


Fig. 9: Schematische weergave van het mechanisme waarbij microbiotica in de darmen beïnvloed worden door stress-geïnduceerde veranderingen met effect op de doorlaatbaarheid van de darmepitheelbarrière en de mucosale en systematische immuunreacties (Bailey, 2012).

4 PROBIOTICA EN *C. RODENTIUM*

4.1 PROBIOTICA EN DARMINFECTIES

Probiotica zijn levende non-pathogene micro-organismen die worden ingenomen om de structuur van de bacteriële kolonies in de darmen te veranderen wat een positief effect zou kunnen hebben op de bevordering van de gezondheid van de gastheer (Chen *et al.*, 2005B, Johnson-Henry *et al.*, 2005). Melkzuurproducerende bacteriën worden bijvoorbeeld aanbevolen voor de behandeling van verschillende darmaandoeningen zoals pouchitis, ziekte van Crohn, reizigersdiarree en infectieuze diarree (Johnson-Henry *et al.*, 2005).

Probiotica worden gebruikt om pathogene darminfecties zoals *Shigella*, *Salmonella* en *C. rodentium* in muismodellen en andere diermodellen te voorkomen en te bestuderen (Chen *et al.*, 2005B). De immuunreactie van de gastheer op een infectie kan voordelig veranderd zijn wanneer de gastheer gelijktijdig probiotica toegediend krijgt (Chen *et al.*, 2005B, D'Arienzo *et al.*, 2006, Johnson-Henry *et al.*, 2005) of te maken heeft met een gelijktijdige concurrerende infectie (Chen *et al.*, 2005A, Chen *et al.*, 2006). Probiotica worden beschouwd als een potentieel belangrijk middel om ontstekingsreacties in het maag-darmkanaal van de gastheer te reguleren (Chen *et al.*, 2005B).

De immuunreactie zou kunnen worden versterkt met behulp van probiotica. Immunologisch onderzoek naar probiotica met betrekking tot infectieziekten in het *C. rodentium* muismodel kan gevolgen hebben voor de behandeling en profylaxe (de manier om ziekte te voorkomen) van infectieuze diarree bij kinderen en zelfs volwassenen, met name in ontwikkelingslanden (Chen *et al.*, 2005B). Bepaalde probiotica kunnen ziektebeelden zoals colitis, geïnduceerd door een *C. rodentium* infectie, in muizen voorkomen (Rodrigues *et al.*, 2012). Wanneer het onderliggende mechanisme van de voordelige effecten van probiotica in het *C. rodentium* muismodel begrepen wordt, kan dit bijdragen aan het onderzoek naar de werkzaamheid van probiotica in mensen met betrekking tot infectieziekten veroorzaakt door overeenkomstige A/E darmpathogenen zoals *EPEC* en *EHEC*.

4.2 *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS*

Het bacteriegeslacht *Lactobacillus* bestaat uit tenminste achttien verschillende soorten (Chen *et al.*, 2005B). *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*) NCFM is een probiotische stam ontwikkeld en beschikbaar in de Verenigde Staten sinds midden jaren '70. Dit probioticum wordt gebruikt als supplement in voedingsmiddelen zoals melk, yoghurt en flesvoeding. *L. acidophilus* NCFM overleeft de doorgang in het maag-darmkanaal, zowel in gezonde als zieke gastheren. *L. acidophilus* wordt geassocieerd met ernstvermindering van diarree bij kinderen (Sanders & Klaenhammer, 2001).

In de studie van Chen *et al.* in 2005B werd het *C. rodentium* muismodel gebruikt om de hypothese omtrent het probioticum *L. acidophilus* te testen. Er werd bestudeerd of het toedienen van *L. acidophilus* in het begin van het leven de afweer van de muis tegen bacteriële infecties kan versterken en de geassocieerde colitis kan verminderen. In de studie werden BALB/cByJ muizen (standaard albino laboratoriummuizenstam), die twee weken oud waren, toegediend met *L. acidophilus* twee keer per week vier weken lang. Dit gebeurde vóór ("pre-inoculation") of gelijktijdig ("concurrent inoculation") met de blootstelling aan *C. rodentium* (Chen *et al.*, 2005B).

Er werd waargenomen dat "pre-inoculation" van *L. acidophilus* een inhiberend effect had op de colitis in de muizen. Dit wordt geassocieerd met afname van de *C. rodentium* kolonisatie, proliferatie en translocatie. Het effect van de probiotica gegeven vóór de *C. rodentium* infectie was dat de muizen de infectie beter onder controle kregen en dat de myeloperoxidase (MPO) activiteit in de dikke darm beter onderdrukt werd. Het meten van MPO (een peroxidase enzym in neutrofiele granulocyten) in het darmweefsel kan gebruikt worden om de ontsteking te kwantificeren. De behandeling met het probioticum *L. acidophilus* stimuleerde ook de expressie

van de cytokines “transforming growth factor β ” (TGF- β) en IL-10 in de dikke darm van de muizen (Chen *et al.*, 2005B).

In figuur 10 is zichtbaar dat het toedienen van *L. acidophilus* vóór de blootstelling aan *C. rodentium* (Pre-La+Cr) effectiever bleek te zijn dan het gelijktijdige gebruik van het probioticum tijdens de infectie (Con-La+Cr). Het totale aantal bacteriën *C. rodentium* was tijdens de infectie het laagst bij de “pre-inoculation” muizen (Pre-La+Cr) (fig. 10). Het induceren van de afgifte van het antilichaam IgA en het downreguleren van de afgifte van de pro-inflammatoire cytokines tumor necrosis factor α (TNF- α), IL-6 en IL-12 waren doeltreffender bij de “pre-inoculation” muizen vergeleken met de “concurrent inoculation” muizen. Deze waarnemingen van Chen *et al.* in 2005B wijzen erop dat colitis bij muizen effectief voorkomen kan worden door het toedienen van *L. acidophilus*. Het probioticum beperkt de bacteriële infectie en het stimuleert de mucosale immuunreactie (Chen *et al.*, 2005B).

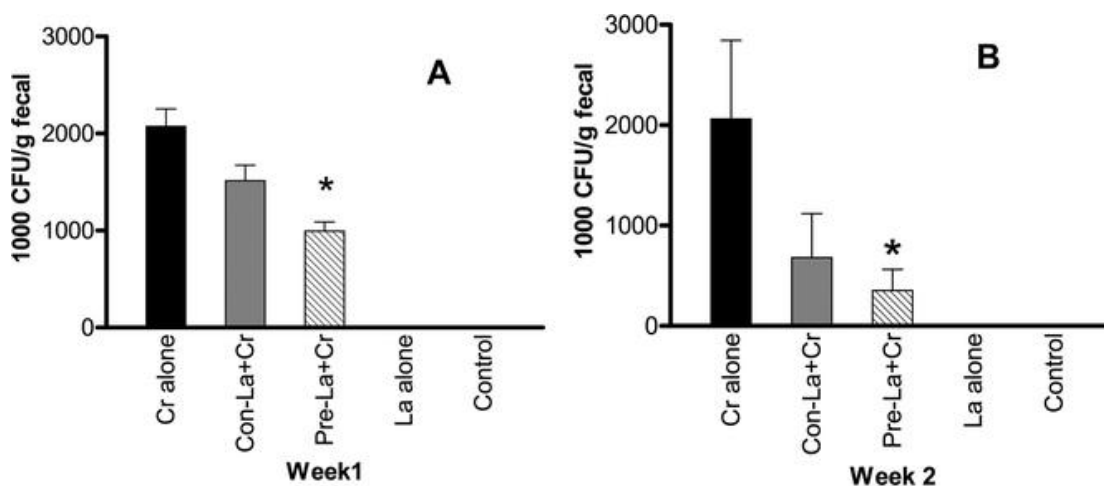


Fig. 10: Analyse van het totale aantal bacteriën *C. rodentium* (1000 CFU/g) in de feces van muizen na één week (A) en twee weken (B) *C. rodentium* infectie bepaald met behulp van een selectieve MacConkey agarplaat bij verschillende studiegroepen (n = 10-16): Cr alone = enkel *C. rodentium*, Con-La+Cr = “concurrent inoculation”/gelijktijdig *L. acidophilus* en *C. rodentium*, Pre-La+Cr = “pre-inoculation”/*L. acidophilus* vóór *C. rodentium*, La alone = enkel *L. acidophilus*, control = controlegroep zonder infectie (Chen *et al.*, 2005B).

4.3 BACILLUS SUBTILIS

Melkzuurbacteriën, zoals *Lactobacillus* spp. en *Bifidobacterium* spp., zijn de meest gebruikte micro-organismen als probiotica. Deze bacteriën koloniseren normaliter ook het maag-darmkanaal van de gastheer. Gebruik van deze bacteriën in probiotische producten levert een bijdrage aan het herstel van de natuurlijke endogene microflora van de darm. Er worden ook veel micro-organismen als probiotica gebruikt die normaliter niet aanwezig zijn in het maag-darmkanaal van de gastheer. Tot deze groep behoren onder andere de gram-positieve sporenvormende bacteriën van het geslacht *Bacillus* (Hong *et al.*, 2005). De spore-vorming is een overlevingsstructuur voor de cel, in de spore is het erfelijk materiaal van de bacterie opgeslagen in een omhulsel.

Eerst werd *Bacillus* enkel beschouwd als een micro-organisme levend in de bodem van de aarde, maar tegenwoordig wordt deze bacterie ook vaak geassocieerd met het maag-darmkanaal van mens en dier. Moleculair en immunologisch onderzoek heeft aangetoond dat in het maag-darmkanaal van een gastheer de sporen van *Bacillus* in staat zijn om hun levenscyclus volledig voort te zetten. Op deze manier kunnen de bacteriën de doorgang in het maag-darmkanaal overleven, zolang er voldoende water en voeding beschikbaar is (D'Arienzo *et al.*, 2006).

Er is succesvol aangetoond dat de sporen van *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), een specifieke stam van het bacteriegeslacht *Bacillus*, gebruikt kunnen worden als competitieve microbiotica

om infecties van *Salmonella enterica* serotype Enteritidis en *Clostridium perfringens* in kippen tegen te gaan (La Ragione & Woodward, 2003). *B. subtilis* sporen worden al op grote schaal gebruikt voor probiotische en farmaceutische producten voor lichte maagdarfstoornissen, maar er wordt nog onderzoek gedaan om te bestuderen of de sporen van de bacteriën ook daadwerkelijk darminfecties kunnen onderdrukken. Om te bepalen of probiotische producten op grond van bacteriesporen gebruikt kunnen worden om infecties door darmpathogenen te voorkomen, gebruikten D'Arienzo *et al.* in 2006 het *C. rodentium* muismodel in hun studie om de pathogenese van *EPEC* en *EHEC* te bestuderen (D'Arienzo *et al.*, 2006).

In de studie van D'Arzenio *et al.* in 2006 werden Swiss NIH muizen (standaard albino pathogeen-vrije muizen) één dag voordat zij geïnfecteerd werden met *C. rodentium* (1×10^3 CFUs/muis) oraal toegediend met *B. subtilis* sporen (1×10^9 sporen/muis). De muizen werden vijftien dagen na de infectie opgeofferd. De distale dikke darm, lever en mesenterische lymfeknopen (MLN) werden verwijderd voor bacterietellingen, morfologie, immunohistologie en IFN- γ mRNA analyse (D'Arienzo *et al.*, 2006).

D'Arzenio *et al.* toonden in 2006 aan dat het toedienen van *B. subtilis* sporen effectief bleek om darminfectie en -pathologie significant te verminderen bij muizen die hierna geïnfecteerd werden met een dosis *C. rodentium* die normaliter voldoende is om bacteriekolonisatie en hyperplasie in de dikke darm te veroorzaken met daarnaast hoge sterftcijfers. Het totale aantal *C. rodentium* bacteriën (CFU) in de dikke darm was significant lager bij de muizen met *B. subtilis* toegediend vergeleken bij de muizen zonder sporen toegediend. Bovendien werd aangetoond dat het totale aantal CD4+ T-cellen en het IFN- γ transcriptieniveau hoog bleven wanneer de muizen de sporen toegediend kregen (fig. 11). De immuunreactie van de muizen was dus ongewijzigd bij het gebruik van dit soort probiotica (D'Arienzo *et al.*, 2006).

D'Arzenio *et al.* concludeerden in 2006 dat sporen van *B. subtilis* de gevoeligheid voor een *C. rodentium* darminfectie in een muismodel verminderen en dat dit een geschikt *in vivo* model is voor het bestuderen van de effecten van probiotische bacteriën op darminfecties (D'Arienzo *et al.*, 2006). Er kan opgemaakt worden uit de studies van D'Arzenio *et al.* in 2006 en Chen *et al.* in 2005B dat bepaalde probiotica inderdaad een positief effect hebben op de preventie van bacteriële infectie in het *C. rodentium* muismodel.

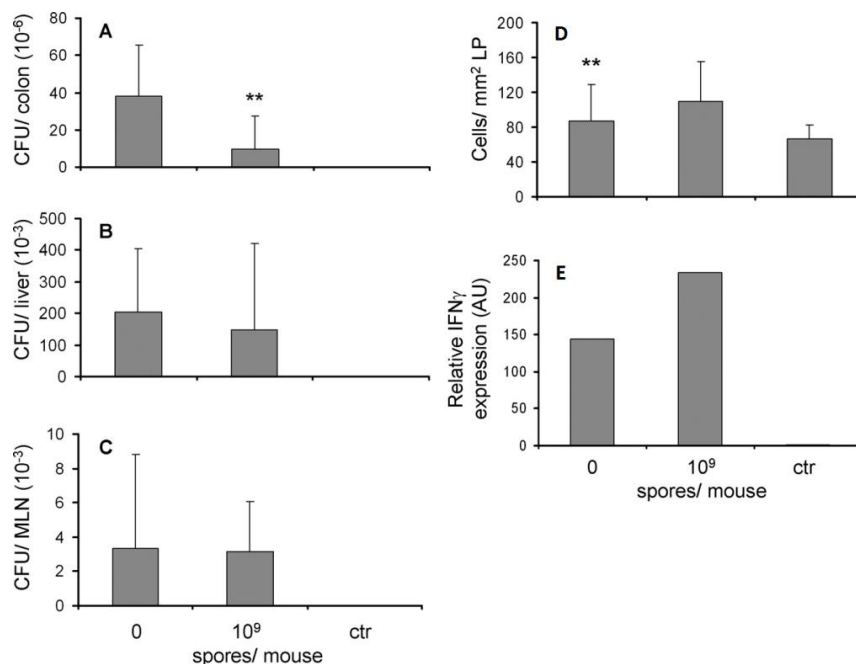


Fig. 11: De effecten van het wel of niet toedienen van *B. subtilis* sporen (1×10^9 sporen/muis) voordat verschillende studiegroepen muizen ($n = 6$) geïnfecteerd werden met *C. rodentium* (1×10^3 CFUs/muis) op de pathogeenkolonisatie in de dikke darm (A), lever (B) en MLN (C) en op de immuunreactie door middel van analyse van het totale aantal CD4+ T-cellen (D) en het IFN- γ transcriptieniveau (E). De controlegroepen (ctr) muizen waren niet geïnfecteerd. ** $P < 0.001$ (D'Arienzo *et al.*, 2006).

In de studie van Johnson-Henry *et al.* 2005 werd bestudeerd of verschillende probiotica de ernst van darmziekten in C57BL/6J muizen geïnfecteerd met *C. rodentium* konden verbeteren. De muizen werden oraal toegediend met een probioticamengsel van *Lactobacillus rhamnosus* (*L. rhamnosus*) en *L. acidophilus* (10^9 CFU/ml) voordat zij geïnfecteerd werden met *C. rodentium* (10^7 CFU in 0.1 ml) (Johnson-Henry *et al.*, 2005).

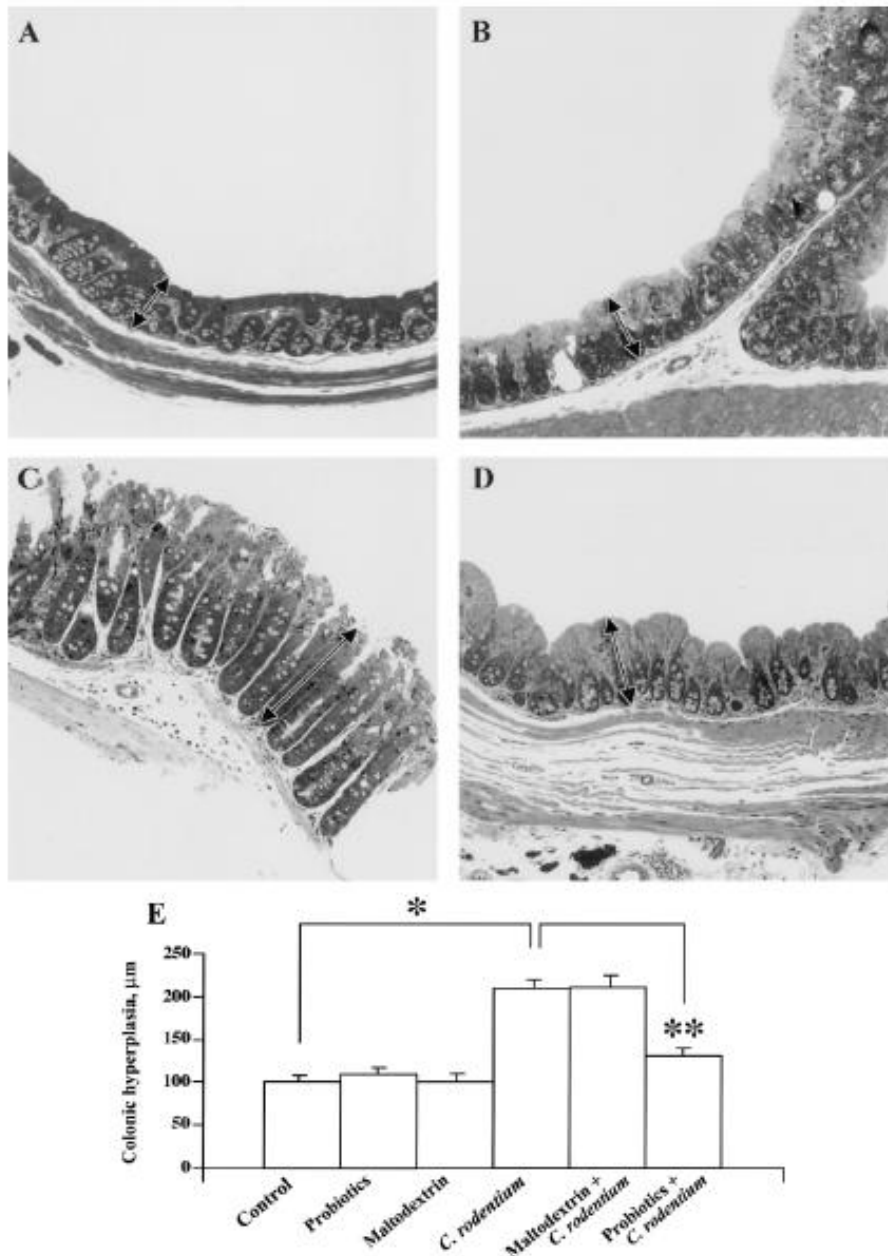


Fig. 12: Verlaging van epitheelhyperplasie in de dikke darm van muizen geïnduceerd door *C. rodentium* infectie (10^7 CFU in 0.1 ml) na voorbehandeling met probiotica *L. rhamnosus* en *L. acidophilus* (10^9 CFU/ml). Normale morfologische kernmerken zichtbaar in de dikke darm van de controle muizengroep (A) en de muizengroep toegediend met probiotica (B), beide niet geïnfecteerd met *C. rodentium*. Epitheelhyperplasie zichtbaar in de dikke darm van de muizengroep geïnfecteerd met *C. rodentium* (C) zoals aangegeven met de dubbele pijl, hierbij zijn onregelmatige randen en toegenomen afscheiding van dood weefsel waargenomen. Verlaging van epitheelhyperplasie zichtbaar in de dikke darm van de muizengroep geïnfecteerd met *C. rodentium* en voorbehandeld met probiotica (D), vergeleken met de onbehandelde muizengroep. Analyse van epitheelhyperplasie in de dikke darm van verschillende muiskolons laat zien dat de ernst van hyperplasie verminderd is bij de geïnfecteerde muizen voorbehandeld met probiotica (E). ** $P < 0.001$, * $P < 0.05$ vs. *C. rodentium* (Johnson-Henry *et al.*, 2006).

Een bepaalde groep muizen kreeg in plaats van de probiotica als controle maltodextrine (een hoogwaardig koolhydraat). Er werd gekeken of voorbehandeling met de probiotica zou bijdragen aan de afname van ziekte in de dikke darm normaliter geïnduceerd door *C. rodentium* (Johnson-Henry *et al.*, 2005).

Er werd aangetoond dat de muizen die de probiotica toegediend gekregen gezond bleven vergeleken met de muizen die geen voorbehandeling van *L. rhamnosus* en *L. acidophilus* kregen voordat zij geïnficeerd werden. Toegenomen hyperplasie in de dikke darm werd enkel waargenomen bij de muisgroepen die geïnficeerd werden en daarvoor geen probiotica hebben ontvangen (fig. 12). De *C. rodentium* infectie induceerde een mucosale ontsteking, epitheelhyperplasie en apoptose in de dikke darm. Ook veroorzaakte de infectie de immuunreactie van IFN- γ productie door splenocyten (verschillende type witte bloedcellen in de milt). De voorbehandeling met de probiotica verminderde de IFN- γ productie bij de geïnficeerde muizen (Johnson-Henry *et al.*, 2005).

Johnson-Henry *et al.* concludeerden in 2005 dat de voorbehandeling met *L. rhamnosus* en *L. acidophilus* de pathologische effecten van *C. rodentium* infectie in muizen verzwakt. De probiotica zouden de bacteriële hechting aan het darmepitheel voorkomen en de Th1-type cellulaire immuunreactie van de gastheer versterken (Johnson-Henry *et al.*, 2005). Johnson-Henry *et al.* hebben dus soortgelijke bevindingen gedaan in 2005 als D'Arzenzo *et al.* in 2006 en Chen *et al.* in 2005B, namelijk dat bepaalde probiotica inderdaad een positief effect hebben op de preventie en vermindering van de bacteriële infectie in het *C. rodentium* muismodel.

4.5 PARASITAIRE WORMEN

In veel delen van de wereld komt het vaak voor dat een gastheer gelijktijdig geïnficeerd is met een bacteriesoort en een parasitaire wormsoort. De aard van deze veelvoorkomende interactie is nog onduidelijk (Chen *et al.*, 2005A). Naar schatting zijn ongeveer drie miljard mensen wereldwijd geïnficeerd met wormen (Crompton & Nesheim, 2002). De afgelopen jaren is de wetenschappelijke belangstelling naar worminfecties erg gegroeid. Onderzoekers proberen te begrijpen hoe een worminfectie invloed kan hebben op het vermogen van de gastheer om een immuunreactie te ontwikkelen op een gelijktijdige bacteriële infectie (Chen *et al.*, 2005A).

De parasitaire worm die in de studie van Chen *et al.* in 2005A gebruikt werd, was de *Heligomosomoides polygyrus* (*H. polygyrus*). *H. polygyrus* is een natuurlijke nematode parasiet voor muizen en leeft meestal in de duodenum (twaalfvingerige darm) of de dunne darm van zijn gastheer (Chen *et al.*, 2005A). In studies waarbij ook *H. polygyrus* werd gebruikt om de immuniteit van de gastheer te bestuderen, werd aangetoond dat deze worm een krachtige T-helper 2 (Th2) type gepolariseerde immuunreactie met behulp van cytokines kan induceren (Finkelman *et al.*, 1997). Deze Th2-type cellulaire immuunreactie, geïnduceerd door de worminfectie, wordt geassocieerd met afname van bepaalde Th1-type gemedieerde ziekten die gelijktijdig ontwikkelen met de infectie. Voorbeelden van ziektebeelden afhankelijk van de Th1-type cellulaire immuunreactie die dan afnemen zijn Th1-diabetes en *Helicobacter* geïnduceerde gastritis (maagslijmvliesontsteking) (Chen *et al.*, 2005A, Fox *et al.*, 2000). De worminfectie veroorzaakt hierbij een verstoring van de balans tussen de Th1-type en de Th2-type immuunreactie. Er wordt gesuggereerd dat deze disregulatie en onbalans een rol speelt bij de modulatie (afstelling) van het immuunsysteem. De interacties tussen de immuunreacties geïnduceerd door meerdere infecties worden echter nog complexer voorgesteld en worden nog niet geheel begrepen (Chen *et al.*, 2005A).

In de studie van Chen *et al.* in 2005A werd bestudeerd of de modulatie van het immuunsysteem, geïnduceerd door een parasitaire worminfectie, een rol kan spelen in de pathogenese van een gelijktijdige bacteriële infectie in het maag-darmkanaal (Chen *et al.*, 2005A). Het *C. rodentium* muismodel stimuleert selectief een mucosale Th1-type immuunreactie (Higgins *et al.*, 1999). In studie van Chen *et al.* in 2005A werd bestudeerd of de ontwikkeling van deze Th1-immuunreactie, geïnduceerd door de *C. rodentium* infectie, beïnvloedt werd door worminfectie *H. polygyrus*. De parasitaire worminfectie zou het vermogen van de gastheer

aantasten om de bacteriële infectie onder controle te krijgen. De parasitaire worminfectie zou ook de darmschade geïnduceerd door de bacteriële infectie stimuleren (Chen *et al.*, 2005A).

In de studie werden BALB/c (standaard laboratoriummuizen) en “signal transducer and activator of transcription” (STAT)6 knockout (KO) muizen geïnfecteerd met *H. polygyrus*, *C. rodentium* of beide pathogenen (Chen *et al.*, 2005A). STAT6 KO muizen missen de pathway voor de STAT6 signaaltransductie en hebben daardoor een tekort aan functionele differentiatie van Th2-cellen (Kaplan *et al.*, 1996). Hierdoor zijn ze een ideaal *in vivo* muismodel waarin de rol van de Th2-type immuunreactie tegen een bacterieel pathogeen onderzocht kan worden.

Er werd aangetoond dat alleen de BALB/c muizen geïnfecteerd met *H. polygyrus* en *C. rodentium* opvallend hoge ziekte- en sterftcijfers lieten zien vergeleken met de andere bestudeerde muiskoloniën. De BALB/c muizen geïnfecteerd met *H. polygyrus* en *C. rodentium* bleken een verhoogde gevoeligheid voor *C. rodentium* en darmschade te hebben. Dit werd geassocieerd met de significante toename van de mucosale en systemische Th2-type immuunreactie geïnduceerd door de parasitaire worm. De verhoogde gevoeligheid voor de bacteriële infectie werd ook geassocieerd met de significante downregulatie van de beschermende IFN- γ reactie en de drastische upregulatie van de proinflammatoire TNF- α reactie (fig. 13).

Bovendien bleken de BALB/c muizen geïnfecteerd met *H. polygyrus* en *C. rodentium* toegenomen pathologie, toegenomen totaal aantal *C. rodentium* bacteriën in de dikke darm en vertraagde controle over de infectie te hebben. De STAT6 KO muizen geïnfecteerd met *H. polygyrus* en *C. rodentium* bleken, in tegenstelling tot de BALB/c muizen, niet in staat te zijn de *C. rodentium* infectie te stimuleren door de gelijktijdige worminfectie. Bij de geïnfecteerde STAT6 KO muizen met beide pathogenen werd geen ernstige ontstekingsreactie of weefselschade in het maag-darmkanaal geïnduceerd (Chen *et al.*, 2005A).

Er werd geconcludeerd dat door een gelijktijdige infectie met een parasitaire worm de immunologische weerstand van de gastheer tegen een bacteriële infectie aangetast werd en dat colitis bij muizen geïnduceerd door *C. rodentium* gestimuleerd werd. De *H. polygyrus* infectie bleek een risico te zijn voor de *C. rodentium* infectie in het muismodel door een STAT6 gemedieerd immuunmechanisme. De Th1-type en Th2-type immuunreacties zijn verstoord door de parasitaire worm, waardoor weefselschade en sterftcijfers toenemen en controle over de bacteriële infectie en lichaamsgewicht afnemen bij de muizen (Chen *et al.*, 2005A). In muizen met een gecombineerde infectie van parasitaire worm en bacterie wordt ook de IL-10 expressie door dendritische cellen verhoogd door de veranderde immuunreactie van de gastheer, ook dit draagt bij aan verhoogde ziekte- en sterftcijfers (Chen *et al.*, 2006).

Chen *et al.* deden andere bevindingen in 2005A dan Johnson-Henry *et al.* in 2006 omtrent de Th1-type cellulaire immuunreactie in het *C. rodentium* muismodel. Johnson-Henry *et al.* zagen in 2005 na behandeling met hun probiotica een versterking van de Th1-type cellulaire immuunreactie en preventie van de bacteriële infectie, terwijl Chen *et al.* in 2005A tot tegenstrijdige resultaten kwamen. In deze studie werd geconcludeerd dat de Th1-type

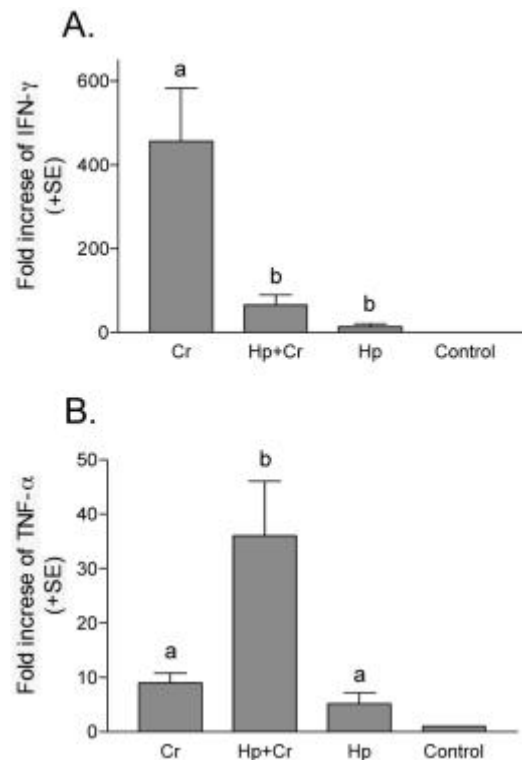


Fig. 13: Gemeten cytokine mRNA expressie van IFN- γ (A) en TNF- α (B) in de dikke darm met behulp van een real-time PCR twee weken na de *C. rodentium* infectie in verschillende studiegroepen muizen (n = 3-5): Cr = *C. rodentium* infectie, Hp+Cr = *H. polygyrus* en *C. rodentium* infectie, Hp = *H. polygyrus* infectie, control = controlegroep zonder infectie. P<0.05 (Chen *et al.*, 2005A).

immuunreactie juist verstoord was door de worminfectie en dat de bacteriële infectie niet voorkomen kon worden in het *C. rodentium* muismodel. De behandeling met de parasitaire worm tegelijkertijd met de *C. rodentium* infectie leidde juist tot ernstige pathologie in de dikke darm, meer afgenomen lichaamsgewicht en hogere sterftcijfers. De voorbehandeling van *L. rhamnosus* en *L. acidophilus* wordt dus wel gezien als potentieel probioticum met voordelige effecten voor de gezondheid van de gastheer, in tegenstelling tot de behandeling van *H. polygyrus* waarbij de Th1-type immuunreactie juist verstoord wordt.

DISCUSSIE EN CONCLUSIE

In deze scriptie werd het onderwerp onderzoek naar probiotica met betrekking tot infectieziekten in het *C. rodentium* muismodel uitgediept. Verschillende onderzoeken naar het effect van verschillende probiotica in het *in vivo* muismodel geïnfecteerd met *C. rodentium* zijn besproken en vergeleken.

In de studie van Chen *et al.* in 2005B werd het effect van het probioticum *L. acidophilus* bestudeerd in het *C. rodentium* muismodel. *L. acidophilus* bleek een beschermend effect te hebben op de gezondheid van de gastheer. Het toedienen van *L. acidophilus* voordat de muizen blootgesteld werden aan *C. rodentium* bleek effectiever te zijn dan een gelijktijdige infectie. De *C. rodentium* infectie werd beter onder controle gehouden, ontwikkeling van colitis werd gehint, de *C. rodentium* kolonisatie, proliferatie en translocatie was afgenomen, de MPO activiteit in de dikke darm werd beter onderdrukt, de expressie van TGF- β en IL-10 werd gestimuleerd en de regulatie van IgA afgifte en de downregulatie van TNF- α , IL-6 en IL-12 afgifte waren doeltreffender. Het probioticum *L. acidophilus* beperkte de bacteriële infectie en stimuleerde de mucosale immuunreactie in het onderzochte muismodel. De immuunreactie was bij het gebruik van *L. acidophilus* als probioticum dus gewijzigd.

In de studie van D'Arienzo *et al.* in 2006 werd het effect van de sporen van *B. subtilis* bestudeerd. Het toedienen van *B. subtilis* sporen als probioticum voordat de muizen geïnfecteerd werden met *C. rodentium* bleek een beschermend effect te hebben op de gezondheid van het muismodel. Toediening van *B. subtilis* veroorzaakte significante vermindering van darminfectie en -pathologie zoals hyperplasie, afname van de *C. rodentium* kolonisatie en afname van de gevoeligheid voor de *C. rodentium* infectie. Het totale aantal CD4⁺ T-cellen en het IFN- γ transcriptieniveau bleven hoog, de immuunreactie was dus ongewijzigd bij het gebruik van de sporen van *B. subtilis*.

In de studie van Johnson-Henry *et al.* in 2005 werd het effect van het probioticamengsel *L. rhamnosus* en *L. acidophilus* bestudeerd in het *C. rodentium* muismodel. De voorbehandeling van *L. rhamnosus* en *L. acidophilus* bleek een beschermend effect te hebben op de gezondheid van de muizen die daarna blootgesteld werden aan *C. rodentium*. Het probioticamengsel verzwakte de pathologische effecten van *C. rodentium*, voorkwam mucosale ontsteking, hyperplasie en apoptose in de dikke darm, verminderde de IFN- γ productie, voorkwam de hechting van *C. rodentium* aan het darmepitheel en versterkte de Th1-type cellulaire immuunreactie van de gastheer. De immuunreactie was bij het gebruik van *L. rhamnosus* en *L. acidophilus* als probiotica dus gewijzigd.

In de studie van Chen *et al.* in 2005A werd het effect van de parasitaire worm *H. polygyrus* bestudeerd in het *C. rodentium* muismodel. Een gecombineerde infectie leidde tot hoge ziekte- en sterftcijfers, toegenomen kolonisatie van *C. rodentium*, verhoogde gevoeligheid voor *C. rodentium* en darmschade, toename van de mucosale en systematische Th2-type immuunreactie, significante downregulatie van de IFN- γ reactie en drastische upregulatie van de TNF- α reactie, toegenomen darmpathologie zoals colitis, vertraagde controle over de bacteriële infectie en aangetaste immunologische weerstand van de gastheer. De Th1-type en Th2-type immuunreacties werden door de *H. polygyrus* infectie in het *C. rodentium* muismodel verstoord. Hierbij werd onder andere de IL-10 expressie door de dendritische cellen verhoogd door de veranderde immuunreactie van de gastheer. De immuunreactie was bij het gebruik van *H. polygyrus* dus wel gewijzigd, maar de parasitaire worm bleek geen beschermend effect te hebben op de gezondheid van de muizen, maar stimuleerde juist het pathofysiologische proces.

Bepaalde probiotica als *L. acidophilus*, *B. subtilis* en *L. rhamnosus* hebben een positief effect op de preventie van de bacteriële infectie in het *C. rodentium* muismodel, maar het gebruik van de verschillende probiotica kan verschillende effecten hebben op de mucosale immuunreactie. De probiotica hebben een beschermend effect op de gezondheid van de gastheer waarbij de immuunreactie vaak gewijzigd wordt, maar in bepaalde onderzoeken ook ongewijzigd blijft. Het onderliggende immunologische mechanisme van de voordelige effecten van probiotica in het *C. rodentium* muismodel wordt hierdoor nog niet volledig begrepen. Verder

onderzoek zou moeten uitwijzen of de immuunreactie daadwerkelijk gewijzigd wordt en met welk mechanisme dit exact gebeurt bij de verschillende probiotica.

De beschreven probiotica bleken dus een positief effect te hebben op de preventie van de *C. rodentium* infectie, maar het moment wanneer de probiotica toegediend moet worden in het muismodel bleek daarbij ook van belang. In de studie van Chen *et al.* in 2005B werd aangetoond dat het toedienen van *L. acidophilus* effectiever was vóór de *C. rodentium* infectie dan een gelijktijdige infectie. In de studie van D'Arienzo *et al.* in 2006 en in de studie van Johnson-Henry *et al.* in 2005 bleek de toediening van *B. subtilis* of *L. rhamnosus* en *L. acidophilus* vóór de *C. rodentium* infectie een beschermend effect te hebben op de gezondheid van de gastheer. In deze studies werd echter alleen de voorbehandeling van deze probiotica vergeleken met controlegroepen zonder infectie. Er werd niet bestudeerd of een gelijktijdige infectie met de probiotica en *C. rodentium* tot een ander resultaat leidde, terwijl dit niet uitgesloten is bij een ander soort probioticum. Verder onderzoek zou moeten uitwijzen of de verschillende probiotica inderdaad enkel effectief zijn als behandeling voorafgaand van de *C. rodentium* infectie. Dit is ook van belang voor de betekenis van dit soort onderzoek naar probiotica met betrekking tot infectieziekten. Wanneer de beschreven probiotica enkel effectief zijn als voorbehandeling, betekent dit dat het gebruik ervan voornamelijk een preventief doel hanteert en niet als behandeling van darmpathologie kan dienen wanneer de darmen reeds geïnfecteerd zijn.

In de studie van Johnson-Henry *et al.* in 2005 werd het effect van het probioticamengsel *L. rhamnosus* en *L. acidophilus* bestudeerd in het *C. rodentium* muismodel. De gecombineerde toediening van deze twee probiotica bleek een beschermend effect te hebben op de gezondheid van de gastheer. De effecten van het gebruik van *L. rhamnosus* en *L. acidophilus* afzonderlijk van elkaar zijn niet vergeleken in dit onderzoek, terwijl het niet uitgesloten is dat aparte toediening van deze probiotica tot andere resultaten zou kunnen leiden. De waarnemingen van Johnson-Henry *et al.* in 2005 zouden beter onderbouwd zijn wanneer dit wel gescheiden onderzocht zou zijn, waarbij ook de onderliggende mechanismen beter begrepen zouden kunnen worden. Verder onderzoek zou moeten uitwijzen of behandeling van *L. rhamnosus* en *L. acidophilus* afzonderlijk het zelfde effect hebben op de infectie in het *C. rodentium* muismodel. Verder onderzoek zou ook kunnen uitwijzen of andere gebruikscombinaties van de verschillende onderzochte probiotica een mogelijk positiever effect hebben op de bescherming van de gezondheid.

De resultaten van de verschillende beschreven onderzoeken naar het *C. rodentium* muismodel vormen een belangrijke schakel in het begrijpen van de samenwerking tussen het aangeboren en adaptieve immuunsysteem bij gelijktijdige andere infecties. De verschillende studies leveren bewijs dat met bepaalde probiotica ziektebeelden als infectieuze diarree, hyperplasie en colitis voorkomen kunnen worden in het *C. rodentium* muismodel. Het gebruik van probiotica tijdens de vroege stadia van de *C. rodentium* infectie in het muismodel kan de gastheer beschermen tegen pathogeenkolonisatie, de doorbraak van de darmepitheelbarrière en darmpathofysiologie.

De kracht van genetisch gemanipuleerde muizen en de beschikbaarheid van immunologische reagentia maken het *C. rodentium* muismodel een bijzonder aantrekkelijk onderzoeksmodel. Dit muismodel heeft geleid tot beter begrip van infectieziekten, mucosale immuunreacties, immuniteit en darmpathofysiologie. Hopelijk kan deze wetenschappelijke vooruitgang bijdragen aan nieuwe methodes om humane overeenkomstige ziektebeelden te voorkomen en/of te behandelen. Verder onderzoek zou moeten uitwijzen of behandeling van *L. acidophilus*, *B. subtilis* en *L. rhamnosus* ook toegepast kan worden op mensen en of de werkzaamheid ook een positief effect heeft op de preventie van bacteriële infecties in mensen. Het vermogen van deze probiotica om in te grijpen op de A/E pathogeeninfectie in het maag-darmkanaal van muizen, ondersteunt het idee dat dit ook een positieve werking kan hebben bij humane infecties met overeenkomstige A/E darmpathogenen zoals *EPEC* en *EHEC*. Positieve resultaten in *C. rodentium* muismodelstudies duiden het belang aan van onderzoek naar gebruik van probiotica bij humane patiënten. De toepassing van probioticagebruik zou een essentiële aanvulling zijn om wereldwijd *EPEC* en *EHEC* infecties te voorkomen en/of te behandelen in de toekomst.

LITERATUURLIJST

Allison, S. D. & Martiny, J. B. (2008). Colloquium paper: resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **105 Suppl 1**, 11512-11519.

Antonopoulos, D. A., Huse, S. M., Morrison, H. G., Schmidt, T. M., Sogin, M. L. & Young, V. B. (2009). Reproducible community dynamics of the gastrointestinal microbiota following antibiotic perturbation. *Infect.Immun.* **77**, 2367-2375.

Bailey, M. T. (2012). The contributing role of the intestinal microbiota in stressor-induced increases in susceptibility to enteric infection and systemic immunomodulation. *Horm.Behav.* .

Bailey, M. T., Dowd, S. E., Parry, N. M., Galley, J. D., Schauer, D. B. & Lyte, M. (2010). Stressor exposure disrupts commensal microbial populations in the intestines and leads to increased colonization by *Citrobacter rodentium*. *Infect.Immun.* **78**, 1509-1519.

Blaser, M. J. (2004). Bacteria and diseases of unknown cause: hemolytic-uremic syndrome. *J.Infect.Dis.* **189**, 552-555.

Borenshtein, D., McBee, M. E. & Schauer, D. B. (2008). Utility of the *Citrobacter rodentium* infection model in laboratory mice. *Curr.Opin.Gastroenterol.* **24**, 32-37.

Bry, L. & Brenner, M. B. (2004). Critical role of T cell-dependent serum antibody, but not the gut-associated lymphoid tissue, for surviving acute mucosal infection with *Citrobacter rodentium*, an attaching and effacing pathogen. *J.Immunol.* **172**, 433-441.

Chen, C. C., Louie, S., McCormick, B., Walker, W. A. & Shi, H. N. (2005A). Concurrent infection with an intestinal helminth parasite impairs host resistance to enteric *Citrobacter rodentium* and enhances *Citrobacter*-induced colitis in mice. *Infect.Immun.* **73**, 5468-5481.

Chen, C. C., Louie, S., McCormick, B. A., Walker, W. A. & Shi, H. N. (2006). Helminth-primed dendritic cells alter the host response to enteric bacterial infection. *J.Immunol.* **176**, 472-483.

Chen, C. C., Louie, S., Shi, H. N. & Walker, W. A. (2005B). Preinoculation with the probiotic *Lactobacillus acidophilus* early in life effectively inhibits murine *Citrobacter rodentium* colitis. *Pediatr.Res.* **58**, 1185-1191.

Chen, H. D. & Frankel, G. (2005). Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiol.Rev.* **29**, 83-98.

Crompton, D. W. & Nesheim, M. C. (2002). Nutritional impact of intestinal helminthiasis during the human life cycle. *Annu.Rev.Nutr.* **22**, 35-59.

Croxen, M. A. & Finlay, B. B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat.Rev.Microbiol.* **8**, 26-38.

D'Arienzo, R., Maurano, F., Mazzarella, G., Luongo, D., Stefanile, R., Ricca, E. & Rossi, M. (2006). *Bacillus subtilis* spores reduce susceptibility to *Citrobacter rodentium*-mediated enteropathy in a mouse model. *Res.Microbiol.* **157**, 891-897.

Falk, P. G., Hooper, L. V., Midtvedt, T. & Gordon, J. I. (1998). Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **62**, 1157-1170.

Festi, D., Schiumerini, R., Birtolo, C., Marzi, L., Montrone, L., Scaioli, E., Di Biase, A. R. & Colecchia, A. (2011). Gut microbiota and its pathophysiology in disease paradigms. *Dig.Dis.* **29**, 518-524.

Finkelman, F. D., Shea-Donohue, T., Goldhill, J., Sullivan, C. A., Morris, S. C., Madden, K. B., Gause, W. C. & Urban, J. F., Jr (1997). Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models. *Annu.Rev.Immunol.* **15**, 505-533.

Fox, J. G., Beck, P., Dangler, C. A., Whary, M. T., Wang, T. C., Shi, H. N. & Nagler-Anderson, C. (2000). Concurrent enteric helminth infection modulates inflammation and gastric immune responses and reduces helicobacter-induced gastric atrophy. *Nat.Med.* **6**, 536-542.

Goto, Y. & Kiyono, H. (2012). Epithelial barrier: an interface for the cross-communication between gut flora and immune system. *Immunol.Rev.* **245**, 147-163.

Higgins, L. M., Frankel, G., Douce, G., Dougan, G. & MacDonald, T. T. (1999). Citrobacter rodentium infection in mice elicits a mucosal Th1 cytokine response and lesions similar to those in murine inflammatory bowel disease. *Infect.Immun.* **67**, 3031-3039.

Hong, H. A., Duc le, H. & Cutting, S. M. (2005). The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiol.Rev.* **29**, 813-835.

Hooper, L. V., Bry, L., Falk, P. G. & Gordon, J. I. (1998). Host-microbial symbiosis in the mammalian intestine: exploring an internal ecosystem. *Bioessays* **20**, 336-343.

Huffnagle, G. B. (2010). The microbiota and allergies/asthma. *PLoS Pathog.* **6**, e1000549.

Johnson-Henry, K. C., Nadjafi, M., Avitzur, Y., Mitchell, D. J., Ngan, B. Y., Galindo-Mata, E., Jones, N. L. & Sherman, P. M. (2005). Amelioration of the effects of Citrobacter rodentium infection in mice by pretreatment with probiotics. *J.Infect.Dis.* **191**, 2106-2117.

Kaplan, M. H., Schindler, U., Smiley, S. T. & Grusby, M. J. (1996). Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity* **4**, 313-319.

Khan, M. A., Ma, C., Knodler, L. A., Valdez, Y., Rosenberger, C. M., Deng, W., Finlay, B. B. & Vallance, B. A. (2006). Toll-like receptor 4 contributes to colitis development but not to host defense during Citrobacter rodentium infection in mice. *Infect.Immun.* **74**, 2522-2536.

La Ragione, R. M. & Woodward, M. J. (2003). Competitive exclusion by Bacillus subtilis spores of Salmonella enterica serotype Enteritidis and Clostridium perfringens in young chickens. *Vet.Microbiol.* **94**, 245-256.

Lebeis, S. L., Bommarius, B., Parkos, C. A., Sherman, M. A. & Kalman, D. (2007). TLR signaling mediated by MyD88 is required for a protective innate immune response by neutrophils to Citrobacter rodentium. *J.Immunol.* **179**, 566-577.

Luo, Y., Frey, E. A., Pfuetzner, R. A., Creagh, A. L., Knoechel, D. G., Haynes, C. A., Finlay, B. B. & Strynadka, N. C. (2000). Crystal structure of enteropathogenic *Escherichia coli* intimin-receptor complex. *Nature* **405**, 1073-1077.

Luperchio, S. A., Newman, J. V., Dangler, C. A., Schrenzel, M. D., Brenner, D. J., Steigerwalt, A. G. & Schauer, D. B. (2000). *Citrobacter rodentium*, the causative agent of transmissible murine colonic hyperplasia, exhibits clonality: synonymy of *C. rodentium* and mouse-pathogenic *Escherichia coli*. *J.Clin.Microbiol.* **38**, 4343-4350.

Maaser, C., Housley, M. P., Iimura, M., Smith, J. R., Vallance, B. A., Finlay, B. B., Schreiber, J. R., Varki, N. M., Kagnoff, M. F. & Eckmann, L. (2004). Clearance of *Citrobacter rodentium* requires B cells but not secretory immunoglobulin A (IgA) or IgM antibodies. *Infect.Immun.* **72**, 3315-3324.

Mundy, R., MacDonald, T. T., Dougan, G., Frankel, G. & Wiles, S. (2005). *Citrobacter rodentium* of mice and man. *Cell.Microbiol.* **7**, 1697-1706.

Philpott, D. J., McKay, D. M., Mak, W., Perdue, M. H. & Sherman, P. M. (1998). Signal transduction pathways involved in enterohemorrhagic *Escherichia coli*-induced alterations in T84 epithelial permeability. *Infect.Immun.* **66**, 1680-1687.

Rodrigues, D. M., Sousa, A. J., Johnson-Henry, K. C., Sherman, P. M. & Gareau, M. G. (2012). Probiotics Are Effective for the Prevention and Treatment of *Citrobacter rodentium*-Induced Colitis in Mice. *J.Infect.Dis.* **206**, 99-109.

Sanders, M. E. & Klaenhammer, T. R. (2001). Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. *J.Dairy Sci.* **84**, 319-331.

Simmons, C. P., Clare, S., Ghaem-Maghami, M., Uren, T. K., Rankin, J., Huett, A., Goldin, R., Lewis, D. J., MacDonald, T. T. & other authors (2003). Central role for B lymphocytes and CD4+ T cells in immunity to infection by the attaching and effacing pathogen *Citrobacter rodentium*. *Infect.Immun.* **71**, 5077-5086.

Turnbaugh, P. J., Backhed, F., Fulton, L. & Gordon, J. I. (2008). Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell.Host Microbe* **3**, 213-223.

Wiles, S., Clare, S., Harker, J., Huett, A., Young, D., Dougan, G. & Frankel, G. (2004). Organ specificity, colonization and clearance dynamics in vivo following oral challenges with the murine pathogen *Citrobacter rodentium*. *Cell.Microbiol.* **6**, 963-972.

Xu, J. & Gordon, J. I. (2003). Honor thy symbionts. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **100**, 10452-10459.

Yoshida, M., Kobayashi, K., Kuo, T. T., Bry, L., Glickman, J. N., Claypool, S. M., Kaser, A., Nagaishi, T., Higgins, D. E. & other authors (2006). Neonatal Fc receptor for IgG regulates mucosal immune responses to luminal bacteria. *J.Clin.Invest.* **116**, 2142-2151.

Zhou, X., Giron, J. A., Torres, A. G., Crawford, J. A., Negrete, E., Vogel, S. N. & Kaper, J. B. (2003). Flagellin of enteropathogenic *Escherichia coli* stimulates interleukin-8 production in T84 cells. *Infect.Immun.* **71**, 2120-2129.