

# Kampilobakterioza u miša - patogeneza i imunološki nadzor

---

**Vučković, Darinka**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**1996**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:188:930767>

*Rights / Prava:* [Attribution-NonCommercial 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-23**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka Library - SVKRI Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Darinka Vučković**

**KAMPILOBAKTARIOZA U MIŠA -  
PATOGENEZA I IMUNOLOŠKI NADZOR**

**Doktorska disertacija**

**SVEUČILIŠNA KNJIŽNICA  
RIJEKA**



**930024910**

**Rijeka, 1996**

## I AUTOR

Ime i prezime DARINKA VUCKOVIC  
Datum i mjesto rođenja 20. prosinca 1958. Rijeka  
Naziv fakulteta, odnosno Medicinski fakultet u Rijeci  
organizacije za postdiplomski 1983.  
studij i datum završene nastave Medicinski fakultet u Rijeci  
I i III stupnja 1992.  
Sadašnje zaposlenje asistent Medicinskog fakulteta  
u Rijeci

## II PODACI O DISERTACIJI I MENTORIMA

KAMPILOBAKTERIOZA U MISA - PA  
TOGENEZA I IMUNOLOSKI NADZOR

Naslov rada

Broj stranica, slika, tabela, 82 str., 16 slike, 2 tab.,  
bibliografskih podataka  
Ustanova i mjesto gdje je Medicinski fakultet u Rijeci  
disertacija izrađena  
Znanstvena disciplina BIOMEDICINA  
Mentori Prof.dr.sc. Miljenko Dorić  
Fakultet na kojem je Medicinski fakultet u Rijeci  
disertacija obranjena

## III OCJENA I OBRANA

Datum prijave teme 2. ožujka 1996.  
Datum predaje rada 5. srpnja 1996.  
Datum sjednice Vijeća na kojoj rad prihvaćen 8. listopada 1996.  
Sastav povjerenstva koje prof.dr.Miro Morović, prof.  
disertaciju ocijenilo dr.sc. Vladimir Delić i prof.  
dr.sc. Miljenko Dorić  
Datum obrane disertacije 30. listopada 1996.  
Sastav povjerenstva pred kojim je disertacija I s t i  
obranjena  
Datum promocije

Rad je najvećim dijelom izrađen na Zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci, a koncentracija citokina u plazmi određivana je na Institutu za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Ljubljani.

Voditelj: ***Prof. dr. Miljenko Dorić***

Lektor: ***Jasna Miškulin-Nemeth, prof.***

Rad ima: 92 stranice

2 tablice

16 slika

Tijekom izrade i konačnog oblikovanja ovog rada, moj mentor prof. dr. Miljenko Dorić uvijek mi je spremno pružao pomoć.

Rad je značajno obogaćen zahvaljujući pomoći dr. sc. Branke Wraber i laborantica Bojane i Katje, koje nisu žalile vrijeme i materijal uloženi u izradu dijela dobivenih rezultata.

Zahvaljujem prof. dr. Stipanu Jonjiću na korisnim sugestijama pri planiranju dijela pokusa.

Na dragocjenoj tehničkoj pomoći zahvalna sam laboranticama Danieli Guić, Mirjani Topić i Zdenki Starčević te ostalim članovima našeg Zavoda koje je svojim zalaganjem omogućilo nesmetano odvijanje eksperimentalnog dijela ovog istraživanja.

Posebna zahvala dr. sc. Maji Abram koja je pomogla i ubrzala dovršavanje ovog rada, te Sandri Abramović na podršci i pomoći pri završnoj realizaciji disertacije.

Zahvaljujem i svim kolegama sa Zavoda za fiziologiju i imunologiju te Zavoda za histologiju na podršci, strpljivosti i razumijevanju.

*Jeleni, Maji i Miodragu*

*koji mi čine život vedrijim i potpunijim.*

# SADRŽAJ

stranica

1. UVOD I OBRAZLOŽENJE TEME .....	1
2. OPĆI DIO .....	6
2.1. Rod <i>Campylobacter</i> .....	7
2.2. <i>Campylobacter jejuni</i> .....	10
2.2.1. Morfološke značajke .....	10
2.2.2. Uzgojne osobine .....	10
2.2.3. Antigena struktura .....	11
2.2.4. Osjetljivost prema činiteljima okoline .....	11
2.2.5. Ekologija i epidemiologija .....	11
2.2.6. Patogeneza infekcija uzrokovanih s <i>C. jejuni</i> .....	12
2.3. Načini obrane od infekcije .....	17
2.3.1. Nespecifični načini obrane od infekcije .....	17
2.3.1.1. Koža i sluznice .....	17
2.3.1.2. Normalna, fiziološka flora .....	18
2.3.1.3. Topivi posrednici .....	19
2.3.1.4. Proteini akutne faze .....	20
2.3.1.5. Fagocitoza .....	22
2.3.2. Stanična imunost .....	23
2.3.2.1. T limfociti .....	24
2.3.2.2. Citokini .....	26
2.3.2.3. NK stanice .....	29
2.3.3. Humoralna imunost .....	29
2.3.3.1. Kinetika stvaranja protutijela .....	32
3. MATERIJALI I METODE RADA .....	34
3.1. Pokusne životinje .....	35
3.2. Bakterijski soj .....	35
3.3. Priprema bakterijske suspenzije za inokulaciju .....	35
3.4. Određivanje broja <i>C. jejuni</i> u organima miša .....	36
3.5. Monoklonska protutijela .....	37
3.6. Selektivna deplecija pojedinih limfocitnih subpopulacija <i>in vivo</i> .....	37
3.7. Određivanje citokina (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-6 i TNF- $\alpha$ ) u plazmi inficiranih životinja .....	38
3.8. Određivanje razine protutijela u plazmi inficiranih životinja .....	38
3.9. Histološki pregled .....	39
3.10. Statistička obrada i prikaz rezultata .....	39

4. REZULTATI .....	40
4.1. Prijemljivost različitih sojeva miševa na infekciju s <i>C. jejuni</i> .....	41
4.2. Tijek primarne kampilobakterioze u C57Bl/6 miševa .....	43
4.2.1. Dinamika iščišćavanja kampilobaktera iz jetre i slezene C57Bl/6 miševa tijekom primarne kampilobakterioze .....	43
4.2.2. Makroskopske i patohistološke promjene jetre i slezene C57Bl/6 miševa u tijeku primarne kampilobakterioze .....	44
4.2.3. Dinamika sinteze citokina u C57Bl/6 miševa tijekom primarne kampilobakterioze .....	47
4.2.4. Tijek primarne infekcije s <i>C. jejuni</i> u C57Bl/6 miševa nakon selektivne deplecije CD4 <sup>+</sup> i CD8 <sup>+</sup> ili NK stanica .....	47
4.2.5. Dinamika sinteze citokina tijekom primarne kampilobakterioze u CD4 <sup>+</sup> depletiranih C57Bl/6 miševa .....	51
4.2.6. Dinamika sinteze citokina tijekom primarne kampilobakterioze u CD8 <sup>+</sup> depletiranih C57Bl/6 miševa .....	53
4.2.7. Dinamika sinteze citokina tijekom primarne kampilobakterioze u NK depletiranih C57Bl/6 miševa .....	53
4.3. Tijek sekundarne kampilobakterioze u C57Bl/6 miševa .	56
4.3.1. Razlike u tijeku primarne i sekundarne kampilobakterioze u C57Bl/6 miševa .....	56
4.3.2. Tijek sekundarne infekcije s <i>C. jejuni</i> u C57Bl/6 miševa nakon <i>in vivo</i> deplecije CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> ili NK stanica .....	58
4.4. Dinamika sinteze specifičnih protutijela protiv <i>C. jejuni</i> tijekom primarne i sekundarne infekcije .....	60
5. RASPRAVA .....	62
6. ZAKLJUČNI PREGLED .....	71
7. LITERATURA .....	74



## SAŽETAK

*Campylobacter jejuni* je sitna gram negativna zavinuta bakterija štapićastog oblika. Mikroaerofilan je i termofilan kao vjerojatna posljedica adaptacije na vanjske čimbenike svoga prirodnog staništa - probavnog sustava toplokrvnih životinja i ptica.

U humanoj patologiji, *C. jejuni* ima važnu ulogu kao etiološki uzročnik infektivnog proljeva. Iako se *C. jejuni* može vezati na epitelne stanice domaćina prodrijeti u njih, te preživjeti napad makrofaga, nema tipične karakteristike intracelularne bakterije. Stoga je imunološki nadzor kampilobakterioze od strane domaćina izuzetno složen proces koji obuhvaća čimbenike humoralne, ali i stanične imunosti.

Našim smo radom, na uspostavljenom mišjem modelu eksperimentalne kampilobakterioze željeli utvrditi kolika je i kakva uloga pojedinih subpopulcija T limfocita ( $CD4^+$  i  $CD8^+$ ) te urođenoubilačkih (NK) stanica na uspostavu, tijek i kontrolu primarne i ponovne, sekundarne infekcije s *C. jejuni*. Analizirali smo i dinamiku sinteze i lučenja nekih citokina: interferona-gama ( $IFN-\gamma$ ), interleukina-2 ( $IL-2$ ), interleukina-6 ( $IL-6$ ), čimbenika tumorske nekroze-alfa ( $TNF-\alpha$ ), kao i sintezu specifičnih protutijela.

Intraperitonealnom injekcijom  $8-9 \times 10^8$  bakterijskih stanica (CFU) *C. jejuni*, u BALB/c, DBA/2 i C57Bl/6 miševa uspostavili smo primarnu infekciju koja se očitovala hepatosplenomegalijom, pojavom vidljivih žućkastih čvorića na površini jetre, te razmekšanjem slezene. Mikroskopskim pretraživanjem histoloških preparata zapazili smo pojavu multiplih nekrotičnih žarišta u jetri

te izražena krvarenja u crvenoj pulpi slezene. Primarna infekcija s *C. jejuni* rezultira potpunim iščišćavanjem bakterija iz jetre i slezene svih ispitivanih sojeva miševa.

Sekundarnu infekciju izazvali smo ponovljenim intraperitonealnim injiciranjem  $9 \times 10^8$  CFU *C. jejuni*, osam tjedana nakon primarne imunizacije s  $5 \times 10^6$  CFU *C. jejuni*. Dok se u jetri klirens i broj izoliranih bakterija nisu bitnije razlikovali tijekom primarne, u odnosu na sekundarnu infekciju, razlike su naglašene u slezeni. Naime, tijekom sekundarne infekcije, nakon ponovljene imunizacije, nismo uspjeli izolirati *C. jejuni* iz slezene niti jedne ispitivane životinje.

Da bi proučili ulogu staničnih elemenata na tijek i broj *C. jejuni* u primarnoj i u sekundarnoj infekciji, tretirali smo C57Bl/6 miševе, *in vivo*, specifičnim anti-CD4<sup>+</sup>, anti-CD8<sup>+</sup> i anti-NK monoklonskim protutijelima. Sve skupine eksperimentalnih životinja, bez obzira na nedostatak pojedinih staničnih subpopulacija, bile su sposobne u potpunosti odstraniti *C. jejuni* iz svojih organa. Ipak, nedostatak CD8<sup>+</sup> limfocita značajno je produžio trajanje sekundarne infekcije i doveo do porasta broja *C. jejuni* u primarnoj, a naročito u sekundarnoj infekciji u oba ispitivana organa. *In vivo* deplecija NK stanica nije bitnije utjecala na kampilobakteriozu u jetri, ali je značajno produžila trajanje primarne i sekundarne infekcije, te povećala broj kampilobaktera u slezeni.

Pratili smo i koncentraciju, te dinamiku sinteze pojedinih citokina tijekom primarne kampilobakterioze u kontrolnih, imunokompetentnih i selektivno depletiranih C57Bl/6 miševa. IFN- $\gamma$  se može odrediti u plazmi od prvog dana primarne infekcije. U CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> depletiranih životinja koncentracije

ovog citokina su niže cijelim tijekom primarne infekcije u odnosu na kontrolu. IL-2 se tijekom primarne kampilobakterioze javlja u malim koncentracijama odmah na početku infekcije, te postiže maksimalne vrijednosti četvrtog dana. Dinamika lučenja ovog citokina nije bitnije promijenjena u depletiranih miševa. Koncentracije IL-6 mjerljive su u plazmi primarno inficiranih miševa od samog početka bolesti. U životinja tretiranih anti-NK monoklonskim protutijelima zapazili smo povećanu sintezu ovog citokina.

Ispitali smo i kinetiku stvaranja specifičnih protutijela protiv *C. jejuni*, tijekom primarne i sekundarne infekcije. U primarnoj reakciji induktivna faza traje osam dana, maksimum se doseže deseti dan kada započinje postupno opadati. U sekundaranoj reakciji faza indukcije zapravo i ne postoji. Naime, protutijela su mjerljiva u niskom titru od prvog dana po reinfekciji, a maksimalne vrijednosti postignute su već sedmog do devetog dana.

## SUMMARY

*Campylobacter jejuni* is a gram negative curved rod. The bacterium is microaerophilic and thermophilic, most probably as a result of its adaptation to the digestive system of warm blooded animals and birds.

In human pathology *C. jejuni* is important as the causative agent of infectious diarrheal disease. Even though *C. jejuni* can adhere to, invade epithelial cells and survive macrophage attack, it is not a typical intracellular bacterium. Therefore, the immune response to *C. jejuni* infection is very complex and includes both humoral and cellular mechanisms.

To determine the role of different T cells ( $CD4^+$  and  $CD8^+$ ) and natural killer (NK) cells in the control and course of primary and secondary infection caused by *C. jejuni*, we established an experimental model of murine campylobacteriosis. We also followed the production and concentration of several cytokines (interferon-gamma -  $IFN-\gamma$ ; interleukin-2 - IL-2; interleukin-6 - IL-6 and tumor necrosis factor-alpha -  $TNF-\alpha$ ), as well as, the production of specific antibodies.

*C. jejuni* was inoculated ( $8-9 \times 10^8$  colony forming units - CFU) intraperitoneally into BALB/c, DBA/2 and C57Bl/6 mice. Primary infection resulted in hepatosplenomegaly, yellow nodes in the liver and changes in spleen as well. Microscopic examination of the infected tissues showed multiple necrotic lesions in the liver and hemorrhagic changes in the spleen. However, all the bacteria were finally eliminated from the tissues enabling the animals to recover completely.

Secondary infection was induced by injecting  $9 \times 10^9$  CFU of *C. jejuni* 8 weeks after primary immunization with  $5 \times 10^6$  CFU of *C. jejuni*.

The number of CFU in the liver did not significantly differ during primary or secondary infection, but the difference was pronounced in spleen. More precisely, *C. jejuni* could not be isolated from the spleen of animals during secondary infection.

To examine the role of different T cell subpopulations we selectively depleted  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  and NK cells with specific monoclonal antibodies. All groups of mice were regularly capable to eliminate completely *C. jejuni* from the analyzed tissues. However, in the group of mice depleted of  $CD8^+$  cells, the duration of secondary infection was very much prolonged and the number of CFU was increased in comparison to the other experimental and control groups.

Depletion of NK cells did not affect the course of infection in the liver but did in the spleen.

In experiments, where we followed the concentration of different cytokines, it could be concluded that the production of  $IFN-\gamma$  was postponed and lower in infected animals depleted of  $CD4^+$  and  $CD8^+$  cells.

The kinetics of IL-2 production reached a peak on the fourth day of infection and did not differ significantly in mice depleted of different T cell subpopulations. In mice depleted of NK cells the level of IL-6 was higher than in other experimental groups.

The titer of specific antibodies formed towards *C. jejuni* was the highest on the tenth day of primary and on the seventh day of secondary infection.

## **1. UVOD I OBRAZLOŽENJE TEME**

Bakterije roda *Campylobacter* prvi put su opisane početkom ovog stoljeća kada su izolirane iz uterinog eksudata ovce koja je abortirala (78). Smatrane su gotovo isključivo patogenima životinja i uzročnicima profesionalnih oboljenja veterinara. Sedamdesetih godina dobivaju na medicinskom značaju, jer su izolirane iz stolice pacijenta s enterokolitisom (33,120).

Danas se u rodu *Campylobacter* nalazi više različitih vrsta i nekoliko podvrsta. Međusobno se razlikuju po svojim biokemijskim karakteristikama. U humanoj se patologiji kao najčešći uzročnik intestinalnih oboljenja pojavljuje *C. jejuni*, a kao uzročnik ekstraintestinalnih oboljenja *C. fetus*.

Kampilobakteri su sitni gram-negativni zavinuti štapići koji na jednom ili oba kraja posjeduju po jednu polarnu flagelu. Rastu u mikroaerofilnim uvjetima, a samo neki su aerotolerantni. *C. jejuni* je termofilan i najbolje raste pri temperaturi od 42°C. To je vjerojatno posljedica adaptacije na temperature u njegovom prirodnom staništu - probavnom sustavu toplokrvnih životinja i ptica.

Iako svaka infekcija uzrokovana s *C. jejuni* ne rezultira manifestnim oboljenjem, enteritis uzrokovan ovom bakterijom predstavlja danas veliki zdravstveni problem u industrijski razvijenim zemljama i zemljama u razvoju (50,130). Prema podacima Mikrobiološkog odjela Zavoda za javno zdravstvo Županije primorsko-goranske, učestalost izolacija iz uzoraka stolice, i u našoj je regiji u zadnjih nekoliko godina u stalnom porastu.

*C. jejuni* se prenosi sa životinja na ljude, i s osobe na osobu fekalno-oralnim putem preko kontaminirane hrane ili vode. Prijenos infekcije može biti i perinatalni, s majke na dijete *in utero*, tijekom prolaska kroz porođajni

kanal ili tijekom prvih dana života (141). Postoje indikacije da se infekcija može prenijeti i transfuzijom krvi (100). Svi čimbenici odgovorni za ovaj fenomen nisu poznati, no najznačajniji se čini broj bakterija koji dospijeva u tanko crijevo i specifična otpornost domaćina.

Klinički se slika infekcije s *C. jejuni* najčešće manifestira pojavom akutnog enteritisa s izraženim proljevima i abdominalnom boli. Bolest obično prolazi spontano i ne zahtijeva antibiotsku terapiju, već samo nadoknadu tekućine i elektrolita. U novije vrijeme opisani su i druge lokalizacije infekta, kao što su kolitis, kolecistitis i cistitis (39,45,73,111). Sve se više u literaturi spominju i komplikacije intestinalne kampilobakterioze u vidu rupture slezene ili encefalopatije (42,91). Dokazana je i pojava reaktivnog postinfekcijskog artritisa u ljudi s HLA-B27 antigenom tkivne podudarnosti (71). Kampilobakterioza dobiva na značaju i uslijed dokazane povezanosti Guillain-Barré-ovog, te Miller-Fisher-ovog sindroma s prethodno preboljelom infekcijom s *C. jejuni* (61,85,148).

U svezi patogeneze ove bakterijske infekcije otkriven je niz zanimljivih pojedinosti, ali još uvijek ima i mnogo nepoznanica. Zna se da se *C. jejuni* može prihvatiti na epitelne stanice u kulturi, te da su za ovo opažanje važni nedavno otkriveni proteini stanične stijenke (64). Nakon prihvaćanja slijedi faza ulaska u epitelne stanice domaćina te prodor bakterija do submukoze transcitozom kroz citoplazmu stanica. Elektronska mikroskopija je pokazala da kampilobakter može prolaziti i između stanica, paracelularno (70). Od važnosti je i uočena pojava da kampilobakter može preživjeti napad makrofaga (66). Do pojave upalne reakcije dolazi uslijed porasta cikličnog adenozin monofosfata, prostaglandina  $E_2$  i leukotriena  $B_4$  u



inficiranom tkivu crijeva (37). Najbolje proučeni faktor patogenosti je flagela, čija je uloga u procesu invazije stanica dokazana sa sigurnošću (49,110). Od važnosti je i uloga toksina koje producira *C. jejuni* (31).

Budući da je enteritis praćen prolaznom fazom bakterijemije, zanimljivo je istaknuti da kod trudnica ovo može rezultirati infekcijom fetusa ili pobačajem (34,106). Mehanizam učinka kampilobaktera na fetus nije objašnjen.

O imunološkom nadzoru kampilobakterioze od strane domaćina danas se relativno malo zna. *C. jejuni* nije tipičan intracelularni parazit jer unutar stanica može preživjeti do jednog tjedna za razliku npr. od listerije ili mikobakterija koji unutar stanica mogu preživjeti i nekoliko tjedana. Iako je dokazano njegovo prodiranje u stanice crijevnog epitela i makrofage, o ulozi pojedinih komponenti stanične imunosti u odgovoru domaćina nema mnogo podataka, što predstavlja izazov za nova istraživanja (97). Istovremeno proučavaju se i mehanizmi humoralne jer *C. jejuni* nema tipične karakteristike intracelularne bakterije. Jasno je dakle, da je imunološki odgovor domaćina na infekciju s *C. jejuni* složen proces čiji slijed i točna svojstva treba tek upoznati.

Patogeneza i načini imunološkog nadzora najbolje se mogu proučavati na *in vivo* modelima. Stoga je u ovom radu uspostavljen model eksperimentalne kampilobakterioze na osjetljivim pokusnim životinjama (različiti sojevi miševa). Selektivnom deplecijom pojedinih subpopulacija T limfocita i urodenoubilačkih (NK - natural killer) stanica pokušala se utvrditi njihova uloga u kontroli primarne i sekundarne infekcije ovom bakterijom. Analizirana je i sinteza specifičnih protutijela, te dinamika sinteze nekih

nekroze- $\alpha$ ). Navedenim istraživanjima željelo se pridonijeti boljem poznavanju patogeneze ove infekcije i uloge različitih obrambenih sustava domaćina.

## 2. OPĆI DIO

## 2.1. Rod *Campylobacter*

Prema najnovijoj Bergey-ovoj klasifikaciji rod *Campylobacter* pripada Sekciji 2. aerobne/mikroaerofilne, pokretne, spiralne/vibrioidne gram negativne bakterije (125).

Prvi opis kampilobaktera u mikroskopskom preparatu stolice djeteta s proljevom datira iz 1887. Prvu bakteriju današnjeg roda *Campylobacter* izolirali su veterinari Mac Fadyean i Stockman 1909. iz uterinog eksudata ovce koja je abortirala. Sličnu bakteriju izolirao je Smith 1918. iz mrtvog fetusa ovce. Vjerujući da se u oba slučaja radi o istoj vrsti bakterije Smith i Taylor su 1919. za nju predložili naziv *Vibrio fetus*. Tek 1963., kada je utvrđeno da se ta bakterija po mnogim karakteristikama, a posebno po malom sadržaju G + C u kromosomskoj DNA, razlikuje od bakterija roda *Vibrio*, Sebald i Veron su predložili formiranje novog roda s nazivom *Campylobacter* i u njega uvrstili spomenutu bakteriju (125).

Danas se u okviru roda diferencira najmanje 14 vrsta, ali nova taksonomska ispitivanja ukazuju na mogućnost imenovanja novih vrsta te mogućnost dalje podjele roda. Tako su u novi rod *Arcobacter* pripali dosadašnji *Campylobacter skirrowi* i *Campylobacter butzleri*, a *C. cinaedi* i *C. fennelliae* su pridruženi rodu *Helicobacter* (136).

U humanoj patologiji su najčešće zastupljeni *C. jejuni* i *C. coli*, te *C. lari*, *C. fetus ssp. fetus*, *C. hyointestinalis*, *C. upsaliensis*.

Kampilobakteri su spiralno zavijene, gram negativne bakterije štapićastog oblika 0,2-0,5µm široki i 0,5-5 µm dugački. Mogu imati jedan ili više zavoja. U mikroskopskom preparatu često se pojavljuju u obliku slova S ili

galebovih krila. Bakterije iz starih kultura ili pod utjecajem neadekvatnih atmosferskih uvjeta postaju kokoidne. Posjeduju jednu polarnu flagelu na jednom ili oba kraja, te su vrlo pokretne (125).

Kampilobakteri su mikroaerofilne bakterije s respiratornim tipom metabolizma. Najbolje rastu u atmosferi s 3-6% kisika i 3-5% ugljik IV oksida. Dobro rastu na krvnom i čokoladnom agaru, Mac Conckey agaru, te u tioglikolatnom bujonu. Na krutim hranjivim podlogama kolonije su najčešće glatke, okrugle, bezbojne, prozirne, promjera oko 0,5 mm. Sve bakterije ovog roda rastu dobro pri temperaturi od 37°C, a većina i pri 42°C (uz izuzetak *C. fetus*). Izolacija kampilobaktera iz primarno sterilnih materijala, kao što je krv, ne predstavlja problem, iako je ponekad potrebno produžiti inkubaciju do dva tjedna. Kampilobakteri se razmnožavaju sporije nego normalna crijevna flora, tako da se iz uzoraka stolice ne mogu izolirati bez korištenja selektivnih tehnika. Najčešće se za izolaciju koriste obogaćene selektivne hranjive podloge po Skirrow-u ili Butzler-u) i inkubacija pri temperaturi od 42°C koja ne pogoduje većini uobičajenih crijevnih bakterija. Vidljive kolonije se pojavljuju nakon 48-72 sata inkubacije. Međusobno se vrste kampilobaktera razlikuju po biokemijskim osobinama (15).

Kampilobakteri ne oksidiraju niti fermentiraju ugljikohidrate. Kemoorganotrofi su, a energiju crpe metabolizmom aminokiselina. Želatinu i ureu ne hidroliziraju. Svi su oksidaza pozitivni, a većina je i katalaza pozitivna. Nitate reduciraju, a pigment ne stvaraju. Molni udio G+C DNA iznosi 30-38% (125).

Kampilobakterioza je u svijetu raširena zoonoza. Kampilobakteri su komenzali probavnog sustava divljih i domaćih životinja, naročito ovaca, goveda, svinja i peradi (125,21). *C. coli* i *C. hyointestinalis* se najčešće izoliraju iz svinja, *C. upsaliensis* iz pasa, *C. fetus* iz ovaca i goveda, a rezervoar *C. jejuni* su brojne životinje, naročito ptice i perad. Životinje se najčešće zaraze vrlo rano i ostaju doživotni asimptomatski kliconoše s razvijenim specifičnim imunitetom.

Infekcije ljudi su najčešće posljedica konzumiranja mesa kontaminiranog prilikom obrade (najčešće meso peradi), te vode zagađene ekskretima inficiranih životinja, kao i nepasteriziranim mlijekom (21). Infekcija je moguća i u izravnom kontaktu sa zaraženom životinjom. Moguć je i perinatalni prijenos, te prijenos transfuzijom krvi (100,141).

Kampilobakteri u ljudi najčešće uzrokuju dva tipa bolesti: crijevne i ekstraintestinalne. Ove bakterije osim infekcija probavnog sustava (najčešće u vidu enteritisa), mogu izazvati i infekcije respiratornog sustava, septične abortuse, septične artrite i meningitis. Neki su nađeni tijekom upalnog procesa gingive. Ponekad mogu izazvati bakterijemiju, i to češće *C. fetus*. Smatra se da je za ovo njegovo svojstvo odgovoran površni (S) protein koji ima zaštitnu ulogu poput kapsule (20).

Najčešći uzročnik crijevnih infekcija je *C. jejuni* (rjeđe su to *C. coli*, *C. lari*, *C. fetus*, *C. upsaliensis*), a ekstraintestinalnih *C. fetus* (rjeđe *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. sputorum*).

## 2.2. *Campylobacter jejuni*

### 2.2.1. Morfološke značajke

*C. jejuni* je bakterija štapićastog oblika, lagano zavijena, zašiljenih krajeva, na kojima posjeduje, obično, po jednu polarnu flagelu. Prosječna duljina zavoja iznosi 1,12  $\mu\text{m}$ , a amplituda oko 0,48  $\mu\text{m}$ . Vrlo brzo, nakon izlaganja zraku, poprima kokoidni oblik (125).

### 2.2.2. Uzgojne osobine

Osim u mikroaerofilnim uvjetima, *C. jejuni* raste i u eksikatoru sa svijećom, a neko vrijeme može preživjeti i izložen atmosferskom kisiku. Raste pri temperaturi od 37°C, a najbolje pri 42°C, dok na sobnoj temperaturi ne raste. Za njegovu izolaciju iz stolice osim već spomenutih selektivnih hranjivih podloga, danas se koristi tehnika filtracije. Naime zbog svoje veličine i pokretljivosti, prolazi kroz uobičajene bakterijske filtere (s porama od 0,45 ili 0,65  $\mu\text{m}$ ) koji zadržavaju normalnu crijevnu floru. Tako je za izolaciju moguće koristiti hranjive podloge bez dodatka antibiotika (127).

Kod primarne izolacije na krutoj podlozi javljaju se dva oblika kolonija: plosnate, sivkaste, razlivenih rubova s tendencijom rojenja, sjajne i vlažne; ili okrugle, sitne, izbočene, mutne i sluzave.

Osim spomenutih biokemijskih karakteristika (oksidaza, katalaza) u identifikaciji se koristi i test hidrolize hipurata koji je kod *C. jejuni* pozitivan. Ovim testom on se diferencira od *C. coli* koji ne hidrolizira hipurat (125).

### 2.2.3. Antigena struktura

Na površini stanice *C. jejuni* ima lipopolisaharidni antigen (LPS) temeljem kojeg je razvrstan u više od 90 serotipova, te proteinski flagelarni antigen s 50 tipova. Tipizacija se izvodi za epidemiološke potrebe, i to LPS neizravnom hemaglutinacijom prema Penneru, a flagelinski tip aglutinacijom na stakalcu prema Lioru (99).

### 2.2.4. Osjetljivost prema činiteljima okoline

*C. jejuni* ne može podnijeti dugotrajno isušivanje ili zamrzavanje, što ograničava njegovo širenje (21). No ipak u mlijeku, vodi i drugoj hrani može tjednima preživjeti na +40°C. Temperatura pasterizacije ga uništava vrlo brzo, kao i uobičajene koncentracije klora u vodovodnoj vodi. Osjetljiv je na sve dezinficijense koji su u uporabi (15).

### 2.2.5. Ekologija i epidemiologija

*C. jejuni* je bakterija široko rasprostranjena u prirodi. Živi kao komenzal i uzročnik bolesti u probavnom i spolno-mokraćnom sustavu mnogih domaćih i divljih životinja. Ima mnogo domaćina: perad, divlje ptice, psi, mačke, goveda, ovce. Neka istraživanja pokazuju da se većina infekcija ljudi izaziva putem zagađenog nepasteriziranog mlijeka. Prijenosnik može biti i neobrađena (neklorirana) voda za piće ili nedovoljno termički obrađeno meso, naročito piletina (21). Rjeđe je uzrok infekcije izravan kontakt s



inficiranom životinjom (kućni ljubimci koji imaju proljev) (121). S osobe na osobu se širi fekalno, a unosi se oralnim putem. U razvijenim zemljama infekcije se najčešće javljaju ljeti i u ranu jesen, dok se u zemljama u razvoju ne može pratiti sezonski karakter bolesti. Infekcije zahvaćaju uglavnom djecu do dvije godine i mlade do 25 godina (123).

Godišnja učestalost infekcija s *C. jejuni* u SAD iznosi 1%, a u Engleskoj i Wales-u pretpostavljeni broj oboljelih iznosi oko 500 000 godišnje (1,130). U Engleskoj broj prijavljenih infekcija s *C. jejuni* ukazuje da se on danas češće izolira od bakterija roda *Salmonella* i *Shigella*, a učestalost je i dalje u porastu (65).

#### 2.2.6. Patogeneza infekcija uzrokovanih s *C. jejuni*

Najčešća manifestacija infekcije s *C. jejuni* je akutni enteritis, čiji simptomi mogu trajati od jednog do sedam dana. Inkubacijski period iznosi jedan do sedam dana i kraći je što je progutana doza bakterija veća. Infektivna doza iznosi obično od  $10^4$  bakterija na više, jer je *C. jejuni* osjetljiv na klorovodičnu kiselinu prisutnu u želudcu (17). Mlijeko, masti ili voda, koje olakšavaju prolaz kroz želudac, omogućavaju pojavu bolesti i prilikom unosa manjeg broja mikroorganizama. Za nastanak infekcije važna je pokretljivost *C. jejuni*, točnije posjedovanje flagela čime je olakšan prolazak kroz želudac do crijeva. *C. jejuni* se razmnožava u žuči što olakšava kolonizaciju gornjeg dijela tankog crijeva u ranoj fazi bolesti (17). Bolest često započinje prodromima s vrućicom, glavoboljom, mijalgijom i slabošću, 12-24 sata prije nastupa crijevnih simptoma: dijareje, slabosti, vrućice i

abdominalne boli (16). Dijareja može biti različitog stupnja, od nekoliko rjeđih stolica do mnogo obilnih vodenastih i krvavih stolica. Abdominalna bol ima obično karakter grčeva koji popuštaju s defekacijom. Bolovi mogu imitirati kliničku sliku akutnog apendicitisa. Oštećenje tkiva uključuje jejunum, ileum i kolon u kojima se razvijaju slične patološke promjene, u smislu difuznog, krvarećeg, edematoznog enteritisa. Infekcija se može manifestirati i kao akutni kolitis sa simptomima vrućice, abdominalnih grčeva i krvavim proljevima koji traju tjedan dana i dulje. Mikroskopski pregled uzorka biopsije rektuma pokazuje nespecifični kolitis s upalnim infiltratom neutrofila, mononuklearnih stanica i eozinofila u lamini proprijji, degeneraciju, atrofiju, nedostatak sluzi i apscese u epitelijalnim žlijezdama, te ulceracije mukoznog epitela (139). Često ove promjene slične na Crohn-ovu bolest. Stupanj oštećenja tkiva ovisi naravno i o stanju domaćina. Bakterijemija je uočena kod manje od 1% bolesnika, za što je djelomično odgovorna činjenica da se krv za hemokulturu vrlo rijetko uzima od bolesnika s proljevom, bez obzira na prisustvo vrućice. Bakterijemija je češća kod vrlo mladih ili vrlo starih osoba (130). Budući je *C. jejuni* osjetljiv na baktericidnost seruma, bakterijemija je možda posljedica cirkulacije kampilobaktera unutar leukocita, u kojima može preživjeti do sedam dana (za razliku od tipičnih intracelularnih parazita koji to mogu i nekoliko tjedana) (37). Prisustvo bakterijemije kod nekih bolesnika, te stanične infiltracije kod *C. jejuni* kolitisa, ukazuje na ulazak u tkiva kao patogenetski mehanizam. LPS koji se nalazi na površini stanice pokazuje sve karakteristike endotoksina, kao i kod ostalih gram negativnih bakterija (101). Dokazano je i prisustvo ekstracelularnih toksina s citopatskim učinkom i

klasičnih enterotoksina (cholera-like toksin, citoletalni distendirajući toksin, shiga-like toksin, hemolizin), iako svih u dosta niskim koncentracijama, na koje inficirane osobe ne stvaraju neutralizirajuća protutijela (57,143). *C. jejuni* se veže na epitelne stanice što olakšava kolonizaciju crijeva. Izdvojen je površni antigen (PEB1) koji je izgleda glavni adhezin i jedan je od značajnijih antigena u ove bakterije, te predstavlja osnovu za izradu vakcine (64,98). Nakon vezivanja na stanice domaćina *C. jejuni* prodire u njih i ostaje u vakuolama u citoplazmi, a ponekad se vide i slobodne bakterije u citoplazmi. Ovo ponekad može rezultirati lizom stanice (111). Sposobnost ulaska u stanice domaćina neki autori objašnjavaju dobro opisanim načinom ovisnim o mikrofilamentima, kao što to čine bakterije roda *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria* (68,69,79). Drugi autori naglašavaju ulogu mikrotubula, dok neki ne mogu potvrditi niti jedan od ovih mehanizama (95,110). Potvrđena je *de novo* sinteza bakterijskih proteina prilikom invazije epitelnih stanica (95). Jedini čimbenik za koji je sa sigurnošću dokazano da ima ulogu u procesu ulaska u stanice jest flagela (49,70,110). Eksperimentalno je dokazana i mogućnost da kampilobakter prolazi i između stanica u dublje slojeve tkiva (36,49,70). Moguća je i uloga membranskih M stanica koje se nalaze između epitelnih stanica iznad Peyer-ovih ploča (što je dokazano kod *Shigella*) (51). M stanice nemaju mikrovile, a aktivno pinocitiraju i prenose makromolekule i neke bakterije iz intestinalnog lumena u subepitelijalna tkiva. Pretpostavlja se da imaju važnu ulogu u izlaganju antigena Peyer-ovim pločama. Važno je naglasiti da one ne funkcioniraju kao antigen prezentirajuće stanice. Za ovaj način prodiranja u subepitelijalna tkiva kampilobakter mora izbjeći ubijanje od strane makrofaga nakon

prolaza kroz M stanice i ulaza u dublje limfoidno tkivo, što je i potvrđeno (66).

Tako su ulazak u stanice domaćina i oštećenje tkiva glavni elementi u patogenezi bolesti (65). Smanjenje broja enterocita (oštećenje epitela) odgovornih za absorpciju tekućine dovodi do proljeva. No osim toga važna je i uloga upalne reakcije, što je dokazano na mnogim animalnim modelima (41,111,144). U radu Everesta i sur. opisano je povećanje nivoa cikličnog adenozin monofosfata (cAMP), prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ) i leukotriena  $B_4$  ( $LTB_4$ ) u inficiranom intestinalnom tkivu (37). Ovo ukazuje na mogućnost aktivne sekrecije tekućine iz crijeva prilikom proljeva uzrokovanog kampilobakterom.

Meningitis i endokarditis su rijetki oblici infekcije s *C. jejuni*. Uglavnom su opisana tri tipa ekstraintestinalnih infekcija s *C. jejuni*: prolazna bakterijemija kod akutnog enteritisa koja ne zahtijeva terapiju; trajna bakterijemija ili duboko žarište infekcije kod bolesnika s enteritisom, gdje je bakterijemija posljedica upale probavnog sustava i obično brzo reagira na antimikrobnu terapiju. I konačno: trajna bakterijemija ili duboka infekcija kod imunokompromitiranog bolesnika koji uglavnom nema simptome enteritisa i kad je nužna dugotrajna antimikrobna terapija (18).

*C. jejuni* može izazvati septični abortus, ali trajna bakterijemija u trudnica ne mora izazvati oštećenje fetusa (46). Točno objašnjenje ove pojave još nije nađeno.

Opisani su i slučajevi akutnog kolecistitisa, pankreatitisa i cistitisa uzrokovanih ovom bakterijom (32,38,39,43,80). Najvjerojatnije je da su ovi

slučajevi posljedica izravnog širenja uzročnika, iako je moguće i da su to metastatska žarišta.

U razvijenim zemljama kliconoštvo zaostaje prosječno dva do tri tjedna nakon infekcije, dok u zemljama u razvoju traje kraće, što ukazuje na visok stupanj imuniteta u populaciji.

Kao i kod svih dijarealnih bolesti osnova terapije je nadoknada tekućine i elektrolita. Medikamentozna terapija je potrebna kod manje od polovine bolesnika i to kod onih s teškom kliničkom slikom koja se pogoršava i ne prolazi dulje od jednog tjedna (16,124).

*In vitro* *C. jejuni* je osjetljiv na mnogo antimikrobnih sredstava: eritromicin, tetracikline, aminoglikozide, kinolone i drugo (119,142). Zbog jednostavne primjene, male toksičnosti i dokazane efikasnosti eritromicin je sredstvo izbora (122).

Većina bolesnika se potpuno oporavi nakon infekcije s *C. jejuni*, spontano ili uz primjenu adekvatne antimikrobne terapije. Komplikacije su rijetke. Reaktivni artritis se može javiti nekoliko tjedana nakon infekcije, naročito u osoba s HLA-B27 histokompatibilnim antigenom (71). Guillain-Barré-ov sindrom je rijetka posljedica ove infekcije, no 10-40% slučajeva ove neurološke bolesti nastaje nakon prethodne infekcije s *C. jejuni* (61,72,85,86). Infekcija iznimno rijetko završava letalno i to uglavnom kod starih osoba, imunokompromitiranih ili onih s nekom popratnom bolesti kao što je šećerna bolest, ciroza i sl.

## 2.3. Načini obrane od infekcije

### 2.3.1. Nespecifični načini obrane od infekcije

Od svih postojećih mikroorganizama čovjek je podložan štetnom utjecaju samo njih stotinjak. Uzrok tome jest upravo djelotvornost nespecifičnih obrambenih sustava. Nespecifična obrana može se razmatrati na lokalnoj i sustavnoj razini. Lokalna obrana se obavlja pretežno na mjestu ulaska antigena, odnosno na površini kože i sluznica. Radi se i o mehaničkoj neprobojnosti za strane tvari i o neprekidnom odstranjivanju fizikalnim i kemijskim sredstvima. Sustavna nespecifična otpornost je prvenstveno utemeljena na fagocitozi i nespecifičnim tvarima izvanstanične tekućine.

#### 2.3.1.1. Koža i sluznice

Intaktna koža čini vrlo efikasnu mehaničku barijeru protiv invazije mikroorganizama. Od važnosti su: relativna suhoća, blaga kiselost (pH 5-6) i normalna flora kože. Upaljena i masna koža, kao i promjenjeni pH olakšavaju kolonizaciju bakterijama. Na sluznicama se izlučuju sekreti s antimikrobnim svojstvima. Npr. lizozim je nađen u sekretima svih sluznica. On je naročito djelotvoran protiv gram pozitivnih bakterija. Osim lizozima mogu se naći i specifični imunoglobulini, naročito IgG i sekretorni IgA, te proteini koji vežu željezo, a značaj željeza za mikroorganizme je poznat (145).

Kiseli pH želuca, antibakterijski učinak raznih pankreasnih enzima i intestinalni sekreti su vrlo učinkoviti antimikrobni čimbenici. Peristaltika i deskvamacija epitelnih stanica također. Svaka promjena povećava osjetljivost domaćina na infekciju. Normalnu floru čini  $10^{12}$  mikroorganizama po gramu fecesa koji imaju važnu zaštitnu ulogu. Svaka promjena uslijed primjene antibiotika širokog spektra može rezultirati infekcijom patogenim mikroorganizmima ili komenzalima.

### *2.3.1.2. Normalna fiziološka flora*

Normalna mikrobna flora organizma predstavlja važan čimbenik u zaštiti od ulaska "patogenih" mikroorganizama (76). Načini kojima je to omogućeno jesu: kompeticija za hranjive tvari, kompeticija za receptore na stanicama domaćina, sinteza bakteriocina, sinteza hlapljivih masnih kiselina ili drugih metabolita, kontinuirana stimulacija imunološkog sustava da bi se održao stalan nivo ekspresije histokompatibilnih molekula (DR) razreda II na površini makrofaga i ostalih stanica koje prezentiraju antigene, stimulacija unakrsno specifičnih imunih čimbenika tzv. prirodnih protutijela (128,132). Normalnu floru čine uglavnom bakterije i gljive, a ostali mikroorganizmi su rijetki. Vrste koje su prisutne ovise o ishrani, zagađenosti zraka, higijenskim navikama pojedinca i hormonskom statusu (88,107).

Na tkivima postoje receptori koji omogućavaju vezivanje mikroorganizama koji imaju komplementarna vezna mjesta ili adhezine (6). Zato mnogi mikroorganizmi preferiraju kolonizaciju određenih tkiva. Histokompatibilni antigeni su povezani s predispozicijom na neke infekcije. Tako naprimjer,

osobe s HLA-B27 genom i Reiter-ov sindrom, a osobe s krvnom grupom 0 i kolera.

Prirodna protutijela su protutijela specifična za mikroorganizme, nađena u zdravih ljudi koji prethodno nisu bili inficirani ovim mikroorganizmima. Sintetiziraju se nakon kolonizacije orofarinksa i crijeva s mikroorganizmima koji imaju unakrsno reaktivne antigene s nekim patogenima (114). Od velikog su značenja za imunitet, naročito protiv inkapsuliranih bakterija.

### 2.3.1.3. *Topivi posrednici*

Nakon probijanja mehaničke barijere slijedeća prepreka su solubilne obrambene molekule i stanice. Razinu i lokalizaciju ovih humoralnih i celularnih komponenti reguliraju citokini i ostali produkti imunološkog sustava.

Topivi posrednici jesu serumske komponente komplementa, fibronektin, protein koji se veže za manozu, haptoglobin, amiloid A protein, C-reaktivni protein, protein koji se veže za LPS (LPS-BP), velik broj glikoproteina i neki inhibitori proteaze ( $\alpha_1$ -antitripsin,  $\alpha_2$ -makroglobulin).

Komplement predstavlja sustav od dvadesetak serumskih proteina koji reagiraju međusobno po određenom redu uobičajeno nazvanom "kaskada". Iako se najčešće aktivira klasičnim putem tj. specifičnim protutijelima, može ga aktivirati i površina nekog mikroorganizma, alternativnim putem. Aktivacija komplementa dovodi do lize mikroorganizma, ali on igra veliku ulogu i u procesu fagocitoze, produkciji citokina i privlačenju leukocita na inficirano mjesto. Sposobnost liziranja ciljne stanice je vrlo učinkovita: većina



intestinalnih bakterija je osjetljiva na lizu posredovanu komplementom. Naprotiv, invazivne bakterije su uglavnom otporne na baktericidnost seruma uzrokovanu komplementom. Većinu komponenti komplementa sintetiziraju makrofagi, a sinteza je povećana kao odgovor na infekciju (30).

Fibronektin je glikoprotein velike molekulske težine koji se nalazi u plazmi i na površini stanica i igra veliku ulogu u vezivanju mikroorganizama na stanice domaćina. Prekriva receptore na staničnoj površini i tako sprečava vezivanje jednih, npr. *Pseudomonas aeruginosa*, ali povećava vezivanje drugih mikroorganizama npr. *Staphylococcus aureus*-a (137).

#### 2.3.1.4. Proteini akutne faze

Proteini akutne faze čine nespecifični odgovor na antigen (mikroorganizam), tijekom kojega se povećava koncentracija humoralnih obrambenih komponenti, broj i aktivnost fagocitnih stanica te započinje specifična imunološka reakcija. U tome sudjeluju već postojeći humoralni faktori, ali i *de novo* sintetizirane molekule (citokini, prostaglandini, hormoni).

Sintezu citokina potiče fagocitoza, vezivanje mikroorganizama ili njihovih produkata na površinu stanica, pojedine komponente komplementa, stres proteini stanica domaćina i promijenjene adhezijske molekule na staničnoj površini. Ovoj fazi najviše doprinose mononuklearni fagociti, urodenoubilačke (NK) stanice, T limfociti ( $\gamma\delta$ -T stanice) i endotelne stanice. Mononuklearni fagociti luče interleukin-1 (IL-1), čimbenik tumorske nekroze- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6) i interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) koji stimulira T stanični odgovor. Makrofagi sintetiziraju i prostaglandine i ostale metabolite arahidonske

kiseline. Endotelne stanice luče IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 te interleukin-8 (IL-8) na što ih između ostalog stimulira i LPS gram negativnih bakterija (55).

NK stanice i  $\gamma\delta$ -T stanice prepoznaju tzv. "heat shock" protein koji se eksprimira na makrofagima nakon ingestije mikroorganizma. No i sami mikroorganizmi mogu ekspimirati ovaj protein. Najvažniji produkt NK i  $\gamma\delta$ -T stanica je interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) koga još pojačavaju i interleukin-2 (IL-2) i interleukin-12 (IL-12). IFN- $\gamma$  povećava lučenje IL-1, TNF- $\alpha$  i IL-6 koje sintetiziraju makrofagi. Citokini također potiču oslobađanje adrenokortikotropnog hormona, endorfina, prolaktina, neurotransmitera i hormona rasta koji dalje reguliraju nespecifični i specifični imunološki odgovor (129).

Vrućica je najčešći znak akutne faze upale. Brojni citokini, naročito IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 i IFN- $\alpha$  potiču stanice koje su blizu termoregulacijskog centra u hipotalamusu na povećanu sintezu prostaglandina (35).

Povećana je i sinteza hormona koji stimulira štitnjaču, vazopresina, inzulina i glukagona. Povećan je i katabolizam proteina mišića.

Kao dio odgovora akutne faze, fagociti i solubilne antimikrobne tvari se upućuju na mjesto ulaska mikroorganizama. Citokini, naročito TNF- $\alpha$  i IL-1 povećavaju ekspresiju adhezijskih molekula na endotelnim stanicama, polimorfonuklearima i monocitima (10). Lučenje IL-8 od strane endotelnih stanica, monocita i polimorfonukleara kao odgovor na citokine ili mikrobne produkte dalje modulira ekspresiju adhezijskih molekula i stvara kemotaktički signal za migraciju polimorfonukleara na mjesto upale. Štoviše, IL-8 izravno izaziva oslobađanje sadržaja granula iz polimorfonukleara (55). Sadržaj granula povećava propusnost krvnih žila i nastanak edema. Ostali produkti

makrofaga, kao što su arahidonska kiselina, prostaglandini i leukotrieni, također povećavaju propusnost krvnih žila te uzrokuju vazodilataciju.

U akutnoj fazi se još javljaju i neki nerazjašnjeni fenomeni: pada razina cinka u serumu, te raste razina ceruloplazmina (63). Cink je važan jer sudjeluje u sintezi proteina, povećava mogućnost odgovora limfocita te pomaže u cijeljenju rana, a tkivni rezervoar mu nije poznat.

#### 2.3.1.5. Fagocitoza

Mikroorganizme koji ulaze u limfu, pluća ili krv progutaju i ubijaju fagociti. Cirkulirajući polimorfonukleari i monociti u krvi dopiru i do tkiva jer su privučeni na mjesto upale. Fagocitoza neovisna o opsonizaciji je učinkovitija u alveolama nego na velikim otvorenim površinama kao što je sinovija (138). Mononuklearni fagociti u krvi, limfni čvorovi, slezena, jetra, koštana srž i pluća tvore retikuloendotelni sustav (RES) koji ima funkciju odstranjivanja stranih čestica, uključujući i mikroorganizme ili oštećene stanice. Čestice bivaju prepoznate preko receptora na površini makrofaga. Oblaganje fibronektinom ili komplementom olakšava prepoznavanje (105). Makrofagi i druge stanice prepoznaju neke komponente na površini mikroorganizma (LPS). Ingestirani mikroorganizmi bivaju ubijeni učinkom toksičnih metabolita kisika (vodikov peroksid, superoksid) ili antimikrobnim molekulama iz granula (defenzini, azurocidin, katepsin G) (23,135).

Produkcija IL-1, TNF- $\alpha$  i interleukina-3 (IL-3) od strane makrofaga i/ili limfocita povećava replikaciju matičnih stanica u koštanoj srži (52). Osim što povećavaju broj fagocitnih stanica, citokini povećavaju i njihovu

mikrobicidnu aktivnost.  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}$ ,  $\text{IFN-}\gamma$  i  $\text{IL-2}$  dovode do povećane destrukcije mikroba zbog povećanog stvaranja toksičnih oksidacijskih spojeva i oslobađanja antimikrobnih molekula iz granula fagocita.  $\text{TNF-}\alpha$  i  $\text{IL-1}$  također pojačavaju ekspresiju receptora za  $\text{C3b}$  komponentu komplementa i zbog toga ingestiju organizama opsoniziranih komplementom (133).

Oštećenja nespecifičnog imuniteta mogu biti posljedica maligne bolesti, bubrežne bolesti, infekcija HIV-om, bolesti jetre, alkoholizma, pothranjenosti, starenja, stresa.

### 2.3.2. Stanična imunost

Imunost posredovana stanicama obuhvaća one dijelove imunološkog odgovora u kojima sudjeluju T limfociti, urođenoubilačke (NK) stanice i mononuklearni fagociti. Ranije se smatralo da je uloga stanične imunosti od važnosti jedino u obrani od intracelularnih mikroorganizama, međutim sada je jasno da ima i važnu ulogu u regulaciji imunološkog odgovora općenito. Tako NK stanice i makrofagi, dijelovi prirodnog, filogenetski jednostavnijeg, imunološkog sustava, nisu od važnosti samo u ranoj fazi staničnog imunog odgovora (prije nego li se induciraju specifične T stanice) nego i u kasnijim fazama stanične imunološke reakcije.

Uloga T limfocita, naročito  $\text{CD4}$  subpopulacije, jasno je dokazana na primjeru osoba s oštećenjem imunoloških funkcija uslijed infekcije virusom HIV-a. Funkcija B limfocita (humoralne imunosti) također ovisi o  $\text{CD4}^+$  T limfocitima i staničnom imunom odgovoru.

### 2.3.2.1. T limfociti

Limfociti timusnog porijekla (T stanice) posreduju u dva glavna oblika imunoloških funkcija: efektorskim i regulacijskim. U efektorske funkcije ubrajamo reakcije poput kasne preosjetljivosti, odbacivanja alotransplantata, imunost na tumore, reakcije transplantata na primaoca te imunost na intracelularne parazite. Te efektorske funkcije se očituju kroz njihovu sposobnost da luče limfokine ( $CD4^+$  T stanice luče IL-2) i njihovu sposobnost da ubijaju druge stanice ( $CD8^+$  T stanice su vrlo učinkovite u citotoksičnoj aktivnosti) (27,28). Regulacijske funkcije T stanica ogledaju se kroz amplifikaciju citotoksičnosti posredovane drugim T stanicama i pomoć u sintezi imunoglobulina od strane B stanica. Za te je funkcije također potrebna sinteza limfokina. Razumijevanje funkcije T stanica olakšano je otkrićem određenih molekula na njihovoj površini. T stanice na površini posjeduju receptor kojim prepoznaju antigen i koji se sastoji od dva lanca:  $\alpha$  i  $\beta$  lanca. Ovakve T stanice prevladavaju u limfoidnim organima, uključujući timus, limfne čvorove, slezenu, a ima ih i u cirkulaciji. Kod ljudi, T stanice koje nose receptor koji se sastoji od  $\gamma$  i  $\delta$  lanaca su nađene u malom broju na tim mjestima, a više ih je na nekim sluznicama, npr. u intestinalnom epitelu gdje čine oko 10% intraepitelnih limfocita (u miševa i do 50%) (25).

Pri aktivaciji T stanica važne su i CD4 i CD8 molekule (dodatne molekule na površini stanice prisutne na gotovo svim zrelim  $\alpha/\beta$  T stanicama), za koje je dokazano da ne sudjeluju u prepoznavanju antigena. One sudjeluju u prepoznavanju produkata gena glavnog kompleksa tkivne podudarnosti

(MHC). Ovi geni kodiraju genetski polimorfne molekule stanične membrane koje sudjeluju u vezivanju peptida važnih za prepoznavanje T stanicama. Ove molekule su u ljudi poznate kao humani leukocitni antigeni (HLA). MHC mjesto kodira dva tipa strukturno različitih molekula poznatih kao molekule razreda I i razreda II (13,44,87).  $CD4^+$  limfociti prepoznaju molekule razreda II kao dio svoje specifičnosti, a po funkciji su to pomoćničke T stanice (pomažu funkciju drugih stanica imunološkog sustava), a  $CD8^+$  limfociti prepoznaju molekule razreda I i posreduju u citotoksičnosti (uništavanju ciljnih stanica). Fizički združene s heterodimerom, receptorom za antigen, nalaze se druge molekule, nazvane CD3. Dok antigenski receptor prepoznaje antigen, CD3 vrši transdukciju aktivacijskog signala kroz membranu u unutrašnjost stanice.

Za T staničnu aktivaciju je potrebna interakcija između kompleksa koji čini antigenski receptor s CD3 molekulama na T stanici, i antigena vezanog s produktima gena MHC-a na akcesorskoj stanici, čime iz membranskog inozitola nastaju dva aktivna metabolita koji aktiviraju T stanice u mirovanju. Također se pojačava lučenje IL-2 i ekspresija receptora za IL-2.

Na temelju vrste limfokina kojeg sintetiziraju, T stanični klonovi se mogu podijeliti u Th1 i Th2. Th1 klonovi sintetiziraju IL-2 i IFN- $\gamma$  te time stimuliraju stanični tip imunog odgovora, povećavaju sintezu IgM i IgG<sub>2</sub> i aktiviraju makrofage. Th2 klonovi sintetiziraju IL-4 i IL-5 te tako povećavaju sintezu IgG<sub>1</sub> i IgE te izazivaju eozinofiliju u krvi i povećanje broja eozinofila lokalno. Th2 tip odgovora prevladava kod infekcije helmintima, dok npr. infekcija protozom koji je intracelularni parazit (*Leishmania major*), inducira Th1 tip odgovora. Do sada nije objašnjeno zašto u nekim imunološkim reakcijama

prevladavaju Th1 ili Th2 stanice, a u većini su one ipak podjednako zastupljene.

#### *2.3.2.2. Citokini*

Limfokini su proteini ili glikoproteini koje sintetiziraju i luče limfociti, a djeluju kao molekularni signali za komunikaciju između stanica imunološkog sustava i kao sustavni medijatori odgovora domaćina na infekciju. Dakle, funkcija im je analogna onoj neurotransmitera i hormona. Danas se zna da veliki broj stanica, naročito mononuklearni fagociti, oslobađaju i/ili odgovaraju na ove tvari.

Citokini su mnogo širi pojam koji se više koristi, i obuhvaćaju limfokine, monokine (citokine koje sintetiziraju mononuklearni fagociti) i ostale medijatore (2).

Djelovanje citokina nije antigen specifično. Međutim njihova uloga u mnogim slučajevima jest da prosljede antigen specifične signale. Tako u slučaju citokina koje sintetiziraju T stanice, njihovo lučenje slijedi nakon stimulacije T staničnog receptora stranim peptidima vezanim uz MHC molekule. Neki mikrobnii antigeni, npr. lipopolisaharid gram negativnih bakterija, izravno stimulira makrofage na sintezu citokina. Aktivacija stanica mikrobnim produktima rezultira oslobađanjem citokina na tom mjestu, fokusirajući upalni odgovor tamo gdje je potrebno. Općenito, citokini reguliraju i koordiniraju klonsku ekspanziju efektorske T i B stanične populacije, mobiliziraju dodatne efektorske stanice na mjesto upale djelujući na adhezijske molekule na endotelnim stanicama i leukocitima, aktiviraju

efektorske stanice na učinkovitiju mikrobicidnost i inaktiviraju odgovor da bi oštećenje tkiva bilo što manje, te koordiniraju proces ozdravljenja (zarastanja) nakon što je patogen ubijen. Ovaj odgovor je uglavnom lokaliziran iako su visoke razine citokina u cirkulaciji dokazane u septičkom šoku. Sustavni efekti posredovani citokinima uključuju ranu regulaciju nespecifičnog imunog odgovora, uključujući vrućicu i reakciju akutne faze, te stimulaciju koštane srži na proizvodnju stanica potrebnih u upalnom odgovoru. Tako citokini posreduju u kompleksnoj regulacijskoj mreži između limfoidnih stanica, hematopoetskih stanica i endotelnih stanica (75)

U *tablici 1* prikazani su najvažniji citokini čija je molekulska građa određena. Opisana su njihova najvažnija svojstva t.j. stanice koje ih sintetiziraju, podražaji koji izazivaju njihovo lučenje, te najvažniji biološki učinci.



**Tablica 1. Važniji citokini i njihova svojstva**

NAZIV	GLAVNI IZVOR	GLAVNI BIOLOŠKI UČINCI
<b>Interleukin-1 <math>\alpha</math> i <math>\beta</math></b>	Makrofagi	Vrućica, oslobađanje adrenokortikotropnog hormona, inducira sintezu TNF, IFN, IL-1, aktivacija fagocita, stimulacija proliferacije B stanica, sinteza imunoglobulina
<b>Interleukin-2</b>	Aktivirane Th1, Tc stanice	Proliferacija T stanica, stimulacija NK stanica, proliferacija B stanica i ekspresija IgG <sub>2</sub>
<b>Interleukin-3</b>	T stanice,	Proliferacija matičnih stanica koštane srži
<b>Interleukin-4</b>	Th2 stanice, mast stanice,	Proliferacija B, Th2 i Tc stanica, inhibicija aktivacije makrofaga
<b>Interleukin-5</b>	Th2 stanice, mast stanice	Proliferacija eozinofila i B stanica
<b>Interleukin-6</b>	Makrofagi, aktivirane Th2 stanice	Proliferacija B i T stanica
<b>Interleukin-7</b>	Stanice koštane srži	Stimulacija B i T staničnih prekursora,
<b>Interleukin-8</b>	Makrofagi, stanice koštane srži	Kemoatraktant za neutrofile i T stanice
<b>Interleukin-9</b>	CD4 <sup>+</sup> T stanice	Kofaktor za neke CD4 <sup>+</sup> T stanične klonove
<b>Interleukin-10</b>	Makrofagi, aktivirane Th2 i CD8 <sup>+</sup> T stanice, B stanice	Inhibira sintezu citokina makrofaga, NK i Th1 stanica, stimulacija rasta B stanica, supresija stanične imunosti
<b>Interleukin-11</b>	Stanice koštane srži	Stimulacija rasta B stanica i produkcije megakariocita
<b>Interleukin-12</b>	Makrofagi, B stanice	Proliferacija Tc i NK stanica, stimulacija sinteze IFN- $\gamma$ stimulacija stanične imunosti, indukcija NK citotoksičnosti, Th1 stanična stimulacija
<b>Interleukin-13</b>	Th2 stanice	Proliferacija B stanica, Indukcija MHC razreda II na makrofagima
<b>Interferon-<math>\alpha</math></b>	Mononuklearni fagociti, limfociti	Utječe na virusnu replikaciju
<b>Interferon-<math>\beta</math></b>	Fibroblasti, epitelne stanice	Utječe na virusnu replikaciju, stimulira funkciju NK stanica i makrofaga
<b>Interferon-<math>\gamma</math></b>	Aktivirane Th1 stanice, CD8 <sup>+</sup> T stanice, NK stanice	Antivirusni učinak, aktivacija stanične imunosti, inhibicija Th2 stanica, aktivacija makrofaga, neutrofila i NK stanica
<b>Faktor tumorske nekroze-<math>\alpha</math></b>	Aktivirani makrofagi, T i NK stanice, mast stanice, eozinofili	Vrućica, aktivacija endotelnih stanica i makrofaga, kofaktor za T i B proliferaciju

### 2.3.2.3. NK stanice

NK stanice su subpopulacija limfocita prvobitno definirana kao veliki granulirani limfociti. U ljudi, na površini eksprimiraju CD16 i/ili CD56 površne antigene, a ne CD3 kompleks (74,103). NK stanice imaju sposobnost lize ciljane stanice bez da je antigen prezentiran u sklopu MHC-a za razliku od T stanica koje prepoznaju strani antigen isključivo u kontekstu vlastitih ili u prisustvu stranih MHC molekula (140). NK stanice mogu igrati važnu ulogu u obrani od intracelularnih patogena, naročito porodice herpes virusa. Većina spoznaja o ovim stanicama potječe iz radova s herpes simpleks virusom, citomegalovirusom, listerijom i toksoplazmom na miševima (5,7,67,113). NK stanice proliferiraju kao odgovor na stimulaciju s IL-2, čiji učinak pojačava IL-12, interleukin-7 (IL-7) i IFN- $\gamma$  (93,102). Citotoksičnu aktivnost im pojačava IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$  i IFN- $\alpha/\beta$ . Uz citotoksičnu aktivnost ove stanice su također značajan izvor IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  u ranim fazama imunog i upalnog odgovora (102).

### 2.3.3. Humoralna imunost

Humoralna imunost je posredovana protutijelima. Plazma stanice koje su završni zreli oblik diferencijacije limfocita B, sintetiziraju protutijela i izlučuju ih u izvanstaničnu tekućinu. Tu se protutijela vežu s antigenom tvoreći imune komplekse. Tako mogu neutralizirati toksin ili virus, ali ne mogu izravno razoriti antigen. Protutijela služe, dakle, kao biljeg za prepoznavanje

cilja (antigena) nekim obrambenim mehanizmima, koji tako obilježen cilj mogu razoriti (sustav komplementa, makrofagi, K stanice).

Protutijela su uz sustav komplementa glavne efektorske molekule humoralne imunosti i njihovo postojanje u cirkulaciji i na sluznicama određuje stečenu otpornost prema mnogim infektivnim agensima. Protutijela su glikoproteini koji se (s izuzetkom prirođenih protutijela) stvaraju nakon dodira imunološkog sustava s tuđim tvarima (antigenima). Ona imaju sposobnost specifičnog selektivnog vezanja s antigenima što su izazvali njihovu sintezu. Protutijela čine oko 20% ukupnih proteina plazme i uglavnom pripadaju serumskoj frakciji gama globulina, ali se znatna količina može naći i među beta globulinima. Osim u plazmi imunoglobulini se nalaze slobodni u međustaničnoj tekućini, u sekretima egzokrinih žlijezda, te vezani uz površinu limfocita B kao receptori za antigen.

Razlikujemo 5 klasa imunoglobulina definiranih gradom teških lanaca. IgM se nalazi u serumu kao pentamer i čini oko 10% ukupnih imunoglobulina. IgM protutijela su prva klasa imunoglobulina koju novorođenče sintetizira i najzastupljenija su u ranom imunološkom odgovoru na novi antigen (24). Većina cirkulirajućih IgM čine protutijela niskog afiniteta za uobičajene tvari u okolišu, naročito polisaharide (26). Tu ubrajamo protutijela na antigene krvnih grupa koja se stvaraju nakon dodira s proteinima iz okoliša ili gastrointestinalnim bakterijama. Ova protutijela najučinkovitije vežu komplement, pri čemu je dovoljna jedna molekula IgM vezana za antigen za aktivaciju kaskade komplementa.

IgG protutijela čine 75% ukupnih imunoglobulina u serumu odrasle osobe i šire su rasprostranjena u tkivima nego ostali izotipovi. Ova protutijela

prolaze kroz posteljicu i predstavljaju osnovu zaštite novorođenčadi tijekom prvih šest mjeseci života. Prevladavaju u donjem dijelu respiratornog sustava i pojavljuju se na sluznicama tijekom eksudativnog odgovora (109). Razlikujemo četiri podklase ( $IgG_1$  -  $IgG_4$ ). Makrofagi imaju površinske receptore koji vezuju  $IgG_1$  i  $IgG_3$ . U odraslih dominira  $IgG_2$  specifičan za polisaharidne determinante inkapsuliranih bakterija (118). Mogu vezati komplement, to najviše  $IgG_3$ , zatim  $IgG_1$  te  $IgG_2$ , dok  $IgG_4$  može aktivirati alternativni put.

$IgA$  čini oko 15% serumskih imunoglobulina, dok je na sluznicama prisutan u najvećoj koncentraciji ( $IgM$  čini svega mali dio sekretornih protutijela). Sekretorni  $IgA$  (u obliku dimera) prisutan je u gastrointestinalnim tekućinama, nazalnom sekretu, slini, suzama i ostalim tjelesnim sekretima i predstavlja značajan način obrane domaćina od infekcije putem dišnog ili probavnog sustava (134). Kolostrum je naročito bogat ovom klasom imunoglobulina što rezultira znatno rjeđim infekcijama dojenčadi hranjenih majčinim mlijekom u odnosu na one hranjene kravljim ili umjetnim mlijekom (146). Razlikujemo dvije podklase  $IgA_1$  i  $IgA_2$ . U koštanoj srži proizvodi se  $IgA_1$  i predstavlja većinu serumskog  $IgA$ , od čega je 80% u obliku monomera. Iako sekretorni  $IgA$  ne aktivira dobro komplement (niti su ovi proteini prisutni na sluznicama u većoj količini),  $IgA$  može neutralizirati aktivnost toksina i omesti vezivanje patogena na receptore na sluznici. Pasivna zaštita pomoću  $IgA$  opisana je na modelima virusnih, bakterijskih i infekcija protozoima (9,54,96).

$IgD$  je u serumu normalno prisutan samo u tragovima (čini svega 0,2% serumskih imunoglobulina). Većina sintetiziranog  $IgD$  nalazi se na površini

ljudskih B limfocita i pretpostavlja se da sudjeluje u diferencijaciji ovih stanica.

IgE čini samo oko 0.004% ukupnih imunoglobulina seruma. Može biti izražen na staničnoj membrani mast stanica i bazofila (81). Nakon vezivanja ovih molekula s određenim antigenima (alergenima), počinje oslobađanje farmakoloških medijatora iz mastocita, a ovi su odgovorni za karakteristične reakcije izazvane izlaganjem alergenima. Povišene koncentracije IgE u serumu vide se i kod crijevnih infekcija s parazitskim crvima (56,83).

#### *2.3.3.1. Kinetika stvaranja protutijela*

Sinteza protutijela ovisi o uvjetima imunizacije (imunogeničnost, količina, oblik, kemizam, molekulska masa, topljivost antigena, put imunizacije, svojstva organizma). Razina imunoglobulina u životinja uzgajanih u akseničnim uvjetima desetak je puta niža, a u bolesnika s kroničnom infekcijom nekoliko puta viša nego u normalnih organizama.

Kinetika stvaranja specifičnih protutijela protiv određenog antigena se razlikuje pri prvom i svakom sljedećem dodiru organizma s tim antigenom.

U primarnoj reakciji razlikujemo nekoliko faza. Induktivna faza (latentno razdoblje) ovisi o antigenu, specijesu i uvjetima imunizacije, a traje od dva do tridesetak dana. Zatim, titar protutijela raste eksponencijalno s vremenom udvostručenja od oko pola dana. Maksimum se doseže za daljnjih pet do deset dana (ovisno o antigenu). Taj se titar može održavati nekoliko dana, a zatim postupno pada (ovisno o brzini sinteze i razgradnje protutijela).

Ponovni ulazak istog antigena nakon nekoliko tjedana izaziva brzi porast titra specifičnih serumskih protutijela do viših vrijednosti negoli u prvom kontaktu. U ovoj sekundarnoj reakciji faza indukcije je gotovo upola kraća. Visok titar protutijela odnosi se pretežno na IgG i traje dulje negoli u primarnoj reakciji. Ova protutijela imaju visok afinitet prema antigenu.

Na dobrovoljcima je dokazano da prilikom ponovnog kontakta s homolognim *C. jejuni* dolazi do infekcije, ali ne i razvoja bolesti (14). U zemljama u razvoju učestalost infekcija s ovom bakterijom opada s dobi što ukazuje na razvoj stečene imunosti. Bolesnici inficirani s *C. jejuni* produciraju specifična IgG, IgM i IgA protutijela u serumu i sekretorni IgA u crijevu (14,143). U zemljama u razvoju specifični serumski IgA raste sa starošću ukazujući na ponavljanu izloženost ovom uzročniku. Humoralna imunost ima veliku ulogu u obrani od infekcije ovom bakterijom, što potvrđuje i težina bolesti kod bolesnika s hipogamaglobulinemijom.

### **3. MATERIJALI I METODE**

### 3.1. Pokusne životinje

U radu su korišteni sljedeći sojevi laboratorijskih miševa: BALB/c (H-2d), C57Bl/6 (H-2b) i DBA/2 (H-2d). Iz literature je soj BALB/c poznat kao osjetljiv, a C57Bl/6 i DBA/2 kao relativno rezistentni na infekciju kampilobakterom (8,97). Starost svih životinja kretala se od 6 do 12 tjedana. Miševi su uzgojeni u uzgojnoj koloniji i vivariju Medicinskog fakulteta u Rijeci, a hranjeni su hranom za miševe, koju proizvodi Biotehnički fakultet Domžale, Slovenija.

### 3.2. Bakterijski soj

U radu je korišten klinički izolat *C. jejuni* NN-1 (od pacijenta s izrazitim enteralnim simptomima) dobiven iz laboratorija za crijevne bakterije Zavoda za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije. Virulentnost soja je održavana povremenim pasažama kroz BALB/c miševe, te uzgojem iz homogenata jetre inficirane životinje u bujonu obogaćenom ekstraktima srca i mozga (BHI - brain heart infusion bujon, DIFCO, Detroit, SAD).

### 3.3. Priprema bakterijske suspenzije za inokulaciju

Bakterijska suspenzija pripremana je presađivanjem soja u BHI bujon, te dovedena inkubacijom pri 42°C uz rotaciju od 4 okretaja u minuti kroz dva sata, u log fazu i raspodijeljena u jednake količine od po 1 ml u kivete za



centrifugiranje (Eppendorf, od 1,5 ml), te smrznuta na  $-70^{\circ}\text{C}$  do upotrebe, uz dodatak 15% (v/v) glicerola.

Inokulum je pripreman odleđivanjem suspenzije iz kivete, te presađivanjem na krvni agar s dodatkom 5% ovčje krvi (Veterinarski zavod, Rijeka, Hrvatska). Nakon inkubacije od 48 sati u mikroaerofilnim uvjetima (koristeći Generbox microaer vrećice i Generbox "catalyseur", BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francuska) i pri temperaturi od  $42^{\circ}\text{C}$ , radila se uvijek svježa suspenzija za inokulaciju. Količina inokuluma je iznosila 0,2 ml BHI bujona po životinji, a sadržavala je  $8-9 \times 10^8$  bakterijskih stanica (CFU - colony forming unit) *Campylobacter jejuni* i injicirana je intraperitonealno. Broj bakterija u suspenziji određivan je spektrofotometrijski (Beckman DB-GT, Burlingame, CA, SAD). Zamućenje je iznosilo 0,9 pri 540 nm.

#### **3.4. Određivanje broja *C. jejuni* u organima miša**

Miševi su žrtvovani cervikalnom dislokacijom. Jetra i slezena aseptički su odstranjene. Svaki je organ propasiran kroz čeličnu mrežicu u 5 ml sterilne fiziološke otopine. Nakon centrifugiranja (Tehtnica LC-320, Železniki, Slovenija) na  $1300 \times g$  kroz 5 minuta supernatant je odstranjen, a talog resuspendiran u 5 ml sterilne destilirane vode i ostavljen 15 minuta na sobnoj temperaturi. Bakterije su zatim isprane u fiziološkoj otopini te resuspendirane u 5 ml BHI bujona (osnovno razrjeđenje) te dalje deseterostruko razrjeđivane. Iz osnovnog, kao i iz svakog sljedećeg razrjeđenja nakapano je na krvni agar s ovčjom krvi  $6 \times 10 \mu\text{l}$ . Nasadne

ploče inkubirane su u mikroaerofilnim uvjetima, pri temperaturi od 42°C kroz 48 sati. Tada je očitana broj poraslih kolonija *C. jejuni*.

### 3.5. Monoklonska protutijela

Monoklonska protutijela korištena u radu u svrhu deplecije pojedinih staničnih populacija proizvedena su iz sljedećih uzgojnih hibridoma: YTS 191.1.2. (štakorsko IgG2b protutijelo na mišju CD4 molekulu), YTS 169.4.2. (štakorsko IgG2b protutijelo na mišju CD8 molekulu), te PK-136 (mišje protutijelo na mišju NK-1 molekulu). Monoklonska protutijela su djelomično pročišćena dvostrukom precipitacijom imunoglobulina sa zasićenom otopinom amonijeva sulfata (50% otopina), a zatim ekstenzivno dijalizirana kroz dijalizacijsku membranu (propusnost 18000 D) u fosfatima puferiranoj fiziološkoj otopini (PBS). Koncentracija protutijela određivana je radijalnom imunodifuzijom (RID, Serotec, Oxford, Engleska) ili enzimskim imunoabsorbentnim testom (103a). Pročišćena protutijela su podijeljena u jednake količine (1ml) i pohranjena na -30°C.

### 3.6. Selektivna deplecija pojedinih limfocitnih populacija *in vivo*

Deplecija pojedinih populacija (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> ili NK) stanica izvršena je metodom po Cobboldu (29). S deplecijom limfocitnih subpopulacija započelo se primjenom odgovarajućih monoklonskih protutijela dan prije infekcije miševa, a zatim je postupak ponavljan svakog petog dana do kraja pokusa. Protutijela su injicirana intraperitonealno u koncentraciji od 1

mg po životinji. Učinkovitost deplecije provjerena je metodom izravne i neizravne imunoflorescencije na protočnom citometru (FACScan, Becton Dickinson, Mountain View, CA, SAD) (59).

### **3.7. Određivanje citokina (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-6 i TNF- $\alpha$ ) u plazmi inficiranih životinja**

Za određivanje citokina u plazmi inficiranih životinja krv je uzimana iz srca životinje anestezirane halotanom. Iz svakog miša dobiveno je 0,5 do 1 ml krvi. Kao antikoagulans korištena je 10,5% otopina EDTA u redestiliranoj vodi (0,1 ml EDTA na 5ml krvi). Nakon centrifugiranja na 800xg kroz 5 minuta plazme su skupljene i smrznute na  $-20^{\circ}\text{C}$  do upotrebe. Korišteni su komercijalni kitovi za određivanje mišjih citokina ELISA testom (Endogen, Cambridge, SAD).

### **3.8. Određivanje razine protutijela u plazmi inficiranih životinja**

Sakupljeni uzorci plazme korišteni su i za određivanje razine protutijela specifičnih za *C. jejuni*, za što je korišten komercijalni kit za izvođenje reakcije vezivanja komplementa (RVK) (Institute VIRION Ltd., Rüşchlikon, Švicarska). Rezultati su izraženi kao titar specifičnih protutijela (najveće razrjeđenje plazme u kojem je RVK reakcija bila pozitivna). Reakcija je izvođena s nerazrjeđenom plazmom te nizom dvostrukih razrjeđenja (od 1:2 do 1:128)

### 3.9. Histološki pregled

Dijelovi tkiva makroskopski promijenjenih organa (jetra, slezena) fiksirani su 4% formalinom, uklopljeni su u parafin te su nakon toga na kliznom mikrotomu rezani odresci debljine 6  $\mu\text{m}$  i bojeni uobičajenim hemalaun-eozinskim bojenjem (116).

### 3.10. Statistička obrada i prikaz rezultata

Razlike u vrijednostima broja *C. jejuni* u jetri i slezeni uspoređivane su Mann-Whitney-evim U testom. Rezultati su prikazani grafički i tabelarno. Svaka pojedinačna točka predstavlja medijanu vrijednost dobivenu testiranjem tri do pet životinja (organa) po skupini, izraženim u  $\log_{10}$  CFU po organu. U tablici su prikazane i najniže i najviše vrijednosti broja CFU *C. jejuni* koje su izostavljene iz slika radi bolje preglednosti. Razlika u dužini trajanja infekcije između pojedinih grupa testirana je Student-ovim *t*-testom. Sve statistički značajne razlike na razini su od 5%.

## 4. REZULTATI

#### 4.1. Prijemljivost različitih sojeva miševa na infekciju s *C. jejuni*

Da bismo utvrdili da li su različiti sojevi miševa prijemljivi za primarnu infekciju s *C. jejuni*, da li se u svih životinja nakon intraperitonealne inokulacije ova bakterija može naći u jetri i slezeni, te da li postoje razlike u tijeku i savladavanju infekcije među pojedinim sojevima miševa, istražena je sposobnost genetički čistih sojeva BALB/c, C57Bl/6 i DBA/2 miševa da uspostave i savladaju primarnu infekciju s *C. jejuni*. Sve životinje su inficirane intraperitonealno s  $8-9 \times 10^8$  CFU kampilobaktera. Praćen je tijek kampilobakterioze to jest dužina trajanja infekcije i broj kampilobaktera u jetri i slezeni žrtvovanih životinja. Svi ispitani sojevi miševa pokazali su se prijemljivima za infekciju s *C. jejuni*. Nakon intraperitonealne inokulacije bakterija infekcija se mogla pratiti u jetri i slezeni svih ispitanih životinja.

U *tablici 2* prikazane su medijane vrijednosti broja izoliranih bakterija, kao i minimalne i maksimalne vrijednosti, dobivene prvog, četvrtog, sedmog, desetog i četrnaestog dana, za svaki obrađeni organ i za svaki soj laboratorijskih miševa. U analizi rezultata posebnu pažnju treba obratiti na prvi dan koji je karakterističan za inicijalnu fazu infekcije, kada u obrani organizma sudjeluju prvenstveno nespecifični sustavi imunosti, te od šestog dana nadalje, kada su već mobilizirani specifični imunosni sustavi, te je uočljiv pad broja CFU *C. jejuni* u jetri i slezeni svih sojeva miševa.

Primarna infekcija s *C. jejuni*, međutim, rezultira potpunim ičišćavanjem bakterije iz jetre i slezene svih istraženih životinja.

**Tablica 2.** Vrijednosti broja CFU *C. jejuni* izoliranog iz organa istraženih sojeva miševa

Dani nakon infekcije	C57Bl/6		BALB/c		DBA/2	
	jetra	slezena	jetra	slezena	jetra	slezena
1	4.35* (3.8-5.8)**	0	3.9 (3.6-5.5)	0	2.4 (0.0-3.7)	0
6	6.1 (5.3-6.6)	2.2 (0.0-2.6)	6.4 (6.3-6.4)	1.65 (0.0-2.1)	5.1 (5.0-5.)	3.2 (2.9-3.6)
8	4.3 (0.0-6.6)	2.9 (0.0-3.3)	4.9 (4.8-5.3)	0	4.5 (0.0-7.1)	3.0 (0.0-6.8)
10	3.3 (0.0-5.7)	0	5.7 (5.6-6.5)	0	5.3 (4.1-6.2)	3.0 (0.0-3.1)

\* medijane vrijednosti broja CFU *C. jejuni* izražene u  $\log_{10}$  CFU po organu

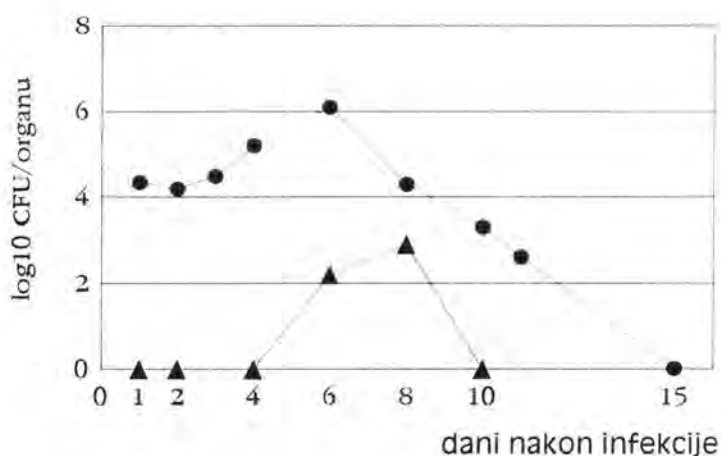
\*\* raspon najnižih i najviših vrijednosti broja CFU *C. jejuni* izražene u  $\log_{10}$  CFU po organu

Obzirom da se C57Bl/6 soj miševa pokazao osjetljivim za infekciju s našim izolatom *C. jejuni*, da je tijekom primarne kampilobakterioze bio pravilan i da je broj bakterija u analiziranim organima bilo moguće točno pratiti, u daljnjem smo se radu ograničili na korištenje upravo ovog soja miševa.

## 4.2. Tijek primarne kampilobakterioze u C57Bl/6 miševa

### 4.2.1. Dinamika iščišćavanja kampilobaktera iz jetre i slezene C57Bl/6 miševa tijekom primarne kampilobakterioze

Kako je iz rezultata prvog pokusa vidljivo da su C57Bl/6 miševi sposobni potpuno iščistiti kampilobakter iz jetre i slezene, željeli smo utvrditi dinamiku iščišćavanja navedenih organa tijekom primarne kampilobakterioze. Ovi rezultati prikazani na *slici 1*.



**Slika 1.** Klirens kampilobaktera iz jetre i slezene C57Bl/6 miševa tijekom primarne kampilobakterioze. CFU *C. jejuni* u jetri (•) i slezeni (▲) inficiranih životinja.

*C. jejuni* se nakon intraperitonealne injekcije u jetri ovih miševa pojavljuje već prvi dan po infekciji u značajnom broju. Broj bakterija zatim postupno raste da bi najveći bio šesti dan. Nakon postupnog smanjenja broja bakterija potpuno čišćenje jetre postiže se 15 dana po infekciji.



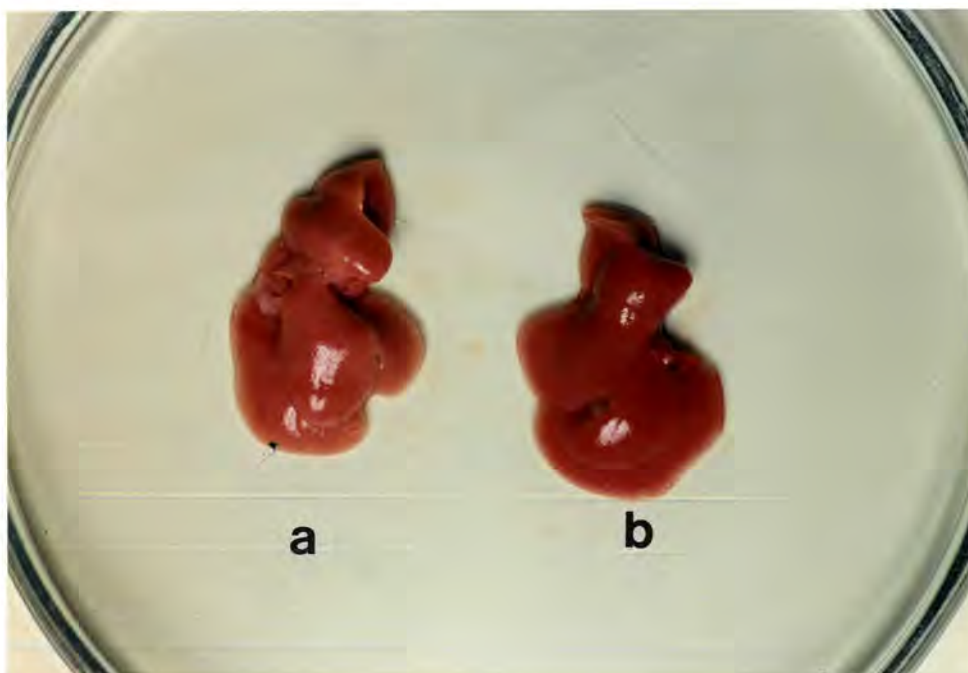
U slezeni ovih životinja kampilobakter se pojavljuje nešto kasnije (šesti dan po infekciji) i to u znatno manjem broju nego u jetri, a već deseti dan ga iz slezene nije moguće izolirati.

#### 4.2.2. Makroskopske i patohistološke promjene jetre i slezene

C57Bl/6 miševa u tijeku primarne kampilobakterioze

Da bi istražili moguće promjene istraživanih organa u tijeku primarne infekcije s *C.jejuni* jetra i slezena inficiranih životinja pregledane su i makroskopski i histološki. Najuočljivije promjene su u C57Bl/6 miševa opažene treći dan nakon infekcije s kampilobakterom.

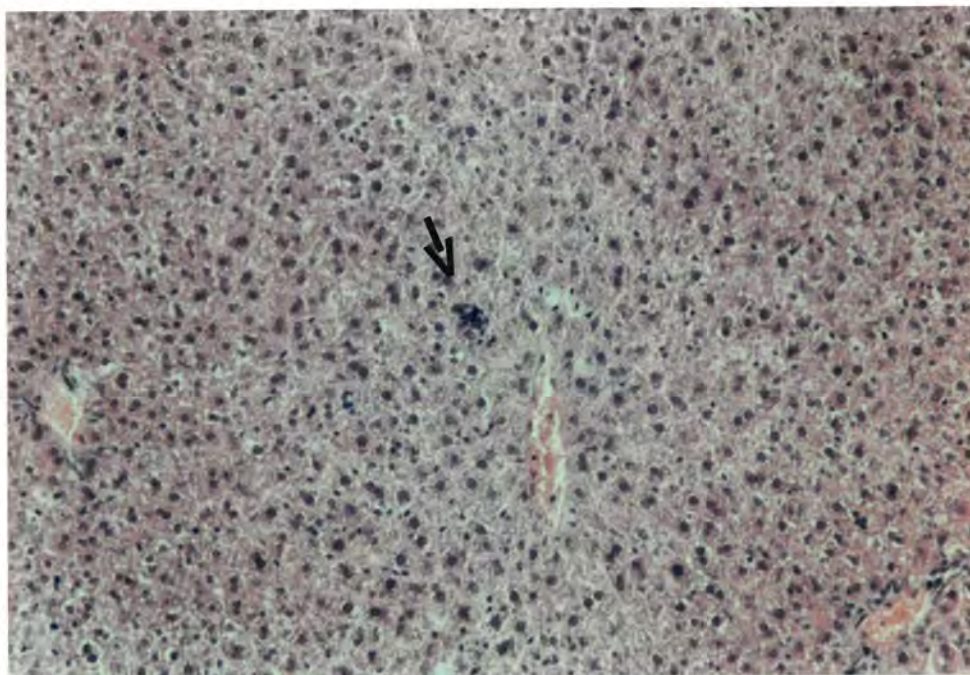
Treći dan po infekciji ovog laboratorijskog soja miševa uočljivo je povećanje jetre, koja je blijeda i mekše konzistencije u odnosu na kontrolu (slika 2).



**Slika 2. Makroskopski izgled jetre C57Bl/6 miša nakon infekcije s *C. jejuni*.** Jetra inficirane životinje (a) u odnosu na kontrolu (b) tri dana nakon intraperitonealne infekcije.

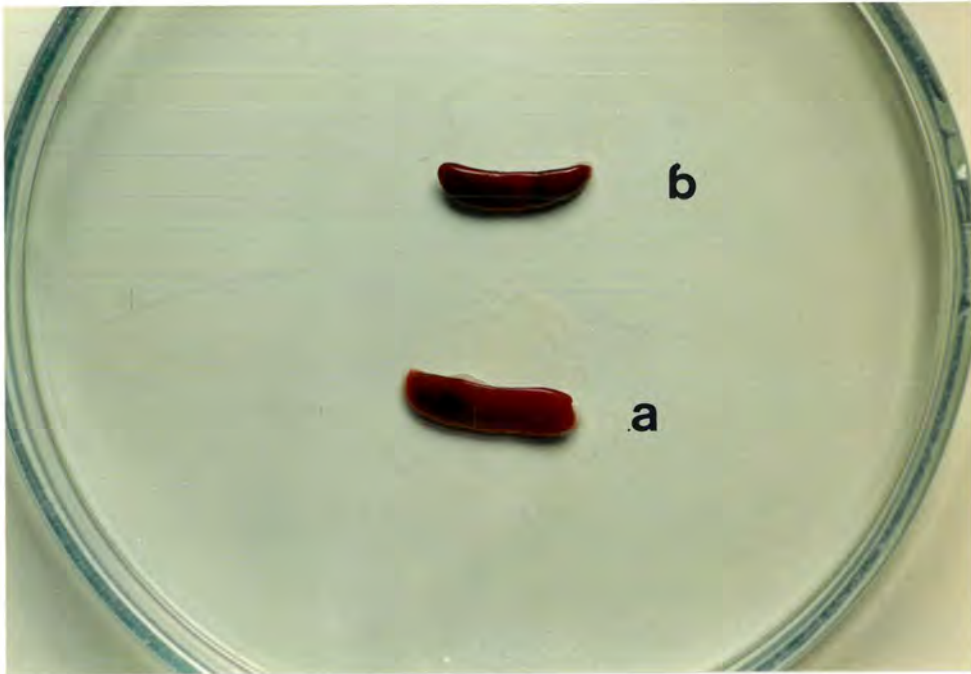
Uočivši makroskopske promjene jetre željeli smo istražiti da li je došlo do promjena u građi jetrenog tkiva.

U histološkom preparatu jetre C57Bl/6 miša trećeg dana infekcije, uočava se da su hepatociti povećani s obilnim svijetlim citoplazmama, a jezgre su povećane s izraženim nukleolima. Vide se i manja žarišta mononuklearnih infiltrata (slika 3).

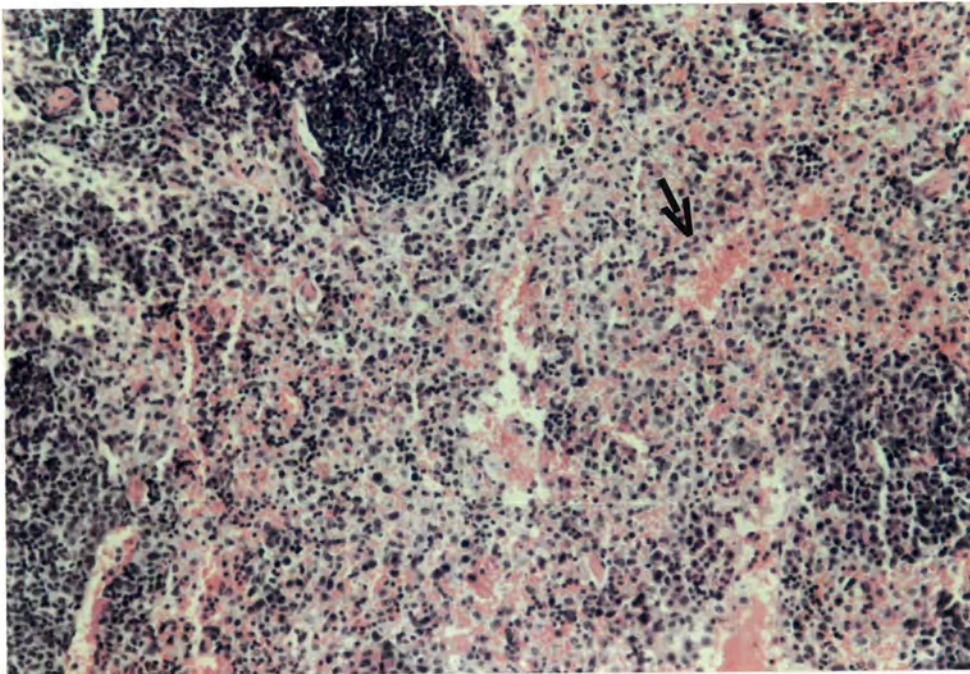


**Slika 3.** Histološki preparat iz jetre C57Bl/6 miša trećeg dana po infekciji s *C. jejuni* (povećanje 200x). Strelica označava žarište mononuklearnih infiltrata u tkivu jetre.

Proučavanje učinka infekcije kampilobakterom na slezenu C57Bl/6 miševa pokazalo je da je slezena ovih životinja također povećana i svijetlija u odnosu na kontrolu, ali su promjene manje izražene nego kod jetre (slika 4). Mikroskopskim pregledom tkiva ovog organa uočava se zastoj krvi u sinusima crvene pulpe (slika 5).



**Slika 4. Makroskopski izgled slezene C57Bl/6 miša nakon infekcije s *C. jejuni*.** Slezena inficirane životinje (a) trećeg dana infekcije u odnosu na kontrolu (b).



**Slika 5. Histološki preparat slezene C57Bl/6 miša trećeg dana po infekciji s *C. jejuni* (povećanje 200x).** Strelica označava zastoj krvi u sinusima crvene pulpe.

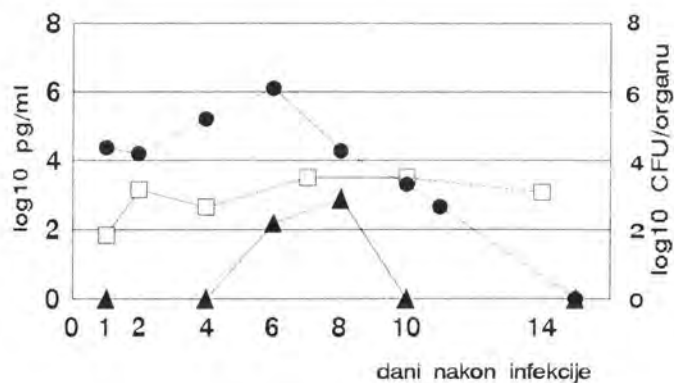
#### 4.2.3. Dinamika sinteze citokina u C57Bl/6 miševa tijekom primarne kampilobakterioze

Želeći utvrditi povezanost lučenja IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-6 i TNF- $\alpha$  s dinamikom iščišćavanja kampilobaktera iz jetre i slezene inficiranih C57Bl/6 miševa tijekom primarne kampilobakterioze, praćena je i dinamika lučenja navedenih citokina u plazmi inficiranih životinja. Koncentracije citokina određivane su tijekom prva dva tjedna infekcije. Rezultati su prikazani slikom 6. Vidljivo je da se već prvi dan po infekciji javljaju IFN- $\gamma$  i IL-6 u visokim koncentracijama. Koncentracija IFN- $\gamma$  nastavlja rasti i ostaje visoka tijekom svih ispitivanih 14 dana. IL-6 se zadržava cijelo vrijeme u gotovo istim koncentracijama. IL-2 i TNF- $\alpha$  dosežu najveće koncentracije četvrti dan po infekciji, neposredno prije nego li u jetri broj *C. jejuni* postiže maksimalne vrijednosti.

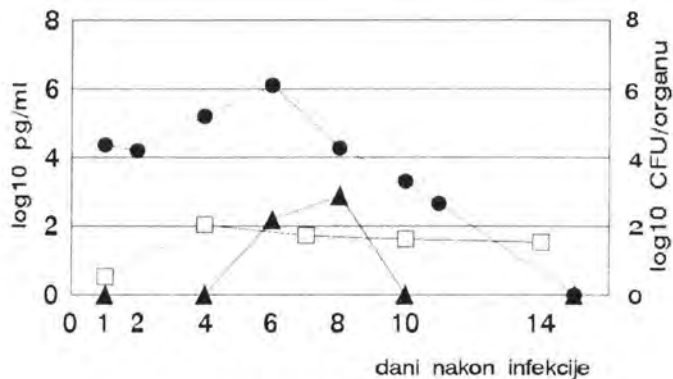
#### 4.2.4. Tijek primarne infekcije s *C. jejuni* u C57Bl/6 miševa nakon selektivne deplecije CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> ili NK stanica

Radi razumijevanja uloge stanične imunosti u kontroli infekcije s *C. jejuni*, istražen je tijek primarne kampilobakterioze u miševa kod kojih je *in vivo*, monoklonskim protutijelima, depletirana određena subpopulacija T limfocita (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> limfocita) ili NK stanica. Praćen je broj *C. jejuni* u jetri i slezeni ispitivanih životinja.

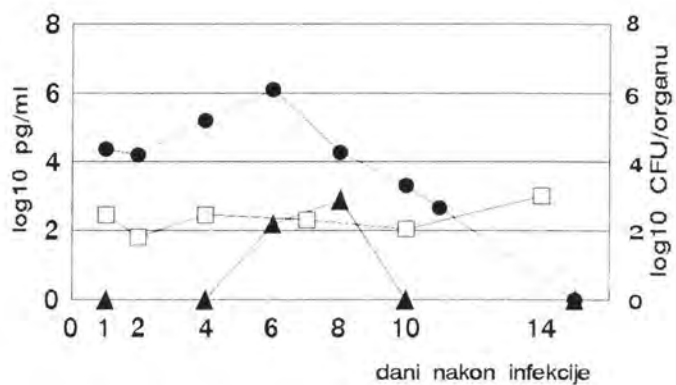
A) IFN- $\gamma$



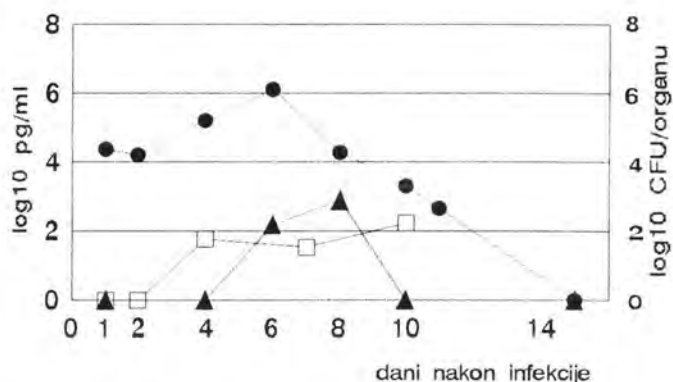
B) IL-2



C) IL-6



D) TNF- $\alpha$

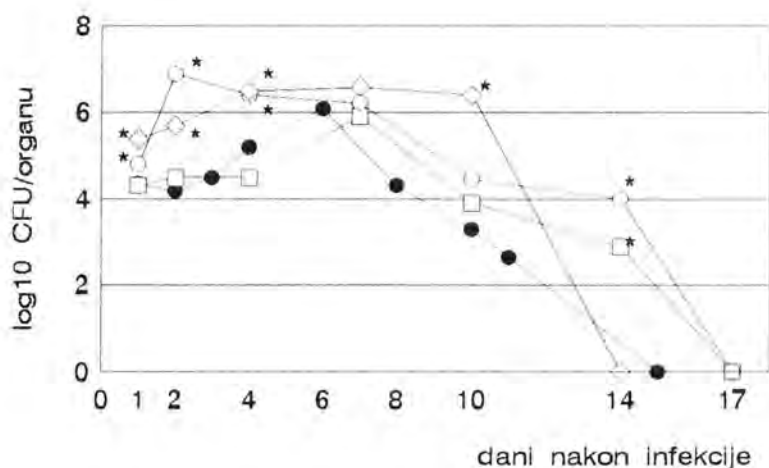


Slika 6. Sinteza IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-6 i TNF- $\alpha$  tijekom primarne kampilobakterioze C57BI/6 miševa. Koncentracija citokina u plazmi ( $\square$ ), te CFU kampilobaktera u jetri ( $\bullet$ ) i slezeni ( $\blacktriangle$ ) istih životinja.

Kao što se vidi na slici 7 brzina iščišćavanja *C. jejuni* iz jetre bila je neznatno produžena u  $CD4^+$  depletiranih miševa (17 dana, u odnosu na 15 dana u kontrolnih životinja). Dužina trajanja infekcije kao i razlike u broju izoliranih bakterija nisu bile statistički značajne.

U  $CD8^+$  depletiranih miševa već prvog dana po intraperitonealnoj injekciji *C. jejuni* uočava se veći broj izoliranih bakterija nego u prethodnoj,  $CD4^+$  depletiranoj skupini. Iako je visok broj kampilobaktera prisutan tijekom cijelog ispitivanog razdoblja, brzina iščišćavanja je tek za dva dana dulja nego u kontrolnoj skupini životinja.

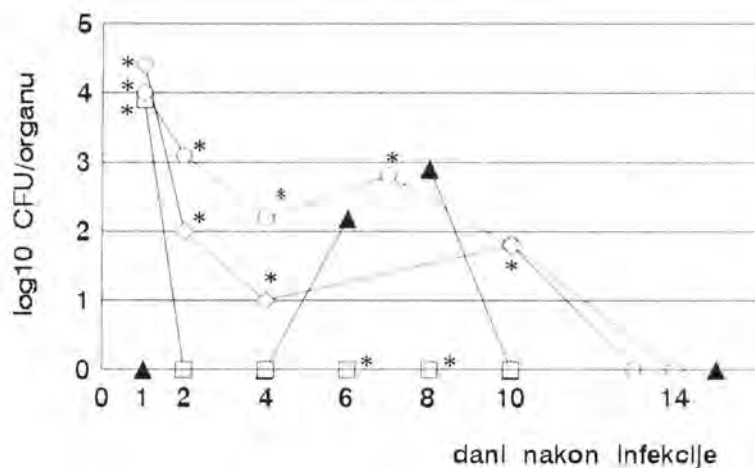
U NK depletiranih miševa broj CFU po jetri je od prvog dana veći nego u kontrolne skupine. Razlike u broju CFU su statistički značajne na razini od 5% sve do desetog dana, nakon čega slijedi nagli pad broja CFU, te potpuno iščišćavanje jetre 14. dana po infekciji.



**Slika 7.** Krivulja rasta *C. jejuni* u jetri C57Bl/6 miševa tijekom primarne kampilobakterioze izazvane nakon *in vivo* deplecije  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  ili NK stanica. Prikazan je CFU kampilobaktera u jetri kontrolnih (●),  $CD4^+$  (□),  $CD8^+$  (○) i NK (◇) depletiranih miševa.

\* statistički značajna razlika ( $p < 0.05$ ) u usporedbi s kontrolom

Deplecija različitih limfocitnih subpopulacija imala je veliki učinak na tijek primarne infekcije s *C. jejuni* u slezeni istraženog soja miševa. Dok je u kontrolnih, imunokompetentnih miševa kampilobakter bilo moguće izolirati iz slezene samo od šestog do osmog dana nakon intraperitonealne infekcije, na slici 8 uočljivo je da je u svih depletiranih skupina miševa, maksimalan broj bakterija bio izoliran već prvog dana po infekciji. Jasno su vidljive i razlike u brzini i dinamici iščišćavanja iz slezene. U  $CD4^+$  depletiranih miševa ovaj proces je bio najbrži. Infekcija završava već drugi dan, kad više nije bilo moguće izolirati kampilobakter iz slezene. U slezeni  $CD8^+$  i NK depletiranih miševa iščišćavanje je bilo znatno sporije: 13 dana u  $CD8^+$  depletiranih, odnosno 14 u NK depletiranih životinja.



**Slika 8.** Krivulja rasta *C. jejuni* u slezeni C57Bl/6 miševa tijekom primarne kampilobakterioze izazvane nakon *in vivo* deplecije  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  ili NK stanica. Prikazan je CFU kampilobaktera u slezeni kontrolnih (▲),  $CD4^+$  (□),  $CD8^+$  (○) i NK (◇) depletiranih miševa.

\* statistički značajna razlika ( $p < 0.05$ ) u usporedbi s kontrolom

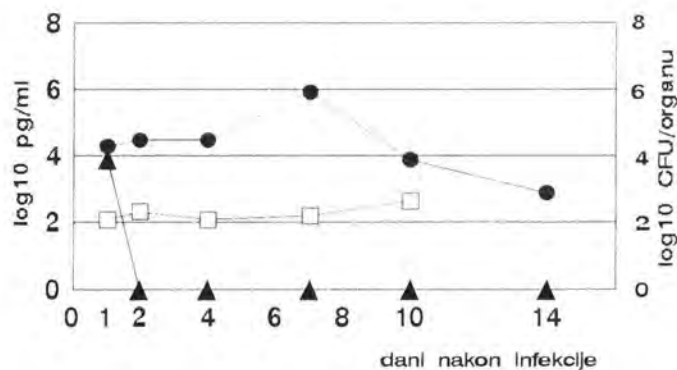
#### 4.2.5. Dinamika sinteze citokina tijekom primarne kampilobakterioze u $CD4^+$ depletiranih C57Bl/6 miševa

Da bismo utvrdili postoji li razlika u dinamici sinteze istraživanih citokina u životinja kojima nedostaju  $CD4^+$  limfociti u odnosu na kontrolu, te da li postoji povezanost s prethodno uočenim promjenama u iščišćavanju kampilobaktera iz jetre i slezene ovih životinja, određivana je koncentracija ovih citokina u plazmi  $CD4^+$  depletiranih C57Bl/6 miševa.

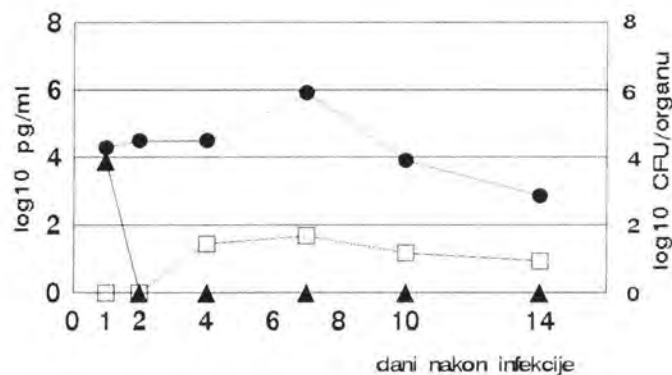
Kao što se vidi iz *slike 9*, miševi kojima nedostaju  $CD4^+$  limfociti sintetiziraju IFN- $\gamma$  u koncentracijama koje ostaju podjednake cijelo ispitivano razdoblje. Ne može se uočiti povezanost koncentracije IFN- $\gamma$  s iščišćavanjem kampilobaktera iz jetre i slezene. Tijekom prva dva dana primarne infekcije u plazmi inficiranih životinja nije bilo moguće odrediti IL-2. Ovaj citokin se javlja u mjerljivim koncentracijama od četvrtog dana infekcije do kraja ispitivanog razdoblja. IL-6 se javlja u plazmi neposredno nakon početka primarne infekcije. Koncentracije mu postupno opadaju do četvrtog dana, do kada raste broj kampilobaktera u jetri.



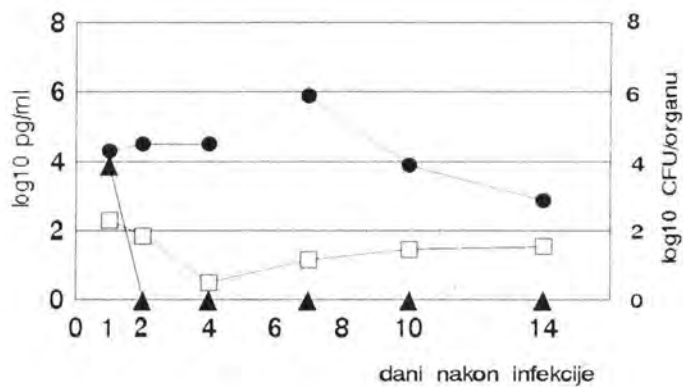
A) IFN- $\gamma$



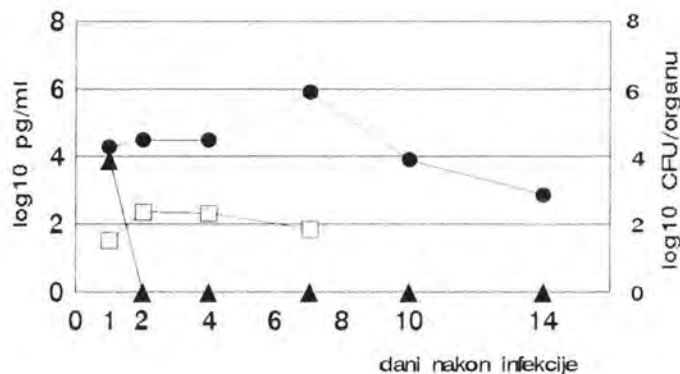
B) IL-2



C) IL-6



D) TNF- $\alpha$



Slika 9. Sinteza IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-6 i TNF- $\alpha$  tijekom primarne kampilobakterioze CD4<sup>+</sup> depletiranih C57Bl/6 miševa. Koncentracija citokina u plazmi ( $\square$ ), te CFU kampilobaktera u jetri ( $\bullet$ ) i slezeni ( $\blacktriangle$ ) istih životinja.

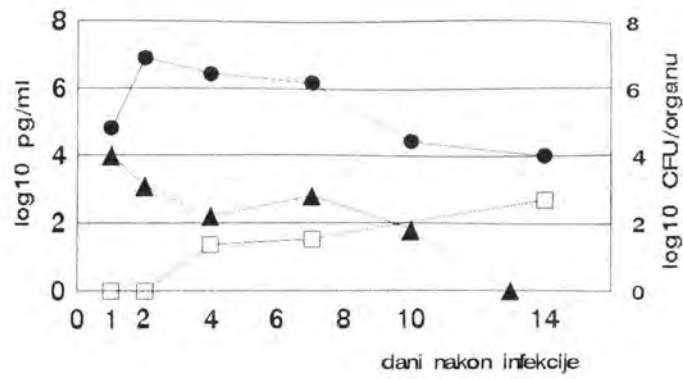
#### 4.2.6. Dinamika sinteze citokina tijekom primarne kampilobakterioze u $CD8^+$ depletiranih C57Bl/6 miševa

Iz prethodno spomenutih razloga željeli smo istražiti moguće promjene u sintezi istraživanih citokina tijekom primarne kampilobakterioze i u  $CD8^+$  depletiranih C57Bl/6 miševa. U  $CD8^+$  depletiranih životinja ponavlja se slika slična onoj viđenoj u  $CD4^+$  depletiranih miševa. Najbitnija je razlika u produkciji  $IFN-\gamma$  koji se u ovom slučaju pojavljuje u plazmi tek četvrti dan infekcije, kada broj kampilobaktera izoliranih iz jetre i slezene opada. Koncentracija  $IFN-\gamma$  u plazmi postupno raste sve do 14. dana infekcije (*slika 10*).

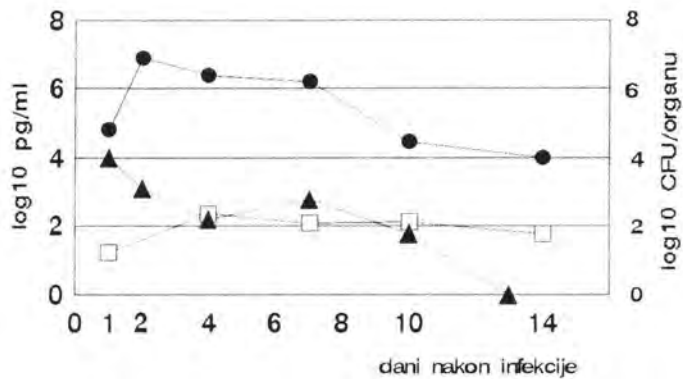
#### 4.2.7. Dinamika sinteze citokina tijekom primarne kampilobakterioze u NK depletiranih C57Bl/6 miševa

Uočivši, u prethodnim pokusima, da deplecija pojedinih limfocitnih subpopulacija utječe na razinu i dinamiku sinteze istraživanih citokina, zanimalo nas je kakav učinak ima deplecija NK stanica. Deplecija NK stanica nije bitnije utjecala na produkciju  $IFN-\gamma$ . Dinamika i koncentracije su gotovo iste onima opisanim u kontrolnih, nedepletiranih životinja. IL-2 pak doseže veće razine, a najveće vrijednosti uočavaju se šesti dan infekcije. Kod produkcije IL-6 uočava se privremeni pad produkcije četvrtog dana infekcije, ali zatim šestog dana postiže i veće koncentracije od onih u kontrolnih životinja. Uočava se također da s najvećim vrijednostima ovih citokina u plazmi korelira pad broja izoliranih bakterija iz jetre i slezene inficiranih životinja (*slika 11*).

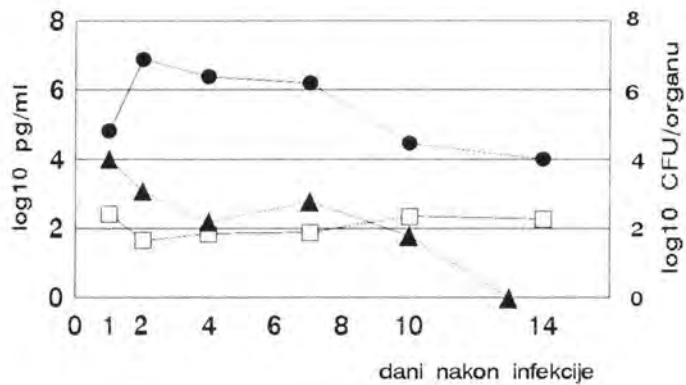
A) IFN- $\gamma$



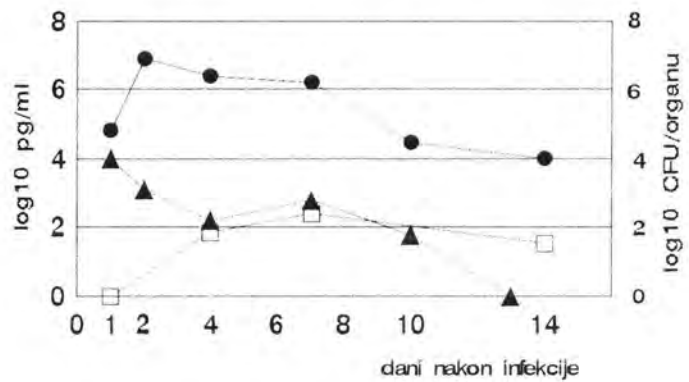
B) IL-2



C) IL-6

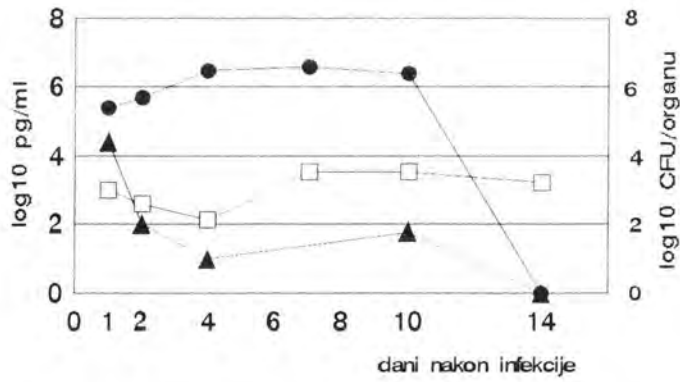


D) TNF- $\alpha$

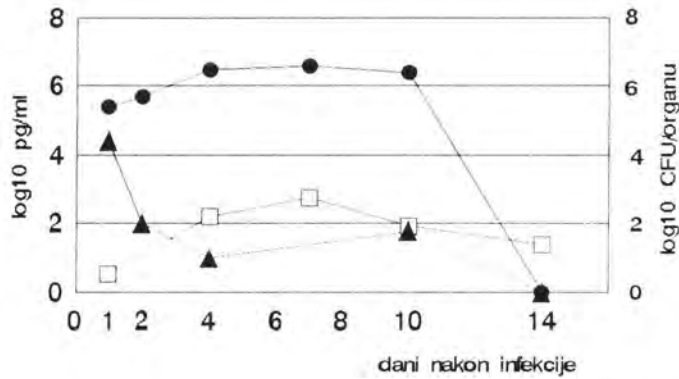


Slika 10. Sinteza IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-6 i TNF- $\alpha$  tijekom primarne kampilobakterioze CD8<sup>+</sup> depletiranih C57Bl/6 miševa. Koncentracija citokina u plazmi (□), te CFU kampilobaktera u jetri (●) i slezeni (▲) istih životinja.

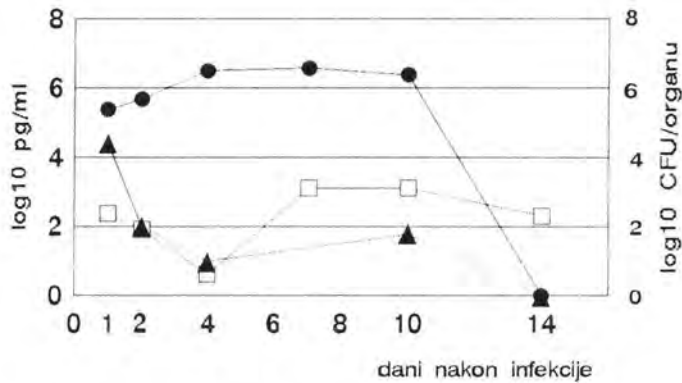
A) IFN- $\gamma$



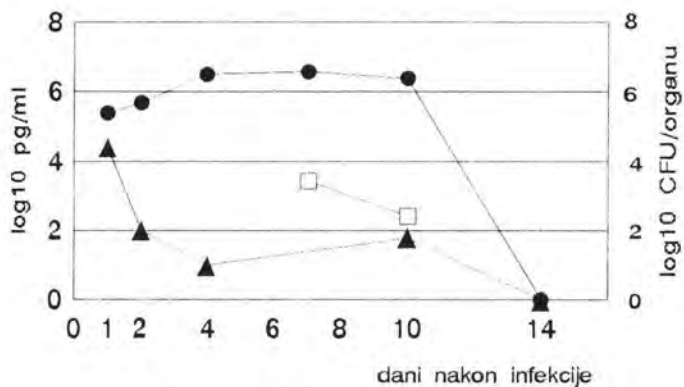
B) IL-2



C) IL-6



D) TNF- $\alpha$

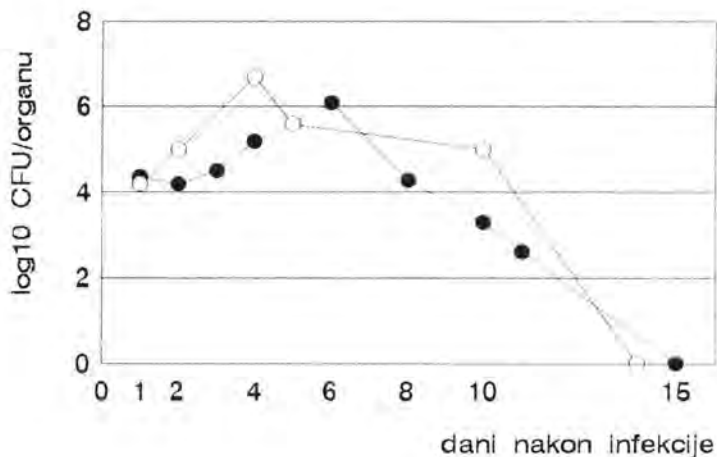


Slika 11. Produkcija IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-6 i TNF- $\alpha$  tijekom primarne kampilobakterioze NK depletiranih C57Bl/6 miševa. Koncentracija citokina u plazmi ( $\square$ ), te CFU kampilobakteria u jetri ( $\bullet$ ) i slezeni ( $\blacktriangle$ ) istih životinja.

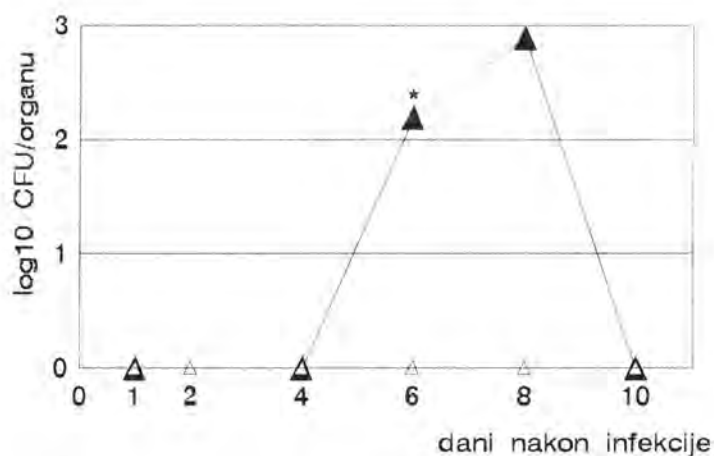
### 4.3. Tijek sekundarne kampilobakterioze u C57Bl/6 miševa

#### 4.3.1. Razlike u tijeku primarne i sekundarne kampilobakterioze u C57Bl/6 miševa

U želji da provjerimo da li postoje razlike u savladavanju ponovne infekcije kampilobakterom, u usporedbi s prethodno uočenim tijekom primarne infekcije, praćen je i tijek infekcije u sekundarno inficiranih C57Bl/6 miševa. Za izazivanje sekundarne infekcije životinje su imunizirane najprije s  $1-5 \times 10^6$  CFU *C. jejuni* intraperitonealno, te nakon razdoblja od osam tjedana ponovno su istim putem docijepljene dozom od  $0,5-1 \times 10^9$  CFU bakterija. Životinje su zatim žrtvovane u određenim razmacima tijekom 17 dana i određivan je broj *C. jejuni* u jetri i slezeni. Rezultati su prikazani slikama 12 i 13.



Slika 12. Krivulja rasta *C. jejuni* u jetri C57Bl/6 miševa tijekom primarne i sekundarne infekcije. CFU *C. jejuni* u jetri primarno (●) i sekundarno (○) inficiranih miševa.



**Slika 13. Krivulja rasta *C. jejuni* u slezeni C57Bl/6 miševa tijekom primarne i sekundarne infekcije. CFU *C. jejuni* u slezeni primarno (▲) i sekundarno (△) inficiranih miševa.**

\* statistički značajna razlika ( $p < 0.05$ )

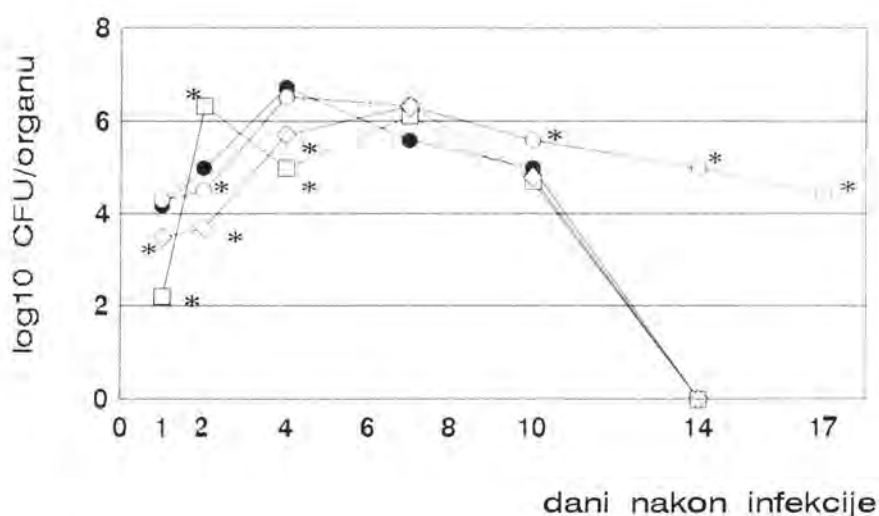
Na slici 12 može se uočiti da je tijekom cijele sekundarne infekcije broj kampilobaktera u jetri vio veći nego u primarno inficiranih životinja, međutim, razlike nisu statistički značajne. Niti u brzini iščišćavanja kampilobaktera iz jetre primarno i sekundarno inficiranih miševa nije bilo statistički značajne razlike.

Veće razlike su uočene u broju *C. jejuni* izoliranom iz slezene sekundarno inficiranih miševa. Naime tijekom cijelog ispitivanog razdoblja iz slezene sekundarno inficiranih životinja nije bilo moguće izolirati *C. jejuni*. Budući u C57Bl/6 miševa infekcija slezene traje kratko (od šestog do osmog dana po primarnoj infekciji) s relativno malim brojem bakterija, razlika u visini titra je bila statistički značajna samo šesti dan po reinfekciji (slika 13).

#### 4.3.2. Tijek sekundarne infekcije s *C. jejuni* u C57Bl/6 miševa nakon *in vivo* deplecije CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> ili NK stanica

Kako su u jetri selektivno depletiranih C57Bl/6 miševa uočene promjene tijekom primarne kampilobakterioze, željeli smo istražiti da li se slična pojava može uočiti i prilikom deplecije pojedinih limfocitnih subpopulacija u sekundarno inficiranih životinja. Rezultati ovih pokusa prikazani su na slici 14.

U CD4<sup>+</sup> depletiranih miševa, prvi dan po reinfekciji zabilježen je najmanji broj CFU kampilobaktera po jetri ispitivane životinje. Najveća vrijednost je dosegnuta već drugi dan i statistički značajno je veća nego u nedepletiranih sekundarno inficiranih miševa. Međutim, iščišćavanje je jednako brzo. Eliminacija kampilobaktera iz jetre obje skupine miševa postignuta je 14. dana po reinfekciji. U CD8<sup>+</sup> depletiranih životinja prvih dana izoliran je iz jetre približno jednak broj CFU kampilobaktera, kao u kontrolnih životinja. Tijekom ispitivanog razdoblja ovaj broj ostaje visok, s izrazito polaganim trendom pada, te tijekom 17 dana ispitivanja nije postignuto sterilno iščišćavanje.



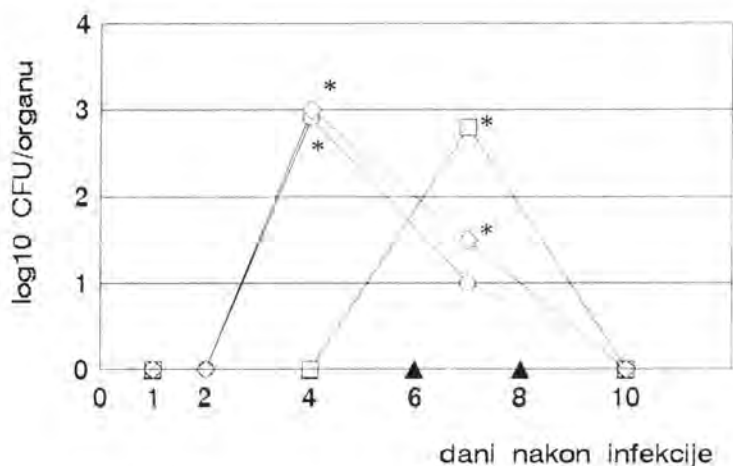
**Slika 14.** Krivulja rasta *C. jejuni* u jetri C57Bl/6 miševa tijekom sekundarne kampilobakterioze izazvane nakon *in vivo* delecije CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> ili NK stanica. CFU kampilobaktera u jetri kontrolnih (●), CD4<sup>+</sup> (□), CD8<sup>+</sup> (○) i NK (◇) depletiranih miševa. \* statistički značajna razlika ( $p < 0.05$ ) u usporedbi s kontrolom

Delecija NK stanica u početku rezultira nižim brojem kampilobaktera u jetri. Tijekom prva četiri dana sekundarne infekcije iz jetre životinja tretiranih anti-NK monoklonskim protutijelima, izoliran je manji broj kampilobaktera nego li u kontrolnoj skupini. Međutim, duljina trajanja sekundarne infekcije ostaje ista i iznosi 14 dana kao i u kontrole.

Opazivši ove promjene istraživali smo i slezene istih životinja (slika 15). U slezeni životinja kojima nedostaju CD8<sup>+</sup> ili NK stanice, tijekom sekundarne infekcije bilo je moguće izolirati kampilobakter četvrti dan po reinfekciji, a iščišćavanje je postignuto deseti dan. U CD4<sup>+</sup> depletiranih miševa izolacija kampilobaktera bila je moguća šesti dan po reinfekciji, a iščišćavanje 10. dan, kao i kod ostalih depletiranih životinja. Većina ovih rezultata bila je



statistički značajna jer se iz slezene nedepletiranih sekundarno inficiranih životinja *C. jejuni* nije mogao izolirati.



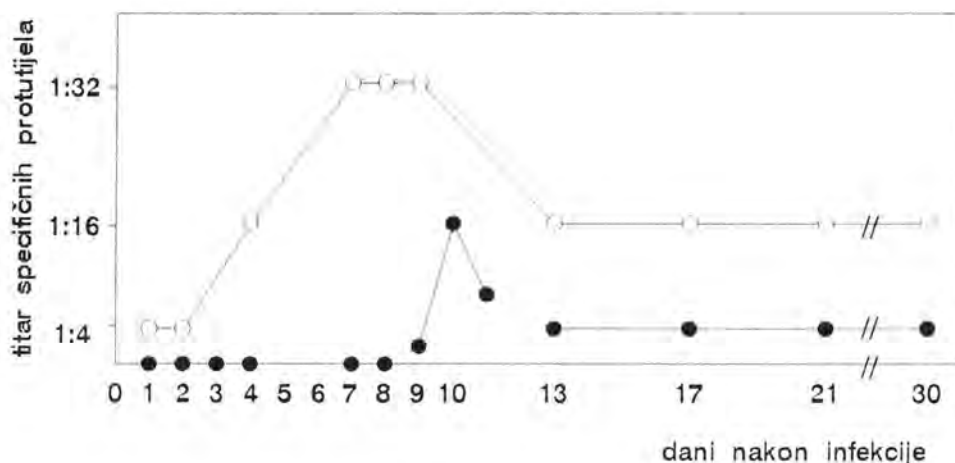
**Slika 15.** Krivulja rasta *C. jejuni* u slezeni C57Bl/6 miševa tijekom sekundarne kampilobakterioze izazvane nakon *in vivo* deplecije CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> ili NK stanica. CFU *C. jejuni* u slezeni kontrolnih (▲), CD4<sup>+</sup> (□), CD8<sup>+</sup> (○) i NK (◇) depletiranih miševa.

\* statistički značajna razlika ( $p < 0.05$ ) u usporedbi s kontrolom

#### 4.4. Dinamika sinteze specifičnih protutijela protiv *C. jejuni* tijekom primarne i sekundarne infekcije

Kako smo željeli istražiti da li postoje uobičajene razlike u sintezi specifičnih protutijela tijekom primarne i sekundarne infekcije kampilobakterom, pratili smo kretanje titra specifičnih protutijela protiv *C. jejuni* u plazmi C57Bl/6 miševa tijekom 30 dana primarne i sekundarne infekcije (slika 16). Induktivna (latentna) faza u primarnoj infekciji traje osam dana, da bi se

specifična protutijela u plazmi počela pojavljivati devetog dana po infekciji, a najviše vrijednosti dosegla desetog dana infekcije. Nakon toga titar specifičnih protutijela u plazmi postupno opada i do kraja ispitivanog razdoblja ostaje mjerljiv u razrjeđenju plazme od 1:4.



**Slika 16. Kretanje titra specifičnih protutijela protiv *C. jejuni* u plazmi inficiranih C57Bl/6 miševa. Vrijednosti titra specifičnih protutijela u plazmi tijekom primarne (●) i sekundarne (○) kampilobakterioze.**

Tijekom sekundarne kampilobakterioze latentna faza ne postoji jer se odmah po docjepljivanju može odrediti titar specifičnih protutijela od 1:4. Titar protutijela tada brzo raste i već sedmi dan doseže najveće vrijednosti (1:32) koje ostaju prisutne u plazmi do devetog dana sekundarne infekcije. Nakon devetog dana titar lagano pada i do kraja ispitivanog razdoblja ostaje 1:16.

## **5. RASPRAVA**

Kampilobakteri se spominju, uz salmonele, kao najčešći uzročnici dijarealnih bolesti širom svijeta. U najvećem broju, od 95% do 98%, slučajeva kampilobakterioze, kao etiološki uzročnik izolirana je i identificirana vrsta *Campylobacter jejuni* (131). Čovjek se obično zarazi konzumiranjem nepasteriziranog mlijeka, nedovoljno termički obrađenom hranom, naročito mesom peradi ili zagađenom vodom (143).

Simptomi bolesti uključuju profuzne vodenaste proljeve s pojavom svježeh krvi u stolici, mučninu, abdominalne grčeve i temperaturu (53). Sve se češće u literaturi spominju i ekstraintestinalne infekcije s *C. jejuni*, kao npr. hepatitis, kolecistitis, meningitis, endokarditis, bakterijemije, pankreatitis i druge (19,38,43,58,108,126). Infekcija može rezultirati i neonatalnom sepsom (48).

Unaprijeđenjem laboratorijskih tehnika, te otkrićem i razvojem novih selektivnih podloga za izolaciju *C. jejuni* iz uzoraka stolice, povećan je i interes za ovu bakteriju.

Epidemiološka istraživanja u razvijenim zemljama, pokazala su da se *C. jejuni* može naći u stolici 4-14% pacijenata s dijarejom, te u oko 1% asimptomatskih nosilaca (kliconoša) (19). U zemljama u razvoju, kao što su Bangladeš, Peru, Ruanda, Gambija, *C. jejuni* predstavlja još češći nalaz u bolesnika s gastrointestinalnim tegobama, i asimptomatsko kliconoštvo je uobičajeno (11,12,47,115). O učestalosti kampilobakterioze u Hrvatskoj nema točnih podataka, budući da infekcije s *C. jejuni* ne podliježu obveznoj prijavi. Ipak, rezultati koje je objavila Popović-Uroić 1989. godine govore o prisustvu i važnosti ove bakterije i u nas (104). Naime, u mikrobiološkom laboratoriju zagrebačke Klinike za infektivne bolesti, od preko 20.000

obrađenih uzoraka stolica godišnje, u oko 800 bude izoliran *C. jejuni* (104). Prema podacima Mikrobiološkog odjela Zavoda za javno zdravstvo Županije primorsko-goranske, u našoj regiji učestalost izolacije *C. jejuni* iznosi 5% u odnosu na ukupno pregledani materijal.

Ipak, unatoč brojnim istraživanjima, još uvijek se ne zna mnogo o patogenezi kampilobakterioze. Poznato je da *C. jejuni* ima sposobnost vezivanja na epitelne stanice domaćina te potom ulaska u njih, iako nije tipična intracelularna bakterija (3,31). Kod ulaska u stanicu važnu ulogu ima flagela, koja je ujedno i najbolje proučeni faktor patogenosti ove bakterije (40,89). Virulenciji doprinose LPS i endotoksin, kao i sposobnost sinteze enterotoksina.

O imunološkom odgovoru domaćina na infekciju s *C. jejuni* također se relativno malo zna. Pacijenti tijekom kampilobakterioze stvaraju specifična IgM, IgG i IgA protutijela u serumu, te IgA protutijela u sekretima intestinalnog sustava (51,84,89,90). Povećana osjetljivost prema *C. jejuni* opisana je u nedonoščadi, stanjima kongenitalne i stečene hipogamaglobulinemije, što upućuje na značaj čimbenika humoralne imunosti. Ipak, zbog spomenute karakteristike ove bakterije, da ulazi u stanice epitela i makrofage sve se češće postavlja pitanje o mogućoj ulozi elemenata stanične imunosti u domaćina (77,79). Upravo stoga našim eksperimentima na modelu mišje kampilobakterioze željeli smo doprinijeti formiranju odgovora na ova pitanja.

U pokusima kojima se istražuje fiziologija *C. jejuni* i patogeneze infekcija uzrokovanih ovom bakterijom uglavnom se koriste pojedine stanične linije

(36,49,68,69,70,79). Kao pokusne životinje koriste se: majmun, kunić, perad, a rjede miševi (8,90,111,144,147).

Intraperitonealnom injekcijom  $8-9 \times 10^8$  CFU *C. jejuni* dokazali smo prijemljivost različitih sojeva miševa na ovu bakterijsku infekciju. Nadalje, pratili smo iščišćavanje kampilobaktera iz jetre i slezene C57Bl/6 miševa kao i makroskopske i patohistološke promjene na spomenutim organima. Vrlo brzo, već drugog ili trećeg dana nakon inokulacije bakterije, uočili smo vidljive promjene na jetri u smislu izrazitog povećanja, promjene konzistencije i pojave granulomatoznih čvorića na površini. Pregledom mikroskopskih preparata uočena su žarišta mononuklearnih infiltrata. Promjene su vremenski odgovarale maksimalnim vrijednostima broja *C. jejuni* izoliranih iz tkiva jetre. Nakon intraperitonealne infekcije dolazi do nastanka bakterijemije što bi moglo objasniti tako dugotrajno održavanje visokog broja *C. jejuni* u jetri ovih životinja (97). Makroskopske promjene na slezeni bile su manje izražene. Slezena je bila lagano povećana i promijenjene boje u odnosu na kontrolu zbog zastoja krvi, što je potvrđeno i histološkim preparatima. Zanimljivo je da se kampilobakter iz slezena inficiranih miševa mogao prvi puta izolirati tek nekoliko dana nakon injiciranja. Literaturni podaci o duljini trajanja infekcije u jetri i slezeni inficiranih miševa vrlo su različiti budući da različiti autori koriste u pokusima različite sojeve *C. jejuni* nepoznate virulencije i neutvrđene sinteze toksina, kao i različite sojeve miševa (8,47,126a).

Imunološki nadzor nad infekcijama izuzetno je složen proces koji obuhvaća i humoralne i stanične elemente imunosti. Poznata je uloga pojedinih limfocitnih subpopulacija u tijeku virusnih i nekih intracelularnih bakterijskih

infekcija, kao i uloga citokina kao modulatora antibakterijske imunosti. Tako je npr. poznato da makrofagi nakon fagocitoze bakterija, posredno, putem aktivacije NK stanica, izazivaju povećano lučenje IFN- $\gamma$  u ranoj fazi infekcije (92). Na našem modelu primarne kampilobakterioze uočili smo da koncentracija IFN- $\gamma$  korelira s brojem bakterija izoliranih iz jetre intraperitonealno inficiranih životinja. U kasnijoj fazi važnija je uloga CD4<sup>+</sup> limfocita. IL-2 je citokin kojeg u najvećoj mjeri sintetiziraju aktivirane CD4<sup>+</sup>, a znatno manje CD8<sup>+</sup> T stanice. U fiziološkim okolnostima u krvi se nalazi u niskim koncentracijama. Uočeno je da mu je lučenje povećano obično u sekundarnom imunološkom odgovoru te je stoga pokušana peroralna terapija infekcija s *C. jejuni* ovim citokinom, međutim, nije postignuto značajnije smanjenje broja izoliranih bakterija (4,22,82).

Infekcija sa *S.typhimurium* povećava razinu serumskog IL-6 i TNF- $\alpha$  u prva četiri dana po intraperitonealnoj infekciji, a isti učinak imaju i "shiga like" toksin i LPS gram negativnih bakterija koje posjeduje i *C. jejuni* (60). Time se mogu objasniti relativno visoke koncentracije ovih citokina u plazmi C57Bl/6 miševa tijekom primarne kampilobakterioze.

Za ispitivanje mehanizama stanične imunosti jedan od najčešće upotrebljavanih eksperimentalnih modela je model listerioze u miša (62). Ovaj uzročnik izaziva akutnu infekciju koja se brzo rješava po aktiviranju specifičnih T limfocita. Ovakav brzi imuni odgovor moguće je vidjeti i u slučaju mišje kampilobakterioze.

*In vivo* deplecija CD8<sup>+</sup> T limfocita uzrokovala je povećanje broja izoliranih bakterija te produženje primarne kampilobakterioze i u jetri i u slezeni C57Bl/6 miševa, ali potpuno iščišćavanje nije izostalo. Deplecija CD4<sup>+</sup> T

stanica izazvala je samo kratkotrajno produženje infekcije, a nije imala učinka na broj bakterija izoliranih iz jetre. Slična pojava uočena je i tijekom pokusa s primarnom listeriozom (82). U NK depletiranih miševa broj bakterija izoliranih iz jetre i iz slezene bio je značajno veći, a trajanje infekcije u slezeni i značajno dulje. Poznata je uloga NK stanica u ranoj fazi obrane od infekcije dok još nisu aktivirani specifični imunološki sustavi, što smo potvrdili i kod infekcije s *C. jejuni*. Na osnovu ovih rezultata možemo zaključiti da se kontrola infekcije i potpuno iščišćavanje *C. jejuni* iz jetre i slezene može odvijati u odsustvu  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  ili NK stanica, te da ove stanice nisu nužno potrebne da bi se organizam domaćina djelotvorno obranio od primarne kampilobakterioze. Dobiveni se rezultati uglavnom slažu s podacima autora koji su radili slične pokuse ali s drugim bakterijama (112a).

Nedostatak  $CD4^+$  T stanica je izazvao očekivano smanjenje lučenja IL-2, IFN- $\gamma$ , te u nešto manjoj mjeri TNF- $\alpha$ , što ipak nije utjecalo na mogućnost iščišćavanja ispitivanih organa. Ova je pojava uočena i na prethodno spomenutom modelu mišje listerioze (82). Smanjenje sinteze ovih citokina dovodi i do slabije proliferacije antigen specifičnih T stanica, a posredno i do manje sinteze protutijela zbog nedostatne stimulacije proliferacije B stanica. Navedeno također doprinosi i duljem trajanju infekcije u jetri. Stanice s pamćenjem tada također nastaju u manjem broju što bi trebalo imati učinka na tijek infekcije prilikom idućih dodira s istim antigenom. Nedostatak  $CD8^+$  limfocita u miševa inficiranih s *C. jejuni* najveći učinak je imao na sintezu IFN- $\gamma$  i to tako da je izazvao odgođeni početak proizvodnje i znatno sniženje koncentracija ovog citokina u plazmi. Ovako



izražene promjene u sintezi IFN- $\gamma$  tijekom deplecije CD8<sup>+</sup> limfocita vjerojatno su omogućile uočene promjene u iščišćavanju *C. jejuni* iz jetre i slezene. Ova pojava nije u skladu s našim očekivanjima jer najveći izvor IFN- $\gamma$  su ipak NK i CD4<sup>+</sup> Th1 stanice koje su u ovom slučaju možda slabije stimulirane za lučenje citokina uslijed nedostatne sinteze IL-2 koji je glavni stimulator sinteze IFN- $\gamma$  od strane T stanica, a u suradnji s IL-12 i sinteze IFN- $\gamma$  od strane NK stanica.

Deplecija NK stanica nije izazvala očekivano smanjenje sinteze IFN- $\gamma$  jer su, očito, CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> limfociti bili sposobni održati proizvodnju ovog citokina na razini koja je gotovo jednaka onoj u nedepletiranih miševa. Moguće je da je za ovu pojavu odgovorno opaženo izrazito povećano lučenje IL-2 u cirkulaciju, što je vrlo zanimljivo jer se ovaj citokin u fiziološkim okolnostima rijetko nalazi u krvi u značajnijim koncentracijama. Za izrazito povećanje koncentracije IL-6 u krvi NK depletiranih životinja je vjerojatno odgovorna povećana razina TNF- $\alpha$ , a i LPS kampilobaktera. Budući da su u ovom slučaju makrofagi osnovne efektorske stanice nespecifičnog imunološkog odgovora, vjerojatno njihova aktivacija izaziva povećano lučenje IL-1 i TNF- $\alpha$ , a time i stimulaciju T limfocita.

U radu smo se bavili istraživanjem razlika u tijeku primarne i sekundarne infekcije u nedepletiranih i depletiranih C57Bl/6 miševa. Tijekom sekundarne infekcije trebale bi se aktivirati T i B stanice s pamćenjem i skratiti tijekom infekcije. Broj kampilobaktera izoliranih iz jetre tijekom sekundarne infekcije nije bio znatnije promijenjen, a trajanje infekcije je tek neznatno skraćeno. Kod infekcije s tipičnom intracelularnom bakterijom, listerijom, ove promjene su znatno uočljivije (112). Nakon preboljele infekcije u organizmu domaćina

ipak zaostaju određene minimalne količine antigena. Obično je to u vidu preživjelog infekcijskog agensa, samo nekih antigena ili što je najvjerojatnije imunih kompleksa vezanih na folikularne dendritičke stanice u limfoidnim folikulima. Ovo je od presudnog značaja za održavanje stanica s pamćenjem i pojačano je ponovljenim kontaktima s istim antigenom. Budući smo proučavali sekundarnu infekciju kampilobakterom moguće je da je broj T stanica s pamćenjem (nastalih nakon samo jednog kontakta s ovom bakterijom) bio nedovoljan da bi svojom aktivacijom doveo do značajnijih promjena u tijeku sekundarne infekcije u jetri inficiranih životinja. Navedeno, međutim, ne objašnjava rezultat o broju *C. jejuni* u slezeni iz koje nije bilo moguće izolirati kampilobakter tijekom cijelog ispitivanog razdoblja. Ovaj rezultat zasigurno zahtijeva daljnja istraživanja.

Ovim radom smo željeli utvrditi i učinak deplecije  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  ili NK stanica na tijek sekundarne infekcije. Najveće promjene opažene su prilikom deplecije  $CD8^+$  limfocita, jer tijekom cijelog ispitivanog razdoblja nije došlo do sterilnog iščišćavanja jetre. Deplecije  $CD4^+$  ili NK stanica dovele su neočekivano do smanjenja broja izoliranih bakterija iz jetre prvih dana sekundarne infekcije, ali nisu imale učinka na dužinu trajanja sekundarne infekcije. Kao što je već spomenuto, tijekom sekundarne infekcije kampilobakterom, iz slezene nedepletiranih životinja nije bilo moguće izolirati ovu bakteriju, stoga su rezultati dobiveni nakon deplecije pojedinih staničnih populacija očekivani.

Pored uloge stanične imunosti tijekom infekcije s *C. jejuni* željeli smo utvrditi i dinamiku sinteze specifičnih protutijela u plazmi primarno i sekundarno inficiranih miševa. Rezultati su pokazali da se faza latencije u

sintezi specifičnih protutijela tijekom sekundarne infekcije praktično gubi, a najviši su se titrovi specifičnih protutijela u plazmi mogli odrediti već sedmog dana po docjepljivanju, za razliku od primarne infekcije gdje su se najviši titrovi mogli odrediti 10. dana infekcije. Ovakvi rezultati ne pokazuju značajnija odstupanja od uobičajene kinetike stvaranja protutijela pri drugim bakterijskim infekcijama.

Ovim radom potvrđena je uloga humoralne imunosti u nadzoru kampilobakterioze, ali je naglašen i značaj pojedinih efektorâ stanične imunosti, naročito  $CD8^+$  T limfocita. Uloga ovih stanica se pokazala naročito značajnom tijekom sekundarne kampilobakterioze jer je njihovom deplecijom znatno produžen tijek infekcije.

## **6. ZAKLJUČNI PREGLED**

Na temelju dobivenih eksperimentalnih rezultata i rasprave zaključuje se sljedeće:

1. Intraperitonealnom injekcijom *C. jejuni* u svih istraženih sojeva miševa (BALB/c, DBA/2 i C57Bl/6) uspostavlja se infekcija karakterizirana hepatosplenomegalijom, te izrazitim makroskopskim i mikroskopskim promjenama ovih organa
2. Primarna infekcija s *C. jejuni* je samoograničena i završava potpunim iščišćavanjem bakterija iz jetre i slezene svih istraženih sojeva miševa.
3. Tijek sekundarne infekcije u jetri C57Bl/6 miševa praktično se ne razlikuje od onog u primarne infekcije, dok su razlike uočljive u slezeni iz koje nije moguće izolirati *C. jejuni*.
4. Selektivna deplecija CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> ili NK stanica ne onemogućava potpuno iščišćavanje jetre i slezene primarno ili sekundarno inficiranih životinja. Najveće promjene izaziva nedostatak CD8<sup>+</sup> limfocita koji značajno produžava trajanje sekundarne infekcije i dovodi do porasta broja *C. jejuni* u oba ispitivana organa. Deplecija NK stanica značajno produžava trajanje infekcije u jetri, te povećala broj kampilobaktera u slezeni. Deplecija CD4<sup>+</sup> limfocita nije imala većeg učinka na tijek primarne i sekundarne infekcije.

5. Interferon gama se u inficiranih životinja sintetizira već od prvog dana primarne infekcije. U  $CD8^+$  depletiranih miševa sinteza ovog citokina započinje kasnije, a koncentracije su niže u odnosu na kontrolu. Deplecija  $CD4^+$  ili NK stanica nema učinka na dinamiku produkcije i količinu ovog citokina u plazmi.
6. Interleukin-2 se tijekom primarne kampilobakterioze javlja u niskim koncentracijama već na početku infekcije. Dinamika sinteze ovog citokina ne mijenja se značajnije u depletiranih miševa.
7. Interleukin-6 mjerljiv je u plazmi inficiranih miševa od samog početka infekcije. Smanjenje produkcije uočeno je u  $CD4^+$  depletiranih miševa, a povećanje u NK depletiranih.
8. Čimbenik tumorske nekroze- $\alpha$  se u plazmi kontrolnih i  $CD8^+$  depletiranih miševa javlja tek četvrtog dana infekcije i to u podjednakim koncentracijama, dok se ranije i u većim koncentracijama pojavljuje u  $CD4^+$  depletiranih miševa.
9. Prilikom praćenja kinetike sinteze specifičnih protutijela protiv *C. jejuni* utvrđeno je da se faza latencije u sekundarnoj infekciji praktično gubi, a vrijednosti titra su znatno veće od onih u primarnoj infekciji..

## **7. LITERATURA**

1. Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food. Interim Report on *Campylobacter*. London: HMSO, 1993.
2. **Arai K-I., Lee F., Miyajima A., et al.:** Cytokines: Coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu. Rev. Biochem.*, 59:783-836, 1990.
3. **Babakhani F.K., Joens L.A.:** Primary swine intestinal cells as a model for studying *Campylobacter jejuni* invasiveness. *Infect. Immun.*, 61:2723-2726, 1993.
4. **Baqar S., Pacheco N.D., Rollwagen F.M.:** Modulation of mucosal immunity against *Campylobacter jejuni* by orally administered cytokines. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 37(12):2688-2692, 1993.
5. **Bancroft G.J., Schreiber R.D., Unanue E.R.:** Natural immunity: A T-cell-independent pathway of macrophage activation, defined in the *scid* mouse. *Immunol. Rev.*, 124:5-24, 1991.
6. **Beachey E.H.:** Bacterial adherence: Adhesion-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *J. Infect. Dis.*, 143:325, 1981.
7. **Beaman M.H., Wong S-Y., Remington J.S.:** Cytokines, *Toxoplasma* and intracellular parasitism. *Immunol. Rev.*, 127:97-117, 1992.
8. **Berndtson E., Danielsson-Tham-M.L., Engvall A.:** Experimental colonization of mice with *Campylobacter jejuni*. *Vet. Microbiol.*, 41:183-188, 1994.
9. **Bessen D., Fischetti V.A.:** Passive acquired mucosal immunity to group A streptococci by secretory immunoglobulin A. *J. Exp. Med.*, 167:1945-1950, 1988.



10. **Bevilacqua M.P., Nelson R.M.:** Selectins. *J. Clin. Invest.*, 91:379-387, 1993.
11. **Bhatnagar S., Dosajh U.:** Diarrhoeal disease morbidity in children below 5 years in urban slums of Delhi. *Indian J. Med. Res.*, 84:53-58, 1986.
12. **Billingham J.D.:** *Campylobacter enteritis* in the Gambia. *Trans. R. Soc. Top. Med. Hyg.*, 76:641-644, 1981.
13. **Bjorkman P.J., Parham P.:** Structure, function and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annu. Rev. Biochem.*, 59:253-288, 1990.
14. **Black R.E., Levine M.M., Clements M.L., et al.:** Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *J. Infect. Dis.*, 157:472, 1988.
15. **Blaser M.J.:** *Campylobacter* and related species. In: Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R. (eds.) *Principles and Practice of Infectious Diseases*. New York, Churchill Livingstone, pp. 1948-1956, 1995.
16. **Blaser M.J., Berkowitz I.D., LaForce F.M., et al.:** *Campylobacter enteritis*; clinical and epidemiologic features. *Ann. Intern. Med.*, 91:179, 1979.
17. **Blaser M.J., Hardesty H.L., Powers B., et al.:** Survival of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* in biological mileus. *J. Clin. Microbiol.* 11:309, 1980.
18. **Blaser M.J., Perez G.P., Smith P.F., et al.:** Extraintestinal *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* infections: Host factors and strain characteristics. *J. Infect. Dis.*, 153:552, 1986.

19. **Blaser M.J., Reller L.B.:** *Campylobacter* enteritis. N. Engl. J. Med., 305:1444-1452, 1981.
20. **Blaser M.J., Smith P.F., Hopkins J.A., et al.:** Pathogenesis of *Campylobacter fetus* infections. Serum resistance associated with high molecular weight surface proteins. J. Infect. Dis., 155:696, 1987.
21. **Blaser M.J., Taylor D.N., Feldman R.A.:** Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections. Epidemiol. Rev. 5:157, 1983.
22. **Bohn E., Heesemann J., Ehlers S., Autenrieth I.B.:** Early gamma interferon mRNA expression is associated with resistance of mice against *Yersinia enterocolitica*. Infect. Immun., 62(7):3027-3032, 1994.
23. **Boman H.G.:** Antibacterial peptides: Key components needed in immunity. Cell, 65:205-207, 1991.
24. **Buckley R.H., Dees S.C., O'Fallon W.M.:** Serum immunoglobulins. I. Levels in normal children and in uncomplicated childhood allergy. Pediatrics, 41:600-611, 1968.
25. **Bucy R.P., Chan C-L.H., Cooper M.D.:** Tissue localization and CD8 accessory molecule expression of Tgd cells in humans. J. Immunol., 142:3045-3049, 1989.
26. **Carson D.A., Chen P.P., Kipps T.J.:** New roles for rheumatoid factor. J. Clin. Invest., 87:379-383, 1991.
27. **Ceredig R., Dialynas D.P., Fitch F.W., et al.:** Precursors of T cell growth factor producing cells in the thymus: Ontogeny, frequency, and quantitative recovery in a subpopulation of phenotypically mature thymocytes defined by monoclonal antibody GK-1.5. J. Exp. Med., 158:1654-1670, 1983.

28. **Ceredig R., Glasebrook A.L., MacDonald H.R.:** Phenotypic and functional properties of murine thymocytes. I. Precursors of cytolytic T lymphocytes and interleukin 2-producing cells are all contained within a subpopulation of "mature" thymocytes as analyzed by monoclonal antibodies and flow microfluorometry. *J. Exp. Med.*, 155:358-379, 1982.
29. **Cobbold S.P., Jayasurya A., Nash A., Prospero T.D., Waldman H.:** Therapy with monoclonal antibodies by elimination of T cell subset in vivo. *Nature*, 312:548-550, 1984.
30. **Colten H.R.:** Tissue-specific regulation of inflammation. *J. Appl. Physiol.*, 72:1-7, 1992.
31. **Cover T.L., Blaser M.J.:** The pathobiology of *Campylobacter* infections in humans. *Annu. Rev. Med.*, 40:269-285, 1989.
32. **Davies J.S., Penfold J.B.:** *Campylobacter* urinary infection. *Lancet*, 1:1091, 1979.
33. **Dekeyser P., Gossuin-Detrain M., Butzler J.P., Sternon J.:** Acute enteritis due to related vibrio: first positive stool cultures. *J. Infect. Dis.*, 125:390-392, 1972.
34. **Denton K.J., Clarke T.:** Role of *Campylobacter jejuni* as a placental pathogen. *J. Clin. Pathol.*, 45:171-172, 1992.
35. **Dinarello C.A.:** Endogenous pyrogens: The role of cytokines in the pathogenesis of fever. In: Mackowiak P. (ed) *Fever: Basic Mechanisms and Management*. New York, Raven Press, pp. 23-47, 1991.

36. **Everest P.H., Goossens H., Butzler J-P., et al.:** Differentiated Caco-2 cells as a model for enteric invasion by *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *J. Med. Microbiol.*, 37:319-325, 1992.
37. **Everest P.H., Goossens H., Sibbons P., et al.:** Pathological changes in the rabbit ileal loop model caused by *Campylobacter jejuni* from human colitis. *J. Med. Microbiol.*, 38:316-321, 1993.
38. **Ezpeleta C., Rojo de Ursula P., Obregon F., et al.:** Acute pancreatitis associated with *Campylobacter jejuni* bacteriemia. *Clin. Infect. Dis.*, 15:1050, 1992.
39. **Feder H.M., Rasoulpour M., Rodriguez A.J.:** *Campylobacter* urinary tract infection. Value of the urine gram stain. *JAMA*, 256:2389, 1986.
40. **Field L.H., Underwood J.L., Payne M.S., Berry L.J.:** Characteristic of an avirulent *Campylobacter jejuni* strain and its virulence-enhanced variants. *J. Med. Microbiol.*, 38:293-300, 1993.
41. **Fox J.G.:** *In vivo* models of enteric *Campylobacteriosis*: natural and experimental infections. In: Nachamkin I., Blaser M.J., Tompkins L.S. (eds.) *Campylobacter jejuni*: current status and future trends. Washington DC, American Society for Microbiology, pp. 131-138, 1992.
42. **Frizelle F.A., Rietveld J.A.:** Spontaneous splenic rupture associated with *Campylobacter jejuni* infection. *Br. J. Surg.*, 81:718-722, 1994.
43. **Gallagher P., Chadwick P., Jones D.M., et al.:** Acute pancreatitis associated with *Campylobacter* infection. *Br. J. Surg.*, 68:383, 1981.
44. **Geraghty D.E.:** Structure of the HLA class I region and expression of its resident genes. *Curr. Opin. Immunol.*, 5:3-7, 1993.

45. **Gerritsen van der Hoop A., Veringa E.M.:** Cholecystitis caused by *Campylobacter jejuni*. Clin. Infect. Dis., 17:133-135, 1993.
46. **Gilbert G.L., Davoren R.A., Cole M.E., et al.:** Midtrimester abortion associated with septicaemia caused by *Campylobacter jejuni*. Med. J. Aust., 1:585, 1981.
47. **Glass R., Stoll B.J., Huq M.I., Stralens M.J., Blaser M., Kibriya A.K.M.G.:** Epidemiologic and clinical features of endemic *C. jejuni* infections in Bangladesh. J. Infect. Dis., 148:292-296, 1983.
48. **Gok J., Flynn M.:** *Campylobacter jejuni* in pregnancy. Aust. NZ. J. Obstet. Gyneacol., 32:246-248, 1992.
49. **Grant C.C.R., Konkel M.E., Cieplak W., Tompkins L.S.:** Role of flagella in adherence, internalization, and translocation of *Campylobacter jejuni* in nonpolarized and polarized epithelial cell cultures. Infect. Immun., 61:1764-1771, 1993.
50. **Guerrant R.L., McAuliffe J.F.:** Special problems in developing countries. In: Gorbach S.L. (ed) Infectious Diarrhea. Boston, Blackwell Scientific, pp.287-307, 1986.
51. **Hale T.L.:** Genetic basis of virulence in *Shigella* species. Microbiol. Rev., 55:206-224, 1991.
52. **Hamilton J.A.:** Colony stimulating factors, cytokines and monocyte-macrophages - Some controversies. Immunol. Today, 14:18-24, 1993.
53. **Healing T.D., Greenwood M.H., Pearson A.D.:** Campylobacters and enteritis. Rev. Med. Microbiol. 3:159-167, 1992.

54. **Heyworth M.F.:** Immunology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. *J. Infect. Dis.*, 166:465-472, 1992.
55. **Huber A.R., Kunkel S.L., Todd R.F.I., Weiss S.J.:** Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous IL-8. *Science*, 254:99-102, 1991.
56. **Jarrett E.E., Miller H.:** Production and activities of IgE in helminth infection. *Prog. Allergy*, 31:178-184, 1982.
57. **Johnson W.M., Lior H.:** Cytotoxic and cytotoxic factors produced by *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Campylobacter lariidis*. *J. Clin. Microbiol.*, 24:275-281, 1986.
58. **Johnson R.J., Nolan C., Wang S.P., Shelton W.R., Blaser M.J.:** Persistent *C. jejuni* infection in an immunocompromised patient. *Ann. Int. Med.*, 100:832-834, 1984.
59. **Jonjić S., Mutter W., Weiland F., Reddehase M.J., Koszinowski U.H.:** Site-restricted persistent cytomegalovirus infection after selective long-term depletion of CD-4-positive T lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 169:1199-1212, 1989.
60. **Jotwani R., Tanaka Y., Watanabe K., Tanaka K., Kato N., Ueno K.:** Cytokine stimulation during *Salmonella typhimurium* sepsis in Itys mice. *J. Med. Microbiol.*, 42(5):348-352, 1995.
61. **Kaldor J., Speed B.R.:** Guillain-Barre syndrome and *Campylobacter jejuni*: A serological study. *Br. Med. J.*, 288:1867-1870, 1984.
62. **Kaufmann S.H.E.:** Immunity to intracellular bacteria. *Annu. Rev. Immunol.*, 11:129-163, 1993.

63. **Keen C.L., Gershwin M.E.:** Zinc deficiency and immune function. *Annu. Rev. Nutr.*, 10:415-431, 1990.
64. **Kervella M., Pages J-M., Pei Z., et al.:** Isolation and characterization of two *Campylobacter* glycine-extracted proteins that bind to HeLa cell membranes. *Infect. Immun.*, 61:3440-3448, 1993.
65. **Ketley J.M.:** Virulence of *Campylobacter* species: a molecular genetic approach. *J. Med. Microbiol.*, 42:312-327, 1995.
66. **Kiehlbauch J.A., Albach R.A., Baum L.L., Chang K-P.:** Phagocytosis of *Campylobacter jejuni* and its intracellular survival in mononuclear phagocytes. *Infect. Immun.*, 48:446-451, 1985.
67. **Kohl S.:** The neonatal human's immune response to herpes simplex virus infection: A critical review. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 8:67-74, 1989.
68. **Konkel M.E., Hayes S.F., Joens L.A., Cieplak W.:** Characteristics of the internalization and intracellular survival of *Campylobacter jejuni* in human epithelial cell cultures. *Microb. Pathog.*, 13:357-370, 1992.
69. **Konkel M.E., Joens L.A.:** Adhesion to and invasion of HEp-2 Cells by *Campylobacter* spp. *Infect. Immun.*, 57:2984-2990, 1989.
70. **Konkel M.E., Mead D.J., Hayes S.F., Cieplak W.:** Translocation of *Campylobacter jejuni* across human polarized epithelial cell monolayer cultures. *J. Infect. Dis.*, 166:308-315, 1992.
71. **Kosunen T.U., Kauranen O., Martio J., et al.:** Reactive arthritis after *Campylobacter jejuni* enteritis in patients with HLA-B27. *Lancet*, 1:1312, 1980.
72. **Kuroki S., Saida T., Nukina M., Et al.:** *Campylobacter jejuni* strains from patients with Guillain-Barre syndrome belong mostly to Penner

- serogroup 19 and contain b-N-acetylglucosamine residues. *Ann. Neurol.* 33:243-247, 1993.
73. **Lambert M.E., Schofield P.F., Ironside A.G., et al.:** *Campylobacter colitis*. *Br. Med. J.*, 1:857-860, 1979.
74. **Lanier L.L., Spits H., Phillips J.H.:** The relationship between NK and T cells. *Immunol. Today*, 13:392-395, 1992.
75. **Locksley R.M., Wilson C.B.:** Cell-mediated immunity and its role in host defense. In: Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R. (eds.) *Principles and Practice of Infectious Diseases*. New York, Churchill Livingstone, pp. 102-149, 1995.
76. **Mackowiak P.A.:** The normal microbial flora. *N. Engl. J. Med.*, 307:83-86, 1982.
77. **Martinez R.M., Figueras M.P., Ramos C., Sanjuan F., Aguirre J.M.:** *Campylobacter jejuni* and HIV infection. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 12:90-94, 1994.
78. **McFadyean F., Stockman S.:** Report of the departmental committee appointed by the board of agriculture and fisheries to enquire into epizootic abortion. Vol 3, London, His Majestis Stationary Office, 1913.
79. **deMelo M.A., Gabbiani G., Pèchere J-C.:** Cellular events and intracellular survival of *Campylobacter jejuni* during infection of HEp-2 Cells. *Infect. Immun.* 57:2214-2222, 1989.
80. **Mertens A., DeSmet M.:** *Campylobacter* cholecystitis. *Lancet*, 1:1092, 1979.



81. **Metzger H., Alcaraz G., Hohman R., et al.:** The receptor with high affinity for immunoglobulin E. *Annu. Rev. Immunol.*, 4:419-470, 1986.
82. **Mielke M.E., Ehlers S., Hahn H.:** The role of cytokines in experimental listeriosis. *Immunobiol.*, 189(3-4):285-315, 1993.
83. **Miller H.:** The protective mucosal response against gastrointestinal nematodes in ruminants and laboratory animals. *Vet. Immunol.*, 6:167-174, 1984.
84. **Mills S.D., Bradbury W.C.:** Human antibody response to outer membrane proteins of *Campylobacter jejuni* during infections. *Infect. Immun.*, 43:739-743, 1984.
85. **Mishu B., Blaser M.J.:** The role of *Campylobacter jejuni* infection in the initiation of Guillain-Barre syndrome. *Clin. Infect. Dis.*, 17:104-108, 1993.
86. **Mishu B., Ilyas A.A., Koski C.L., et al.:** Serologic evidence of *Campylobacter jejuni* infection preceding Guillain-Barre syndrome. *Ann. Intern. Med.*, 118:947-953, 1993.
87. **Monaco J.J.:** Structure and function of genes in the MHC class II region. *Curr. Opin. Immunol.*, 5:17-20, 1993.
88. **Moore W.E.C., Burmeister J.A., Brooke C.W., et al.:** Investigation of the influences on puberty, genetics and environment on the composition of subgingival peridontal flora. *Infect. Immun.*, 61:2891-2898, 1993.
89. **Nachamkin I., Yand X.-H.:** Human antibody response *Campylobacter jejuni* cellular antigens during gastrointestinal infection. *J. Clin. Microbiol.*, 21:33-38, 1985.

90. **Nachamkin I., Yang X.-H., Stern N.:** Role of *Campylobacter jejuni* flagella as colonization factors for three-day-old chicks: analysis with flagellar mutants. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59:1269-1273, 1993.
91. **Nasralla C.A., Pay N., Goodpasture H.C., Lin J.J., Svoboda W.B.:** Postinfectious encephalopathy in a child following *Campylobacter jejuni* enteritis. *AJNR Am. J. Neuroradiol.*, 14: 444-448, 1993.
92. **Nauciel C.:** Defense mechanisms against bacteria of intracellular development. *Presse Medicale*. 24(2):129-132, 1995.
93. **Naume B., Gately M., Espevik T.:** A comparative study of IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor)-, IL-2-, and IL-7-induced effects on immunomagnetically purified CD56<sup>+</sup> NK cells. *J. Immunol.*, 148:2429-2436, 1992.
94. **Nolte F.S.:** Practical considerations in the laboratory diagnosis of bacterial enteric infections. *Am. J. Clin. Pathol.*, 101:S14-17, 1994.
95. **Oelschlaeger T.A., Guerry P., Kopecko D.J.:** Unusual microtubule-dependent endocytosis mechanisms triggered by *Campylobacter jejuni* and *Citrobacter freundii*. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 90:6884-6888, 1993.
96. **Ogra P.L., Karzon D.T., Righthand F., et al.:** Immunoglobulin response in serum and secretions after immunization with live and inactivated poliovaccine and natural infection. *N. Engl. J. Med.*, 279:894-902, 1968.
97. **Pancorbo P.L., Gallego A.M., DePablo M., et al.:** Inflammatory and phagocytic response to experimental *Campylobacter jejuni* infection in mice. *Microbiol. Immunol.*, 38:89-95, 1994.

98. **Pei Z., Blaser M.J.:** PEB1, the major cell-binding factor of *Campylobacter jejuni*, is a homolog of the binding component in Gram negative nutrient transport systems. *J. Biol. Chem.*, 267:18717-18725, 1993.
99. **Penner J.L.:** *Campylobacter, Helicobacter*, and related spiral bacteria. *Manual of Clinical Microbiology*. 5th ed., Washington DC, ASM, 402-409, 1991.
100. **Pepersack F., Prigogyne T., Butzler J.P., et al.:** *Campylobacter jejuni* posttransfusional septicaemia. *Lancet*, 2:911, 1979.
101. **Pérez-Pérez G.I., Blaser M.J.:** Lipopolysaccharide characteristic of pathogenic campylobacters. *Infect. Immun.*, 47:353-359, 1985.
102. **Perussia B.:** Lymphokine-activated killer cells, natural killer cells and cytokines. *Curr. Opin. Immunol.*, 3:49-55, 1991.
103. **Phillips J.H., Hori T., Nagler A., et al.:** Ontogeny of human natural killer (NK) cell: Fetal NK cells mediate cytolytic function and express cytoplasmic CD3 $\epsilon$ ,d proteins. *J. Exp. Med.*, 175:1055-1066, 1992.
- 103a. **Polić B.:** Mehanizmi imunološkog nadzora latentne herpesvirusne infekcije. *Doktorska disertacija, Medicinski fakultet Rijeka, str. 40.*, 1996.
104. **Popović-Uroić T.:** *C. jejuni* and *C. coli* diarrhoea in rural and urban population in Jugoslavia. *Epidem. Infect.*, 102:59-67, 1989.
105. **Proctor R.A.:** Fibronectin: A brief overview of its structure, function, and physiology. *Rev. Infect. Dis.*, 9:S317-321, 1984.

106. **Quentin R.:** Use of nonradioactive DNA probes to identify a *Campylobacter jejuni* strain causing abortion. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 12:627-630, 1993.
107. **Ramirez-Ronda C.H., Fuxench-Lopez Z., Navarez M.:** Increased pharyngeal bacterial colonization during viral illness. Arch. Intern. Med., 141:1599, 1981.
108. **Reddy K.R., Thomas E.:** *C. jejuni* enterocolitis and hepatitis. Gastroenterology, 82:1156, 1982.
109. **Reynolds H.Y.:** Immunoglobulin G and its function in the human respiratory tract. Mayo Clin. Proc., 63:161-174, 1988.
110. **Russell R.G., Blake D.C.:** Cell association and invasion of Caco-2 cells by *Campylobacter jejuni*. Infect. Immun., 62:3773-3779, 1994.
111. **Russell R.G., O'Donnoghue M., Blake D.C., Zulty J., DeTolla L.J.:** Early colonic damage and invasion of *Campylobacter jejuni* in experimentally challenged infant *Macaca mulatta*. J. Infect. Dis., 168:210-215, 1993.
112. **Samsom J.N., Langermans J.A., Savelkoul H.F., van Furth R.:** Tumor necrosis factor, but not interferon-gamma, is essential for acquired resistance to *Listeria monocytogenes* during a secondary infection in mice. Immunology, 86(2):256-262, 1995.
- 112a. **Sasaki T., Mieno M., Udono H., et al.:** Roles of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells, and the effect of administration of recombinant murine interferon  $\gamma$  in listerial infection. J. Exp. Med. 171:1141-1154, 1990.
113. **Scalzo A.A., Fitzgerald N.A., Wallace C.R., et al.:** The effect of *Cmv-1* resistance gene, which is linked to the natural killer cell gene

- complex, is mediated by natural killer cells. *J. Immunol.*, 149:581-589, 1992.
114. **Schneerson R., Robbins J.B.:** Induction of serum *Haemophilus influenzae* type b capsular antibodies in adult volunteers fed cross reacting *Escherichia coli* 075:K100:H5. *N. Engl. J. Med.*, 292:1093, 1975.
115. **Schorling J.B., Wanke C.A., Schorling S.K. et al.:** A prospective study of persistent diarrhea among children in an urban Brazilian slum. *Am. J. Epidemiol.*, 132:144-156, 1990.
116. **Sheehan D.C., Hrapchak B.B.:** Theory and practice of histotechnology. 4 edition, Saint-Louis, The CV Mosby Company, pp. 18-51, 1973.
117. **Sheehy T.W.:** Digestive diseases as a national problem. VI. Enteric disease among United States troops in Vietnam. *Gastroenterology*, 55:105, 1968.
118. **Siber G.R., Schur P.H., Aisenberg A.C., et al.:** Correlation between serum IgG2 concentrations and the antibody response to bacterial polysaccharide antigens. *N. Engl. J. Med.*, 303:178-181, 1980.
119. **Sjögren E., Kaijser B., Werner M.:** Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated in Sweden: A 10-year follow-up report. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 36:2847-2849, 1992.
120. **Skirrow M.B.:** *Campylobacter* enteritis: a "new" disease. *BMJ*, 2:9-11, 1977.

121. **Skirrow M.B.:** *Campylobacter* enteritis in dogs and cats: A "new" zoonosis. *Vet. Res. Commun.*, 5:13, 1981.
122. **Skirrow M.B.:** *Campylobacter* enteritis: The first five years. *J. Hyg.*, 89:175, 1982.
123. **Skirrow M.B.:** A demographic survey of *Campylobacter*, *Salmonella* and *Shigella* infections in England. A Public Health Laboratory Service survey. *Epidemiol. Infect.* 99:647-657, 1987.
124. **Skirrow M.B.:** *Campylobacter*. *Lancet*, 336:921-923, 1990.
125. **Smibert R.M.:** Genus *Campylobacter*. In: Krieg N.R., Holt H.G. (eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1:111-118, 1984.
126. **Spelman D.W., Davison M., Buckmaster N.D., Spicer W.J., Ryan P.:** *Campylobacter* bacteraemia: a report of 10 cases. *Med. J. Aust.*, 144:503-505, 1986.
- 126a. **Stanfield J.T., McCardell B.A., Madeen J.M.:** *Campylobacter* diarrhea in an adult mouse model. *Microb. Pathog.*, 3:155-165, 1987.
127. **Steele T.W., McDermott J.N.:** Technical note: The use of membrane filters applied directly to the surface of agar plates for the isolation of *Campylobacter jejuni* from feces. *Pathology*, 16:263-265, 1984.
128. **Stiehm E.R., Sztejn M.B., Steeg P.S., et al.:** Deficient antigen expression on human cord blood monocytes. Reversal with lymphokines. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 30:430-436, 1984.
129. **Sullivan G.W., Mandell G.L.:** The role of cytokines in infection. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 4:344-349, 1991.

130. **Tauxe R.V.:** Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. In: Nachamkin I., Blaser M.J., Tompkins L.S. (eds.) *Campylobacter jejuni*. Current Status and Future Trends. Washington DC, American Society for Microbiology, pp. 9-19, 1992.
131. **Taylor D.E., Courvalin P.:** Mechanisms of antibiotic resistance in *Campylobacter species*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 8:1170-1112, 1988
132. **Tazume S., Ozawa A., Yamamoto T., et al.:** Ecological study on the intestinal bacterial flora of patients with diarrhea. *Clin. Infect. Dis.*, 16(2):S77-82, 1993.
133. **Thompson H.L., Matsushima K.:** Human polymorphonuclear leucocytes stimulated by tumor necrosis factor alpha show increased adherence to extracellular matrix proteins which is mediated via the CD11b/18 complex. *Clin. Exp. Immunol.*, 90:280-285, 1992.
134. **Underdown B., Schiff M.:** Immunoglobulin A.: Strategic defense initiative at the mucosal surface. *Ann. Rev. Immunol.*, 389:417, 1986.
135. **Vaara M.:** Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol. Rev.*, 56:395-411, 1992.
136. **Vandamme P., Vancanneyt M., Pot B., et al.:** Polyphasic taxonomic study of the emended genus *Arcobacter* with *Arcobacter butzleri* comb. nov. and *Arcobacter skirrowii* sp. nov., an aerotolerant bacterium isolated from veterinary specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 42:344-356, 1992.

137. **Vandaux P., Didier P., Haeberli A., et al.:** Fibronectin is more active than fibrin or fibrinogen in promoting *S. aureus* adherence to inserted intravascular catheters. *J. Infect. Dis.*, 167:633-641, 1993.
138. **Van Oss C.J., Gillman C.F.:** Phagocytosis as a surface phenomenon. I. Contact angles and phagocytosis of nonopsonized bacteria. *J. Reticuloendothel. Soc.*, 12:283, 1972.
139. **Van Spreeuwel J.P., Duursma G.C., Meijer C.J.L.M., et al.** *Campylobacter* colitis: Histologic, immunohistochemical and ultrastructural findings. *Gut*, 26:945-957, 1985.
140. **Versteeg R.:** NK cells and T cells: Mirror images? *Immunol. Today*, 13:244-247, 1992.
141. **Vesikari T., Huttunen L., Maki R.:** Perinatal *Campylobacter fetus* ss *jejuni* enteritis. *Acta Paediatr. Scand.*, 70:261, 1981.
142. **Walder M.:** Susceptibility of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* to twenty antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 16:37, 1979.
143. **Walker R.I., Caldwell M.B., Lee E.C., et al.:** Pathophysiology of *Campylobacter* enteritis. *Microbiol. Rev.*, 50:81-94, 1985.
144. **Walker R.I., Rollins D.M., Burr D.H.:** Studies of *Campylobacter* infection in the adult rabbit. In: Nachamkin I., Blaser M.J., Tompkins L.S. (eds.) *Campylobacter jejuni*: current status and future trends. Washington DC, American Society for Microbiology, pp. 139-147, 1992.
145. **Weinberg E.D.:** Iron withholdings: A defense against infection and neoplasia. *Physiol. Rev.*, 64:65-102, 1984.



146. **Welsh J.K., May J.T.:** Antiinfective properties of breast milk. *J. Pediatr.*, 94:1-9, 1979.
147. **Yrios J.W., Balish E.:** Colonization and infection of athymic and euthymic germ free mice by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter fetus* subsp. fetus. *Infect. Immun.*, 53(2):378-383, 1987.
148. **Yuki N., Ichikawa H., Doi A.:** Fisher syndrome after *Campylobacter jejuni* enteritis: human leukocyte antigen and the bacterial serotype. *J. Pediatr.*, 126:55-57, 1995.

## ŽIVOTOPIS

Rođena sam 20. prosinca 1958. godine u Rijeci gdje sam završila osnovnu i srednju školu. Godine 1977. upisala sam studij opće medicine pri Medicinskom fakultetu u Rijeci, a diplomirala sam 7. srpnja, 1983. godine.

Pripravnički staž sam obavila u KBC Rijeka, te položila završni stručni ispit 1984. godine.

Od veljače 1986. do kolovoza 1992. godine u stalnom sam radnom odnosu kao doktor medicine, a sada kao asistent pri Katedri za mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci.

Razdoblje od 1986.-1989. provela sam na specijalizaciji iz Medicinske mikrobiologije, te položila specijalistički ispit u Zagrebu u prosincu 1989.

U srpnju 1992. godine nakon završenog poslijediplomskog studija iz Kliničke imunologije i transplantacije smjera Klinička imunologija, obranila sam magistarski rad pod naslovom "Promjene u funkciji fagocita tijekom kemoterapije".

Od 1991. godine uključena sam u rad na projektu "Identifikacija i terapija bakterijskih upala" (br. 3-01-165) čiji je voditelj prof. dr. Miljenko Dorić. Projekt financira Ministarstvo znanosti i tehnologije Republike Hrvatske.

U travnju 1996. godine prihvaćena mi je tema doktorske disertacije pod naslovom: "Kampilobakterioza u miša - patogeneza i imunološki nadzor".