

DISS. ETH NO. 19059

IN VITRO ASSESSMENT OF BACTERIOGENIC
PROBIOTICS FOR PREVENTION AND TREATMENT OF
SALMONELLA IN CHILDREN USING NOVEL *IN VITRO*
CONTINUOUS COLONIC FERMENTATION AND
CELLULAR MODELS

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

DOCTOR OF SCIENCES

presented by

ANNINA ZIHLER

Dipl. Lm.-Ing. ETH Zurich

Born September 24, 1981

Citizen of Mauensee (LU)

Accepted on the recommendation of

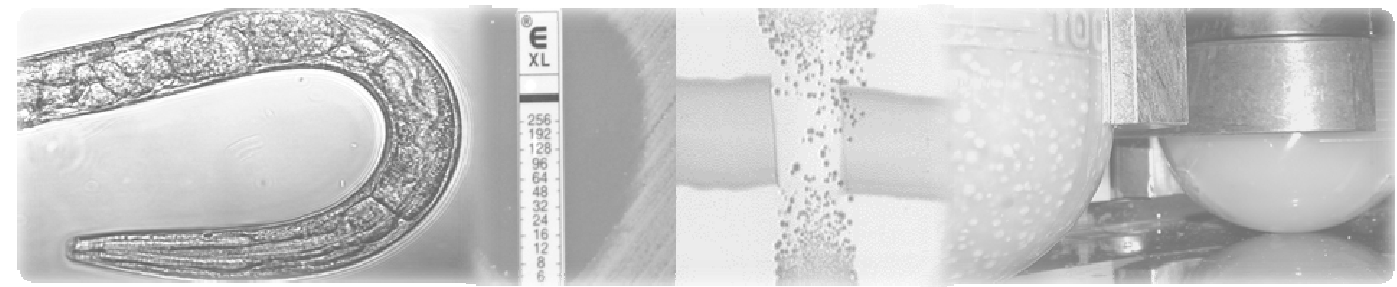
Prof. Dr. Christophe Lacroix, examiner

Prof. Dr. Seppo Salminen, co-examiner

Prof. Dr. med. Christian P. Braegger, co-examiner

Dr. Christoph Chassard, co-examiner

2010



Summary

Salmonella is one of the most common and serious foodborne pathogen worldwide. Gastroenteritis caused by non-typhoidal serovars is normally self-limiting and the use of antibiotics is controversial due to an enhanced risk of long-term pathogen carriage and transmission. Antibiotic therapy is indispensable for immunocompromised patients including children, being more susceptible to develop severe complications. Antibiotic resistant *Salmonella* strains are however increasingly reported and alternative treatment strategies are urgently needed. Probiotics could potentially offer an alternative to conventional antibiotic therapy for the prophylaxis and treatment of salmonellosis. Probiotics have an array of functional properties, which are strain-specific, allowing competing with the intestinal microbiota and exogenous invaders for the colonization of specific ecological niches in the human gastrointestinal tract. The work presented in this thesis aimed to elucidate the anti-*Salmonella* potential of different bacteriocinogenic probiotic strains, first *in vitro* using advanced models characterized by an increasing complexity and *in vivo* using a simple animal model with *Caenorhabditis elegans*.

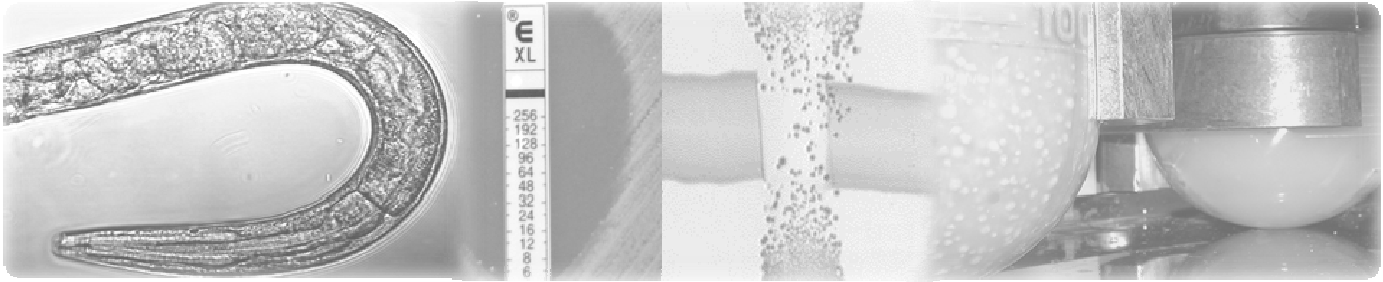
Using simple *in vitro* antagonism tests (deferred antagonism and microdilution tests), the human feces-derived Gram-negative strain *Escherichia coli* L1000 (microcin B17-producer) as well as the Gram-positive strain *Bifidobacterium thermophilum* RBL67 (thermophilicin B67-producer) were shown to effectively inhibit a broad and well-characterized panel of various *Salmonella* serotypes isolated in 2007 from clinical cases all over Switzerland. Because gut environments are more complex and dynamic interactions between microorganisms are largely involved in maintaining a healthy balance and barrier effect of gut microbiota *in vivo*, a continuous *in vitro* intestinal fermentation model of *Salmonella* infection in the proximal child colon with immobilized fecal micro-

biota was used to further elucidate the anti-*Salmonella* potential of *B. thermophilum* RBL67, compared to conventional antibiotic treatments, and their effects on gut microbiota composition and activity. In accordance with clinical reports, amoxicillin/clavulanic acid treatments produced only a transient decrease of *Salmonella* (selective plating) but strongly modified bacterial population profiles (FISH-flow cytometry) and metabolic activity (HPLC). In contrast, when added before (preventive) or after (curative) *Salmonella*, *B. thermophilum* RBL67 was shown to transiently colonize the intestinal reactor leading to a high probiotic/pathogen ratio (3050/1) accompanied by a strong inhibition of *Salmonella*. Furthermore this strain was able to restore the metabolic activity of gut microbiota which was profoundly changed after antibiotic treatments.

In a second part, a combination of *E. coli* L1000 and *B. thermophilum* RBL67 was tested on *Salmonella* infection in a more complete three-stage colonic fermentation model mimicking the proximal (pH 5.7), transverse (pH 6.2) and distal (pH 6.7) sections of the child colon during 65 days. With real-time qPCR analysis, *E. coli* L1000 was shown to preferably colonize the distal reactor, although at low levels compared to total copy numbers detected for *Enterobacteriaceae*, and to boost *Salmonella* propagation in all reactors. It was further shown that in these conditions, the microcin B17 production phenotype had no effect on *Salmonella* but led to a better colonization of the probiotic in the distal reactor. The lack of effects after *B. thermophilum* RBL67 addition on *Salmonella* inhibition observed in this trial was likely explained by the very low probiotic/pathogen ratio (2/1). Although this ratio increased to 115/1 after prebiotic inulin addition to the medium, *Salmonella* counts further increased in the distal but stabilized in proximal and transverse reactors.

To study host-microbe interactions, effluents from different reactors and treatment periods from the three-stage fermentation model were directly applied to mucus-secreting intestinal epithelial HT29-MTX cells to measure *Salmonella* invasion and monitor changes in cellular transepithelial electrical resistance (TER), as a marker for epithelial integrity. The presence of *E. coli* L1000 in distal reactors was shown to be associated with a significant reduction of TER although *Salmonella* invasion into HT29-MTX cells was decreased. In contrast, the presence of *B. thermophilum* RBL67 induced a high increase of TER after 24 h of incubation in all reactors resulting in TER values similar to that measured before *Salmonella* addition, while only small effects on *Salmonella* infectivity were measured. Finally, the small soil nematode *Caenorhabditis elegans* was used as a first simple animal *in vivo* model to study the effects of different bacteriocinogenic strains and their bacteriocin-negative mutants on the longevity of *Salmonella*-infected worms. In agreement with intestinal fermentation data and in contrast to its high efficacy in simple *in vitro* models, *E. coli* L1000 showed no positive effect on worm longevity indicating a lack of efficacy to inhibit *Salmonella*. Unexpectedly, *B. thermophilum* RBL67 was able to strongly increase worm longevity and slightly increase worm lifespan when fed prior infection.

In conclusion, a well-defined strategy combining novel *in vitro* intestinal fermentation and cell models was used in this thesis for an accurate assessment of potential probiotics with targeted anti-*Salmonella* activity. The use of different *in vitro* models characterized by an increasing complexity as well as a first simple *in vivo* model with *C. elegans* revealed a high potential of *B. thermophilum* RBL67 for prevention and treatment of salmonellosis in children, while *E. coli* L1000 clearly failed to inhibit *Salmonella* under gut-like conditions.



Zusammenfassung

Salmonellen gehören zu den weltweit häufigsten und gravierendsten bakteriellen Erregern von Lebensmittelinfektionen. Im Gegensatz zu denjenigen Salmonellen-Stämmen, die Typhus auslösen, verursachen Enteritis-Salmonellen beim Menschen meist spontan ausheilende Durchfallerkrankungen (Salmonellose). Antibiotische Behandlungen sind aufgrund des mit einer Behandlung erhöhten Risikos einer Langzeitausscheidung und -übertragung der Enteritis-Salmonellen umstritten. Bei Immungeschwächten sowie bei Kleinkindern können durch die Erreger jedoch schwere Komplikationen hervorgerufen werden, die eine entsprechende Antibiotikatherapie erfordern. Im Verlaufe der letzten Jahre wurde allerdings eine erhebliche Zunahme antibiotikaresistenter Erreger registriert, weshalb dringend weitere Behandlungsmethoden benötigt werden. Probiotika können eine vielversprechende Alternative zu konventionellen Antibiotikabehandlungsmethoden darstellen, sowohl die Prophylaxe, als auch die Heilung betreffend. Probiotika besitzen eine Reihe stammspezifischer funktioneller Eigenschaften welche es ihnen ermöglicht mit der Darmflora und exogenen Eindringlingen um die Kolonisierung spezifischer ökologischer Nischen im menschlichen Magen-Darm-Trakt zu konkurrieren. Vorliegende Arbeit bezweckte das Behandlungspotenzial verschiedener Bakteriozin produzierender probiotischer Bakterienstämmen zu eruieren, zuerst *in vitro* mit Hilfe fortgeschrittener Modelle, die sich durch ihre zunehmende Komplexität auszeichnen, und schliesslich *in vivo* mit Hilfe eines einfachen Tiermodells mit *Caenorhabditis elegans*.

Die Verwendung einfacher antagonistischer *in vitro* Tests zeigte, dass zwei Fäkalisolate, der Gram-negative Stamm *Escherichia coli* L1000 (microcin 17-Produzent) sowie der Gram-positive Stamm *Bifidobacterium thermophilum* RBL67 (thermophilicin B6-Produzent), eine repräsentative Gruppe verschie-

dener Salmonellenstämme effektiv hemmten, die im Jahr 2007 von infizierten Personen in der Schweiz isoliert wurden. Die Darmumgebung ist jedoch sehr komplex und dynamische Interaktionen zwischen Mikroorganismen gehen *in vivo* mit dem Erhalt eines gesunden Gleichgewichtes und Barriereeffektes der Darmflora einher. Deshalb wurde ein kontinuierliches *in vitro* Fermentationssystem benötigt, welches mit einer immobilisierten Fäkalprobe eines Kindes angeimpft wurde. Eine Salmonelleninfektion im aufsteigenden Dickdarm wurde simuliert, um das gegen Salmonellen gerichtete Potenzial von *B. thermophilum* RBL67 weiter abzuklären und mit einer konventionellen Antibiotikabehandlung zu vergleichen. Zudem wurde der Einfluss auf die Zusammensetzung und Aktivität der Darmflora untersucht. In Übereinstimmung mit klinischen Berichten induzierten Behandlungen mit Amoxicillin/Clavulansäure nur eine vorübergehende Abnahme der Salmonellenkonzentration (selektives Ausplattieren), veränderten aber die Zusammensetzung (FISH-Durchflusszytometrie) und Aktivität (HPLC) der Darmbakterien stark. *B. thermophilum* RBL67 hingegen, entweder vor (präventiv) oder nach (kurativ) der Infektion beigefügt, kolonisierte die simulierte Darmumgebung effizient was zu einem hohen Probiotika:Erreger Verhältnis führte (3050:1), begleitet von einer starken Unterdrückung des Salmonellenwachstums. Zusätzlich war dieser probiotische Stamm fähig, die durch die Antibiotikabehandlung stark veränderte Stoffwechselaktivität und Zusammensetzung der Darmflora wiederherzustellen.

In einem zweiten Teil wurde während 65 Tagen die Kombination von *E. coli* L1000 und *B. thermophilum* RBL67 gegen Salmonelleninfektionen mit Hilfe eines kompletteren dreistufigen Fermentationsmodells für den aufsteigenden (pH 5.7), querverlaufenden (pH 6.2) und den absteigenden (pH 6.7) Abschnitt

des Dickdarms getestet. *E. coli* L1000 besiedelte bevorzugt den simulierten absteigenden Dickdarm (real-time qPCR), verglichen mit den Enterobakterien allerdings in geringer Zahl, förderte jedoch das Wachstum der Salmonellen in allen Reaktoren. Zusätzlich hatte der microcin B17-Phänotyp keinen Effekt auf die Salmonellen, führte jedoch zu einer besseren probiotischen Besiedlung des absteigenden Dickdarmes. Die fehlende Wirkung von *B. thermophilum* RBL67 gegen die Salmonellen in diesem Versuch war wahrscheinlich durch das gemessene niedrige Probiotika:Erreger Verhältnis (2:1) zu erklären. Obwohl sich dieses Verhältnis nach der Zugabe von präbiotischem Inulin auf 115:1 erhöhte, stieg die Salmonellenkonzentration im simulierten absteigenden Dickdarm weiter, stagnierte aber im aufsteigenden und querverlaufenden Abschnitt.

Um die Interaktion zwischen Wirt und Mikroorganismen zu untersuchen, wurden die Ausflüsse der verschiedenen Reaktoren des Dreistufen-Dickdarm Fermentationsmodells während den verschiedenen Behandlungsperioden direkt auf Mukus absondernde HT29-MTX Darmzellen appliziert. Dies erfolgte, um die Invasion von Salmonellen zu messen und Veränderungen der Transepithelialen Elektrischen Resistenz (TER), ein Marker der Epithelintegrität, zu beobachten. Das Vorhandensein von *E. coli* L1000 im simulierten absteigenden Dickdarm war von einer signifikanten Reduktion der TER begleitet, obwohl die Invasion von Salmonellen in HT29-MTX Zellen vermindert wurde. Das Vorhandensein von *B. thermophilum* RBL67 induzierte hingegen nach einer 24-stündigen Inkubationszeit einen hohen Anstieg der TER in allen Reaktoren und führte zu ähnlichen TER Werten, wie sie vor der Zugabe der Salmonellen gemessen wurden, verbunden mit einem nur geringen Effekt auf die Infektiosität der Salmonellen.

Schlussendlich wurde der kleine Bodenfadewurm *Caenorhabditis elegans* als erstes einfaches Tiermodell verwendet, um den Effekt verschiedener bakteriozinogener Stämme und deren Bakteriozin-negativen Mutanten auf die Langlebigkeit von mit Salmonellen infizierten Würmern zu testen. In Übereinstimmung mit den Fermentationsdaten und im Gegensatz zu einfachen *in vitro* Modellen, bei denen eine hohe Wirksamkeit gemessen wurde, zeigte der microcin B17-produzierende Stamm *E. coli* L1000 keinen positiven Effekt auf die Langlebigkeit der Würmer was eine fehlende Wirksamkeit gegen Salmonellen indiziert. Unerwartet war *B. thermophilum* RBL67 hingegen in der Lage, die Langlebigkeit von *C. elegans* stark und die Lebensdauer der Würmer nach der Infektion mit Salmonellen leicht zu erhöhen.

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit eine definierte Strategie basierend auf der Kombination eines neuartigen *in vitro* Fermentations- und Zeldarmmodells verfolgt um das Potenzial von Probiotika mit einer gezielten Wirkung gegen Salmonellen präzise zu beurteilen. Die Verwendung von verschiedenen in ihrer zunehmenden Komplexität ausgezeichneten *in vitro* Modellen und eines ersten einfachen *in vivo* Modells mit *C. elegans* enthüllte ein hohes Potenzial von *B. thermophilum* RBL67 einerseits zur Prävention und andererseits zur Behandlung von Salmonellosen in Kindern. Unter ähnlichen im Dickdarm vorherrschenden Bedingungen scheiterte hingegen *E. coli* L1000 dabei, das Wachstum von Salmonellen zu hemmen.