

# Účinek dávky na antiadhezní aktivitu uropatogenní *Escherichia coli* v moči po konzumaci brusinkového prášku, standardizovaného na obsah proanthokyanidinů: multicentrická, randomizovaná, dvojitě zaslepená studie

Amy B. Howell<sup>1</sup>, Henry Botto<sup>2</sup>, Christophe Combescure<sup>3</sup>, Anne-Béatrice Blanc-Potard<sup>4</sup>, Lluís Gausa<sup>5</sup>, Tetsuro Matsumoto<sup>6</sup>, Peter Tenke<sup>7</sup>, Albert Sotto<sup>4</sup> a Jean-Philippe Lavigne<sup>\*4,8</sup>

## Abstrakt

**Základní údaje:** Požívání brusinek (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) je tradičně využíváno jako prevence infekcí močového systému. Proanthokyanidiny (PAC) v brusinkách, především s vazbou A-typu, působí jako důležité inhibitory adheze mikroorganismů *E. coli* především s P-fimbriemi na buňky uroepitelu. Byly nezbytné další experimenty, aby se prozkoumalo přetrvávání ve vzorcích moči po delší časové období a stanovila se tak nejúčinnější denní dávka a zjistilo se, zda je antiadhezní účinek v moči po brusinkách detekován u dobrovolnic různého původu.

**Metody:** Dvě zvlášť provedené biologické zkoušky (zkouška manózo-resistentní hemaglutinace a původní nová zkouška lidské epiteliální buněčné linie T24) hodnotily *ex-vivo* močovou bakteriální antiadhezní aktivitu ve vzorcích moči, odebraných od 32 dobrovolnic z Japonska, Maďarska, Španělska a Francie, v randomizované, dvojitě zaslepené studii, kontrolované placebem. Pro zhodnocení vlivu požívání brusinek na virulenci kmene *E. coli* byl použit *in vivo* *Caenorhabditis elegans* model.

**Výsledky:** Výsledky ukázaly významnou bakteriální antiadhezní aktivitu ve vzorcích moči, odebraných od dobrovolníků, kteří požívali brusinkový prášek, ve srovnání s placebem ( $p < 0,001$ ). Tato inhibice byla jednoznačně závislá na dávce, byla dlouhotrvající (až do 24 h se 72 mg PAC) a zvyšovala se s počtem ekvivalentů PAC, požitých v každém stravovacím režimu brusinkového prášku. *In vivo* *Caenorhabditis elegans* model prokázal, že brusinky působí proti bakteriální virulenci: kmen *E. coli* vykazoval redukovanou schopnost usmrctvat červy po růstu ve vzorcích moči pacientů, kteří užívali brusinkové kapsle. Tento účinek je významný zejména u režimu 72 mg PAC.

**Závěry:** Podávání brusinkového prášku se standardizovaným obsahem PAC v dávkách obsahujících 72 mg PAC denně může poskytovat určitou ochranu proti bakteriální adhezi a virulenci v močovém ústrojí. Tento účinek může poskytnout nykthemerní ochranu.

## Základní údaje

Požívání brusinek (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) je tradičně využíváno jako prevence infekcí močového ústrojí (UTI). Nedávné systematické přezkoumání vedlo k závěru, že existují určité pozitivní klinické důkazy, že konzumace brusinkové šťávy může během období 12 měsíců snížit

počet symptomatických UTI u žen (1). Výzkum naznačuje, že konzumace brusinkových produktů může zabránit adhezi některých kmenů *Escherichia coli* na uroepitel (2-4), čímž naruší tento důležitý počáteční krok v infekčním procesu (5). Jako důležité inhibitory adheze mikroorganismů *E. coli* s P-fimbriemi na buňky uroepitelu *in vitro* (6-9) a *ex vivo* (10) zde působí proanthokyanidiny (PAC) z brusinek, zejména řetězce typu A. Extrakty PAC z brusinek inhibovaly adhezi *E. coli* lineárním a na dávce závislým způsobem v rozsahu koncentrací PAC 75 až 5  $\mu\text{g}$ /

\* Korespondence: [jean.philippe.lavigne@chu-nimes.fr](mailto:jean.philippe.lavigne@chu-nimes.fr)

<sup>4</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Espri 26, Universitè Montpellier 1, Nimes, Francie

Kompletní seznam informací o autorech je k dispozici na konci článku.

ml (9). PAC v brusinkách obsahují neobvyklé dvojité spoje A-typu, které mohou být důležitým stavebním rysem pro antiadhezní proces (7). V jedné studii docházelo ke konzumaci jiných potravinových zdrojů PAC, obsahujících pouze řetězce B-typu (čokoláda, hroznové víno, a zelený čaj), ty však nevyvolávaly *ex vivo* bakteriální antiadhezní aktivitu. Bakteriální adhezi bránila pouze brusinková šťáva s A-typem PAC (11).

Po detekci bakteriální antiadhezní aktivity brusinek bylo použito s úspěchem několik zkoušek včetně manózo-resistentní hemaglutinace (MRHA) (3,7,9,12), Gal-Gal receptorové korálkové aglutinace (3,6), adherence na epiteliální buňky močového měchýře (2,3,9,12,13) a mikrodestičkového zákalu (14). Využití biologické zkoušky k detekci *in vitro* antiadhezní aktivity celých produktů z brusinek a izolovaných PAC je vhodné pro stanovení integrity produktu, nehodnotí to však aktivitu *in vivo* brusinkových metabolitů po požití. Bakteriální antiadhezní aktivita v moči může být biologicky významnějším markerem pro požití brusinek i pro účinnost konzumace brusinek pro prevenci UTI. Řada studií demonstrovala *ex vivo* bakteriální antiadhezní účinek v lidské moči po požití různých produktů z brusinek (11-13, 15-17).

Běžná doporučená denní dávka brusinek pro prevenci UTI je založena na hladinách účinnosti, jež byly podávány v intervenčních studiích na člověku. Obvykle doporučené množství brusinek pro prevenci UTI je denní požívání 300 ml koktejlu s brusinkovou šťávou, obsahující 36 mg proanthokyanidinů, měřených metodou DMAC, jež klinicky snižovalo bakteriurii a pyurii (18). Formulace z brusinek v práškové formě jako tablety a tobolky prokázaly aktivitu *in vitro* (9), *ex vivo* (19) a *in vivo* (20,21). Pro jasnější stanovení rozsahu dávky brusinek, jež je účinná pro odezvu, jsou však nezbytné další studie na člověku s využitím produktů se standardizovaným obsahem PAC. Standardizace je důležitá pro stanovení integrity a poločasu produktu a formulaci přesných materiálů zkoušky pro použití ve výzkumných studiích. Kritika prvních studií využívajících brusinky se často soustřeďuje na nedostatečné použití vhodného standardizovaného materiálu, což ztěžuje vyvozování závěrů a srovnání s jinými studiemi (1). Výzkum naznačuje, že zpracování brusinek do různých produktů může mít vliv na složení PAC, které je velmi heterogenní (22). Molekulová hmotnost a umístění spojů A-typu v PAC z brusinek by mohlo mít potenciálně dopad na bakteriální antiadhezní aktivitu (23). Řádná standardizace brusinkových produktů na obsah PAC a korelace úrovně PAC s antiadhezní bioaktivitou může být tudíž důležitá pro zajištění, že určité produkty brusinek obsahují PAC, jež jsou účinné.

První dvakrát zaslepená, randomizovaná a placebem kontrolovaná studie našeho týmu zjistila na dávce závislý účinek *ex vivo* bakteriální antiadhezní aktivity moči po požití komerčního brusinkového prášku, standardizovaného na PAC (12). Antiadhezní aktivita byla měřena v moči 12 hodin po léčebných režimech. Po těchto výsledcích byly nezbytné další experimenty pro výzkum přetrvá-

ní v moči po delší časové období a stanovení neúčinnější dávky ekvivalentů PAC denně. Jsou nezbytné i další studie pro stanovení, zda je antiadhezní efekt v moči po požití brusinek univerzální v celé populaci nebo je specifický pro určitá etnika, dietní režimy, místa atd. Pro zodpovězení těchto otázek jsme provedli tuto randomizovanou, dvojité zaslepenou studii kontrolovanou placebem, prováděnou na více pracovištích, jejímž cílem bylo zhodnotit další režimy dávkování a časová období odběru po požití stejného brusinkového prášku, standardizovaného na PAC.

## Metody

Ačkoliv brusinky jsou pouze doplňkem stravy, byla studie schválena různými etickými komisemi (1/ Comité d'éthique Sud Méditerranée III, Nîmes, Francie; 2/ Comité Ético de Investigaciòn Clinica (CEIC) de Fundació Puigvert, Barcelona, Španělsko; 3/ Ethical Committee of Jahn Ferenc South-Pest Teaching Hospital, Maďarsko; 4/ Ethics Committee of Medicine and Medical Care, University of Occupational and Environmental Health, Japonsko) v každé zemi a byla provedena podle principů, vyjádřených v Helsinské deklaraci. K účasti na této randomizované, dvojité zaslepené, placebem kontrolované studii typu cross-over bylo získáno prostřednictvím čtyř urologických oddělení v Japonsku (Univerzitní nemocnice Kjúšú), Maďarsku (Nemocnice Jižní Pešť, Budapešť), Španělsku (Fundació Puigvert, Barcelona) a Francii (Hôpital Foch, Suresnes) celkem 32 sexuálně aktivních dobrovolnic, a sice po osmi z každé země. Dobrovolnice byly schváleny etickými komisemi a poskytl informovaný souhlas. Kritéria nezařazení do studie zahrnovala používání antibiotik v šesti měsících před studií, těhotenství, známou alergii nebo nesnášenlivost na produkty z brusinek nebo rutinní požívání jakýchkoliv potravinových doplňků, skládajících se z vitamínů, minerálů nebo stopových prvků. Dobrovolnice byly poučeny, aby během studie nijak neměnily své stravovací návyky nebo svůj životní styl. Pro dobu užívání kapslí se však měly vyhnout všem jídlům, nápojům a doplňkům obsahujícím rod *Vaccinium* včetně jiných forem *V. macrocarpon* (brusinka kanadská), *V. myrtillus* (brusnice borůvka), *V. angustifolium* (brusnice úzkolistá), *V. corymbosum* (borůvka chocholičnatá) a *V. vitis-idae* (brusnice obecná). Dobrovolnice byly rovněž instruovány, aby omezily spotřebu čokolády, čaje, vinných hroznů a vína. Všechny léky, užívané v průběhu studie byly hlášeny lékaři, který odpovídal za sledování studie v příslušném centru.

Studie byla provedena s využitím komerčně dostupných kapslí brusinkového prášku (Urell®/Ellura™ Pharmatoka, Rueil Malmaison, Francie) a kapslí placeba, složených z koloidního silikagelu, stearanu hořečnatého, celulózy a želatiny. Kapsle byly neprůhledné, aby se skryla barva obsahu. PAC v brusinkovém prášku byl kvantifikován společností Brunswick Laboratories (Norton, MA) kolorimetricky, aktualizovanou metodou s dimethylaminocinnamaldehydem (metoda DMAC), s využitím selektivní kolorimetrické reakce mezi PAC a DMAC po gelové chromatografii s otevřeným sloupcem na Sephadex® LH-20

(Amersham). Dávky v tobolkách byly standardizovány na podání 18 nebo 36 mg ekvivalentů PAC v brusinkovém prášku.

Dobrovolnice v Japonsku a Maďarsku dostávaly 0, 36 nebo 72 mg ekvivalentů PAC denně, dobrovolnice ve Francii a ve Španělsku 0, 18 nebo 36 mg ekvivalentů PAC denně. Každá dobrovolnice prošla postupně v náhodném pořadí třemi režimy (vždy 2 tobolky); jednotlivé režimy byly založeny na: (1) brusinkách (2 úrovně dávek PAC) nebo (2) placebo nebo (3) 1 tobolce s brusinkami v každé dávce PAC a jedné tobolce placebo; vymývací období mezi jednotlivými režimy trvalo minimálně jeden týden. Dobrovolnice požívaly tobolky ráno v 8 hodin. První moč byla shromažďována od 9 hodin ráno do 14 hodin po požití tobolky a podíly byly sloučeny. Druhý odběr byl prováděn následujícího rána (v 8 hodin). Ještě před podáváním brusinek byla také odebrána moč na počátku studie (0 h). Různé biologické a fyzikálně chemické parametry vzorků moči (sebraných při každém režimu) byly měřeny pomocí systému Multistix® (Bayer). Moč s velkým zastoupením leukocytů a dusitanů byla vždy vyloučena. Zbývající vzorky byly centrifugovány při 4000 g po dobu 15 minut, sterilizovány filtrací (0,45 µm), rozděleny do 3 alikvotů a skladovány při -20 °C.

Využil se uropatogenní kmen *E. coli*, izolovaný dříve u pacienta s UTI (NECS978323) (12) s P-fimbriemi *papG* a typem pili 1. Aby bylo možné přímé pozorování ulpívajících bakterií fluorescenčním mikroskopem, byl NECS978323 geneticky modifikován pomocí nemobilizovatelného plazmidu, odvozeného od pBBR a nesoucího expresní kazetu GFP, a to tak, aby vylučoval zelený fluorescenční protein (GFP) (24). Baktérie byly kultivovány v tryptikázovém sojovém bujónu (bioMerieux, Marnes La Coquette, Francie) nebo antigenovém agaru s kolonizačním faktorem po dobu 16 hodin při 37 °C pro zvýšení exprese P-fimbrií.

Pro zajištění účinku produktu byl brusinkový prášek, standardizovaný na PAC, testován před požitím dobrovolnicemi na *in vitro* uropatogenní bakteriální antiadhezní aktivitu s využitím MRHA pro detekci antiadhezní aktivity u uropatogenního mikroorganismu *E. coli* s P-fimbriemi (11). V krátkosti, antiadhezní bioaktivita prášku byla testována měřením schopnosti frakcí potlačovat aglutinaci červených lidských krvinek (HRBC) (A1, Rh+) s následnou inkubací s uropatogenní *E. coli* s P-fimbriemi. Baktérie byly suspendovány ve fyziologickém roztoku, pufovaném fosforečnanovým puforem (PBS) na pH 7,0, v koncentraci 5 x 10<sup>8</sup> bakterií/ml. Prášek byl rozpuštěn v PBS v počáteční koncentraci 60 mg/ml a pH bylo upraveno na neutrální pomocí NaOH. Roztok byl dvakrát zředěn a každé zředění (30 ml) bylo inkubováno s 10 ml bakteriální suspenze na polystyrenové destičce s 24 prohlubněmi po dobu 10 minut při pokojové teplotě na rotační třepačce. Byla připravena 3% v/v suspenze HRBC v PBS a k testované suspenzi bylo přidáno 10 ml zředěné krve. Suspenze byla inkubována 20 minut na rotační třepačce při 21 °C a mikroskopicky byla vyhodnocena jeho schopnost bránit aglutinaci.

Byla zaznamenána konečná koncentrace roztoku, při níž došlo k potlačení aglutinace brusinkovou frakcí. Prohlubně s obsahem bakterií plus PBS, HRBC plus PBS, bakterií plus testovaná frakce a HRBC plus testovaná frakce sloužily jako negativní kontroly aglutinace a prohlubně s obsahem bakterií plus HRBC sloužily jako pozitivní kontrola aglutinace. Zkoušky byly prováděny třikrát.

Moč byla testována *ex vivo* na antiadhezní aktivitu před a po léčebném režimu s využitím dvou různých zkoušek. Zkouška MRHA, popsaná výše, byla modifikována nahrazením roztoku brusinek močí. V krátkosti, kapka 30 µl moči byla vždy inkubována s 10 µl bakteriální suspenze na polystyrenové desce s 24 prohlubněmi po dobu 10 minut při 21 °C na rotační třepačce. HRBC byly přidány k moči, inkubovány po dobu 20 minut na rotační třepačce při 21 °C a vyhodnoceny mikroskopicky na schopnost bránit aglutinaci. Nebyla-li pozorována žádná aglutinace, byla moč vyhodnocena tak, že obsahuje antiadhezní metabolity a byla zaznamenána jako moč s antiadhezní aktivitou (AAA). Výsledky byly vyjádřeny jako procento antiadhezní aktivity (0% MRHA = 100% AAA, 50% MRHA = 50% AAA a 100% MRHA = 0% AAA). Zkoušky byly čtyřikrát opakovány na třech vzorcích moči a byla vypočítána standardní odchylka.

Ve druhé zkoušce moči *ex vivo* byla bakteriální adheze hodnocena při využití lidské buněčné linie epiteliálních buněk T24 (ATRCC HTB-4). Byla vyvinuta nová technika za pomoci fluorescentní NEC978323 pro zesílení detekce adheze kmene. Monovrstvy epiteliálních buněk byly kultivovány při 37 °C v McCoyově médiu 5a s obsahem 10% (v/v) fetálního telecího séra, 1,5 mM glutaminu a antibiotik (50 U/ml penicilinu a 50 mg/ml streptomycinu) na krycích sklíčkách v kultivačních deskách s 24 prohlubněmi. Baktérie byly kultivovány přes noc ve vzorcích moči s obsahem 5% (v/v) Luriova bujónu. Baktérie byly odděleny centrifugací, resuspendovány při DO600 0,1 v McCoyově médiu, přidány ke tkáňové kultuře a inkubovány po dobu 2,5 hodiny při 37 °C. Po promytí PBS byly buňky fixovány 4% paraformaldehydem, inkubovány 20 minut při pokojové teplotě a zkoumány pod fluorescenčním mikroskopem. Byl vypočítán index adheze (AI), odpovídající průměrnému počtu ulpívajících bakterií na buňku pro 100 buněk. Tento index byl vyjádřen jako průměr minimálně tří nezávislých zkoušek.

Po vypracování snadného modelového systému interakcí hostitel-patogen bylo použito háďátka obecné - *C. elegans*, aby se identifikovaly základní evolučně zachované cesty, spojené s mikrobiální patogenezí. Tento test je založen na schopnosti *E. coli* být pohlčen bezobratlými *C. elegans*, což vede k infekci a nakonec usmrcení hlístic (25). Procento usmrcených hlístic za přítomnosti kmene *E. coli* je nepřímým markerem potenciálu virulence tohoto kmene. Zkouška infekce *C. elegans* byla prováděna tak, jak popsal Lavigne se spolupracovníky (25) s využitím mutantní linie Fer-15, jež má poruchu plodnosti, citlivou k teplotě. Fer-15 poskytlo Centrum genetiky *Caenorhabditis*, jež je financováno organizací NIH National Center

for Research Resources (NCRR). V krátkosti, aby byl růst červů synchronizovaný, byla shromážděna vajíčka pomocí chlornanové metody. Kmen *E. coli* byl kultivován přes noc v lidské moči, obsahující 5 % (v/v) růstové médium pro červy (NGM). Bakteriální buňky byly izolovány centrifugací, jednou promyty a suspendovány ve fyziologickém roztoku, pufrovaném fosfátovým pufrém (PBS) na pH 7,0, v koncentraci 10<sup>5</sup> CFU/ml. Agarové plotny NGM byly inokulovány 10  $\mu$ l kmene a inkubovány při 37 °C po dobu 8-10 hodin. Plotny byly ponechány vychladnout na pokojovou teplotu a naočkovány červy ve stadiu L4 (20-30 na plotnu). Poté byly plotny inkubovány při 25 °C a hodnoceny každý den pod stereomikroskopem (Leica MS5) na počet hlístic. Pro každý zvolený klon byly připraveny tři plotny a experiment byl opakován pětkrát. Hlístice byla považována za mrtvou, když již nereagovala na dotyk. Hlístice, které uhynuly v důsledku ulpění na stěnu desky, byly z analýzy vyloučeny. Letální doba 50 % (LT50) a doba do uhynutí (LT100) odpovídaly času (v hodinách), nezbytnému pro usmrcení 50 % resp. 100 % populace hlístic. OP50 je avirulentní kmen *E. coli*, mezinárodní standardní potrava pro hlístice, použitá jako kontrola. Počet bakterií v zaživacím ústrojí *C. elegans* byl zjištěn metodou, popsanou Garsinem se spolupracovníky (26). Pět *C. elegans* bylo odebráno po 72 hodinách a povrchové bakterie byly odstraněny proplachem hlístic dvakrát kapkou 4  $\mu$ l média M9 na agarové desce NGM s obsahem gentamycinu 25  $\mu$ l/ml. Hlístice byly vloženy do 1,5 ml zkumavek typu Eppendorf s obsahem 20  $\mu$ l média M9 s 1 % Tritonem X-100 a byli mechanicky narušeni paličkou. Objem byl upraven na 50  $\mu$ l médiem M9 s obsahem 1% Tritonu X-100, který byl zředěn a vložen na Luria-Bertaniho agar s obsahem 50  $\mu$ g/ml ampicilinu. Každá zkouška byla provedena minimálně třikrát.

Kvantitativní proměnné byly popsány hodnotami mediánu, rozptylem a průměrem a standardní odchylkou. Kvalitativní proměnné byly popsány pomocí obrázků a procent. 95% intervaly spolehlivosti byly vyhodnoceny exaktní Clopper-Pearsonovou metodou. Četnosti mezi AAA = 0 % a AAA > 0 % byly porovnány pomocí kritérií s využitím Fisherova přesného testu a hodnoty ukazatelů byly porovnány pomocí Kruskal-Wallisova testu. Hodnota ukazatele byla vytvořena dle hodin, země a dávky pomocí modelu rovnice generalizovaného odhadu. Křivky přežití červů byly zkoumány univariantní analýzou (Kaplan-Meierovy křivky). Byly uvedeny hodnoty mediánu přežití. Křivky přežití byly porovnávány pomocí log-rank testu. Poté byla provedena multivariantní analýza přežití (Coxův model). Nebyla provedena žádná metoda výběru proměnných. Byly prověřeny předpoklady proporcionálních rizik. Za statisticky významnou byla považována hodnota  $p \leq 0,05$ , daná softwarem SAS®/ETS (verze 8.1) (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA).

## Výsledky

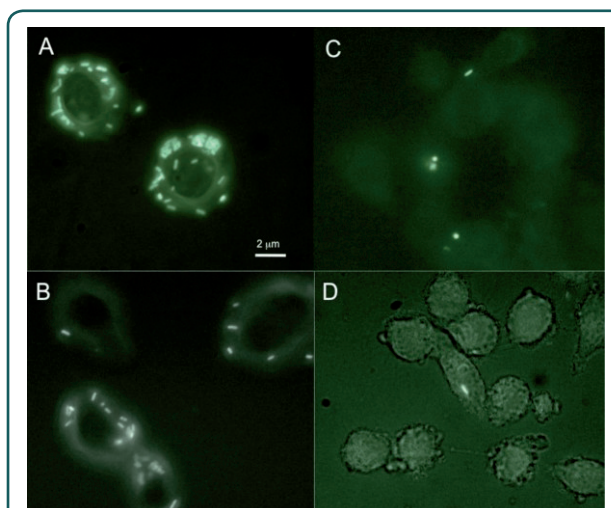
### Antiadhezní aktivita brusinkového prášku in vitro

Bakteriální antiadhezní aktivita celého brusinkového prášku Urell®/Ellura™ (naměřené aktivitou MRHA) byla 0,47 mg/ml (data neuvedena).

### Účinky zjištěné zkouškami ex vivo

Výsledky MRHA naznačovaly významnou antiadhezní aktivitu (AAA) v moči, odebrané od dobrovolnic, které požívaly brusinkový prášek oproti placebo ( $p < 0,001$ ) (tabulka 1). Tato inhibice byla jasně závislá na dávce a zvyšovala se s množstvím ekvivalentů PAC, použitých v každém režimu brusinkového prášku. V časovém průběhu experiment byl stanoven pík AAA. Ve vzorcích moči, odebraných po 6 hodinách, byl významný rozdíl mezi dávkami brusinek, obsahujícími 18 mg PAC, a dávkami s obsahem 36 nebo 72 mg PAC ( $p = 0,002$ ); mezi 36 a 72 mg PAC však nebyl zjištěn žádný statistický rozdíl. Ve vzorcích moči, odebraných po 24 hodinách, byl významný rozdíl mezi AAA v moči, patřící pacientům, kteří požívali dávky brusinek s obsahem 72 mg PAC (50% AAA), a AAA v moči, patřící pacientům, kteří požívali 18 nebo 36 mg PAC (0 resp. 12% AAA) ( $p = 0,002$ ) (tabulka 1). Ve všech zemích byly zjištěny podobné výsledky a trendy (tabulka 1).

Výsledky zkoušky adheze buněk epitelu *ex vivo* ukázaly vysoce významnou redukci bakteriální adheze na buňky T24 oproti placebo ( $p < 0,001$ ) po požití dávek brusinek



**Obrázek 1: Fluorescenční mikroskopie *E. coli gfp+* kmene, vypěstovaného v moči dobrovolnic, odebrané po požití brusinkového prášku a uloženo na buňky epitelu T24. A – *E. coli*, pěstovaná v moči, odebráno po požití placeba; B – *E. coli*, pěstovaná v moči, odebráno 6 hodin po požití brusinkového prášku s obsahem 18 mg proanthokyanidinů (PAC); C – *E. coli*, pěstovaná v moči, odebráno 6 hodin po požití brusinkového prášku s obsahem 36 mg PAC; D – *E. coli*, vypěstovaná v moči, odebráno 6 hodin po požití brusinkového prášku s obsahem 72 mg PAC.**

**Tabulka 1: Bakteriální antiadhezní aktivita (AAA) moči, stanovená zkouškou (A) manózo-resistentní hemaglutinace (MRHA) a močové bakteriální adheze na buňky T24 (B), vyjádřenou jako index adheze (AI) po požití zvyšujících se dávek brusinkového prášku, standardizovaného na 18, 36 nebo 72 mg proanthokyanidinu (PAC) versus placebo účastníky ve 4 zemích.**

Regimen	AAA						P	
	Placebo	18 mg PAC	36 mg PAC	72 mg PAC	18 vs 36	36 vs 72		6 h vs 24 h
<b>Spain (n = 8)</b>								
0 h	0% [0-0]	0% [0-0]	0% [0-0]	ND				
1-6 h	0% [0-0]	50% [50-100]	100% [50-100]	ND	0.002	ND	<0.001	<0.001
24 h	0% [0-0]	0% [0-0]	12.5% [0-50]	ND	0.01	ND	<0.001	
<b>France (n = 8)</b>								
0 h	0% [0-0]	0% [0-0]	0% [0-0]	ND				
1-6 h	0% [0-0]	50% [50-100]	75% [50-100]	ND	0.005	ND	<0.001	
24 h	0% [0-0]	0% [0-0]	0% [0-0]	ND	NS	ND	<0.001	
<b>Japan (n = 8)</b>								
0 h	12.5% [0-50]	ND	25% [0-50]	25% [0-50]				<0.001
1-6 h	0% [0-0]	ND	100% [100-100]	100% [100-100]	ND	NS	<0.001	
24 h	0% [0-0]	ND	12.5% [0-50]	75% [50-100]	ND	0.001	0.005	
<b>Hungary (n = 8)</b>								
0 h	0% [0-0]	ND	0% [0-0]	0% [0-0]				
1-6 h	0% [0-0]	ND	87.5% [50-100]	100% [100-100]	ND	NS	<0.001	
24 h	0% [0-0]	ND	25% [0-50]	25% [0-50]	ND	NS	<0.001	
<b>Total (n = 32)</b>								
0 h	0.3% [0-0]	0% [0-0]	0.6% [0-50]	12.5% [0-50]				
1-6 h	0% [0-0]	50% [50-100]	90.6% [50-100]	100% [100-100]	0.003	NS	<0.001	ND
24 h	0% [0-0]	0% [0-0]	12.5% [0-50]	50% [50-100]	0.01	<0.001	<0.001	ND

**Tabulka 1: Bakteriální antiadhezní aktivita (AAA) moči, stanovená zkouškou (A) manózo-resistentní hemaglutinace (MRHA) a močové bakteriální adheze na buňky T24 (B), vyjádřenou jako index adheze (AI) po požití zvyšujících se dávek brusinkového prášku, standardizovaného na 18, 36 nebo 72 mg proanthokyanidinu (PAC) versus placebo účastníky ve 4 zemích (pokračování).**

Regimen	AI Median [Range]						P	
	Placebo	18 mg PAC	36 mg PAC	72 mg PAC	18 vs 36	36 vs 72		6 h vs 24 h
<b>Spain (n = 8)</b>								
1-6 h	18.5 [15-22]	8.5 [5-14]	5.0 [1-11]	-	<0.001	ND	<0.001	<0.001
24 h	20.0 [18-22]	14.5 [10-18]	12.5 [5-17]	-	<0.001	ND	<0.001	
<b>France (n = 8)</b>								
1-6 h	17.5 [15-28]	8.0 [5-16]	4.0 [2-10]	-	<0.001	ND	<0.001	
24 h	19.5 [18-25]	17.5 [12-22]	5.0 [2-10]	-	<0.001	ND	<0.001	
<b>Japan (n = 8)</b>								
1-6 h	21.5 [18-28]	-	5.0 [1-9]	3.5 [1-6]	ND	NS	<0.001	<0.001
24 h	25.5 [17-29]	-	13.5 [10-18]	10.0 [2-15]	ND	0.01	<0.001	
<b>Hungary (n = 8)</b>								
1-6 h	18.5 [15-22]	-	2.0 [1-5]	1.0 [1-5]	ND	NS	<0.001	
24 h	20 [15-25]	-	9.5 [5-25]	4.5 [2-10]	ND	<0.001	<0.001	
<b>Total (n = 32)</b>								
1-6 h	21.5 [15-28]	10.5 [5-16]	5.9 [1-11]	2.5 [1-6]	<0.001	<0.001	<0.001	ND
24 h	22.3 [15-29]	16.0 [10-22]	14.5 [2-25]	9.9 [2-15]	<0.001	<0.001	<0.001	ND

The results are representative of at least three independent trials. NS, not significant; ND, not determined. 0 h, pre-cranberry consumption collection

s obsahem 36 nebo 72 mg PAC (tabulka 1, obrázek 1). Bakteriální adheze klesala v závislosti na dávce brusinkového prášku. Index adheze (AI) bakterií, vyrostlých ve vzorcích moči, odebraných po požití brusinek s 36 nebo 72 mg PAC byl významně nižší než AI po dávce 18 g PAC ( $p < 0,001$ ). Multivariantní analýza jasně potvrdila účinek dávkování pro každý režim brusinek ve srovnání s placebem ( $p < 0,001$ ) (tabulka 2). AI bakterií v moči, odebrané po 6 hodinách a po 24 hodinách se významně lišily po všech režimech brusinek ( $p < 0,001$ ). Je zajímavé, že AI po 24 hodinách po požití brusinek s ekvivalenty 72 mg PAC zůstal významně nízký (AI medián  $< 10$ ) ve srovnání s jinými režimy ( $p < 0,001$ ). Multivariantní analýza, potvrdila účinek časové závislosti s maximálním účinkem po 6 hodinách ve srovnání s 24 hodinami ( $p < 0,001$ ). Multivariantní analýza demonstrovala účinek původu pacienta. Když byla data upravena hodinou a dávkou, výsledky z Japonska se významně lišily ve srovnání se třemi dalšími zeměmi vyšším AI ( $p < 0,001$ ) (tabulka 2).

Po 6 hodinách pro 3 dávky ekvivalence PAC byla zaznamenána významná korelace mezi výsledky AAA a výsledky AI ( $p = 0,01, 0,04$  a  $0,04$  pro 18, 36 a 72 mg PAC). Tento trend nebyl pozorován po 24 hodinách pro 3 dávky ( $p =$  nevýznamné,  $0,94$  a  $0,10$  pro 18, 36 a 72 mg PAC).

### Redukce virulentnosti *E. coli*

Vyhodnotili jsme virulentní potenciál *E. coli* za přítomnosti různé moči po požití brusinkového prášku. Průměrná doba přežití (LT50) se u červů významně zvýšila na 5-6 dnů u *E. coli*, pěstované ve vzorcích moči, odebraných po požití brusinek ve srovnání s LT50 u kmene, vypěstovaného ve vzorcích moči, odebraných po požití placeba (3 dny) ( $p < 0,001$ ) (tabulka 3). U vzorků moči, odebraných po 6 hodinách, není možné zjistit žádný rozdíl mezi virulencí kmene *E. coli*, vypěstovaného v moči, odebraného po požití PAC.

V multivariantní analýze byl významný účinek dávky PAC, ovlivňující virulentnost *E. coli* (HR = 1 pro placebo až HR = 0,32 pro 72 mg); mezi požitými PAC a pozorovanou virulentností *E. coli* byl inverzní vztah ( $P < 0,001$ ) (tabulka 2). Účinek PAC byl tedy pro červy „ochranný“. Na virulenci *E. coli* měla kromě toho vliv i hodina. Virulence *E. coli* vůči červům se zvýšila o 32 % u moči, odebrané po 24 hodinách, oproti moči, odebrané po 6 hodinách ( $P < 0,001$ ).

Počet CFU *E. coli* v zažívacím traktu červů kolísal kolem 106 bakterií na červa pro každý kmen 72 hodin po požití bez statistických rozdílů (data neuvedena), což potvrzovalo požití a proliferaci izolátů ve střevě *C. elegans*.

### Diskuse

V této studii byly úspěšně optimalizovány dvě experimentální zkoušky pro demonstrování antiadhezní aktivity v lidské moči po požití brusinkového prášku. Byly zvoleny dva časy odběru: 1 až 6 hodin, odpovídající nejdůležitějšímu období vylučování PAC močí, jak dříve demonstrovali Howell se spolupracovníky (11), a 24 hodin, období reziduální eliminace PAC močí. Výsledky zkoušek MRHA byly inverzně korelovány se zkouškou adheze epiteliálních buněk pro první moč, shromažďovanou od 1 do 6 hodin po požití různých dávek ekvivalentů PAC v brusinkách (např. AI klesal, když se zvýšila antiadhezní aktivita, stanovená MRHA). Tato korelace však nebyla zaznamenána při 24 hodinách, z čehož lze vyvodit, že zkouška adheze epiteliálních buněk může být pro detekci aktivity v moči citlivější, když jsou aktivní metabolity méně koncentrované. Naše výsledky udávají, že by jak MRHA, tak zkoušky adheze epiteliálních buněk mohly být potenciálně využity pro vyšetření antiadhezní aktivity moči, především v prvních 6 hodinách po požití brusinek.

**Tabulka 2: Multivariantní analýza výsledků, získaných pro močovou bakteriální adhezi na buňkách T24, vyjádřenou jako index adheze.**

		Parametrers	SD	IC95%		p	p globale
				inf	sup		
<b>Countries</b>	France	.	.	.	.		<0.001
	Spain	-1.649	1.4478	-4.487	1.188	0.26	
	Japan	3.127	1.6099	-0.028	6.283	0.05	
	Hungary	0.332	1.7194	-3.038	3.702	0.85	
<b>Hours</b>	1-6 H	.	.	.	.		<0.001
	24 H	7.089	0.7367	5.645	8.533		
<b>Dose</b>	<b>Placebo</b>	.	.	.	.		<0.001
	<b>36 mh</b>	-9.236	1.1482	-11.487	-6.986	<0.001	
	<b>72 mg</b>	-16.595	0.6769	-17.921	-15.268	<0.001	
	<b>144 mg</b>	-20.929	0.9071	-22.0707	-19.151	<0.001	

The index value was modelled by the hours, the country and the dose using a Generalized Estimating Equation model.





**Tabulka 3: vivo kinetika usmrcování *C. elegans*, infikovaných *E. coli*, vypěstovanou ve vzorcích moči po různých režimech požití proanthokyanidinů.**

Regimen	LT100 Median (IC95%) in days		P						Sp-Fr vs Ja-Hu
	Placebo	18 mg	36 mg	72 mg	Pl vs 18/36	18 vs 36	36 vs 72	6 h vs 24 h	
<b>Spain</b>									
<b>1-6 h</b>	8.5 [7-8]	10 [9-10]	11.5 [11-12]	ND	<0.001	<0.001	ND	NS except for 72 mg	<0.001
<b>24 h</b>	7 [6-8]	9 [8-10]	9.5 [9-10]	ND	<0.001	NS	ND	<0.001	
<b>France</b>									
<b>1-6 h</b>	7 [6-8]	10 [9-11]	11 [10-12]	ND	<0.001	NS	ND	NS except for 36 mg	
<b>24 h</b>	7 [6-8]	8 [7-9]	10.5 [10-11]	ND	NS	<0.001	ND	<0.001	
<b>Japan</b>									
<b>1-6 h</b>	8 [7-8]	ND	12.5 [12-13]	13 [12-14]	<0.001	ND	NS	NS	<0.001
<b>24 h</b>	7.5 [7-8]	ND	11 [10-12]	12 [11-13]	<0.001	ND	NS		
<b>Hungary</b>									
<b>1-6 h</b>	7 [6-8]	ND	12 [11-13]	12.5 [12-13]	<0.001	ND	NS	NS	
<b>24 h</b>	8 [7-8]	ND	11 [10-12]	11.5 [11-12]	<0.001	ND	NS		
<b>Total</b>									
<b>1-6 h</b>	7 [6-8]	5 [3-7]	5.5 [4-9]	6.5 [5-10]	<0.001	NS	<0.001	NS	ND
<b>24 h</b>	8 [7-8]	4 [2-6]	5 [3-8]	6 [4-9]	<0.001	<0.001	<0.001		ND
<b>OP50</b>	14 [13-15]								

(A) Determination of LT50 Median; (B) Determination of LT100 Median.

Úprava zkoušky buněčné adheze s využitím fluoreskujícího kmene *E. coli* odstraňuje falešně pozitivní výsledky, pozorované v předchozích experimentech s využitím roztoku Giemsa pro barvení bakterií (12,13). V experimentálním protokolu, použitím v této studii, je analýza rychlejší a snazší než u roztoku Giemsa, což znamená zlepšení kvantifikace bakteriální adheze.

Tato randomizovaná, dvojitě zaslepená studie, kontrolovaná placebem a prováděná na více pracovištích, odhalila závislost účinku na dávce a čase dvou různých modelů *ex vivo* ulpívání *E. coli* na epiteliálních buňkách močového měchýře. Prokázali jsme vrchol antiadhezní aktivity moči 6 hodin po požití brusinkového prášku, standardizovaného na PAC, se snížením aktivity při 24 hodinách. Antiadhezní aktivita moči lineárně stoupala se zvyšujícími se dávkami ekvivalentů PAC jak při 6 tak 24 hodinách. Je zajímavé, že 24 hodin po požití 36 mg ekvivalentů PAC se projevil reziduální antiadhezní účinek, který byl výraznější po 72 mg. Tento účinek byl evidentní u moči od všech dobrovolníků bez ohledu na zemi. Tyto výsledky poprvé upozornily na to, že pro dosažení bakteriálního antiadhezního účinku v moči je účinných 36 mg brusinkových ekvivalentů PAC denně, ale 72 mg může poskytnout nykthemerní ochranu. Data kinetiky signalizují, že aktivita je nejvyšší po 6 hodinách jak u 36 tak 72 mg, po 24 hodinách však výrazně klesá, což znamená, že může být přínosné požívat brusinky ve dvou oddělených dávkách po 36 mg ráno a večer. Při 72 mg PAC jsou 24 hodin po požití brusinek vždy přítomny různé účinné metabolity PAC (zejména různé anthokyaniny (27)). Pro zkorelování úrovně *ex vivo* antiadhezní aktivity s prevencí klinického UTI jsou nutné další studie na člověku.

Moč, odebraná ještě před studií od japonských dobrovolnic, vykazovala antiadhezní aktivitu. Tento jev může být dán produkcí endogenních inhibitorů adheze (jako je Tamm-Horsfallův glykoprotein), jež se u některých lidí vyskytuje. Je známo, že tyto inhibitory jsou přechodné a lze je ovlivnit řadou faktorů, jak v oblasti výživy (na základě rovnováhy soli a vody), tak životního prostředí. V multi-variantní analýze však byl AI v této populaci výrazně vyšší než u ostatních populací ( $p < 0,001$ ). Protože vliv dávkování a hodiny byl v této analýze potlačen, lze tento rozdíl vysvětlit účinkem rozdílné výživy mezi asijským a evropským stylem života.

PAC, obsažené v brusinkách, inhibují prvky adheze *E. coli*, především P-fimbrie (3,7). Adheze je prvním krokem bakteriální virulence, aby se zajistilo její přežití a zajištění replikace. Aby se demonstroval účinek PAC na virulenci bakterií, využili jsme *in vivo* model úhynu hlístic, validovaný různými výzkumnými týmy (12,25,26,28,29). Stanovili jsme, že snížená schopnost kmene *E. coli* zabít hlístice koreluje s požíváním tobolek s brusinkami. Baktérie, pěstované v moči jedinců, požívajících tobolek s brusinkami, nejsou schopny k hlísticím přilnout a tudíž vykazují nižší schopnost zabít hlístice navzdory přítomnosti a proliferaci kmene *E. coli* ve střevě *C. elegans*. *E. coli* byly ve střevě červa lokalizovány, nemohly však působit

virulentním účinkem, protože mohou vyvolat infekci jen se sníženou virulencí.

## Závěry

Podávání brusinkového prášku, standardizovaného na PAC, v dávkách obsahujících 72 mg PAC denně, může poskytnout nykthemerní ochranu proti bakteriální adhezi a virulenci v močovém ústrojí. Protože bakteriální adheze je prvním krokem při zahájení UTI, může požívání brusinek poskytnout další prostředek na pomoc při prevenci infekcí.

## Zkratky

AAA – antiadhezní aktivita; AI – index adheze; MRHA – manózo-resistentní he-maglutinace; PAC – proanthokyanidiny; UTI – infekce močového ústrojí

## Konkurenční zájmy

HB a TM se účastnili hodnocení, organizovaných společností Pharmatoka. ABH, CC, ABBP, LG, PT, AS a JPL prohlásili, že nemají žádné konkurenční zájmy. Pharmatoka nehrála při navrhování studie, sběru dat a analýze, rozhodnutí publikovat nebo přípravě rukopisu žádnou roli.

## Příspěvky autorů

ABH, JPL a AS studii naplánovali, zúčastnili se jejího návrhu a koordinace, provedli zkoušky a vypracovali pracovní verzi rukopisu. HB se podílel na návrhu a koordinaci studie, nabíral dobrovolnice a pomáhal při přípravě pracovní verze rukopisu. CC provedl statistickou analýzu a pomohl při vypracování pracovní verze rukopisu. ABBP provedla zkoušky, spojené s uroteliálními buňkami, a pomáhal s vypracováním pracovní verze rukopisu. LG, TM, PT nabírali dobrovolnice v příslušných zemích, sledovali studii a pomáhali vypracovat pracovní verzi rukopisu. Všichni autoři přečetli a schválili konečnou verzi rukopisu.

## Poděkování

Děkujeme společnosti Pharmatoka France za komerční kapsle (Urell®/Ellura™). INSERM Espri 26 je podporován Université de Montpellier 1, La Ville de Nîmes, Le CHU de Nîmes a La Région Languedoc Roussillon.

## Podrobnosti o autorech

<sup>1</sup> Marucci Center for Blueberry and Cranberry Research and Extension, Rutgers, The State University of New Jersey, Chatsworth, NJ, USA; <sup>2</sup> Service d'Urologie, Hôpital Foch, Suresnes, Francie; <sup>3</sup> Faculté de Médecine, Université de Genève, Ženeva, Švýcarsko; <sup>4</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Espri 26, Université Montpellier 1, Nîmes, Francie; <sup>5</sup> Fundació Puigvert, Barcelona, Španělsko; <sup>6</sup> Department of Urology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Kitakyushu, Japonsko; <sup>7</sup> Department of Urology, South-Pest Hospital, Budapešť, Maďarsko; <sup>8</sup> Laboratoire de Bactériologie, Virologie, Parasitologie, University Hospital Carémeau, Nîmes, Francie.

## Literatura

1. Jepson RG, Craig JC: **Cranberries for preventing urinary tract infections.** *Cochrane Database of Syst Rev* 2008, 1:CD001321.
2. Sobota AE: **Inhibition of bacterial adherence by cranberry juice: potential use for the treatment of urinary tract infections.** *J Urol* 1984, **131**:1013-1016.
3. Zafiri D, Ofek I, Adar R, Pocino M, Sharon N: **Inhibitory activity of cranberry juice on adherence of type I and type P fimbriated *Escherichia coli* to eucaryotic cells.** *Antimicrob Agents Chemother* 1989, **33**:92-98.
4. Ofek I, Goldhar J, Zafiri D, Lis H, Adar R, Sharon N: **Anti-*Escherichia coli* adhesin activity of cranberry and blueberry juices.** *N Engl J Med* 1991, **324**:1599.
5. Beachey EH: **Bacterial adherence: Adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surface.** *J Infect Dis* 1981, **143**:325-345.
6. Howell AB, Vorsa N, Der Marderosian A, Foo LY: **Inhibition of adherence of P-fimbriated *Escherichia coli* to uroepithelial-cell surfaces by proanthocyanidin extracts from cranberries.** *N Engl J Med* 1998, **339**:1085-1086.
7. Foo LY, Lu Y, Howell AB, Vorsa N: **A-type proanthocyanidin trimers from cranberry that inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriated *Escherichia coli*.** *J Nat Prod* 2000, **63**:1225-1228.

8. Liu Y, Black MA, Caron L, Camesano TA: **Role of cranberry juice on molecular-scale surface characteristics and adhesion behavior of *Escherichia coli***. *Biotechnol Bioeng* 2006, **93**:297-305.
9. Gupta K, Chou MY, Howell A, Wobbe C, Grady R, Stapelton AE: **Cranberry products inhibit adherence of uropathogenic *Escherichia coli* to primary cultured bladder and vaginal epithelial cells.** *J Urol* 2007, **177**:2357-2360.
10. Howell AB, Leahy MM, Kurowska E, Guthrie N: **In vivo evidence that cranberry proanthocyanidins inhibit adherence of P-fimbriated *E. coli* bacteria to uroepithelial cells.** *FASEB J* 2001, **15**:A284.
11. Howell AB, Reed JD, Krueger CG, Winterbottom R, Cunningham DG, Leahy M: **A-type cranberry proanthocyanidins and uropathogenic bacterial anti-adhesion activity.** *Phytochemistry* 2005, **66**:2281-2291.
12. Lavigne JP, Bourg G, Combescurie C, Botto H, Sotto A: **In-vitro and in-vivo evidence of dose-dependent decrease of uropathogenic *Escherichia coli* virulence after consumption of commercial *Vaccinium macrocarpon* (cranberry) capsules.** *Clin Microbiol Infect* 2008, **14**:350-355.
13. Di Martino P, Agniel R, David K, Templer C, Gaillard JL, Denys P, Botto H: **Reduction of *Escherichia coli* adherence to uroepithelial bladder cells after consumption of cranberry juice: a double-blind randomized placebo-controlled cross-over trial.** *World J Urol* 2006, **24**:21-27.
14. Turner A, Chen SN, Joike MK, Pendland SL, Pauli GF, Farnsworth NR: **Inhibition of uropathogenic *Escherichia coli* by cranberry juice: A new antiadherence assay.** *J Agric Food Chem* 2005, **53**:8940-8947.
15. Howell AB, Foxman B: **Cranberry juice and adhesion of antibiotic-resistant uropathogens.** *JAMA* 2002, **287**:3082-3083.
16. Greenberg JA, Newman SJ, Howell AB: **Consumption of sweetened dried cranberries versus unsweetened raisins for inhibition of uropathogenic *Escherichia coli* in human urine: A pilot study.** *J Altern Complement Med* 2005, **11**:875-878.
17. Valentova K, Stejskal D, Bednar P, Vostalova J, Cihalik C, Vecerova R, Koukalova D, Kolar M, Reichenbach R, Sknouril L, Ulrichova J, Simanek V: **Biosafety, antioxidant status, and metabolites in urine after consumption of dried cranberry juice in healthy women: A pilot double-blind placebo-controlled trial.** *J Agric Food Chem* 2007, **55**:3217-3224.
18. Avorn J, Monane M, Gurwitz JH, Glynn RJ, Choodnovskiy I, Lipsitz LA: **Reduction of bacteriuria and pyuria after ingestion of cranberry juice.** *JAMA* 1994, **271**:751-754.
19. Howell AB: **Cranberry capsule ingestion and bacterial anti-adhesion activity of urine.** *FASEB J* 2006, **20**:LB454.
20. Walker EB, Barney DP, Mickelsen JN, Walton RJ, Mickelsen RA Jr: **Cranberry concentrate: UTI prophylaxis.** *J Fam Practice* 1997, **45**:167-168.
21. Stothers L: **A randomized trial to evaluate effectiveness and cost effectiveness of naturopathic cranberry products as prophylaxis against urinary tract infection in women.** *Can J Urol* 2002, **9**:1558-1562.
22. Prior RL, Lazarus SA, Cao G, Muccitelli H, Hammerstone JF: **Identification of procyanidins and anthocyanins in blueberries and cranberries (*Vaccinium* spp.) using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry.** *J Agric Food Chem* 2001, **49**:1270-1276.
23. Howell AB: **Bioactive compounds in cranberries and their role in prevention of urinary tract infections.** *Mol Nutr Food Res* 2007, **51**:732-737.
24. Amalric J, Mutin PH, Guerrero G, Ponche A, Sotto A, Lavigne JP: **Phosphonate monolayers functionalized by silver thiolate species as antibacterial nanocoatings on titanium and stainless steel.** *J Mater Chem* 2009, **19**:141-149.
25. Lavigne JP, Blanc-Potard AB, Blossier G, Moreau J, Chanal C, Bouziges N, O'Callaghan D, Sotto A: **Virulence genotype and nematode killing properties of extraintestinal *Escherichia coli* producing CTX-M  $\beta$ -lactamases.** *Clin Microbiol Inf* 2006, **12**:1199-1206.
26. Garsin DA, Sifri CD, Mylonakis E, Qin X, Singh KV, Murray BE, Calderwood SB, Ausubel FM: **A simple model host for identifying Gram-positive virulence factors.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, **98**:10892-10897.
27. Ohnishi R, Ito H, Kasajima N, Kaneda M, Kariyama R, Kumon H, hatano T, Yoshida T: **Urinary excretion of anthocyanins in humans after cranberry juice ingestion.** *Biosci Biotechnol Biochem* 2006, **70**:1681-1687.
28. Sifri CD, Begun J, Ausubel FM: **The worm has turned--microbial virulence modeled in *Caenorhabditis elegans*.** *Trends Microbiol* 2005, **13**:119-127.
29. Diard M, Baeriswyl S, Clermont O, Gouriou S, Picard B, Taddei F, Denamur E, Matic I: ***Caenorhabditis elegans* as a simple model to study phenotypic and genetic virulence determinants of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*.** *Microbes Infect* 2007, **9**:214-223.