



Myndigheten för
samhällsskydd
och beredskap

Intracelullär tillväxt och överlevnad av *Vibrio cholerae* inuti humana och vattenburna makrofager

Slutrapport

September 2010



FORSKNING

Hadi Abd

Smittskyddsinstitutet

Kunskapscentrum för Mikrobiologisk Beredskap

MSB:s kontaktpersoner:
Ebba Hallsenius, 010-240 42 33

Förord

Detta är redovisning av postdoktoralt projekt nr 800/2008 med titeln "Intracelluläritet av *Vibrio cholerae*". Projektet har bedrivits från 1 september, 2008 till 31 augusti, 2010. Mikrobiolog, medicine doktor, Hadi Abd, Smittskyddsinstitutet, Kunskapscentrum för Mikrobiologisk Beredskap, var projektledare och Ebba Hallsenius, Myndigheten för samhällsskydd och beredskap, Enheten för inriktning av forskning var forskningssamordnare.

Projektet har resulterat i 4 publicerade artiklar, 2 skickade till publicering och 3 manus. Sju abstrakt (sammanfattningar) har accepterats och presenterats som poster vid nationella samt internationella vetenskapliga möten liksom Sida konferens 2008 Stockholm, Svenska läkarstämman 2008 och 2009 i Göteborg och Stockholm, European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) 2009 och 2010 och Louis Pasteur Konferenser 2008 och 2009.

Denna vetenskapliga rapport sammanfattar bakgrunden till projektet som försöker beskriva begreppet extracellulära och intracellulära bakterier och hur det humana försvarssystemet reagerar mot dessa bakterier. *Vibrio cholerae* anses vara en extracellulär bakterie som finns i vatten och infekterar endast människor där den orsakar en livsfarlig sjukdom kallad kolera.

Kolerainfektioner har ökat globalt på grund av naturliga katastrofer så som översvämningar, kombination av ökad vattentemperatur och salthalt som leder till ökad närvaro av bakterier med vattenlevande djur och protozoer. Därför är det oerhört viktigt att studera hur *V. cholerae* interagerar med humana makrofager och vattenburna makrofager. Därefter beskriver rapporten metoddesign och redovisar viktiga resultat som kommer att ändra synen på *V. cholerae*.

Innehållsförteckning

1. Bakgrund	6
2. Metod och material	8
2.1. Metod design.....	8
2.2. Mikroorganismer.....	8
3. Resultat	9
3.1. Intracellulär tillväxt och överlevnad av <i>V. cholerae</i>	9
3.2. Tillväxt och överlevnad av makrofager samodlat med <i>V. cholerae</i>	10
3.3. Intracellulär lokalisering av <i>V. cholerae</i> inuti makrofager.....	11
3.4. Viabilitet av intracellulära <i>V. cholerae</i>	12
3.5. Påverkan av antibiotika på extra- och intracellulära bakterier..	13
2. Slutsatser	14
3. Referenser	15

Sammanfattning

Vibrio cholerae anses vara en extracellulär bakterie som finns i vatten och infekterar endast människor där den orsakar en livsfarlig sjukdom kallad kolera. Trots att sjukdomen utgör ett globalt hälsoproblem, finns det ingen information om hur denna bakterie lever i människor, men det finns lite information om bakteriens ekologi liksom fästande till alger och djur i vattnet.

Syftet med detta projekt är att studera förmågan hos kliniska isolat av *V. cholerae* att föröka sig inuti humana makrofager och vattenburna makrofager och att studera roller av bakteriens kapsyl, lipopolysaccharid O-sidokedja och yttre membranprotein A för tillväxt och överlevnad. Undersökningsmetoder visade att *V. cholerae* vild, kapsel mutant och kapsel/LPS O-sidokedje dubbel mutant växte intracellulärt inuti humana makrofager TPH-1, U937 och inuti vattenburna makrofager *A. castellanii*. Bakterierna överlevde > 24 timmar inuti humana makrofager och > 24 timmar inuti de vattenburna makrofager. Den intracellulära överlevnaden har skyddat bakterierna från antibiotika och visat att *V. cholerae* inte är en extracellulär bakterie, vilket har beskrivits tidigare, utan en fakultativt intracellulär bakterie. Det intracellulära beteendet ger mer kunskap om bakteriens infektion och ekologiska förlopp och om hur kolera kan behandlas.

1. Bakgrund

Patogena bakterier delas in i extracellulära och intracellulära efter deras förmåga att föröka sig utanför eller inuti värdceller (Fig. 1). Extracellulära bakterier inkluderar ett stort antal bakterier, som *Bacillus* och *Pseudomonas* arter, och förökar sig utanför värdceller. Obligat intracellulära bakterier som *Chlamydia* arter förökar sig enbart inuti värdceller, medan fakultativt intracellulära bakterier som *Shigella* arter förökar sig både extracellulärt och intracellulärt (Ismail 2002).

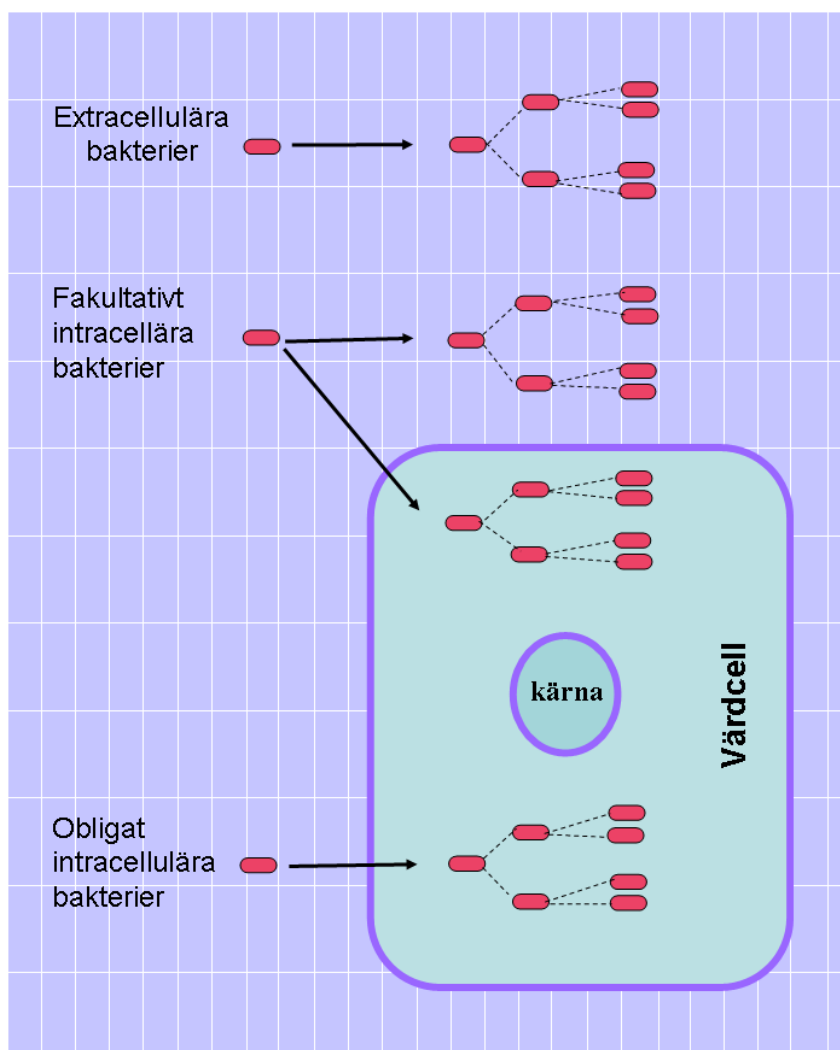


Fig. 1: Lokalisering och tillväxt av extracellulära och intracellulära bakterier i deras värd.

Det humana försvarssystemet eliminerar de extracellulära bakterierna med medfödd och humoral immunitet medan intracellulära bakterierna bara elimineras av cellmedierad immunitet.

Värdcellerna, liksom humana fagocyter och makrofager samt vattenburna makrofager i naturen (amöbor), tar upp bakterierna genom fagocytos.

Fagocytosen används som försvarsmekanism av humana celler för att avdöda patogener och som näringsmekanism av frilevande amöbor (FLA).

Acanthamoeba castellanii är en art av FLA som kan finnas i naturliga vattensystem. FLA livscykel består av en aktiv trofozoit som återgår till en vilande cysta vid ogynnsamma förhållanden. Trofozoiten förflyttar sig och fagocyterar födan som kan bestå av alger, svampar och bakterier. Studier har visat att FLA fungerar som värdceller till en lång rad av mikroorganismer (refererat i Abd et al 2007).

Vibrio cholerae anses vara en extracellulär bakterie (Greub 2004) som finns i vatten och infekterar endast människor (Faruque et al., 2005) där den orsakar en livsfarlig sjukdom kallad kolera (Reidl 2002).

Det har observerats att kolera och andra infektioner orsakade av *V. cholerae* och andra *Vibrio* arter liksom *V. mimicus* har ökat globalt på grund av naturliga katastrofer, kombination av ökad vattentemperatur och salthalt som leder till ökad närvaro av bakterier med vattenlevande djur och protozoer (amöbor). (<http://www.emedicine.com/med/TOPICT2375.HTM>).

Trots att kolera drabbar miljoner och dödar flera tusentals människor under pandemier och utgör ett globalt hälsoproblem i många länder (Sack 2004), finns det ingen information om hur denna bakterie lever i människor. I detta sammanhang finns det lite information om bakteriens ekologi liksom fästande till alger och djur i vattnet (Cottingham et al., 2003).

Nyligen visade en svensk doktorandavhandling att *V. cholerae* växer och lever inuti ett encelligt djur (*A. castellanii*) som finns fritt i vattenmiljöer (Abd 2006). Avhandlingen beskrev också en molekylär detektionsmetod för både *V. cholerae* och *Acanthamoeba* arter från olika provmaterial (Abd 2006). Denna metod diagnostiserade för första gången *A. castellanii* som orsak till ett fall av hjärninfektion i Sverige (Abd et al 2009), och för första gången detekterade metoden närvaro av *V. cholerae* tillsammans med *Acanthamoeba* species i samma vatten prover från epidemiområde i Sudan (ej publicerat data).

Syftet med detta projekt är att studera förmågan hos kliniska isolat av *V. cholerae* att föröka sig inuti humana makrofager och vattenburna makrofager och att studera roller av bakteriens kapsyl, lipopolysaccharid O-sidokedja och yttre membranprotein A för tillväxt och överlevnad.

2. Metod och material

2. 1. Metod design

Olika *Vibrio* arter har odlats med humana och vattenburna makrofager. Gentamicin antibiotikum används för avdöda extracellulära bakterier. Varje bakteriearts förmåga att föröka sig inuti makrofagerna har undersökts genom räkning av levande bakterier, fluorescensmikroskopi och RNA extraktion. Lokalisering av bakterier inuti makrofagerna har visualiserats med konfokalmikroskopi och elektronmikroskopi. Roll av kapsel, lipopolysaccharider och yttre membranprotein A för intracellulär tillväxt of *V. cholerae* undersökts genom statistiskt verifierad jämförelse mellan tillväxt av vild bakterie och bakterie vars respektive kapsel-, LPS- och protein A uttryck har muterat.

2. 2. Mikroorganismer

Bakterier som används i detta projekt inkluderar *V. cholerae* O1 klassisk, *V. cholerae* O1 El Tor vild, *V. cholerae* O1 El Tor yttre membran A mutant, *V. cholerae* O139 vild, *V. cholerae* O139 kapsel mutant och *V. cholerae* O139 kapsel/LPS O-sidokedje dobbel mutant. Humana makrofager TPH-1, U937 samt *Acanthamoeba castellanii*.

3. Resultat

3. 1. Intracellulär tillväxt och överlevnad av *V. cholerae*

Vibrio arter har odlats med humana och vattenburna makrofager. Intracellulär tillväxt av varje bakterieart har undersökts med räkning av levande bakterier. Erhållna resultat visade att *V. cholerae* vild, kapsel mutant och kapsel/LPS O-sidokedje dobbel mutant växte intracellulärt inuti humana makrofager TPH-1, U937. Bakterierna överlevde mer än 24 timmar inuti makrofagera (Fig. 2A). Resultatet visade också att *V. cholerae* O1 El Tor vild och dess yttre membran A mutant växte inuti makrofag TPH-1. *V. cholerae* och dess mutant växte inuti vattenburna makrofager *A. castellanii* och överlevde >48 timmar (Fig. 2B).

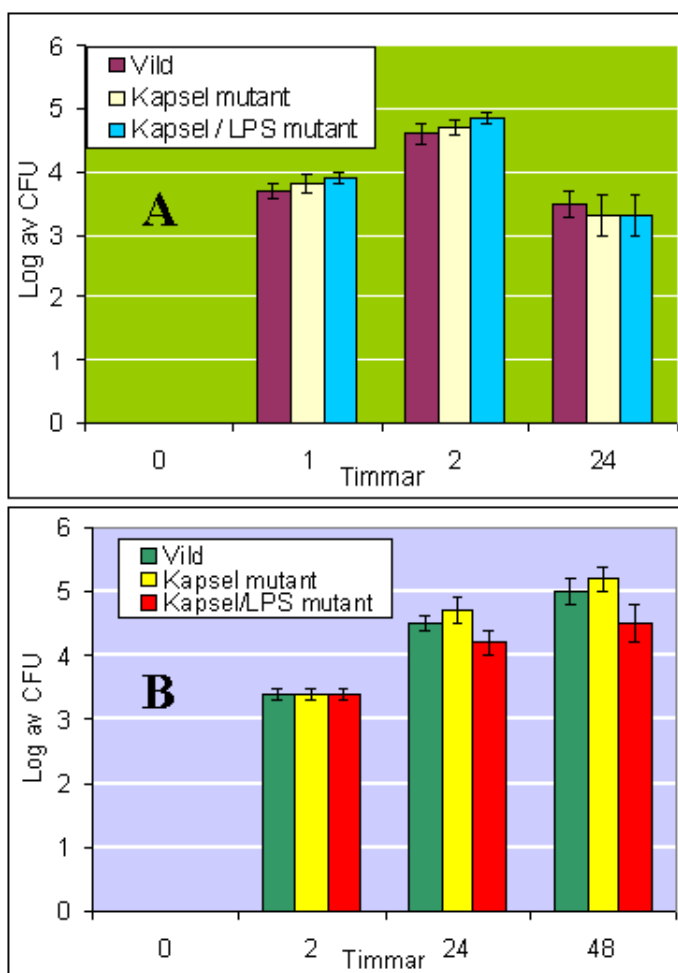


Fig. 2. Intracellulär tillväxt och överlevnad av *V. cholerae* O139 vildtyp, kapsel mutant och kapsel/LPS dobbel mutant inuti makrofager U 937 (A) och inuti vattenburna makrofager *A. castellanii* (B). Data är medel \pm SD från tre oberoende experiment.

3. 2. Tillväxt och överlevnad av makrofager samodlat med *V. cholerae*

Tillväxt och överlevnad av både humana makrofager och vattenburna makrofager samodlade med *V. cholerae* har studerats genom räkning av levande celler.

Resultat visade att humana makrofager U 937 levde 48 timmar (Fig. 3) medan vattenburna makrofager *A. castellanii* tillväxte och levde mer än 48 timmar (Fig. 4).

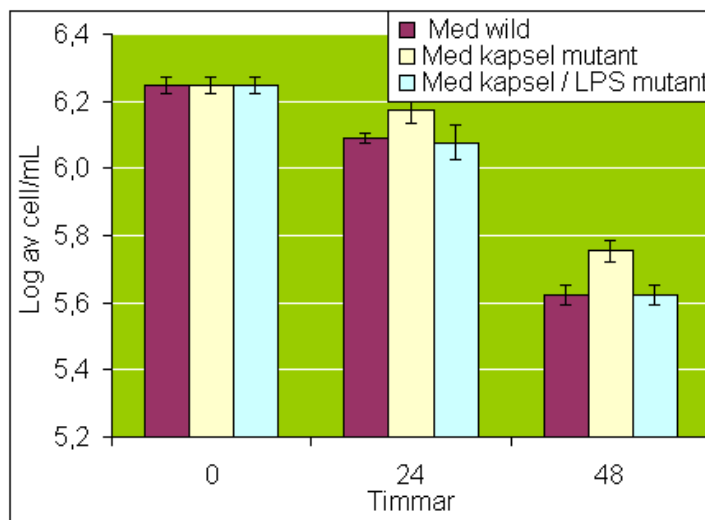


Fig. 3. Överlevnad av humana makrofager U 937 samodlat med *V. cholerae* O139 arter. Data är medel \pm SD från tre oberoende experiment.

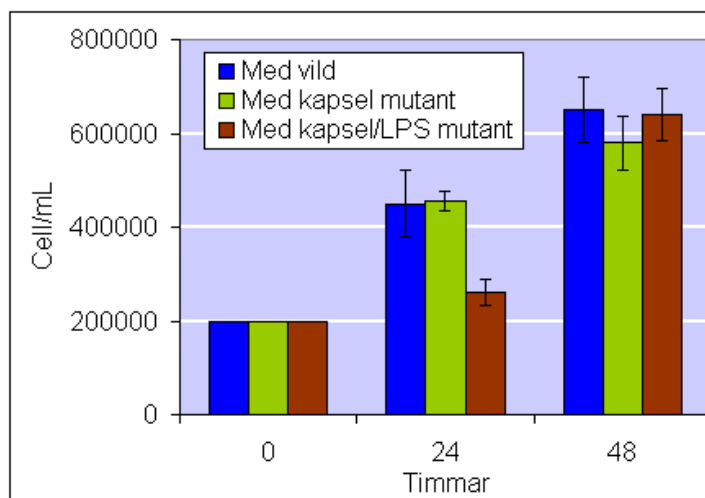


Fig. 4. Tillväxt av vattenburna makrofager *A. castellanii* samodlat med *V. cholerae* O139 arter. Data är medel \pm SD från tre oberoende experiment.

3. 3. Intracellulär lokalisering av *V. cholerae* inuti makrofager

Samspel mellan bakterier samodlade med makrofager började när bakterier vidhäftade sig till makrofager. Vidhäftningen visualiserades med hjälp av fluorescensmikroskopi som detekterade *V. cholerae* producerande rött fluorescerande proteiner (RFP) (Fig. 5).

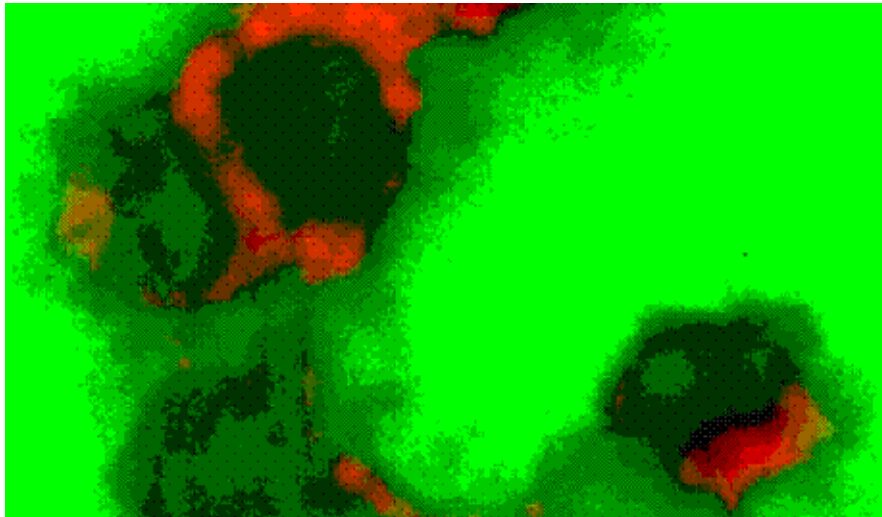


Fig. 5. Vidhäfte av *V. cholerae* O1 El Tor RFP till human makrofag TPH-1

Makarofagerna tar upp bakterierna med hjälp av pseudopodier (skena fötter) (Fig. 6) som bildar membranbunden vakuol innehållande bakterier (Fig. 7). Bakterierna förökar sig i makrofag cellers cytoplasma (Fig.10).

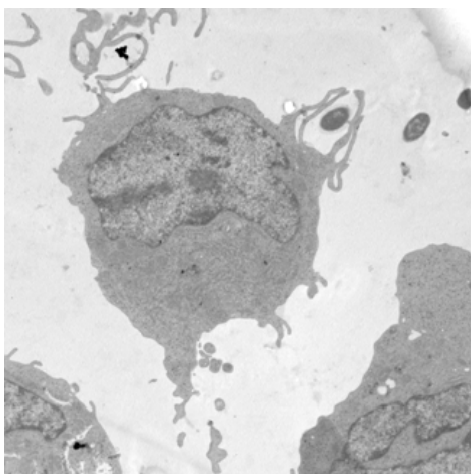


Fig. 6. Makrofag TPH-1 tar upp *V. cholerae* med pseudopodier

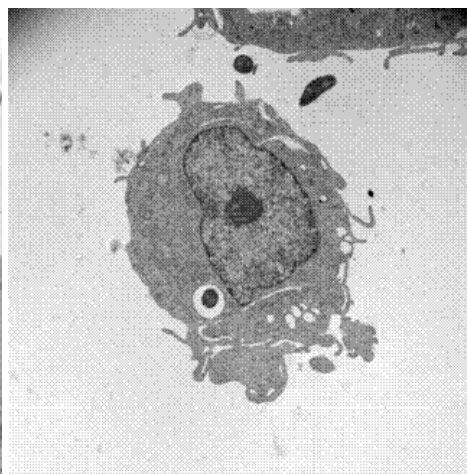


Fig. 7. *V. cholerae* O139 in vakuol

Den vattenburna makrofagen *A. castellanii* tar upp bakterier som förökar sig i cytoplasma av *A. castellanii* trofozoit som kan återgå till cysta. *V. mimicus* har förökat sig *A. castellanii* trofozoit, Abd et al., 2010 (Fig. 8). *V. cholerae* har förökat sig i cytoplasma av trofoziten som har återgått till cysta innehållande bakterierna (Fig.9).

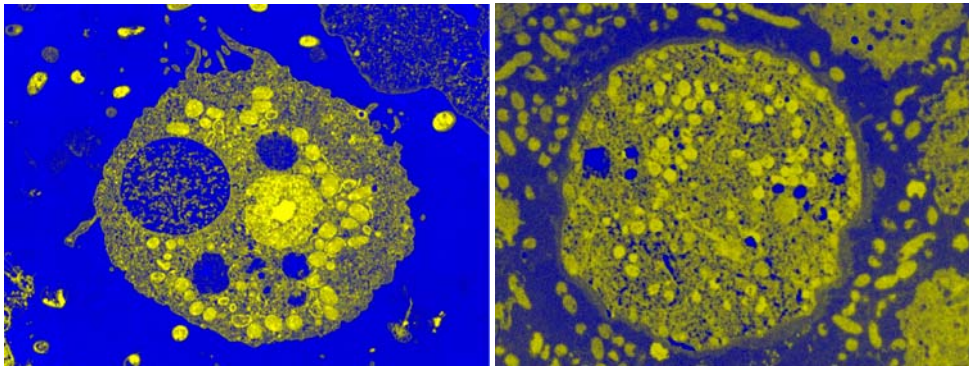


Fig. 8. *V. mimicus* tillväxer i cytoplasma av *A. castellanii* trofozoit, 3600x. Fig. 9. *V. cholerae* O139 överlever inuti *A. castellanii* cysta, 1650x.

3. 4. Viabilitet av intracellulära *V. cholerae*

Levande bakterier inuti värdceller producerar RNA, proteiner och delar sig. För att undersöka viabilitet av *V. cholerae* inuti makrofager har en gen klonats i *V. cholerae* för att producera grönt fluorescerande protein som kan spåras med fluorescensmikroskopi. Antalet levande bakterier inuti makrofager bestäms med räkning av växande bakterier på odlingsplatta. RNA extraheras och detekteras med gelelektrofores.

Fluorescensmikroskopi visade att *V. cholerae* O1 inuti humana makrofager producerar grönt fluorescerande protein (Fig. 10 A). Räkning av levande intracellulära bakterier visade att *V. cholerae* O1 (Fig. 11 B) och *V. cholerae* O139 (Fig. 2) växer inuti makrofager till 10^4 CFU/mL. Både makrofager och intracellulära *V. cholerae* har producerat RNA (Fig. 10 C).

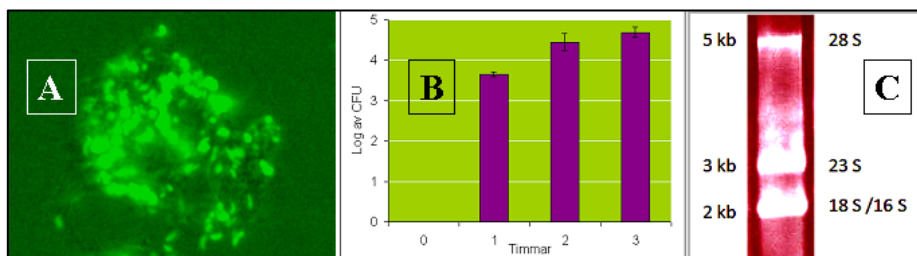


Fig. 10. Viabilitet av intracellulära *V. cholerae*. *V. cholerae* O1 gfp fluorescerar grönt efter 2 timmars överlevnad inuti en human makrofag (A). Antalet av levande *V. cholerae* O1 (B). Gel elektrofores för RNA av TPH-1 humana makrofagers subenhet 28S och 18S samt *V. cholerae* subenhet 23S och 16S.

3. 5. Påverkan av antibiotika på extra- och intracellulära bakterier

40 mL av odlingsmedium innehåller 10^6 /mL makrofager och 10^7 /mL *V. cholerae* O1 El Tor under 1 timme och tvättas 2 gånger genom centrifugering. Supernatant från andra gången odlades för att bestämma antalet av extracellulära bakterier som var 5×10^7 CFU/mL.

Pellet resuspenderas till 40 ml och delat i 2 cellodlingsplattor. Till ena tillsätts 100 µg/mL gentamicin och till andra 20 µg/mL ciproflouxacin. Plattorna inkuberas i 2 timmar. Antalet extracellulära respektive intracellulära bakterier har bestämts. Resultat har presenterats i figur 13.

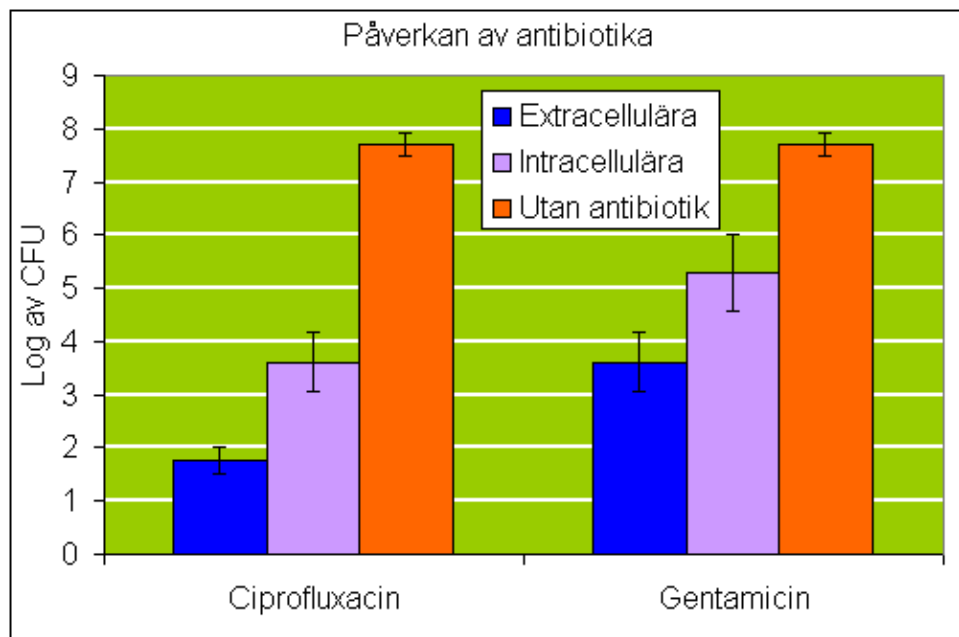


Fig. 13. Påverkan av antibiotika. Ciproflouxacin avdödat 10^5 extracellulära bakterier/mL och 10^2 intracellulära bakterier/mL. Gentamicin avdödat 10^4 extracellulära bakterier/mL och har inte kunnat påverka antalet intracellulära bakterier som varit 10^5 bakterier/mL.

4. Slutsatser

V. cholerae O1 och O139 överlevde fagocytos och växte inuti såväl humana fagocyter som vattenburna makrofager. Intracellulär tillväxt och överlevnad skyddade bakterierna från antibiotisk påverkan.

In vitro metod för att undersöka påverkan av antibiotika på intracellulära bakterier har utvecklats. Metoden använder makrofager för att bestämma vilka antibiotika som avdödar bara extracellulära bakterier eller antibiotika som avdödar både extracellulära och intracellulära bakterier.

Denna metod kommer att identifiera effektiv behandling för obligat intracellulära och fakultativt intracellulära bakterier eftersom det har visat tidigare att aminoglykosider inte kunde behandla infektioner orsakade av obligat intracellulära och fakultativt intracellulära bakterier (Maurin 2001).

V. cholerae är inte enbart en extracellulär bakterie, vilket har beskrivits tidigare, utan även en intracellulär bakterie (fakultativt intracellulär bakterie). Det intracellulära beteendet av *V. cholerae* ger mer kunskap om bakteriens infektion, ekologiska förlopp och om hur kolera kan behandlas.

Vid behandling av kolerapatienter har man sett att kinoloner gett en bra effekt, men har inte vetat varför. Nu kan resultat av detta projekt förklara varför kinolonerna ger en bra behandling mot kolera eftersom både *V. cholerae* och ciproflouxacin (ett kinolonpreparat) går inuti värdceller och avdödar de intracellulära bakterierna.

Det humana försvarssystemet eliminerar de extracellulära bakterierna med medfött och humoral immunitet medan intracellulära bakterierna bara elimineras av cellmedierad immunitet. Därför behövs ett förbättrat framtida vaccin för att kunna stimulera det cellulära immunförsvaret.

5. Referenser

- Abd H, Valeru S P, Sami S M, Saeed A, Raychaudhuri S & Sandström G.** 2010. Interaction between *Vibrio mimicus* and *Acanthamoeba castellanii*. *Environmental Microbiology Reports* **2**: 166–171
- Abd H., Saeed A., Weintraub A. Nair, G. B. & Sandström G.** 2007. *Vibrio cholerae* O1 strains are facultative intracellular bacteria, able to survive and multiply symbiotically inside the aquatic free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *FEMS Microbiol Ecol* **60**: 33–39.
- Abd H.** 2006. Interaction between waterborne pathogenic bacteria and *Acanthamoeba castellanii*. Doctoral thesis. ISSN/ISBN, 91-7140 - 569 - 0. Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden. www.diss.kib.ki.se.
- Cottingham KL, Chiavelli DA & Taylor RK.** 2003. Environmental microbe and human pathogen: the ecology and microbiology of *Vibrio cholerae*. *Front Ecol Environ* **1**: 80–86.
- Faruque SM, Naser IB, Islam MJ, Faruque AS, Ghosh AN, Nair GB, Sack DA & Mekalanos JJ.** 2005. Seasonal epidemics of cholera inversely correlate with the prevalence of environmental cholera phages. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**:1702–1717.
- Greub G & Raoult D.** 2004. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev* **17**:413-433.
- Ismail N, Olano J P, Feng H M & Walker D H.** 2002. Current status of immune mechanisms of killing of intracellular microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* **207**:111-120.
- Maurin M & Raoult D** 2001. Use of aminoglycosides in treatment of infections due to intracellular bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:2977-2986.
- Reidl J & Klose K E** 2002. *Vibrio cholerae* and cholera: out of the water and into the host. *FEMS Microbiol Rev* **26**:125-139.
- Sack D A, Sack R B, Nair G B, & Siddique A K.** 2004. Cholera. *Lancet* **363**:223-233.
www.emedicine.com/med/TOPIC2375.