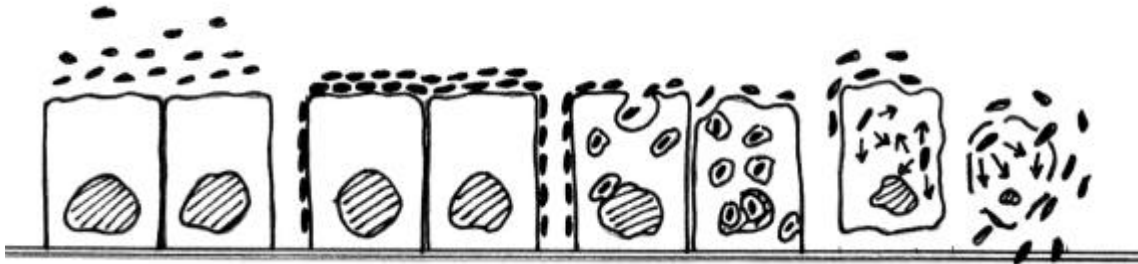


# Bakteriella virulensfaktorer – studie kring adhesiva egenskaper hos *Plesiomonas shigelloides*

Helena Ekman



Handledare Karel Krovacek, PhD  
Institutionen för Veterinärmedicinsk Mikrobiologi, avdelningen för Bakteriologi

Examensarbete 2003:9  
Veterinärprogrammet  
Veterinärmedicinska fakulteten  
SLU  
ISSN 1650-7045  
Uppsala 2003

# Tack

Stort tack riktas till min handledare Karel Krovacek för all hjälp, inspiration och stort engagemang.

Varmt tack även till Professor Stefano Dumontet, Raffaele Boni, Carmine Danza och Carmine Lomagistro som gjorde min vistelse i Potenza både spännande och mycket lärorik.

## Inledning

Kunskap om värd-parasit relationer är en viktig del i kartläggningen av alla sorters mikroorganismer. Relationen påverkas av såväl värd som mikroorganism och kunskap kring dess interaktioner ligger ofta till grund för bland annat bekämpningen av mikroorganismen. En viktig del av interaktionen är mikroorganismens virulens, d v s dess grad av förmåga att framkalla sjukdom hos dess värd. Hos bakterier anses adhesionsförmåga många gånger vara en avgörande virulensfaktor för dess möjlighet att etablera sig hos en värd.

*Plesiomonas shigelloides* är en gramnegativ, oxidaspositiv stav, som tillhör familjen Enterobacteriaceae. Dess habitat utgörs framförallt av sötvatten och sediment, men den förekommer även som harmlös kommensal hos fiskar och vissa andra vattenlevande djur. *P. shigelloides* har förmågan att framkalla sjukdom hos både människor och djur och anses vara en allt vanligare orsak till bland annat sk turistdiarréer. Bakgrunden till denna bakteries förmåga att framkalla sjukdom är ännu inte klarlagd. Man har länge antagit att adhesion och även invasion av humana- och animala tarmepitelceller är några av dess virulensfaktorer, men hittills är allt för få studier gjorda för att detta säkert ska kunna fastställas.

Detta arbete syftar till att förutom presentera *P. shigelloides*, även belysa olika former av virulens-faktorer hos bakterier och konsekvenserna av dessa i en värd-parasit relation. Avslutningsvis presenteras en studie kring adhesionsförmågan hos *P. shigelloides* och eventuell koppling mellan denna och bakteriens virulens.

# Bakteriella virulensfaktorer

## Värd-parasit relationer

### Terminologi

Förhållandet mellan en mikroorganism och dess omgivning definieras beroende av interaktionerna dem emellan och resultatet av denna interaktion (4,5). Exempelvis finns värd-parasit förhållanden där båda parter drar nytta av varandra, men vanligare är att mikroorganismer lever av och på en värd på bekostnad av denna. Terminologin kring mikroorganismer och deras värd-parasit förhållanden presenteras nedan.

**Patogener:** mikroorganismer som kan framkalla sjukdom hos djur, människor eller växter.

**Patogenicitet:** förmågan hos en mikroorganism att kunna framkalla sjukdom.

**Virulens:** ett mått på graden av patogenicitet. Specifika egenskaper hos mikroorganismen, sk virulensfaktorer, gör att den kan orsaka skada hos en värd.

**Saprophyter:** mikroorganismer som lever på döda organismer. Orsakar i regel ej sjukdom.

**Kommensaler:** mikroorganismer som lever av eller på en värd utan att orsaka den skada. Normalflora, t ex i gastrointestinalkanal och på hud, ingår i denna grupp. Många av kommensalerna är potentiella patogener, d v s de kan orsaka sjukdom under vissa förhållanden. Detta kan vara vid fall av kraftig överväxt av en normalt harmlös kommensal eller vid nedsatt motståndskraft hos värden.

**Symbionter:** mikroorganismer som lever i samexistens med sin värd och där båda parter drar nytta av varandra. I denna grupp bland annat våmmikroberna hos idisslare.

**Parasiter:** mikroorganismer som drar nytta av en värd och samtidigt orsakar den skada.

**Opportunistiska patogener:** mikroorganismer som i sin normala omgivning fungerar som kommensaler men som kan orsaka sjukdom om de får tillträde till annan miljö eller vävnad. Till exempel kan harmlösa stammar av *E-coli* från gastrointestinalkanalen orsaka urinvägsinfektion.

**Obligata patogener:** orsakar alltid sjukdom.

### Värd-parasit interaktioner

Förhållandet mellan en mikroorganism och dess värd är dynamiskt och kan hela tiden kan förändras. Resultatet eller utgången av interaktionen dem emellan påverkas av faktorer hos såväl mikroorganism som värd, men även av omgivningen (bild 1). Enbart virulensen hos en bakterie är inte avgörande för om en infektion etableras utan samspelet mellan värd, parasit och omgivning måste beaktas (4,5).

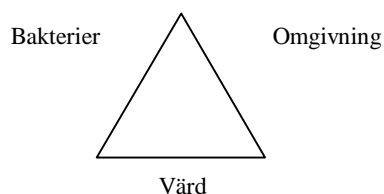


Bild 1. Interaktion mellan en värd och en parasit påverkas alltid av faktorer hos såväl värd, som parasit och omgivning.

Hos bakterien är det framför allt graden av förmåga att framkalla sjukdom, virulensen, som är avgörande för att upprätta en infektion. Virulensen hos en bakterie utgörs av virulensfaktorer, d v s specifika egenskaper hos mikroorganismen som möjliggör etablering i eller på en värd.

För värden är resistensen mot mikroorganismen viktig. Vårdens motstånd utgörs av såväl rent fysiska barriärer (hud, slemhinnor) som inflammationsreaktioner och specifik antikroppsmedierad resistens.

Omgivningen utgör många gånger en reservoar för bakterien och är avgörande för bakteriens möjlighet till överlevnad och tillväxt. En för bakterien ogynnsam miljö gynnar istället värden.

## Mekanismer för etablering av sjukdom - Patogenicitet

Bakterier kan orsaka sjukdom genom olika strategier, som t ex invasion av vävnad och/eller toxinproduktion (4,5). De grundläggande förutsättningarna för etablering av en bakteriell infektion är att bakterien har förmåga att lämna sin reservoar och spridas till lämplig värd. Denna spridning eller transmission kan ske bland annat via direktkontakt mellan individer eller indirekt via vatten, luft, mjölk eller andra typer av vektorer (4). För att sjukdom sedan ska etableras hos individen bör följande parametrar beaktas:

- bakteriens lokalisering i kroppen
- bakteriens virulens
- minsta infektionsdos
- förekomst eller grad av vävnadsskada
- värdjurets resistens

## Adhesion och kolonisation

Den inledande fasen för upprättande av infektion hos en värd innebär kolonisation av lämplig ingångsport. I de allra flesta fall utgörs ingångsporten av slemhinna, t ex konjunktiva, luftvägar, gastrointestinalkanal eller urogenitalkanal, men penetration kan även ske genom intakt eller skadad hud. Skadad slemhinna eller hud medför ofta ett nedsatt försvar hos värden samtidigt som det underlättar adhesion och penetration för bakterien (2,4,5).

En bakteries virulens avgörs delvis av förmågan att kolonisera och invadera vävnad (bild 2). Kolonisation sker genom adhesion till specifik vävnad följt av bakterietillväxt. Adhesion sker oftast genom en sk receptor-ligand interaktion mellan bakterie och värdcell (1,2,5). Ligander utgörs ofta av ytstrukturer såsom fimbrier, flageller, kapsel eller delar av cellväggen och kallas hos bakterier för adhesiner. Receptorer hos värdcellen utgörs i de flesta fall av kolhydrat- eller peptidrester på cellytan. Adhesin-receptor interaktionen är specifik och är en förklaring till varför vissa bakterier bara kan adherera till vissa typer av celler eller vävnader, sk vävnadstropism (2,5). Efter adhesion till en vävnad kan bakterien, om förhållandena är gynnsamma och värdens försvar kan undvikas, börja föröka sig och på så sätt kolonisera vävnaden i fråga. Vidare mekanismer för adhesion diskuteras i kapitel 2 ”Bakteriell adhesion och invasion av värdceller”.

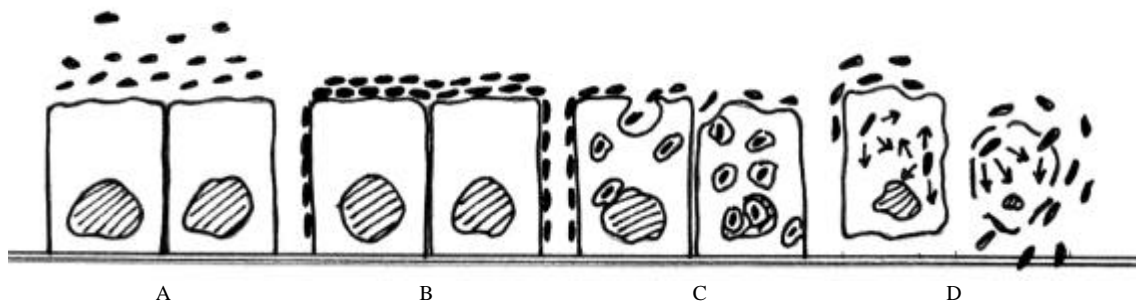


Bild 2. Olika typer av interaktioner mellan bakterier och värdcell; association (A), adhesion (B), invasion (C) och toxinproduktion (D).

## Invasion

Många bakterier har förmåga att producera extracellulära enzymer och enzymliknande ämnen som genom att skada omgivande vävnad och bryta ned värdens försvar kan underlätta invasion (5). Dessa ämnen kallas invasiner, eller ”spreading factors” och är bidragande till bakteriens virulens. Till skillnad från exotoxiner, se nedan, är invasinerna mer ospecifika, inte lika potenta och verkar enbart lokalt (4,5). Invasiner verkar främst för att underlätta spridning av bakterien i vävnader genom att angripa strukturella element eller framkalla lysis av celler. Invasiner utgörs bland annat av:

- hyaluronidas – bryter ned hyaluronsyra, som utgör den grundläggande strukturen i bindväv, och underlättar på så sätt spridning
- kollagenas – bryter ned kollagen i muskelvävnad och underlättar spridning
- fosfolipas – hydrolyserar fosfolipider i cellmembran vilket leder till celledöd
- hemolysin – bildar porer genom cellmembran i röda blodkroppar, vilket leder till lysis
- koagulas – omvandlar fibrinogen till fibrin som täcker bakterien och döljer denna för värdens immunförsvar

Förutom invasiner har många bakterier förmågan att påverka och manipulera en värdcell till att själv underlätta

för invasion. Genom mekanismer som påverkar värdcellens cytoskelett kan bakterien inducera ett upptag intracellulärt (1,2). Mer om dess mekanismer behandlas i kapitel 2 ”Bakteriell adhesion och invasion av värdceller”.

## Produktion av toxiner

Toxinproduktion förekommer hos såväl gramnegativa som grampositiva bakterier och utgör ännu en virulensfaktor. Man skiljer mellan två typer av toxiner; exotoxiner, som är proteiner, och endotoxiner, som är en del av de gramnegativa bakteriernas cellvägg (4,5).

Exotoxiner utgörs av proteiner och påminner i sin verkningsmekanism mycket om enzymer. De förekommer hos såväl gramnegativa- som grampositiva bakterier och frisätts, med vissa undantag, under bakteriens tillväxtfas. Exotoxiner är ofta mycket potenta och verkar specifikt på vissa celler eller vävnader hos värden. Ett exotoxin är specifikt för sin bakterieart och namnges ofta efter på vilken vävnad det verkar som t ex neurotoxin, som verkar på nervvävnad, eller enterotoxin, som verkar i tarmen (5).

Vissa exotoxiner är uppbyggda av två subenheter (bild 3). Subenhet A utgör toxinets enzymatiska förmåga, medan subenhet B utgör ligand för en receptor hos målcellen (1,5). Båda enheterna krävs för att toxinet ska kunna utöva effekt på målcellen. Målcellen angrips antingen genom att subenhet B binder till cellen och bildar en por genom cellmembranet genom vilken subenhet A kan nå cytoplasman alternativt att båda subenheterna når cytoplasman genom receptormedierad endocytos. Andra exotoxiner, sk cytotoxiner, attackerar olika specifika celler, t ex leukotoxin, cardiotoxin och hepatotoxin.



Bild 3. Exotoxiner består av två subenheter, där subenhet A utgör toxinets enzymatiska förmåga och subenhet B utgör en ligand för en receptor hos målcellen.

Exotoxiner är kraftigt antigena och stimulerar till antikropsproduktion. Ett toxin som förlorat sin toxicitet kallas toxoid och kan bland annat framställas genom behandling av toxinet med formalin eller jod (1,4,5). Toxoider kan sedan användas för immunisering av djur och människor, vilket sker bland annat vid tetanusvaccinering.

Endotoxiner finns enbart hos gramnegativa bakterier då detta toxin ingår som en del av deras cellvägg. Små mängder endotoxin kan frisättas under bakteriernas tillväxtfas, men den största frisättningen sker då bakterierna dör och cellväggen bryts sönder. Till skillnad från exotoxinerna är endotoxinerna inte lika potenta och de verkar ej heller lika specifikt. Endotoxiner är svagt antigena och kan inte omvandlas till toxoider (4,5).

Endotoxiner är uppbyggda av lipopolysaccharider, LPS. Molekylen delas in i tre delar (bild 4) med en lipiddel, ett kolhydratskelett och en ände med repeterande sockerarter. Lipiddelen utgör den toxiska delen av LPS-molekylen och kallas lipid A. De repeterande sockerarterna bygger upp vad som brukar kallas gramnegativa bakteriers O-antigen (1,4,5). O-antigenet skyddar bakterien mot fagocytos och utgör därför tillsammans med lipid A några av bakteriens virulensfaktorer.

Effekterna av ett endotoxin är desamma hos alla djurslag oavsett vilken bakterie det kommer ifrån. Vanliga effekter är feber, förändringar av den vita cellbildningen och hypotension. Man ser även produktion av tumörnekrotisk faktor (TNF-?) från makrofager, vilket kan leda till skada på blodkärl, ökad permeabilitet, vätskeförlust och ytterligare hypotension. I vissa fall drabbas individen av chock och endotoxinemi, vilket kan resultera i död (4,5).



Bild 4. Schematisk illustration av LPS-molekylens uppbyggnad.

## Vårdens försvar och bakteriens undkommande

Alla individer har skyddsmekanismer för att undvika kolonisation och invasion av bakterier och för att eliminera eventuella bakterier som lyckas invadera en vävnad. Bakterierna i sin tur har utvecklat mekanismer för att på olika sätt undvika detta försvar. Vårdens försvarsmekanismer delas in i ospecifik respektive specifik resistens. Den ospecifika resistensen utgörs av fysiska barriärer såsom hud och slemhinnor, samt av fagocytos, monocyter och makrofager, inflammationsreaktioner och feber. Den specifika resistensen består av cellmedierad- samt antikroppsmedierad resistens (4,5).

Huden utgör en fysisk barriär samtidigt som den även utsöndrar ämnen som är skadliga för många bakterier. De flesta bakterier kräver att huden är skadad för att de ska kunna penetrera denna, men det finns även arter som kan penetrera intakt hud. Körtlar i huden utsöndrar bland annat fettsyror som har antibakteriella egenskaper. Dessutom finns på huden ett enzym, lysozym, som bryter ned cellväggen hos grampositiva bakterier vilket leder till lys av dessa (2).

Slemhinnor är den vanligaste ingångsporten för bakterier, men även här har kroppen skyddsmekanismer. De flesta slemhinnor täcks av mucus som fångar upp bakterierna och omöjliggör adhesion till vävnaden. Mucus innehåller immunoglobuliner (IgA) som binder till bakterierna och förhindrar adhesion av dessa till cellytan (1,2). Dessutom innehåller mucus även lysozym, som orsakar bakterielys. Även saliv, magsyra och proteolytiska enzymer som täcker slemhinnor i gastrointestinkanalen har antibakteriella egenskaper eller utgör en miljö ohälsosam för bakterierna.

Fagocytos utgör ett mycket viktigt skydd mot bakterieinfektion. Såväl blodbanan som olika vävnader patrulleras av neutrofiler, monocyter och makrofager som känner igen kroppsfrämmande ämnen och fagocyterar dessa. Fagocyter kan verka både ospecifikt i avsaknad av antikroppar och specifikt då antikroppar finns närvarande (2,5). De flesta mikroorganismer dör då de fagocyteras, men det finns även de som kan överleva fagocytosen och föröka sig inuti de fagocyterande cellerna.

Invasion av bakterier och den vävnadsskada som då uppkommer triggar ett inflammatoriskt svar hos värden. Inflammationsmediatorer och komplementfaktorer framkallar effekter som ökad kärlpermeabilitet, ökat blodflöde, infiltration av fagocyter, svullnad och feber (5). Dessa effekter verkar för att eliminera bakterierna från drabbad vävnad.

Det specifika försvaret utgörs av cellmedierat- samt antikroppsmedierat immunförsvar. Antikropparna kan tillföras utifrån via t ex råmjölk och utgör då en passiv immunitet. Passiv immunitet är enbart tillfällig, dvs den avtar då tillförda antikroppar dör eller förbrukas. Vanligast är dock den aktiva immuniteten där kroppen själv bildat antikroppar som svar på en infektion (4,5). Antikropps svaret är specifikt för varje enskild typ av infektion.

Bakterier har genom århundradens lopp utvecklat mekanismer för att undkomma eller övervinna vårdens försvarsmekanismer. Strukturer och funktioner som utvecklats är framförallt inriktade på skydd mot fagocytos och mot vårdens immunmedierade försvar. Dock är den strukturella uppbyggnaden av bakterier, såsom gramnegativa bakteriers cellvägg och LPS-molekylen i denna, eventuell kapsel och andra ytstrukturer många gånger ett effektivt skydd mot också andra ospecifika försvar från värden.

Efter invasion är fagocyterna bakteriernas största problem. En bakterie drar snabbt till sig fagocyter och måste därför utveckla metoder för att antingen inte bli upptäckt eller på något sätt undkomma fagocytos. Följande strategier används av bakterier för att överleva eller undkomma eventuell interaktion med fagocyter (2,5):

1. Undvika kontakt med fagocyter genom att:
  - invadera vävnader som inte patrulleras av fagocyterande celler, såsom hud eller körtellumen
  - undvika att framkalla en inflammatorisk reaktion och på så sätt undvika att locka till sig fagocyterande celler
  - utsöndra ämnen som inhiberar kemotaxi. Kemotaktiska ämnen verkar normalt för att dra till sig fagocyterna. Exempel på inhiberande ämnen är streptolysin, som utsöndras av vissa streptokocker, samt vissa exotoxiner.
  - dölja den antigena strukturen på cellytan och på så sätt uppfattas som "kroppsegen" av fagocyterna
2. Hämma upptag av bakterien in i fagocyten – om kontakt sker mellan bakterie och fagocyt har dessa bakterier utvecklat ytstrukturer som hämmar fagocytens upptag av bakterien. Exempel på sådana ytstrukturer är kapsel, fimbrier, O-antigen på LPS-molekylen hos gramnegativer med flera.

3. Överleva inne i fagocyten – dessa sk intracellulära parasiter har utvecklat metoder för att överleva inne i fagocyten. På så sätt får de ett extra skyddande cellmembran samtidigt som de uppfattas som kroppsegna och undviker andra fagocyter. Metoder för att överleva inne i fagocyten går ut på att antingen förhindra fusion mellan fagosom och lysosom eller att kunna fly ut ur fagosomen. Vissa bakterier har utvecklat resistens mot lysozymer och överlever helt enkelt inne i fagolysosomen. Mekanismerna bakom denna strategi är ännu inte helt klarlagd.
4. Skada eller döda fagocyten – vilket kan ske innan eller efter upptag. Bakterien producerar extracellulära enzymer som angriper fagocytens eller lysosomernas cellmembran vilket leder till lysis av fagocyten.

Bakterier har även utvecklat strategier och mekanismer för att undkomma det specifika antikroppsmedierade immunsvaret. Huvudsakligen är dessa mekanismer riktade till att inte upptäckas av de cirkulerande antikropparna genom att efterlikna ”kroppsegna” ämnen. Mekanismer för att dölja den antigena strukturen förekommer också och fungerar genom att bakterien ”klär sig” i värdens egna ämnen (2,5). De ämnen som används är t ex fibrin, fibronectin eller polysaccharider som hyaluronsyra. Vissa bakterier undviker helt enkelt antikroppskontakt genom att hårbärgera intracellulärt eller i områden dit antikroppar inte når, såsom lumen i gastrointestinalkanalen, urogenitalkanalerna, spottkörtlar eller i njurtubuli. Variation av antigen är ytterligare ett effektivt sätt att undkomma det antikroppsmedierade immunsvaret. Genom att förändra de ytstrukturer till vilka antikroppar fäster in, undgår bakterien immunsvaret tills nya antikroppar hunnit bildas.

## Bakteriell adhesion och invasion av värdceller

### Adhensionsmekanismer

För att en bakterie ska kunna föröka sig och kolonisera en värd krävs att den har möjlighet att adherera till värdceller. Adhensionen kan vara direkt eller indirekt, d v s antingen direkt till cellytor på värdcellen eller indirekt till ämnen utsöndrade från vävnaden, t ex mucin. Bakterier kan även adherera till andra bakterier som sedan tidigare fäst in till vävnaden, vilket sker när en vävnad koloniserats (2).

### Principer för adhesion

Generellt gäller att adhesion mellan bakterie och värdcell sker genom ”lock-and-key” principen, d v s det krävs en ligand hos bakterien och en receptor hos värdcellen (2,4,5). Ligander kallas hos bakterier för adhesiner och utgörs av strukturer på cellytan. Receptorn hos värdcellen utgörs av specifika kolhydrat- eller peptidrester. Detta medför att de flesta bakterier enbart har möjlighet att adherera till en typ av cell eller vävnad där ”rätt” receptor finns.

Adhesion till en värdcell sker under inflytande av flera mekanismer, såväl specifika som ospecifika. Framförallt påverkas adhesionen av hydrofoba interaktioner, bildande av katjon-bryggor och specifika receptor-ligand interaktioner (2). Hydrofoba interaktioner och katjon-bindningar är ospecifika reversibla bindningar, medan receptor-ligand bindningen utgör en specifik, irreversibel interaktion, vilket ger upphov till den art- och vävnadstropism som förekommer hos vissa bakteriearter (2,5).

Hydrofoba interaktioner uppkommer då opolära molekyler på bakterie och värdcell närmar sig varandra och resulterar i att adhesion blir energimässigt fördelaktig. Dessa interaktioner är helt ospecifika och följs om möjligt av en receptor-ligand bindning (2). Katjon-bindningar uppkommer när positiva joner, t ex kalciumjoner, går in som en brygga mellan de negativt laddade bakterie- och cellytorna och möjliggör adhesion. Denna typ av bindningar förekommer bland annat då bakterier i munhålan adhererar till tandytor (2).

Receptor-ligand bindning är en höggradigt specifik bindningstyp mellan bakterie och värdcell. Adhesiner på bakteriens yta binder till en receptor på värdcellen på samma sätt som ett enzym binder till sitt substrat (2,5) (bild 5-1). En receptor-ligand bindning kan hämmas av molekyler med en snarlik struktur till adhesinen eller receptorn, sk analoger. Bindning kan också ske till isolerade adhesiner eller receptorer, vilket förhindrar adhesion eftersom bindningen är irreversibel.

Specifika bindningar ger upphov till den vävnadstropism som förekommer hos vissa bakteriearter. Vävnadstropism innebär att bakterien enbart har förmåga att binda till en specifik vävnad hos sin värd. Exempel på detta ses bland annat hos olika *Streptococcus* species som finns i munhålan, där *Strept. mutans* fäster in till tandytor, men ej till munslemhinna och *Strept. salivarius* fäster till munslemhinna, men saknar förmåga att fästa till tandytor. Fler exempel på vävnadstropism finner man också hos *Vibrio cholerae*, som är tunntarmsspecifik och *Neisseria gonorrhoeae*, vars bindningsplats finns i urogenitalia.



## Adhesionsfaktorer

Adhesiner utgörs ofta av bakteriella ytstrukturer eller makromolekyler i bakteriens cellvägg. Vissa fungerar uteslutande som adhesiner, medan andra även står för andra funktioner såsom rörlighet eller skydd. En bakterie har ofta förmåga att uttrycka flera typer av adhesionsfaktorer, vilket möjliggör adhesion varierande vävnader under olika faser av invasionen.

Fimbrier är filamentösa proteiner som finns på de flesta gramnegativers cellyta och deras huvudsakliga uppgift är att verka för adhesion till värdceller (bild 5-1, 5-2). Fimbrier är uppbyggda av ett protein kallat pilin och kallas därför även för pilier (1,4). Adhesinen är ofta placerad på fimbriernas topp eller längs skaftet och har därför en längre räckvidd än eventuell kapsel eller andra ytstrukturer. Detta medför en fördel vid adhesion till en värdcell då avståndet gör att effekterna av eventuella repellerande krafter mellan de negativt laddade cellytorna minskas (1,2,5). Fimbrier brukar delas in i fem olika klasser, typ 1-5, beroende på skillnader i struktur och adhesin. Under en bakteries tillväxt sker en kontinuerlig produktion av nya fimbrier. Detta är nödvändigt på grund av att fimbrier är relativt ömtåliga och lätt går sönder. Den ständiga produktionen möjliggör också den variation av antigen som många bakterier använder för att undvika värdens immunförsvar (1).

Flageller är proteinmonomerer utgående från bakteriens plasmamembran som ger bakterien rörlighet. En bakterie kan vara försedd med en eller flera flageller placerade antingen i polerna eller runt hela cellytan. Flagellerna innehåller H-antigen och är viktiga vid identifiering av olika serotyper inom en bakterieart. Hos vissa arter kan flagellerna även verka som adhesiner (2,5).

Vissa bakteriearter är försedda med en kapsel belägen utanför cellväggen. Kapseln är uppbyggd av polysaccharider och dess uppgift är i första hand att verka som ett extra skydd för bakterien mot immunkomponenter och antibakteriella ämnen som utsöndras av värden (1,2). Kapseln kan dock även verka som adhesionsfaktor och mediera såväl specifik som ospecifik adhesion. Glykocalyx är en annan typ av skyddande lager av polysaccharider som finns på cellytan hos vissa bakterier (3,4). Även om den skyddande effekten är den primära har glykocalyxen, precis som kapseln, även funktion som adhesionsfaktor.

Även cellväggen i sig kan verka som adhesin hos både grampositiva och gramnegativa bakterier. Förutom de hydrofoba molekylerna (proteiner) i cellväggen, som interagerar med hydrofoba molekyler i värdcellen, kan även LPS-molekyler, teikonsyra och lipoteikonsyra fungera som adhesiner (2,5).

Lipopolysaccharider (LPS) ingår i alla gramnegativers yttermembran. Dessa molekyler utgör bakteriens endotoxin, motverkar fagocytos och kan även verka som en adhesin. Detsamma gäller teikonsyra och lipoteikonsyra (LTA), som utgör en del av cellväggen hos grampositiva bakterier. Molekylerna är involverade i såväl specifik som ospecifik adhesion. För LTA har man funnit att receptorn utgörs av ett glykoprotein, fibronectin, som finns på cellytan hos bland annat epitelceller (2).

Lectiner är proteiner med möjlighet att binda till kolhydrater. Sådana proteiner finns i bakteriers cellvägg och medverkar i adhesionen till värdceller. Lectin-kolhydrat bindningar har visats vara delaktiga i bakteriell adhesion till intestinala epitelceller, samt epitelceller i svalg, munhåla och urinvägar (2,5).

Nya uppgifter föreslår enzymer på bakteriens yta som möjliga adhesiner. Man har visat att ett enzym på ytan av *Streptococcus pyogenes*, kallat glycerinaldehyd 3-fosfat dehydrogenas, kan binda till proteiner såsom fibronectin, lysozym och myosin. Likaså har ett enzym hos *Streptococcus gordonii* visats vara inblandat i adhesion av bakterien till endotelceller, vilket möjliggör kolonisation av endokardiet och upprättande av endokardit (2).

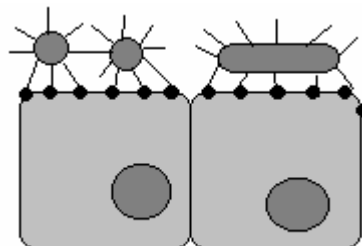


Bild 5-1. Schematisk bild av adhesion mellan bakterier och värdceller, här i form av en receptor-ligand bindning mellan bakteriernas fimbrier och värdcellernas receptorer.

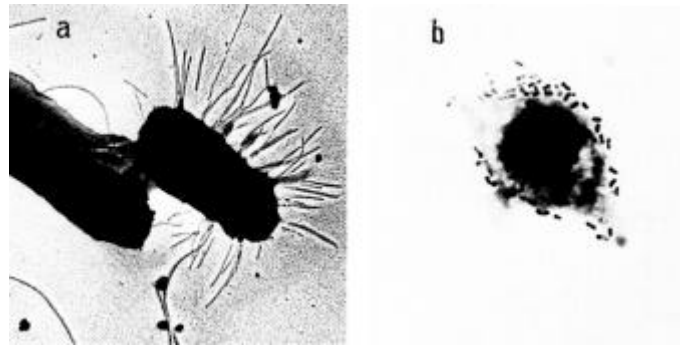


Bild 5-2. Elektronmikroskopisk bild (a) av fimbrier hos *Aeromonas hydrophila*, samt adhesion av aeromonader (b) till en human tarmepitelcell (19).

## Värdcellsreceptorer

Värdcellens membran är uppbyggt av ett dubbelt lipidlager i vilket proteiner finns inkorporerade. Proteinernas uppgift är att ansvara för transporter in och ut ur cellen, fungera som receptorer för hormoner och andra extracellulära ämnen, samt medverka i interaktioner mellan celler i vävnaden. Proteinerna är antingen lokaliserade i membranets yttre lipidlager eller transmembrant (2,4).

Tre principiellt olika strategier finns för bakteriers adhesion till en värdcell. Bindning kan ske direkt till lipider i cellmembranet, direkt till molekyler på cellytan som normalt fungerar som receptorer för andra ämnen eller indirekt till molekyler som redan adhererat till värdcellen (2). Vanligen utgörs receptorerna av peptid- eller kolhydratrester på glykolipider eller glykoproteiner i värdcellens cellmembran. Dessa ska normalt fungera som receptorer för kroppsegna ämnen, men utnyttjas av bakterien. Vid indirekt bindningen till en molekyl som redan adhererat till värdcellen kan invasion in i cellen underlättas, genom att upptag av kroppseget ämne och bakterie sker simultant. Bakterier har också förmåga att adherera till extracellulärt matrix (ECM).

## Effekter av adhesion

Då bakterien adhererat till en värdcell sker många gånger förändringar i såväl bakterie som värdcell. Förändringarna i bakterien anpassar den till sin nya miljö och gör det också möjligt för den att ta nästa steg och invadera värdcellen. Förändringarna påverkar bland annat tillväxtfaktorer eller produktion av ämnen nödvändiga för fortsatt adhesion eller vidare invasion (1,2).

Förändringar av värdcellen efter bakteriell adhesion är mycket varierande. I de allra flesta fall sker interaktionen med så kallad normalflora, vilket inte ger upphov till några förändringar alls. Interaktioner med patogener eller toxin från dessa kan dock ge upphov till såväl strukturella som funktionella förändringar, vilka underlättar för invasion av bakterien (2).

## Invasion

### Invasionsmekanismer

Invasion av en vävnad kan ske med hjälp av sk invasiner eller spreading-factors (se kapitel 1 "Bakteriella virulensfaktorer"), men vissa bakterier har även förmågan att stimulera en värdcell till upptag av bakterien intracellulärt, trots att cellerna normalt inte har fagocyterande egenskaper. Detta sker genom påverkan av värdcellens cytoskelett, ffa mikrofilarer eller mikrotubuli, och brukar kallas "forced phagocytosis" (1). Mekanismerna kan skilja sig åt något beroende på vilken celltyp som invaderas, men grundprincipen är att bakterien stimulerar den normalt icke-fagocyterande värdcellen till bildandet av pseudopodier enligt samma principer som hos en fagocyt. Detta sker genom polarisering och depolarisering av aktin i värdcellens cytoplasma (1,2).

Efter fagocytos in i värdcellen befinner sig bakterien innesluten i en membranbunden vakuol. Genom att bryta ned lipidmembranet eller bilda porer genom detta kan bakterien lämna vakuolen och frigöras ut i cytoplasman. Detta medför en fördel för bakterien då tillgången på näring i cytoplasman är god samtidigt som värdcellen ger ett extra skydd mot antikroppar, komplement och antibakteriella substanser som kan finnas extracellulärt (1). Att kunna lämna en fagocyterad vakuol är också till fördel för bakterier som tas upp av "äkta" fagocyter. Flykten ut i cytoplasman sker då innan fusion sker mellan fagosom och lysosom och bakterien undgår de lytiska enzymerna.

Bakterien interagerar med värdcellens cytoskelett också då den befinner sig intracellulärt. För att kunna förflytta sig inom cellen och nå intilliggande celler sker en kondensering av aktin i bakteriens ena pol. Detta medför att en svansliknande struktur bildas, som möjliggör förflyttning genom cytoplasman och in i intilliggande celler (1,2).

För att kunna upprätta en systemisk sjukdom krävs först att bakterien har förmåga penetrera och invadera epitel för att sedan spridas vidare via exempelvis blod eller lymfa. De flesta invasiva bakteriearter invaderar epitel genom påverkan på mikrofilament i cytoskelettet enligt ovan.

Försök med såväl *in vitro* som djurmodeller har frambringat följande teori kring den invasiva mekanismen hos *Yersinia* spp. (1,2). Efter adhesion till M-celler i tarmens Peyerska plaque tas *Yersinia enterocolitica* upp genom fagocytos. M-celler är naturliga fagocyter och adhesion till deras cellyta medför automatiskt fagocytos och transport till den underliggande lymfatiska vävnaden. Om organismen lyckas undkomma makrofagerna kring de Peyerska plaquen kan den sedan adherera till integrinreceptorer på epitelcellernas basalyta. Bakterien utnyttjar således receptorer som normalt används till adhesion mellan värdcell och ECM-molekyler. Adhensionen leder till förändringar av värdcellens mikrofilament och bakterien tas in i värdcellen via bildandet av en vakuol enligt principen beskriven ovan.

Makrofager, precis som många andra celler som ingår i immunförsvaret, uttrycker integrinreceptorer på sin cellyta. Receptorerna används normalt till adhesion mellan makrofag och ECM-molekyler, men kan också utnyttjas av invasiva bakteriearter. Genom att binda till en integrinreceptor tas bakterien upp intracellulärt i makrofagen genom en alternativ väg skild från den normala fagosombildningen (1,2). Detta medför en fördröjning i fusionen mellan vakuol och lysosomer och bakterien har möjlighet att lämna vakuolen innan fusion sker.

## Effekter av invasion

Bakteriell invasion av en värdcell medför förändringar av såväl bakterien som värdcellen. Bakterien måste snabbt anpassa sig till sin nya miljö, som ofta skiljer sig väsentligt från den tidigare extracellulära omgivningen, samtidigt som värdcellen genomgår allt från knappt märkbara förändringar till död (2).

Värdcellen genomgår i första hand förändringar som verkar för att eliminera den invaderande organismen. Bland annat kan man efter bakteriell invasion se en ökad produktion av cytokiner som triggar värdens immunförsvär. Likaså kan man se en ökning av antalet ICAM-1 molekyler på tarmepitelcellers yta efter invasion av vissa bakteriearter (1). ICAM-1 fungerar som receptor för neutrofiler vid adhesion till epitelytan.

Förökning och tillväxt av bakterier intracellulärt medför många gånger att värdcellen dör, ffa på grund av minskad näringstillgång och ansamling av toxiska restprodukter från bakteriernas metabolism. Denna typ av celldöd brukar betecknas som nekrotisk. Vissa bakteriearter har också förmågan att inducera apoptos, d v s programmerad celldöd, hos de celler de invaderar eller närliggande celler. Det är dock ännu inte klarlagt om apoptos av invaderade celler är ett resultat av invasionen eller ett led i värdens försvar. Att offra de invaderade cellerna kan vara ett sätt för värden att bli av med mikroorganismerna (1,2).

Efter upptag in i värdcellen måste bakterien snabbt anpassa sig till de nya förhållandena som råder. Den nya miljön kan medföra förändringar i såväl temperatur, som pH och koncentration av syre och koldioxid. Vissa bakterier har utvecklat metoder för att överleva inne i fagolysosomer, medan andra som fort som möjligt efter fagocytos lämnar fagosomen och lever fritt i cytoplasman. Efter invasion av epitel har bakterien två möjligheter till vidare utveckling, den kan växa till och förökas inne i värdcellen för att sedan lämna denna och spridas vidare extracellulärt eller den kan fortsätta invadera djupare vävnader och spridas vidare till andra delar av värden. Hos vuxna, friska individer är det vanligast att invasionen begränsas till epitelet, även om det finns vissa bakteriearter som alltid orsakar systemisk sjukdom (1). De bakterier som invaderar djupare vävnader kommer att stöta på en rad av värden försvarsmekanismer och har därför utvecklat metoder för att undvika dessa. Bland annat finns metoder för att undvika fagocytos, vilket behandlats i tidigare kapitel.

# ***Plesiomonas shigelloides***

## **Bakgrund**

*Plesiomonas shigelloides* är en fakultativt anaerob, gramnegativ, oxidas-positiv stav. Den är rörlig med vanligen 2-5 polära flageller. Dess naturliga habitat anses vara sötvatten och den har isolerats från sjöar, dammar, floder och sediment i ett flertal länder i såväl kallt, som tempererat och tropiskt klimat (6). *P. shigelloides* förekommer som normalflora hos vissa fiskar, reptiler och amfibier (6,16) och anses vara en ökande orsak till gastrointestinala störningar hos både människor och djur (7,8,9,18).

## **Taxonomi och klassificering**

*Plesiomonas shigelloides* isolerades första gången 1947 av Ferguson och Henderson från ett humant faecesprov. Organismen visade sig ha vissa likheter med *Shigella sonnei*, bland annat påvisades samma somatiska antigen som hos *S. sonnei* fas 1, men organismerna skiljde sig åt vad det gällde rörlighet, indolproduktion och möjlighet att fermentera mannitol. Den nyfunna bakterien fick arbetsnamnet Paracolon C27 och placerades i familjen Enterobacteriaceae (8 9,13).

Sedan dess upptäckt har *P. shigelloides* tillhört ett flertal genus, bland annat *Pseudomonas*, *Fergusonia*, *Scatomonas*, *Vibrio* och *Aeromonas* (8). Först 1962 fick bakterien ett eget genus, *Plesiomonas*, efter det att Habs och Schubert framhållit ett antal unika egenskaper hos organismen som skiljer sig från närbesläktade genus såsom t ex *Aeromonas* (8,9).

På grund av sin likhet med *Aeromonas* vad det gällde fermentationsmetabolism, oxidasproduktion och placering av flageller (8) placerades *P. shigelloides* i familjen Vibrionaceae och har tillhört denna familj fram till alldeles nyligen. Enligt andra upplagan av Bergey's Manual of Systematic Bacteriology har dock genus *Plesiomonas* återigen placerats i familjen Enterobacteriaceae (17).

## **Morfologi, serologi och biokemiska egenskaper**

*P. shigelloides* är en fakultativt anaerob, icke-sporformande, gramnegativ stav. Den är rörlig genom en eller flera polära flageller och förekommer enskilt, i par eller i korta kedjor. Storleken på en enskild cell är 0.8-1,2 µm x 3 µm (8,18).

Optimal tillväxttemperatur för *P. shigelloides* är 37-38°C, men tillväxt kan ske i temperaturer mellan 8-44°C. Toleransen för NaCl varierar mellan 0 och 5 % för olika stammar, medan pH toleransen varierar mellan 4 och 9 (13). Odling kan ske på såväl blodagar som selektivt agar. Efter 24 h inkubation i 37°C på blodagar växer organismen som runda, glänsande, ogenomskinliga kolonier med upphöjd mitt (8,13) (bild 6). Som selektivt agar rekommenderas antingen *Plesiomonas*-agar (PL) eller Inositol Brilliant Green Bile Salts agar (IBB) (9,18), se tabell 1. På IBB-agar växer organismen som rosa till lila, torra kolonier med upphöjd mitt. Vid isolering kan ibland även krävas 24 h i berikningsmedium, t ex alkaline peptone water, innan utstryk sker på platta (12,18).

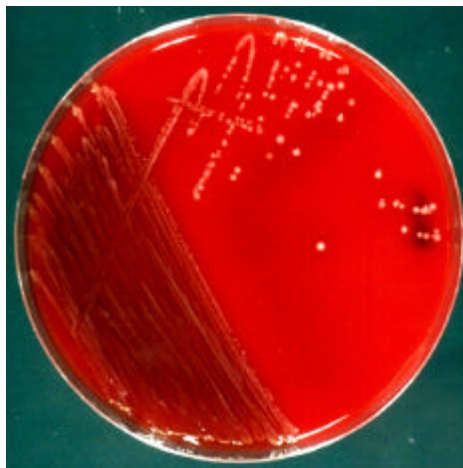


Bild 6. Blodagarplatta med kolonier av *P. shigelloides*.

De viktigaste biokemiska egenskaperna för *P. shigelloides* är bland annat rörlighet, oxidas- och inositolproduktion, samt oförmåga att producera exoenzymer som t ex lipas och amylas (tabell 2) (9,13). För biokemisk identifiering av organismen används ofta systemet API 20E från bioMérieux.

Serotypning av *P. shigelloides* sker genom identifiering av somatiska (O) antigen samt antigen från flageller (H). Hittills har 101 O-antigen och 51 H-antigen identifierats (6). Vissa stammar av organismen har ett O-antigen identiskt med det hos stammar av *Shigella sonnei* fas 1 och forskning pågår kring möjligheten att använda antigen från *Plesiomonas* för vaccinframställning mot human shigellos (6,8,9,18).

Tabell 1. Innehåll i selektivt media för *P. shigelloides*.

PL-agar	g/l	IBB-agar	g/l
Peptone	1.0	Peptone	10.0
NaCl	5.0	NaCl	5.0
Yeast extract	2.0	Meat extract	5.0
Mannitole	7.5	Bile salts No. 3	8.5
Arabinose	5.0	Brilliant green	0.0033
Inositol	1.0	Neutral red	0.025
Lysine	2.0	Inositol	10.0
Bile salts No. 3	1.0	Agar	15.0
Phenol red	0.08		
Agar	15.0		

Tabell 2. Några viktiga biokemiska egenskaper hos *P. shigelloides*

Egenskap	Reaktion
Rörlighet	+ (85)
Oxidas	+ (100)
Katalas	+ (100)
Araginin dehydrolas	+ (93)
Ornitin dekarboxylas	+ (100)
Fermentation av inositol	+ (100)
Gas från glukos	- (100)
Lipas	- (100)
Amylas	- (100)

## Habitat och värdspektra

Den naturliga miljön för *P. shigelloides* är sötvatten och organismen har isolerats från sjöar, dammar, floder och sediment i ett flertal länder. Förekomst av organismen och mängden som kan isoleras beror av vattnets temperatur, tillgången på näringsämnen och förekomst av avloppsföroreningar (6). De flesta stammar kräver temperaturer över 8°C för att kunna växa till, men organismen har även isolerats från kallare temperaturer (6,8). I vissa vattendrag har även noterats säsongvariationer i förekomsten av *P. shigelloides*. Isolering och tillväxt har då varit möjlig under den varma säsongen, men ej under den kalla (6). Isolering har även skett från saltvatten, men då oftast enbart i närheten av avloppsutsläpp. Försök har visat att *P. shigelloides* har en begränsad överlevnad i saltvatten, 22-25 h, och att överlevnaden ökar med ökad mängd näringsämnen (9).

Förekomst av *P. shigelloides* hos olika djurarter och människor speglar framför allt deras närhet till vatten (6,9). Bakterien förekommer naturligt hos fiskar och vissa reptiler och har isolerats från en rad olika däggdjur, inklusive människor. Fisk utgör också en sekundär reservoar för organismen. Sporadisk förekomst hos däggdjur och människor tros bero på kontakt med fisk, vatten eller vattenförorenad föda som innehåller organismen (bild 7) (6).

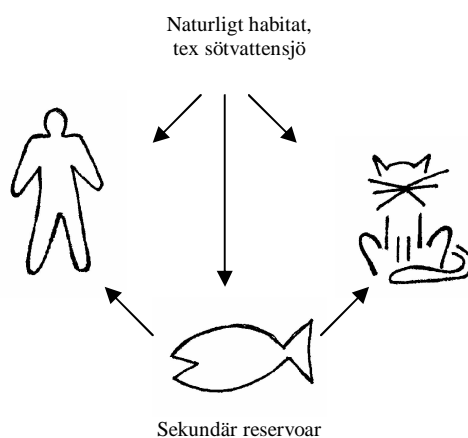


Bild 7. *Plesiomonas shigelloides* förekommer naturligt i sötvatten, fiskar fungerar som sekundär reservoar och påverkas ej av bakterien. Infektion av såväl människor som djur sker via vatten eller vattenkontaminerad föda. Spridning mellan djur och människor är ej rapporterad.

## Klinisk manifestation hos människor och djur

Infektion med *P. shigelloides* hos människor kan delas in i två grupper; infektioner som orsakar gastroenterit och infektioner som orsakar extraintestinal sjukdom. Vanligast är att man drabbas av gastroenterit, men organismen kan hos immunokomprimerade personer och små barn orsaka sjukdomar som septikämi, septisk artrit, meningit och cholecystit (6,7,8,9,13). Människor drabbas efter att på något sätt varit i kontakt med vatten, fisk eller skaldjur som innehåller organismen (8,18). Även vattenförorenad föda anses vara en smittokälla. Man räknar med att 70% av de som drabbas har antingen en underliggande sjukdom (cancer, levercirrhos) eller har utsatts för en identifierbar risk såsom utlandsresa eller konsumtion av fisk/skaldjur (8).

Större utbrott av *Plesiomonas*-orsakad diarré har skett i ett flertal länder till följd av bland annat konsumtion av kontaminerat vatten (Japan), kontaminerade skaldjur (USA), sötvattensfisk (Zaire), samt efter bad i sötvattenssjö (Holland) (13). I Japan räknas *P. shigelloides* som den tredje största orsaken till sk "turistdiarré" (7,8).

Gastroenterit orsakad av *P. shigelloides* finns i tre olika former, en sekretorisk form, en invasiv form och en subakut-kronisk form. Sjukdomen ger symptom som feber, diarré, huvudvärk, yrsel, kräkningar, buksmärtor och dehydrering (6,7,8,9,13,18). Vid den invasiva formen ses även blodig diarré. Sjukdomen kräver sällan behandling hos i övrigt friska människor och varar i cirka 1-7 dagar. Drabbade individer kan dock fortsätta utsöndra organismen i faeces upp till två månader efter tillfrisknande (6). Inkubationstiden varierar från 1 till 9 dagar.

Förekomst av *P. shigelloides* hos däggdjur är ej lika väldokumenterad som hos människa, men organismen har isolerats från faeces hos såväl asymptomatiska djur, som djur med gastrointestinala störningar (6). *P. shigelloides* har nyligen rapporterats som orsak till både akut och kronisk diarré hos katter (11). Dessa mikroorganismer har även isolerats från hundar, nötboskap, får, getter och grisar, samt vilda djur som varg, tvättbjörn, isbjörn och olika typer av apor. Även däggdjur tror man smittas från kontaminerad föda eller kontaminerat vatten (6).

## Patogenicitet

Mekanismerna kring enteropatogeniciteten hos *P. shigelloides* är ännu inte klarlagda. Organismen orsakar inte alltid sjukdom, men anses inte heller tillhöra den gastrointestinala normalfloran hos människor (6). Förekomst beräknas till ca 0.2-3.2% hos individer som ej visar symptom (13). Också hos djur har isolering skett från såväl asymptomatiska individer som individer med gastrointestinala störningar, men här krävs ytterligare undersökningar innan bakterien kan avskrivas som enterisk kommensal (6).

De potentiella virulensfaktorer som påvisats hos *P. shigelloides* är produktion av enterotoxin, men organismen tros även besitta adhesiva och invasiva egenskaper (13).

## Enterotoxin

Produktion av enterotoxin som virulensfaktor hos *P. shigelloides* har länge varit ett omtvistat ämne. Flertalet försök har gjorts med varierande resultat, men bland annat genom att använda sig av upprepade passager av bakterien i *in vivo* försök har man lyckats rena fram och karaktärisera såväl ett värmelabilt (LT), som ett värmestabilt (ST) enterotoxin (6,13). Modellerna som använts vid *in vivo*-försöken är rat ileal loop model, rabbit ileal loop model, samt suckling mouse assay model (6,10). Man har rapporterat ökande toxinaktivitet vid upprepade passager *in vivo* (10). Teorin kring detta fenomen är att det troligtvis krävs passage *in vivo* för att inducera produktion av enterotoxiner. Denna teori styrks också av det faktum att stammar som vid odling *in vitro* mist sin toxinproduktion återfår den igen vid ytterligare passage *in vivo* (10).

Enterotoxinproduktion har också påvisats i *in vitro* försök. I en studie med VERO-celler (green monkey kidney) rapporterades cytotoxinproduktion från *P. shigelloides*-stammar isolerade från barn med diarré (18) (bild 8). I ytterligare en studie beskriver Gardner et al. (15) morfologiska förändringar hos chinese hamster ovary-celler (CHO), dvs produktion av cytotoniskt toxin, efter exponering av sterilfiltrat från *P. shigelloides*. Denna effekt liknar de förändringar som uppkommer vid enterotoxinpåverkan från choleratoxin och stärker hypotesen att *P. shigelloides* har förmågan att producera enterotoxin (15).

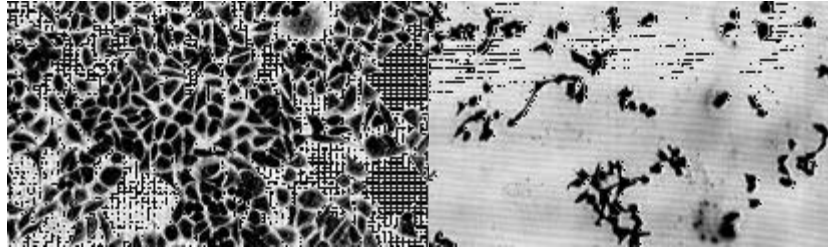


Bild 8. Normala respektive cytotoxiskt förändrade VERO-celler efter inkubation med sterilfiltrat av *P. shigelloides*.

## Produktion av exoenzymer

Exoenzymer är ämnen som produceras av bakterier, som genom att bryta ned och skada vävnad underlättar spridning och invasion av denna. Hos *P. shigelloides* har förekomst av cytolysin och hemolysin påvisats, vilket kan ha en inverkan på bakteriens förmåga att framkalla sjukdom (6,7).

Cytolysin verkar genom nedbrytning av kringliggande vävnad och hämning av omgivande normalflora. Skadad vävnad är lättare att adherera till och förenklar invasion, medan påverkan på normalfloran underlättar för tillväxt och kolonisation av vävnaden (5,6). Detta medför att produktion av cytolysin mycket väl kan vara en av *P. shigelloides* virulensfaktorer och bidrar på så sätt till dess patogenicitet.

Enligt vissa undersökningar förekommer också hemolytisk aktivitet hos *P. shigelloides* (6,7). Produktion av hemolysin medför att organismen kan utnyttja bland annat världens hemoglobin som en järnkälla. Hemolysin verkar genom att bilda porer genom membranet på röda blodkroppar, vilket leder till lyses av dessa. Eventuellt kan hemolysin även fungera för att bryta ned membran efter fagocytos, vilket ger organismen möjlighet att undkomma fagocytens lytiska enzymer (7).

## Adhesion och invasion

Endast ett fåtal studier har gjorts kring *P. shigelloides* adhesiva förmåga, men man har nu kunnat visa att vissa isolat kan adherera till (14) och invadera tarmepitelceller *in vitro* (7). Tidigare har man enbart antagit att *Plesiomonas* har en invasiv förmåga då man kliniskt påvisat blodinhåll i faeces från individer med *Plesiomonas*-orsakad gastroenterit, men forskare har nu lyckats visa detta *in vitro*. Vid försöket användes en cellinje med humana coloncancer celler (Caco-2), vilka efter interaktion med bakteriestammar studerades i elektronmikroskop (7).

Resultat av dessa studier visade att vissa isolat av *P. shigelloides* har förmåga att adherera till mikrovilli och intakt membran på tarmceller, men också att de invaderar dessa celler. Organismen påvisades både fritt i cytoplasman hos cellerna, samt i membranbundna vakuoler. Detta medför att organismen troligtvis tas upp intracellulärt genom en fagocyterande process, men att den också har förmågan att lämna dessa vakuoler för att undkomma fagocytens lytiska enzymer (7).

I detta försök påvisades för första gången även fimbrier på ytan av bakterierna. Fimbrier spelar en stor roll i adhesionsmekanismen hos flertalet bakteriearter och troligtvis så även hos *P. shigelloides*. Fimbrier påvisades enbart hos bakterier i nära association med värdceller, vilket antyder att stimuli från värdceller krävs för att fimbrier ska uttryckas på bakteriens yta (7).

## Behandling och antibiotikaresistens

Flertalet stammar av *P. shigelloides* uppvisar resistens mot olika penicilliner, bland annat ampicillin, piperacillin, ticarcillin och carbenicillin. Detta beror troligtvis på produktion av  $\beta$ -lactamas då många stammar har visats vara känsliga *in vitro* för penicilliner med  $\beta$ -lactamas hämmare. Resistens också mot aminoglykosider, såsom gentamicin och tobramycin, har påvisats, men här är mekanismen bakom ännu inte klarlagd (6,18).

Rekommenderad behandling vid *Plesiomonas*-orsakad sjukdom är således kinoloner alternativt potentierade sulfonamider, baserat på ovanstående resistensspektra. Detta kan även tillämpas inom veterinärmedicinen, men på grund av den enbart sporadiska förekomsten rekommenderas resistensbestämning av alla isolat (6,18).

Antibiotikabehandling har visats minska sjukdomsperioden hos individer drabbade av gastroenterit, vilket medför att behandling kan vara befogat vid såväl intestinala som extraintestinala åkommor orsakade av *P. shigelloides* (8,9).

# Experimentell studie kring adhesiva egenskaper hos *Plesiomonas shigelloides* isolerade från människor, djur och akvatisk miljö.

## **Inledning**

*P. shigelloides* anses vara en ökande och hittills underdiagnosticerad orsak till gastrointestinala störningar hos såväl människor som djur. Intresset kring dess förmåga att framkalla sjukdom har därigenom ökat och bland annat förmåga att adherera till tarmepitelceller har föreslagits vara en av dess virulensfaktorer. Trots flertalet publicerade studier kring potentiella virulensfaktorer hos *P. shigelloides* har man inte kunnat fastställa vilka faktorer som har avgörande betydelse för patogenesen (7).

Syftet med mina studier var att undersöka och jämföra *in vitro* adhesionsförmåga och produktion av exotoxin hos *P. shigelloides*-stammar isolerade från olika källor.

## **Material och metoder**

### Bakteriestammar

Totalt 27 stammar av *P. shigelloides* undersöktes (tabell 3-5).

### Odling

Stammarna odlades på hästblodagar (5% hästerytrocyter i heart infusion broth, HIB, Difco laboratories) i 24 h vid 37°C. Med svabb överfördes bakterierna till 10 ml av HIB och inkuberades i 24h vid 37°C. Efter centrifugering (30000xg/30min) avskiljdes, sterilfiltrerades (Millipore filter 0.22µm) och frystes (-20°C) supernatanten. Detta kulturfiltrat användes senare för detektion av exotoxin.

### Adhesionsexperiment

Bakteriecellerna tvättades upprepade gånger med PBS. INT-407 celler (Homo sapiens Intestine 407, BSL 2, F) odlades på objektglas under 48h, 37°C i CO<sub>2</sub> inkubator. 12ml av bakteriesuspension i PBS innehållande 10<sup>8</sup> bakterier/ml tillfördes till petriskålar där objektglas med INT-407 placerats. Efter inkubering i 60 min vid 37°C tvättades objektglaset 5 ggr i PBS för att avlägsna icke-adherenta bakterier. Objektglaset fixerades med metanol och färgades med metylenblått. Experimentet utfördes två gånger.

### Detektion av exotoxiner

Detektion av cytotoxiskt- och cytotoniskt toxin utfördes genom att använda INT-407 celler (tabell 6). 15 selekterade *P. shigelloides*-stammar testades, enligt tidigare beskriven metod (19).

### Avläsning av tester

Avläsning av adhesionsförsöket utfördes manuellt i ljusmikroskop med 100 gångers förstoring, enligt metod beskriven av Schubert och Holz-Bremer (14). Antalet celler med adhererande bakterier räknades, samt antalet bakterier som adhererade till dessa celler. Totalt räknades 100 celler per objektglas. Resultaten som använts vid beräkning är ett medelvärde av resultaten vid de två olika omgångarna.

Detektion av exotoxin utfördes manuellt i ljusmikroskop. Positiv exotoxin effekt bedömdes efter följande kriterier: cytotoxin - total eller partiell destruktion av INT-407 cellerna, cytotoniskt toxin – morfologisk förändring (elongering) av INT-407 cellerna, utan destruktion.

## **Resultat**

### **Adhesion**

Resultaten av adhesionsförsöken presenteras i tabellerna nedan (tabell 1- 3), enligt modell efter Schubert och Holz-Bremer (14).

Indelning av resultaten i grupper har skett efter det antal celler som adhererar en viss mängd bakterier. Grupp I utgörs av de celler som saknar adherenta bakterier, grupp II är de celler till vilka 1-5 bakterier adhererat osv.



Tabell 3. Medelvärde av adhesionsresultat vid experiment med INT-407 celler och *P. shigelloides* stammar med animalt ursprung

Stam	Gr. I 0	Gr. II 1-5	Gr. III 6-10	Gr. IV 11-20	Gr. V 21-50	Gr. VI > 50	Ursprung
615/94	58	37,5	2	2	0,5	0	svan
397/95	84,5	15,5	0	0	0	0	hare
PYRY2000	84	15,5	0,5	0	0	0	katt
CAT3	67	25	4,5	3	0,5	0	katt
CAT12	58	32,5	7,5	2	0	0	katt
CAT19	88,5	10,5	0,5	0	0	0	katt
660/97	69,5	27	2,5	1	0	0	örn
1014/99	70	28,5	1,5	0	0	0	fisk
B1129/2000	66	32	1	1	0	0	fågel

Tabell 4. Medelvärde av adhesionsresultat vid experiment med INT-407 celler och *P. shigelloides* stammar med humant ursprung.

Stam	Gr. I 0	Gr. II 1-5	Gr. III 6-10	Gr. IV 11-20	Gr. V 21-50	Gr. VI < 50	Ursprung*
IH40828	90	10	0	0	0	0	människa
IH40845	78,5	21	0,5	0	0	0	
IH40904	45	34	8,5	7	5	0,5	
IH40936	65	31	3	1	0	0	
IH41154	74,5	23,5	2	0	0	0	
1102	39,5	34	16	8	2,5	0	
1516	58	39	3	0	0	0	
2044	77	22,5	0,5	0	0	0	
2416	56	40,5	3	0,5	0	0	

\* Samtliga humanstammar är hämtade från kliniska fall av diarré

Tabell 5. Medelvärde av adhesionsresultat vid experiment med INT-407 celler och *P. shigelloides* stammar isolerade från akvatisk miljö.

Stam	Gr. I 0	Gr. II 1-5	Gr. III 6-10	Gr. IV 11-20	Gr. V 21-50	Gr. VI < 50	Ursprung
4C	92	8	0	0	0	0	flodvatten
3F	56,5	31	8	4	0,5	0	flodvatten
73/297	100	0	0	0	0	0	flodvatten
75/301	76,5	23,5	0	0	0	0	flodvatten
92/380	29	42	10	11	8	0	flodvatten
16/21	43	43	9,5	3	0,5	0	flodvatten
23/90	47,5	32	7,5	10,5	2,5	0	sjövatten
5/43	88,5	11	0,5	0	0	0	avloppsvatten
75/302	56,5	35,5	6,5	1	0,5	0	flodvatten

Resultaten i tabellerna är baserade på ett medelvärde av respektive stams resultat vid de två olika tillfällena som experimentet utfördes. Noteras bör att resultaten för vissa stammar varierade kraftigt mellan första och andra tillfället. Ytterligare upprepningar av experimentet krävs för att bringa mer klarhet kring medelvärdet.

Resultaten för respektive grupp av isolat visar stor variation av adhesionsförmåga mellan de olika stammarna. Till exempel finns inom gruppen av akvatiska isolat stam nr 73/297 som helt saknar adhesionsförmåga. Samma grupp innehåller också övervägande fler stammar som adhererar kraftigt, med upptill 50 bakterier. Exempel på bakteriell adhesion från studien visas i bild 9.

Det totala medelvärdet av antalet celler till vilka bakterier adhererar för respektive grupp är störst för de humana isolaten (adherens till i medeltal 35,2 av 100 celler). Akvatiska isolat visar i medeltal adhesion till 32,4 av 100 celler och de animala stammarna till 28,3 av 100 celler.

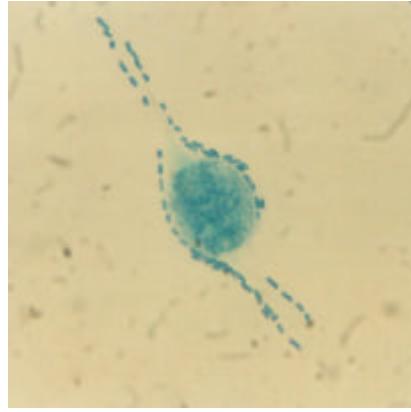


Bild 9. Adhesion av *P.shigelloides* stam IH 40936 till en INT-407 cell.

## Detektion av exotoxin

Resultaten av studien visar (tabell 6) att inget av undersökta isolat var kapabelt att producera cytotoxiska toxiner i INT-407 celltestet. Däremot sågs i utspädda prover, hos samtliga isolat, en cytotonisk effekt med kraftig morfologisk förändring av cellerna.. Även vid spädning 1:10 uppvisade vissa isolat cytotoniska förändringar (bild 10).

Tabell 6. Detektion av exotoxin

Stam	Ursprung	1:1	1:10	1:100
B1129/2000	fågel	+++	0	0
615/94	svan	+++	0	0
397/95	hare	+++	+	0
1014/99	fisk	+++	0	0
CAT 19	katt	+++	0	0
IH40904	human	+++	0	0
IH41154	human	++	0	0
IH40845	human	+++	+	0
IH40936	human	+++	+	0
2044	human	++	0	0
4C	akvatisk	+++	0	0
92/380	akvatisk	+++	0	0
75/302	akvatisk	+++	0	0
5/43	akvatisk	+++	0	0
16/21	akvatisk	++	+	0

Den av försöket resulterande morfologiska förändringen av INT-407 cellerna gentemot den negativa kontrollen är graderad enligt följande: 0 – ingen förändring, + - övervägande mängd normala celler, enstaka förändrade, ++ - övervägande mängd förändrade celler, enstaka normala, +++ - samtliga celler förändrade.

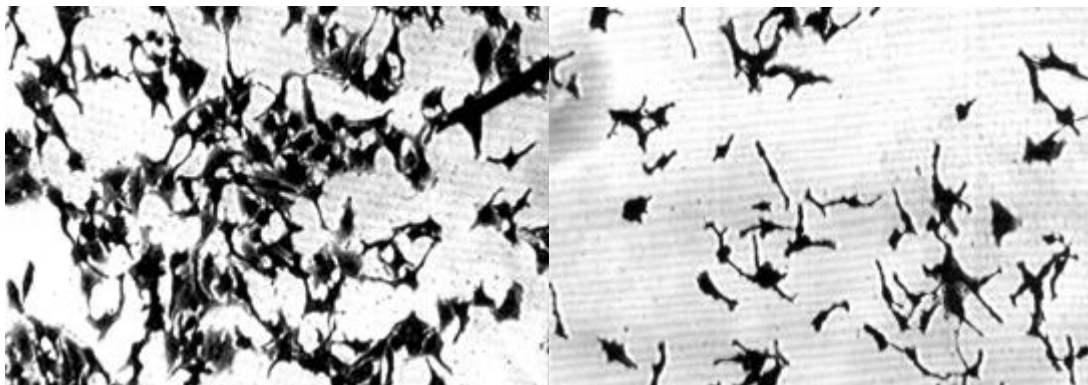


Bild 10. Normala respektive cytotoniskt förändrade INT-407 celler efter inkubation med sterilfiltrat av *P. shigelloides*.

## Diskussion

Virulensen hos bakteriearter som orsakar gastrointestinala sjukdomar är många gånger kopplad till deras förmåga att adherera till humana- och animala tarmepitelceller och produktion av enterotoxiner. Resultat från mina studier kring adhesionsförmåga hos *P. shigelloides*-isolat visar att undersökta isolat har, oavsett ursprung, varierande förmåga att adherera *in vitro* till odlade humana tarmepitelceller. Störst adhesionsförmåga uppvisade stam nr 92/380 isolerad från akvatisk miljö, med adhesion till 71% av 100 räknade celler och där 8% band upptill 50 bakterier per cell.

Ingen tydlig skillnad i adhesion mellan de olika grupperna av isolat från olika källor uppvisades. För att ytterligare försöka klargöra om denna skillnad i adhesion fanns, utfördes ett t-test. I detta test jämfördes medelvärdena av antalet celler till vilka bakterier adhererat, inom respektive grupp av isolat. Signifikant skillnad i adhesion mellan de olika grupperna av isolat kunde ej påvisas ( $p < 0,05$ ).

Enbart ett fåtal studier kring den adhesiva förmågan hos *P. shigelloides* är rapporterade. I en nyligen publicerad artikel från Australien (7) rapporteras att humana isolat från kliniska fall adhererar till och invaderar Caco-2 celler. Schubert och Holz-Bremer (14) rapporterar skillnader i adhesion hos plesiomonader med olika ursprung. Resultat från mina pilotstudier skiljer sig från tidigare publicerat arbete av Schubert och Holz-Bremer (14). Dessa författare beskriver att *P. shigelloides*-stammar isolerade från humana kliniska fall adhererar i högre grad till INT-407-celler, jämfört med akvatiska isolat. Intressant är att mina resultat från adhesionsexperimenten uppvisar en generellt högre adhesionsförmåga hos de akvatiska isolaten, jämfört med studie av Schubert och Holz-Bremer. Man kan enbart spekulera kring orsakerna till dessa skillnader. En av orsakerna kan vara själva utförandet av experimenten, såsom inkubationstemperatur, tid för interaktion mellan bakterie och cell, samt antal passager av bakterierna. Även geografisk- och serologisk variation av isolat kan bidra till förklaringen.

Resultaten från mina studier visar också att samtliga undersökta isolat av *P. shigelloides*, oavsett ursprung, ger upphov till en cytotonisk reaktion i INT-407 celltest. Liknande cytotonisk påverkan har tidigare rapporterats av Gardner, Fowlston och George (15). Resultaten av båda dessa studier stödjer teorin om att *P. shigelloides* har förmåga att producera exotoxin.

Fortsatta studier kring potentiella virulensfaktorer hos *P. shigelloides*, i kombination med ekologiska och epidemiologiska parametrar, är nödvändiga för att kunna klargöra dess roll som human- och animal enteropatogen.

## Sammanfattning

*Plesiomonas shigelloides* är en gramnegativ, oxidaspositiv stav som tillhör familjen Enterobacteriaceae. Den förekommer naturligt i sötvatten, samt som normalflora hos vissa fiskar, (6, 16) och anses vara en ökande och hittills underdiagnosticerad orsak till gastrointestinala störningar hos både människor och djur (7,8,9). Mekanismerna kring enteropatogeniciteten hos *P. shigelloides* är ännu inte klarlagda. Det finns ett flertal potentiella virulensfaktorer som kan vara involverade i sjukdomsförloppet. Adhesiv förmåga, tillsammans med produktion av enterotoxiner, tros ha stor betydelse i detta förlopp.

Resultat från mina studier kring adhesionsförmåga hos *P. shigelloides*-isolat visar att undersökta isolat har, oavsett ursprung, varierande förmåga att adherera *in vitro* till odlade humana tarmepitelceller. Resultaten visar också att samtliga undersökta isolat av *P. shigelloides*, oavsett ursprung, ger upphov till en cytotonisk reaktion i INT-407 celltest.

Fortsatta studier kring potentiella virulensfaktorer hos *P. shigelloides*, i kombination med ekologiska och epidemiologiska parametrar, är nödvändiga för att kunna klargöra dess roll som human- och animal enteropatogen.

## Conclusion

*Plesiomonas shigelloides* is a gram-negative, oxidase-positive rod of the family Enterobacteriaceae. The primary natural habitat of the organism is fresh water and it is part of the normal bacterial flora of fish (6,16). *P. shigelloides* causes gastrointestinal disease in both animals (7,8). Mechanisms involved in the pathogenicity of *P. shigelloides* are not yet fully understood. Several potential virulencefactors, eg adhesive properties and ability to produce enterotoxins, are suggested to be involved in the mechanisms of disease.

The results of my studies of adhesive properties of *P. shigelloides*, show a variation between different strains in the ability to attach to human enteric epithelial cells *in vitro*. The results also show that all examined strains, regardless of origin, cause cytotoxic reactions in the INT-407 cell test.

Complementary studies concerning potential virulence factors of *P. shigelloides*, including ecological and epidemiological parameters, are necessary to clarify the role of the organism as an enteric pathogen in both humans and animals.

## Referenser

1. **Salyers AA, Whitt DD** (1994) Bacterial Pathogenesis – a molecular approach, pp 30-60. American Association for Microbiology, Washington, USA.
2. **Henderson B, Wilson M, McNab R, Lax AJ** (1999) Cellular microbiology – bacteria-host interactions in health and disease. John Wiley & Sons, West Sussex, England.
3. **Ofek I, Doyle RJ** (1994) Bacterial Adhesion to Cells and Tissues, pp 1-12. Chapman & Hall, London, England.
4. **Carter GR, Chengappa MM, Roberts AW** (1995) Essentials of Veterinary Microbiology, 5<sup>th</sup> edition, pp 67-80. Williams & Wilkins, Philadelphia, USA.
5. **Todar K** (1997) Bacteriology 330: Host-parasite interactions. University of Wisconsin, Department of Bacteriology. [www.bact.wisc.edu/Bact330/Bact330HomePage](http://www.bact.wisc.edu/Bact330/Bact330HomePage)
6. **Jagger TD** (2000) *Plesiomonas shigelloides* – a veterinary perspective. Infect Dis Rev 2000;2(4): 199-210
7. **Theodoropoulos C, Wong TH, O'Brien M, Stenzel D** (2001) *Plesiomonas shigelloides* enters polarized human intestinal Caco-2 cells in an in vitro model system. Infect. Immun. 69: 2260-2269
8. **Brenden RA, Miller MA, Janda JM** (1988) Clinical disease spectrum and pathogenic factors associated with *Plesiomonas shigelloides* infections in humans. Rev Inf Dis 10: 303-316
9. **Miller ML, Koburger JA** (1985) *Plesiomonas shigelloides*: an opportunistic food and waterborne pathogen. J. Food Prot. 48: 449-457
10. **Matthews BG, Douglas H, Guiney DG** (1998) Production of heat stable enterotoxin by *Plesiomonas shigelloides*. Microb. Patho. 5: 207-213
11. **Sjøberg EK** (1994) *Plesiomonas shigelloides* som årsak till diaré hos katt. Norsk Vet. Tid. 106: 455-458
12. **Freund SM, Koburger JA, Wei C** (1987) Enhanced recovery of *Plesiomonas shigelloides* following an enrichment technique. J. Food Prot. 51: 110-112
13. **Bier, Miliotis** (in press) International handbook of foodborne pathogens, pp 369-373. Marcell Dekker, New York
14. **Schubert RHW, Holz-Bremer A** (1998/99) Cell adhesion of *Plesiomonas shigelloides*. Zbl. Hyg. Umweltmed. 202: 383-388
15. **Gardner SE, Fowlston SE, George WL** (1990) Effect of iron production of a possible virulence factor by *Plesiomonas shigelloides*. J. Clin. Microbiol. 28(4): 811-813
16. **Aldova E, Melter O, Chyle P, Slosarek M, Kodym P** (1999) *Plesiomonas shigelloides* in water and fish. Cent Eur J Public Health. 7(4): 172-175
17. **Garrity GM, Boone DR, Castenholz RW** (2001) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2<sup>nd</sup> edition. Springer-Verlag, New York.
18. **Clark RB, Janda JM** (1991) *Plesiomonas* and human disease. Clin. Microbiol. News. 13(7): 49-56
19. **Krovacek K** (1996) *Aeromonas* spp. as foodborne pathogens. ISBN 91-576-5114-0