

Salmonella typhi ve İnsan Makrofaj Etkileşimlerinin Live/Dead BacLight™ Boyama Yöntemi ile Gösterilmesi(*)

Bora EKİNCİ(**), Ahmet Yılmaz ÇOBAN(**), Belma DURUPINAR(**)

ÖZET

Birçok mikroorganizmanın neden olduğu infeksiyonlarda bakteriyel patojenlerle konak makrofajları arasında ilişki vardır. Mononükleer fagositler hücreler hücre içi infeksiyon oluşturan organizmalara karşı aktif etkin hücrelerdir ve bu infeksiyöz ajanları oksijen bağımlı ve bağımsız yollarla öldürürler. İnfeksiyon esnasında konak makrofajları ve bakteriyel patojenler arasında kompleks ve dinamik bir ilişki söz konusudur. Makrofajlar içindeki bakteriyel yaşamı inceleyen birçok çalışmada toplam popülasyondaki canlılık incelenir ve canlılıktan ziyade aynı ortamda beraber bulunan fakat gözardı edilen canlı ve ölü bakteriler hep biraradadır. Bu sonuçlar sıklıkla infeksiyon dinamiğini tam olarak yansıtmaz.

Çalışmamızda insan monosit kökenli makrofajlar iki adet Salmonella typhi suşu ile 10 bakteriye 1 makrofaj olacak şekilde infekte edilmiştir. Örnekler hem kültür hem de canlı ve ölü bakterilerin mikroskopik olarak ayırımını sağlayan LIVE/DEAD BacLight™ boyama yöntemi ile incelenmiştir. Çalışmamızda yirmidört saatin sonunda klinik suşun, standart suşa oranla makrofajların etkisine daha dirençli olduğu saptanmıştır. BacLight™ boyama yöntemi makrofajların bakterisidal etkilerini direkt olarak görmemize olanak sağlamıştır.

Anahtar Kelimeler: BacLight Boyama Yöntemi, Salmonella typhi, Makrofaj

GİRİŞ

Mikroorganizmaların neden olduğu infeksiyonlarda bakteriyel patojenler ve konak makrofajları arasında etkileşim söz konusudur (1). Salmonella typhi'nin neden olduğu infeksiyonun patogeneğinde, bakterinin barsak mukozasını geçerek makrofajlar içerisinde de yaşamını sürdürebilmesi önemlidir (2). Mononükleer fagositler, hücre içi infeksiyon oluşturan or-

SUMMARY

Estimating of Interactions Between Salmonella typhi and Human Monocyte Derived Macrophages by Using Live/Dead BacLight™ Staining System

Each infections caused by sorts of microorganisms, there is a relationship between bacterial pathogens and host macrophages. Mononuclear phagocytes are active effector cells to intracellular infectious organisms and they kill those infectious agents by both oxygen dependent and independent pathways. During the infection there is a complex and dynamic interaction between host macrophages and bacterial pathogens. The majority of studies examining bacterial survival within macrophages, have measured viability of the total bacterial population and instead of viability, dead and live bacteria, which are being together have been overlooked. These results often give an incomplete picture of the dynamics of the infection.

In our study, human monocyte derived macrophages were infected by two S. typhi strains at a cell ratio of 10 bacteria per one macrophage. Specimens were examined by both culture and LIVE/DEAD BacLight™ staining system which allow us to see dead and live bacteria directly. At the end of 24 hours it was found that clinical strain was more resistant than standard strain to the effect of macrophages. With BacLight™ stain it was possible for us to observe bactericidal effects of macrophages.

Key Words: BacLight™ staining system, Salmonella typhi, Macrophages.

ganizmalara karşı etkin olan efektör hücrelerdir. Makrofajlar infeksiyon etkenlerini oksijene bağımlı ve oksijene bağımsız yollarla öldürürler (3,4,5).

Konak makrofajları ve bakteriyel patojenler arasında infeksiyon süresince kompleks ve dinamik bir ilişki vardır. Makrofajlar ve bakterilerin birarada bulunduğu ortamlarda fagosite edilmiş ölü bakteriler yanında fagosite olmamış veya makrofajlar içinde üremelerini sürdüren canlı bakteriler de bulunmaktadır. Makrofaj-bakteri ilişkilerini araştırılmasına yönelik çalışmalarda bakteri popülasyonundaki canlı/ölü bakterilerin birlikteliği gözardı edilmekte ve bakteri sayısı

(*) 9. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi (3-8 Ekim 1999, Antalya)'nde sunulmuştur,

(**) Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun.

populasyondaki tüm canlı bakteri sayısı olarak ifade edilmektedir (1). Dolayısıyla canlı/ölü ayırımının yapılmadığı bu gibi sonuçlar infeksiyon dinamiğini tam olarak yansıtmamaktadır.

Çalışmada S.typhi ve insan makrofaj etkileşimleri canlı ve ölü bakterilerin floresan mikroskopunda direkt olarak ayırımını sağlayan LIVE/DEAD BacLight™ boyama yöntemi ile araştırılmış ve sonuçlar kültür sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Suşlar:

S.typhi-42 TA(2-1) standart suşu Ankara Refik Saydam Hıfzıssıhha Enstitüsü'nden; klinik izolat, O.M.Ü. Tıp Fakültesi Merkez Lab., Bakteriyoloji Ünitesine gelen gaita örneklerinden elde edilmiştir. Suşlar kullanılmaya kadar %20 gliserollü Brain-Heart Infusion (BHI) (Difco) besiyerinde saklanmıştır. Bakteri sayısı yumuşak agar kat yöntemiyle nutrient agarda saptanmıştır. Çalışmada mililitrede 1×10^6 koloni oluşturan bakteri kullanılmıştır.

İnsan monosit kökenli makrofajlar:

İnsan monosit kökenli makrofajlar; HIV, hepatit ve herhangi bir infeksiyon hikâyesi olmayan kişilerin periferik kanlarından Ficoll-Hypaque density gradient yöntemi ile elde edilmiştir(6,7). Makrofajlar RPMI 1640 + %10 Fetal Calf Serum (FCS)'u (Sigma) içeren hücre kültür kaplarında, 37°C'de, %5'lik CO₂'li nemli ortamda 7-12 gün inkübe edilmiştir. Üç günde bir besiyeri değiştirilmiştir (2,6,8,9).

Makrofajların S.typhi ile infekte edilmesi ve örneklerin alınması

Makrofajlar kültür kaplarından buz soğukluğundaki %0.02 EDTA/PBS'te 10 dk. bekletildikten sonra hücre kazıyıcısı (Costar) yardımı ile ayrılmıştır (7).

Makrofajlar, S.typhi suşları ile muamele edilmeden bir gece önce, 96 kuyucuklu plaklara (Greiner) 10⁴ hücre/kuyucuk olacak şekilde eklenmiştir. Bir gece 37°C'de, %5'lik CO₂'li nemli ortamda inkübe edilmiştir. S.typhi suşları %10 insan serumu içeren ortamda 37°C'de 30 dk. opsonize edilmiştir. Makrofajların bulunduğu ortamdaki besiyeri değiştirildikten sonra her kuyucuğa makrofaj/bakteri 1:10 olacak şekilde S.typhi suşları (105 bakteri/kuyucuk) eklenmiş-

tir. Plak 200 rpm'de 5 dk rotatorda homojen dağılım için çevrildikten sonra, fagositoz için 37°C'de, %5'lik CO₂'li nemli ortamda 30 dk. inkübe edilmiştir. Kuyucuklar fagosite olmayan bakterilerin uzaklaştırılması için PBS ile yıkanmıştır (1,5,6,9,10). Örnekler 0, 3, 6 ve 24. saatlerde alınmıştır.

Örneklerin alınma işleminde besiyerleri uzaklaştırarak, %0.5'lik sodyum deoksikolat (Sigma) eklenmiştir (1,4,9). Alınan örneklerin 100 µl'si yumuşak agar kat yöntemi ile kültüre alınmıştır(11). BacLight™ boyama işlemi için örnekler 10000X g'de 5 dk. santrifujde çevrilerek besiyeri uzaklaştırılmıştır. Pellet 0.22 µm porlu membran filtreden filtre edilmiş deiyonize steril suda suspanse edilmiştir. Suspansiyon 1 ml bakteri suspansiyonu / 3µl BacLight™ boya karışımı ile karıştırılarak 15 dk. oda ısısında inkübe edilmiştir ve floresan mikroskopunda incelenmiştir.

LIVE/DEAD BacLight™ boyama yöntemi

Çalışmada BacLight™ boyası Molecular Probes Inc., Oregon, A.B.D. firmasından sağlanmıştır.

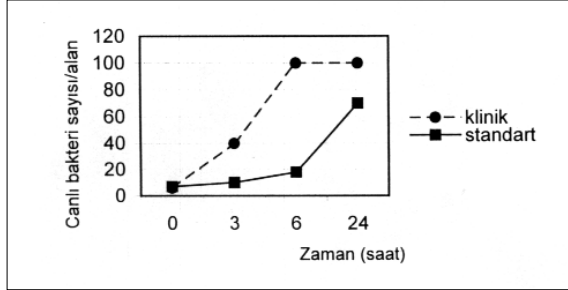
BacLight™ boyası canlı ve ölü bakterilerin floresan mikroskobu ile direkt olarak ayırımını sağlayan, SYTO 9® ve Propidyum iodid boyalarından oluşan iki komponentli floresan bir boyadır. SYTO 9® boyası ortamdaki tüm bakterileri yeşil renge boyayarak, canlı bakterilerin yeşil olarak gözlenmesine olanak verir. Propidyum iodid boyası ise, hücre membranı zarar görmüş olan bakterileri boyayan, daha önceden SYTO 9® boyası ile boyanmış ölü bakterilerdeki SYTO 9® etkisini redükte eden ve kırmızı olarak gözlenmelerini sağlayan boyadır.

BULGULAR

Çalışmada makrofajların canlılıkları tripan mavisi ile >%90 olarak bulundu. Makrofajlar tarafından fagositoz sonrası bakterilerin 0, 3, 6 ve 24. saatlerdeki gelişim dinamikleri BacLight™ boyama yöntemi ile saptanmıştır ve sonuçlar Tablo 1 ve Şekil 1'de sunulmuştur.

Makrofajların S.typhi suşlarına zamana göre etkileri Tablo 2'de sunulmuştur.

S.typhi klinik suşunun makrofaj etkisine daha dirençli ve standart suşa göre üremesinin daha hızlı olduğu gözlenmiştir. Makrofajların zamana göre hücre içi öldürme oranlarının, klinik suşa azaldığı, standart suşa ise arttığı belirlenmiştir. Yirmidördüncü

Şekil 1. Makrofaj içeren ortamda *S. typhi* suşlarının üremelerinin zamana göre değişimiTablo 1. Makrofajlı ortamda *S.typhi* suşlarının üreme oranları

Zaman (saat)	Klinik suş		Standart Suş	
	Kültür(n)	Boya(ö/c)	Kültür(n)	Boya(ö/c)
0	1x10 ⁴	1/6	1x10 ⁴	1/7
3	1x10 ⁵	20/40	1x10 ⁵	2/10
6	1x10 ⁶	25/100	4x10 ⁶	25/18
24	1x10 ⁷	11/100*	1x10 ⁷	30/70

n: Koloni oluşturan bakteri(kob),ö:Ölü bakteri sayısı,c:Canlı bakteri sayısı

Tablo 2. Makrofajların *S.typhi* suşlarına etkileri

Zaman (saat)	Klinik suş		Standart Suş	
	n	(%)	n	(%)
0	1	(14)	1	(12.5)
3	20	(33)	2	(16.6)
6	25	(20)	25	(58)
24	11	(10)	30	(30)

n:Bakteri popülasyonunda BacLight™ boyama yöntemi ile saptanan ölü bakteri sayısı

saatin sonunda klinik suşun makrofajların etkisine daha dirençli olduğu saptanmıştır.

TARTIŞMA

Fakültatif hücre içi patojeni olan *S.typhi*'nin neden olduğu tifo birçok ülkede sorun olmayı sürdürmektedir. *S.typhi*'nin konağa girdikten sonra yayılarak infeksiyon oluşturabilmesi için önce makrofajları infekte etmesi gerekmektedir. Makrofajlara girdiğinde ise makrofajın lizozomal enzimleri ve sentezlediği ürünlerin oluşturduğu etkilerden kendini koruyabilmelidir (12). Hücre içinde yaşayan *S.typhi*'nin virülans özelliğini sağlayan ve hücre içi yaşamını etkileyen yirmiden fazla gen olduğu bildirilmiştir (4).

Makrofaj- hücre içi patojeni arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalarda, toplam canlı bakteri sayısı, dilüsyon ve ekim, kemilüminesans, tetrazolyum redüksi-

yonu optik yoğunluk gibi birçok yöntem kullanılmaktadır (5). Bu çalışmada canlı ve ölü bakterilerin mikroskopik olarak ayırımını sağlayan BacLight™ boyama yöntemi kullanılmıştır. Çalışmada örneklerin homojen olarak yayılamaması nedeni ile mililitredeki bakteri sayısı saptanamamıştır. Ancak kültür yöntemi ile saptanamayan bakterileri, boyama sonucunda direkt olarak görmek olanaklı olmuştur. Makrofaj- *S.typhi* etkileşiminin zamana göre dinamiği her bir alanda saptanan ortalama canlı bakteri sayısı esas alınarak bulunmuştur. Klasik yöntemler ile makrofaj veya çevre etmenleri ile ölen bakterileri saptamak olanaksızdır. Çalışmamızda koloni oluşturan bakteri sayısının düşük olduğu durumlarda kültürde üreme saptanmamasına karşın, BacLight™ boyası ile canlı bakteriler gözlenebilmişlerdir. Ek olarak BacLight™ boyama yöntemi ile makrofajların bakterisidal etkileri de anlaşılmıştır.

Sonuç

BacLight™ boyama yönteminin özellikle hücre içi infeksiyon oluşturan veya hücre kültür ortamlarında mikroorganizmalar ile yapılan benzer çalışmalarda canlı ve ölü bakterilerin birarada gözlenmesine olanak veren yeni bir yöntem olarak önerilebileceği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Buchmeier NA, Libby SJ: Dynamic of growth and death within a Salmonella typhimurium and population during infection of macrophages, Can J Microbiol 43: 29 (1997).
2. Sizemore DR, Elsinghorst EA, Eck LC, Branstorm AA, Hoover DL, Warren RL, Rubin FA: Interaction of Sallmonella typhi Strains with Cultured Human Monocyte-Derived Macrophages, Infect Immun 65: 309 (1997).
3. Arias M, Rojas M, Zabaleta J, Rodriguez JI, Paris SC, Barrera LF, Garcia LF: Inhibition of Virulent Mycobacterium tuberculosis by Bcg^r and Bcg^s Macrophages Correlates with Nitric Oxide Production, J Infect Dis 176: 1552 (1997).
4. Fields PI, Swanson RV, Haidaris CG, Heffron F: Mutants of Salmonella typhimurium that cannot survive within the macrophage are evirulent, Proceeding of National Academy Science USA 83: 5189 (1986).
5. Shiloh MU, Ruan J, Nathan C: Evaluation of bacterial survival and phagocyte function with a fluorescence-based microplate assay, Infect Immun 65: 3193 (1997).
6. Chang HR, Vladoianu IR, Pechere JC: Effects of Ampicillin, Ceftriaxone, Pefloxacin, and Trimethoprim-sulphamethoxazole on Salmonella typhi within human mo-

nocyte-derived macrophages, J Antimicrob Chemother 26: 689 (1990).

7. Coligan JE, Kruisbeek AM, Morgulies DH, Schevach EM, Strober: Current protocols in immunology, W. John Wiley & Sons Inc., USA (1994).

8. Balland O, Pinto-Alphandry H, Viron A, Puvion E, Andreumont A, Couvreur P: Intracellular distribution of ampicillin in murine macrophages infected with salmonella typhimurium and treated with (³H) ampicillin-loaded nanoparticles, J Antimicrob Chemother 37: 105 (1996).

9. Buchmeier NA, Heffron F: Intracellular survival of wild-type Salmonella typhimurium and macrophage-sen-

sitive mutants in diverse populations of macrophages, infect immun 57: 1 (1989).

10. Horne SM, Kottom TJ, Nolan LK, Young KD: Decreased intracellular survival of an fkpA mutant of Salmonella typhimurium copenhagen, infect Immun 65: 806 (1997).

11. Bilgehan H: Klinik Mikrobiyolojik Tanı, 2. Baskı, Barış Yayınları, İzmir (1995).

12. Buchmeier NA, Heffron F: Induction of Salmonella stress proteins upon infection of macrophages, science 248: 730 (1990).