

# Salmonella Typhi Ve İnsan Makrofaj Etkileşimlerinin Lyve/Dead BacLight Boyama Yöntemi İle Gösterilmesi (\*)

Bora EKİNCİ(\*\*), Selma DURUPINAR(\*\*)

## ÖZET

Birçok hücre içi 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 canlılığı incelerler 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 hemde canlı ve ölü bakterilerin görsel olarak ayırımını sağlayan LIVE/DEAD BacLight boyama yöntemi ile incelenmiştir. 24 saatin sonunda klinik suşun, standart suşa oranla makrofajların etkisine daha dirençli olduğu saptanmıştır. BacLight boyama yöntemi makrofajların bakterisidal etkilerini direk 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 içerisine

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

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

## SUMMARY

Estimating Of Interactions Between Salmonella Typhi And Human Monocyte Derived Macrophages By Using BacLight Staining System

Such infections caused by sorts of intracellular 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 Salmonella typhi strains at a cell ratio of 10 bacteria per one macrophage (10:1). 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. With BacLight stain it was possible for us to observe bactericidal effects of macrophages.

Key Words: Macrophage, BacLight staining system, Salmonella typhi.

de de yaşamını sürdürebilmesi önemlidir (2). Mononükleer fagositler, hücre içi infeksiyon oluşturan organizmalara 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 popülasyondaki 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.

## MATERYAL VE METOD

**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 edildi. Suşlar kullanılmaya kadar %20 gliserollü Brain-Heart Infusion (BHI) (Difco) besiyerinde saklandı. Bakteri sayısı yumuşak agar kat yöntemiyle nutrient agarda saptandı. Çalışmada mililitrede 1 X 10<sup>6</sup> koloni oluşturan bakteri (kob) kullanıldı.

**İnsan Monosit Kökenli Makrofajlar:** İnsan monosit kökenli makrofajlar; HIV, Hepatit ve herhangi bir infeksiyon hikayesi olmayan kişilerin periferik kanlarından Ficoll-Hypaque density gradient yöntemi ile elde edildi (6,7). Makrofajlar RPMI 1640 + %10 Fetal Calf Serum (FCS)'u (Sigma) içeren hücre kültür kaplarında, 37C'de, %5'lik CO<sub>2</sub>'li nemli ortamda 7- 12 gün inkübe edildi. Üç günde bir besiyeri değiştirildi (2,6,8,9).

**Makrofajların S.typhi ile İnfekte Edilmesi ve Örneklerin Alınması:** Makrofajlar kültür kaplarından buz soğukluğundaki %0.02 EDTA/PBS'te 10 dakika bekletildikten sonra hücre kazıyıcısı (Costar) yardımı ile ayrıldı (7).

Makrofajlar, S.typhi suşları ile muamele edilmeden bir gece önce, 96 kuyucuklu plaklara (Greiner) 104 hücre/kuyucuk olacak şekilde eklendi. Bir gece 37C'de, %5'lik CO<sub>2</sub>'li nemli ortamda inkübe edildi.

S.typhi suşları %10 insan serumu içeren ortamda 37°C'de 30 dakika opsonize edildi. Makrofajların bulunduğu ortamdaki besiyeri değiştirildikten sonra her kuyucuğa makrofaj/bakteri 1:10 olacak şekilde S.typhi suşları (105 bakteri/kuyucuk) eklendi. Plak 200 rpm'de 5 dk rotatorda homojen yayılım için çevrildikten sonra, fagositoz için 37C'de, %5'lik CO<sub>2</sub>'li nemli ortamda 30 dak. inkübe edildi. Kuyucuklar fagosite olmayan bakterilerin uzaklaştırılması için PBS ile yıkandı (1,5,6,9,10). Örnekler 0, 3, 6 ve 24. saatlerde alındı.

Örneklerin alınma işleminde besiyerleri uzaklaştırılarak, %0.5'lik sodyum deoksikolat (Sigma) eklendi (1,4,9). Alınan örneklerin 100 l'si yumuşak agar kat yöntemi ile kültüre alındı (11). BacLight boyama işlemi için örnekler 10000 X g'de 5 dak santrifuj edilerek besiyeri uzaklaştırıldı. Pellet 0.22 m porlu membran filtreden filtre edilmiş deiyonize steril suda suspanse edildi. Suspansiyon 1ml bakteri suspansiyonu / 3l BacLight boya karışımı ile karıştırılarak 15 dk oda ısısında inkübe edildi ve floresan mikroskopta incelendi.

## LIVE/DEAD BacLight Boyama Yöntemi

Çalışmada BacLight boyası Molecular Probes Inc., Oregon, A.B.D. firmasyndan sağlandı.

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 trypan mavisi ile >%90 olarak bulundu. Makrofajlar tarafından fagositoz sonrası bakterilerin 0, 3, 6 ve 24. saatlerdeki gelişim dinamikleri BacLight boyama yöntemi ile saptandı ve sonuçlar Tablo1 ve şekil 1' de sunuldu.

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

BacLight boyası ile bakteri popülasyonundaki canlı ve ölü bakterilerin birarada saptandığı örnekler Resim 1’de sunulmuştur.

S.typhi klinik suşunun makrofaj etkisine daha dirençli ve standart suşa göre üremesinin daha hızlı olduğu gözlemlendi. Makrofajların zamana göre hücre içi öldürme oranlarının, klinik suşta azaldığı, standart suşta ise arttığı görüldü. 24. saatin sonunda klinik suşun makrofajların etkisine daha dirençli olduğu saptandı.

## TARTIŞMA

Hücre içi patojeni olan S.typhi’nin neden olduğu tifo

**Tablo 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            | 1x104      | 1/6                 | 1x104        | 1/7        |
| 3            | 1x105      | 20/40               | 1x105        | 2/10       |
| 6            | 1x106      | 25/100              | 4x105        | 25/18      |
| 24           | 1x107      | 11/100 <sup>a</sup> | 1x106        | 30/70      |

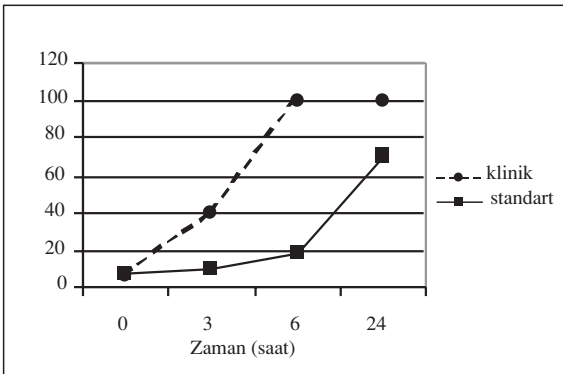
n: koloni oluşturan bakteri (kob), ö: Ölü bakteri sayısı, c: Canlı bakteri sayısı

**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

**Şekil 1: Makrofaj içeren ortamda S.typhi suşlarının üremelerinin zamana göre değişimi**



birçok ülkede sorun olmayı sürdürmektedir. S.typhi’nin konağa girdikten sonra yayılarak infeksiyon oluşturabilmesi için, önce makrofajlara infekte etmesi gerekmektedir. Makrofajlara invaziv olduğunda ise makrofajın lizozomal enzimleri ve sentezlediği ürünlerin oluşturduğu etkilerden kendini koruyabilmelidir (12). Hücre içinde yaşayan S.typhi’nin virulans özelliğini sağlayan ve hücre içi yaşamını etkileyen 20’den fazla genin rol aldığı bildirilmiştir (4).

Makrofaj- hücre içi patojeni arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalarda; toplam canlı bakteri sayısı, dilüsyon ve ekim, kemilüminesans, tetrazolyum redüksiyon, optik yoğunluk gibi birçok yöntemler kullanılmaktadır (5). Bu çalışmada canlı ve ölü bakterilerin görsel 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 saptanamamasına karşın, BacLight boyası ile canlı bakteriler gözlemlenmişlerdir. 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: Dynamics of growth and death within a Salmonella typhimurium and population during infection of macrophages, Can J Microb 43:29 (1997).
2. Sizemore DR, Elsinghorst EA, Eck LC, Branstorm

- AA, Hoover DL, Warren RL, Rubin FA:** Interaction of *Salmonella typhi* Strains with Cultured Human Monocyte-Derived Macrophages, *Infect Immun* 65(1):309 (1997).
- 3. Arias M, Rojas M, Zabaleta J, Rodriguez JI, Paris SC, Barrera LF, Garcia LF:** Inhibition of Virulent Mycobacterium tuberculosis by Bcgr and Bcgs 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 avirulent, *Proc Natl Acad Sci 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(8):3193 (1997).
- 6. Chang HR, Vladoianu IR, Pechere JC:** Effects of Ampicillin, Ceftriaxone, Pefloxacin, and Trimethoprim-Sulphamethoxazole on *Salmonella typhi* within Human Monocyte-Derived Macrophages, *J Antimicrob Chemother* 26:689 (1990).
- 7. Coligan JE, Kruisbeek AM, Morgulies DH, Schevach EM, Strober:** *Current Protocols in Immunology*, sect.7.0-7.5 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 Wilde-Type *Salmonella typhimurium* and Macrophage-Sensitive Mutants in Diverse Populations of Macrophages, *Infect Immun* 57(1):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(2):806 (1997).
- 11. Bilgehan H:** *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*, s.133 2. Baskı, Barış Yayınları, İzmir (1995).
- 12. Buchmeier NA, Heffron F:** Induction of *Salmonella* Stress Proteins upon Infection of Macrophages, *Science* 248:730 (1990).