

## PIERWOTNIAKI JAKO REZERWUARY CHOROBOTWÓRCZYCH DLA CZŁOWIEKA BAKTERII

JAN KOŁODYŃSKI

Zakład Mikrobiologii Ogólnej Instytutu Mikrobiologii  
51-148 Wrocław, ul. Przybyszewskiego 63

### PROTOZOA AS RESERVOIRS FOR HUMAN BACTERIAL PATHOGENS

**Abstract.** The ability of bacterial pathogens to survive within the human host cells results from their evolutionary adaptation of which the most important stage could be the development of parasitic relations between bacteria and free-living protozoa. This paper shows the bacterial species, pathogenic for man, surviving in protozoans cells.

### WSTĘP

Żyjące w środowisku naturalnym bakterie stanowią główne źródło pokarmu dla pierwotniaków. Z tego, prawdopodobnie najstarszego ewolucyjnie układu „predator-ofiara”, uwolniły się gatunki bakterii, którym udało się rozwinąć mechanizmy ochrony przed sfagocytowaniem, lub mechanizmy blokujące procesy zabijania i trawienia po wchłonięciu przez komórkę pierwotniaka. Ten drugi sposób mógł prowadzić do rozwoju mniej lub bardziej złożonych układów „żywiciel-pasożyt”.

Niektóre populacje bakterii potrafiły wykorzystać dostęp do bogatego i bezpiecznego wewnątrzkomórkowego środowiska dla własnej, korzystnej w skali gatunku reprodukcji, inne jedynie do, ograniczonej w czasie, ochrony przed skutkami oddziaływań szkodliwych czynników z zewnętrznego środowiska.

Przetrwanie radykalnej zmiany otoczenia, którą przechodzą bytujące w komórkach pierwotniaków bakterie po zakażeniu nimi komórek stałocięplnego gospodarza, wymaga posiadania sprawnych mechanizmów adaptacyjnych. Przypuszczalnie zdolności opanowywania komórek ssaków rozwinęły się w trakcie długiego okresu dostosowywania się do współewolucji między bakteriami a pierwotniakami.

Inaczej mówiąc, inwazja patogennego drobnoustroju do wnętrza komórki kręgowca jest „powtórzeniem” na wyższym ewolucyjnie poziomie sytuacji, z jaką zetknęły się już poprzednio chorobotwórcze, np. dla człowieka, bakterie pasożytując najpierw w komórkach wolno żyjących pierwotniaków.

Wykorzystanie przez pasożytnicze drobnoustroje tej samej strategii w nowych warunkach pozwala na uniknięcie ataku nieswoistych i swoistych mechanizmów obronnych organizmu, zapewnia dostęp do nowego, bogatego w czynniki odżywcze środowiska, a często ułatwia rozprzestrzenianie się chorobotwórczych bakterii w organizmie zakażonego osobnika.

Wymienione tu korzyści, podobnie jak w przypadku bakterii wodnych czy glebowych, zdolnych do przeżywania w komórkach wolno żyjących pierwotniaków, zwiększają istotnie prawdopodobieństwo osiągnięcia sukcesu w sensie ekologicznym, to znaczy dalszego przetrwania gatunku.

Zainicjowane w latach siedemdziesiątych badania nad biologią *Legionella pneumophila*, jako etiologicznego czynnika nieznaney wcześniej choroby legionistów, której pierwsza epidemia dotknęła uczestników dorocznego konwentu Legionu Amerykańskiego w Filadelfii w r. 1976 (FRASHER i wsp. 1977), zwróciły uwagę na możliwość wykorzystania wodnych i glebowych Protozoa jako rezerwuarów chorobotwórczych dla człowieka gatunków bakterii (ROWBOTHAM 1980).

#### Występowanie chorobotwórczych gatunków bakterii w komórkach żyjących w naturze pierwotniaków

Bakterie, zdolne do wewnątrzkomórkowego pasożytnictwa, można podzielić na gatunki powodujące lizę komórki gospodarza w wyniku namnożenia się w jej wnętrzu, gatunki mnożące się bez wywołania lizy oraz gatunki tam przeżywające bez możliwości wewnątrzkomórkowych podziałów.

*Legionella pneumophila* – pałeczki, które po namnożeniu się w makrofagach organizmu człowieka, powodują ostre, odoskrzelowe, nietypowe zapalenie płuc określane jako legionelloza (HACKER i wsp. 1991), wyizolowano z kilku gatunków pierwotniaków rozpowszechnionych w wodzie i glebie. Były to głównie pełzaki z rodzajów *Hartmannella*, *Acanthamoeba* i *Naegleria* (ANAND i wsp. 1983, FIELDS i wsp. 1989, BARKER i wsp. 1992) oraz orzęski z rodzaju *Tetrahymena* (FIELDS i wsp. 1984).

Po wchłonięciu przez pierwotniaka bakterie te hamują fuzję fagocytosomu z lizosomami uniemożliwiając rozpoczęcie procesu wewnątrzkomórkowego trawienia. Zwykle po 36–48 godz. większą część komórki pierwotniaka wypełnia cytosom zawierający około  $10^4$  zdolnych do ruchu komórek bakterii. Końcowym etapem infekcji jest liza komórki gospodarza, prowadząca do uwolnienia nowych generacji *L. pneumophila* (ROWBOTHAM 1993). Stwierdzenie w cytoplazmie wolno żyjących pełzaków obecności bakterii określanych jako LLAP (legionella-like amoebal pathogens) niezdolnych do wzrostu na mikrobiologicznych podłożach hodowlanych, wskazuje na możliwość zróżnicowania *Legionella* na względne i bezwzględne wewnątrzkomórkowe pasożyty. Bakterie te mogą powodować bezobjawowe, wykrywalne serologicznie, zakażenia u człowieka (ROWBOTHAM 1993).

*Listeria monocytogenes* – pałeczki, które u człowieka mogą wywoływać posocznicę, zapalenie opon mózgowych oraz okołoporodową listeriozę, są zdolne do zainfekowania makrofagów jak i innych, nefagocytarnych komórek tkanek gospodarza (GOEBEL i wsp. 1991). W środowisku zewnętrznym może zakażać pełzaki z rodzajów *Acanthamoeba* i *Tetrahymena* (LY i MÜLLER 1990a). Bezpośrednio po wchłonięciu przez pierwotniaka bakteria uwalnia się z fagocytarnej wakuoli i przenika do cytoplazmy, w której mnoży się aż do spowodowania lizy komórki gospodarza (LY i MÜLLER 1990b).

*Vibrio cholerae* – dobrze znany gatunek przecinkowców chorobotwórczych dla człowieka, reprezentuje drugą grupę wymienionych na początku względnych wewnątrzkomórkowych pasożytów. Przecinkowce cholery mogą ulegać namnożeniu po sfagocytowaniu przez pierwotniaki z rodzajów *Naegleria* i *Acanthamoeba*, jednak nie powodują lizy komórki gospodarza. Żywe bakterie udało się wyizolować zarówno z hodowli komórek wegetatywnych jak i form przetrwalnikowych pełzaka (THOM i wsp. 1992).

Prawdopodobnie do tej samej grupy, mnożących się bez niszczenia komórki gospodarza, wewnątrzkomórkowych pasożytów, zaliczyć można chorobotwórcze dla wodnych kręgowców gatunki pałeczek, jak *Edwardsiella tarda* i *Aeromonas salmonicida* (KING i SHOTTS 1988a).

*Mycobacterium leprae* – chorobotwórcze dla człowieka prątki trądu, jak i inne oportunistyczne gatunki prątków, np. *M. avium*, znaleziono w komórkach pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba*. Pasożyty te są zdolne do długotrwałego przeżywania w komórkach pierwotniaków, o czym może świadczyć stwierdzenie ich obecności także w komórkach potomnych (JADIN 1975, KRISHNA-PRASAD i GUPTA 1978).

Niedawno potwierdzono możliwość wewnątrzkomórkowego bytowania heterotroficznych środowiskowych gatunków bakterii z rodzajów *Pseudomonas* i *Alcaligenes*, które wyizolowano z wegetatywnych i przetrwalnikowych form *Hartmannella* (TYNDALL i wsp. 1991).

Jak dotąd brak danych potwierdzających pasożytnictwo w pierwotniakach bytujących w środowisku zewnętrznym przedstawicieli chorobotwórczych dla człowieka bakterii jelitowych, których patogenność wynika ze zdolności do wnikania i namnażania się w komórkach narządów wewnętrznych człowieka (WILLIAMS i wsp. 1988, HOF 1991a). Na możliwość taką wskazują jednak prowadzone *in vitro* badania przeżywalności pałeczek *Salmonella typhimurium* i *Shigella sonnei* w laboratoryjnych hodowlach *Acanthamoeba castellanii* i *Tetrahymena pyriformis* (KING i wsp. 1988).

#### Rola pierwotniaków w przetrwaniu chorobotwórczych bakterii w środowisku naturalnym

Przedstawione przykłady wskazują, że pierwotniaki, których obecność w naturalnym środowisku w znacznym stopniu ogranicza liczebność populacji bakterii, mogą też ułatwiać przeżywalność chorobotwórczych dla człowieka

szczepów, stanowiąc ich naturalny rezerwuuar. Szczególną ochronę zapewniają bakteriom pierwotniaki wytwarzające, charakterystyczne dla danego gatunku, formy przetrwalnikowe (BARKER i BROWN 1994).

Badania ilościowe zawartości *Legionella* w biologicznych systemach oczyszczania ścieków nie wykazały redukcji ich liczebności, ani w wyniku pierwotnych, ani wtórnych procesów oczyszczania (PALMER i wsp. 1993). Brak skuteczności konwencjonalnych metod dezynfekcji ścieków komunalnych można tłumaczyć obecnością znacznych ilości żywych bakterii w cystach pełzaków. Wykazano też, że przebywające tam bakterie są skutecznie chronione przed zmianami temperatury (CHANG 1978), skutkami chlorowania wody (KILVINGTON i PRICE 1990), działaniem detergentów i wielu spośród biocydów stosowanych do odkażania ścieków (KILVINGTON 1990).

Zdolność do okresowego przebywania bakterii we wnętrzu form przetrwalnikowych umożliwia ponadto kolonizację nowych, często odległych terenów w wyniku przestrzennej propagacji cyst z wiatrem lub wodą (KINGSTON i WARHURST 1969).

Rozwój bakterii w komórkach pierwotniaków może wpływać modyfikująco na ich fizjologiczne właściwości. Wyizolowane z *Acanthamoeba* szczepy *L. pneumophila* charakteryzowały się istotnie wyższym poziomem oporności na działanie testowanych biocydów oraz wyraźnie przedłużonym okresem przeżywalności w porównaniu do pochodzących z laboratoryjnych hodowli szczepów tego samego gatunku bakterii (BARKER i wsp. 1992).

#### Wewnątrzkomórkowa przeżywalność bakterii

Opisywane tu względne wewnątrzkomórkowe pasożyty zdolne do przeżywania zarówno w komórkach pierwotniaków wyspecjalizowanych w niszczeniu bakterii, jak i w komórkach układu odpornościowego organizmu człowieka, muszą dysponować wyjątkowo sprawnym systemem regulacyjno-adaptacyjnym umożliwiającym szybkie zmiany metabolizmu w odpowiedzi na tak gwałtowne zmiany środowiska.

Wyniki badań mechanizmów molekularnych i genetycznych podstaw procesów wewnątrzkomórkowej przeżywalności i zjadliwości chorobotwórczych dla człowieka bakterii, takich jak *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* czy *Brucella* zostały przedstawione w wielu, godnych polecenia, pracach przeglądowych (WILLIAMS i wsp. 1988, FINLAY i FALKOW 1989, MAURELLI 1989, BRUNHAM i wsp. 1993), brak jednak podobnych opracowań na temat mechanizmów regulacyjnych na poziomie bakteria/pierwotniak. Z prowadzonych w ostatnich latach badań wynika, że sygnałem do regulacji zdolności adaptacyjnych, jak i zjadliwości szczepów bakterii w środowisku oraz w organizmie człowieka, może być zmiana temperatury otoczenia (MAURELLI 1989). W wyniku obniżenia temperatury obecna w komórce pierwotniaka *L. pneumophila* staje się zwykłym, podlegającym strawieniu pokarmem (ANAND i wsp. 1983).

Zjadliwe w testach *in vivo*, hodowane w 37°C szczepy *L. pneumophila*, tracą zdolności chorobotwórcze po obniżeniu do 24°C temperatury ich hodowli (MAUCHLINE i wsp. 1993).

Już sam przebieg endocytozy może decydować o powodzeniu wewnątrzkomórkowej infekcji, np. dodatek metylaminy (która hamuje proces adsorpcyjnej pinocytozy) do hodowli *L. pneumophila* uniemożliwia ich wchłanianie przez *Hartmannella*, natomiast dodatek cytocholazy D (która blokuje wytwarzanie mikrofilamentów) nie wstrzymuje wchłaniania bakterii do wnętrza komórki pełzaka (KING i wsp. 1991).

Cytologiczne badania ultrastruktury zakażonych pierwotniaków wskazują na możliwość szybkiego połączenia endosomów zawierających bakterie z retikulum endoplazmatycznym komórki gospodarza, co daje szansę bezpiecznego wewnątrzkomórkowego mnożenia się pasożytów (FIELDS 1993). Analogiczne badania nad endocytozą wewnątrzkomórkowych pasożytów człowieka, np. należących do gatunków z rodzaju *Brucella*, wykazały, że one również mnożą się we wnętrzu endoplazmatycznego retikulum, co chroni komórki bakterii przed działaniem lizosomalnych enzymów (DETILLEUX i wsp. 1990).

Na podstawie wyników rozwijających się dopiero badań nad współzależnościami na poziomie bakteria/pierwotniak, trudno określić wzajemną rolę gospodarza i pasożyta w rozwoju strategii inwazyjnych czy mechanizmów zjadliwości dla człowieka. Nie podlega jednak dyskusji epidemiologiczna rola pierwotniaków jako rezerwuaru etiologicznych czynników infekcji czy wektorów w rozprzestrzenianiu się, przynajmniej niektórych, chorób zakaźnych. Wiadomo też, że leczenie chorób powodowanych przez bytujące w komórkach gospodarza pasożytnicze bakterie stwarza wiele poważnych i trudnych do przezwyciężenia medyczno-terapeutycznych problemów (HOF 1991b).

Można oczekiwać, że dalszy rozwój niedawno zainicjowanych badań nad przeżywalnością bakterii w naturalnym środowisku, umożliwi również postęp w zwalczaniu chorobotwórczych dla człowieka drobnoustrojów, jeszcze przed ich inwazją do wnętrza komórek makroorganizmu.

#### LITERATURA

- ANAND C. M., SKINNER A. R., MALIC A., KURTZ J. B. 1983. Interaction of *Legionella pneumophila* and free living amoebae (*Acanthamoeba palestinensis*) *J. Hyg. (Camb)* 91: 167-178.
- BARKER J., BROWN M. R. W. 1994. Trojan Horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiol.* 140: 1253-1259.
- — COLLIER P. J., FARREL I. D. F., GILBERT P. 1992. Relationship between *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba polyphaga*: physiological status and susceptibility to chemical inactivation. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2420-2425.
- BRUNHAM R. C., PLUMMER F. A., STEPHENS R. S. 1993. Bacterial antigenic variation, host immune response, and pathogen-host coevolution. *Infect. Immun.* 61: 2273-2276.
- CHANG S. L. 1978. Resistance of pathogenic *Naegleria* to some common physical and chemical agents. *Appl. Environ. Microbiol.* 35: 368-375.

- DETILLEUX P. G., DEYOE B. L., CHEVILLE N. F. 1990. Entry and intracellular localization of *Brucella* spp. in Vero cells: fluorescence and electron microscopy. *Vet. Pathol.* 27: 317-328.
- FIELDS B. S. 1993. *Legionella* and protozoa: interaction of a pathogen and its natural host. In: J. M. BARBAREE, R. F. BREIMAN and A. P. DUFOUR [Eds]. *Legionella: Current Status and Emerging Perspectives*. Washington, DC: AM. Soc. Microbiol.: 70-72.
- SANDEN G. N., BARBAREE J. M., MORRIL W. E., WADOWSKY R. M., WHITE E. H., FEELEY J. C. 1989. Intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* in amoebae isolated from hospital hot water tanks. *Curr. Microbiol.* 18: 131-137.
- SHOTTS E. B., FEELEY J. C., GORMAN G. W., MARTIN W. T. 1984. Proliferation of *Legionella pneumophila* as an intracellular parasite of the ciliated protozoan *Tetrahymena pyriformis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 467-471.
- FILNAY B. B., FALKOW S. 1989. Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiol. Rev.* 53: 210-230.
- FRASHER D. W., TSAI T., ORENSTEIN W., PARKIN W. E., BEECHAM H. J., SHARRAR R. G., HARRIS J., MALLISON G. F., MARTIN S. M., MCDADE J. E., SHEPARD C. C., BRANCHMAN P. S. and the Field Investigation TEAM. 1977. Legionnaires' disease: Description of an epidemic of pneumonia. *N. Engl. J. Med.* 297: 1189-1197.
- GOEBEL W., CHAKRABORTY T., DOMANN E., KOHLER S., KUHN M., LEIMEISTER-WACHTER M., SOKOLOVIC Z., WUENSCHAR M. 1991. Studies on the pathogenicity of *Listeria monocytogenes*. *Infect.* 19 (Suppl. 4): S195-S197.
- HACKER J., OTT M., LUDWIG B., RDEST U. 1991. Intracellular survival and expression of virulence determinants of *Legionella pneumophila*. *Ibid.* 19 (Suppl. 4): S198-S201.
- HOF H. 1991a. Intracellular microorganisms: A particular problem for chemotherapy. *Ibid.* 19 (Suppl. 4): S193-S194.
- 1991b. Microbial strategies for intracellular survival. *Ibid.* 19 (Suppl. 4): S202-S205.
- JADIN J. B. 1975. *Amibes limax* vecteurs possible de Mycobacteries et de *M. leprae*. *Acta Leprolog.* 59: 57-67.
- KILVINGTON S. 1990. Activity of water biocide chemicals and contact lens disinfectans on pathogenic free-living amoebae. *Int. Biodeter.* 26: 519-525.
- PRICE J. 1990. Survival of *Legionella pneumophila* within *Acanthamoeba polyphaga* cysts following chloride exposure. *J. Appl. Bacteriol.* 68: 519-525.
- KING C. H., FIELDS B. S., SHOTTS E. B. Jr., WHITE E. H. 1991. Effects of cytochalasin D and methylamine on intracellular growth of *Legionella pneumophila* in amoebae and human monocyte-like cells. *Infect. Immun.* 59: 758-763.
- SHOTTS E. B. Jr. 1988. Enhancement of *Edwardsiella tarda* and *Aeromonas salmonicida* through ingestion by the ciliated protozoan *Tetrahymena pyriformis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 51: 95-100.
- — WOOLEY R. E., PORTER K. G. 1988. Survival of coliforms and bacterial pathogens within protozoa during chlorination. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 3023-3033.
- KINGSTON D., WARHURST D. C. 1969. Isolation of amoebae from the air. *J. Med. Microbiol.* 2: 27-36.
- KRISHNA-PRASAD B. N., GUPTA S. K. 1978. Preliminary report on engulfment and retention of mycobacteria by trophozoites of axenically grown *Acanthamoeba castellanii* Douglas, 1930. *Curr. Sci.* 47: 245-247.
- LY T. M. C., MÜLLER H. E. 1990a. Interactions of *Listeria monocytogenes*, *Listeria seeligeri* and *Listeria innocua* with protozoans. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 36: 143-150.
- — 1990b. Ingested *Listeria monocytogenes* survive and multiply in protozoa. *J. Med. Microbiol.* 33: 51-54.
- MAUCLINE W. S., ARAUJO R., FITZGEORGE R. B., DENNIS P. J., KEEVIL C. W. 1993. Environmental regulation of the virulence and physiology of *Legionella pneumophila*. In: J. M. BARBAREE, R. F. BREIMAN and A. P. DUFOUR [Eds]. *Legionella: Current Status and Emerging Perspectives*. Washington, DC: Am. Soc. Microbiol.: 262-264.

- MAURELLI A. T. 1989. Temperature regulation of virulence genes in pathogenic bacteria: a general strategy for human pathogens? *Microb. Pathogen.* 7: 1-10.
- PALMER C. J., TSAI Y., PASZKO-KOLVA C., MAYER C., SANGERMANO L. R. 1993. Detection of *Legionella* species in sewage and ocean water by polymerase chain reaction, direct fluorescent-antibody, and plate culture methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3618-3624.
- ROWBOTHAM T. J. 1980. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J. Clin. Pathol.* 33: 1179-1183.
- 1986. Current views on the relationship between amoebae, legionellae and man. *Israel. J. Med. Sci.* 22: 678-689.
- 1993. *Legionella*-like amoebal pathogens. In: J. M. BARBAREE, R. F. BREIMAN and A. P. DUFOUR [Eds], Washington, DC: Am. Soc. Microbiol.: 137-140.
- THOM S., WARHURST D., DRASAR B. S. 1992. Association of *Vibrio cholerae* with fresh water amoebae. *J. Med. Microbiol.* 36: 303-306.
- TYNDALL R. L., IRONSIDE K. S., LITTLE C. D., KATZ D., KENNEDY J. R. 1991. Free-living amoebae used to isolate consortia capable of degrading trichloroethylene. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 28/29: 917-925.
- WILLIAMS P. H., ROBERTSON M., HINSON G. 1988. Stages in bacterial invasion. *J. Appl. Bacteriol., Symp. Suppl.* 1988: 131-147.

Otrzymano 10 III 1995, zaakceptowano 15 XI 1995