

21 JUN 2002



**EVIDENCE SUPPORTING CELL-TO-CELL,  
SPREADING OF *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI***

**SIRIPORN RATTANACHETKUL**

With compliments  
of

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFULMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY (ORAL BIOLOGY)**

**FACULTY OF GRADUATE STUDIES**

**MAHIDOL UNIVERSITY**

**2002**

**ISBN 974-04-1251-7**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

TH

S619ev

2002

©.2

4036654 DTOB/D : MAJOR : ORAL BIOLOGY ; Ph.D. (ORAL BIOLOGY)

KEY WORD : CELL-TO-CELL SPREADING/ *BURKHOLDERIA*

*PSEUDOMALLEI*

SIRIPORN RATTANACHETKUL : EVIDENCE SUPPORTING CELL-TO-CELL SPREADING OF *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI*. THESIS ADVISORS : WORANUT WEERAPRADIST, D.D.S., M.Sc., STITAYA SIRISINHA, D.M.D, Ph.D., WORALUK PRACHYABRUED, D.D.S., M.Sc., SUWAN CHOONHARUANGDEJ, B.Sc., Ph.D., 120 P. ISBN 974-04-1215-7

*Burkholderia pseudomallei* is the causative agent of melioidosis, a disease being increasingly recognized as an important cause of morbidity and mortality in many regions of the world. In this study, its ability to invade host cells by cell-to-cell spreading from infected macrophages which were previously infected by this bacterium was demonstrated.

An *in vitro*-infected macrophage (J774A.1) was used as donor and endothelium (ECV304), keratinocyte (HaCaT) and fibroblast (L929) were used as recipients. To test the possibility of a cell-to-cell spreading, donor cells were cocultured with uninfected recipient cells for 4 hours and intracellular bacteria in the coculture were quantitated and compared with those found in the infected macrophages. The number of intracellular bacteria in the infected macrophages was found to be significantly less than the numbers from the cocultures in the presence of recipient. Results from Giemsa's and fluorescent staining showed the areas of infection in the recipient cell monolayer to be initially in the areas where the infected macrophages adhered. The infection spread to other areas with prolonged coculturing. Plaque formation in the recipient cell monolayers was found 24 hours after coculturing with infected macrophages, thus confirming that the process of direct cell-to-cell spreading could occur from one cell type to another.

The data suggests that macrophage-facilitated invasion is an alternative pathway for this organism to spread the infection. Cell fusion did not occur when the spreading occurred between different cell types.

Although the data presented in the present study has provided useful clues and insights leading to the understanding of pathogenesis in this highly fatal infection, the study raises many more questions that need to be answered before a full understanding on the pathogenesis of this disease can be clarified.

4036654 DTOB/D : สาขาวิชา : ชีววิทยาช่องปาก ; ปร.ด. (ชีววิทยาช่องปาก)

ศิริพร รัตนเขตกุล : กลไกการแพร่กระจายเชื้อ *Burkholderia pseudomallei* ไปยังเซลล์ข้างเคียง (EVIDENCE SUPPORTING CELL-TO-CELL SPREADING OF *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI*). คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : วรนิติ วีระประดิษฐ์, ท.บ., M.Sc., สติศย์ สิริสิงห, D.M.D, Ph.D., วรลักษณ์ ปรัชญพฤทธิ, ท.บ., M.Sc., สุวรรณ ชุณหเรืองเดช, วท.บ., Ph.D., 120 หน้า. ISBN 974-04-1215-7

เชื้อ *Burkholderia pseudomallei* เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค melioidosis ซึ่งเป็นโรคที่มีแนวโน้มพบมากขึ้นในหลายแห่งทั่วโลกและเป็นโรคที่มีอัตราการเสียชีวิตสูง การทดลองในห้องปฏิบัติการนี้ ได้แสดงถึงความสามารถของเชื้อในการเข้าสู่เซลล์ปกติโดยการแพร่ผ่านเซลล์เม็ดโครพาจที่มีเชื้อชนิดนี้อยู่ โดยการใช้เซลล์ J774A.1 ที่ติดเชื้อเป็นเซลล์พาหะ (donor) และใช้เซลล์หลอดเลือด (ECV304) เซลล์เคราทีโนไซต์ (HaCaT) และ เซลล์สร้างเส้นใย (L929) เป็นเซลล์รองรับเชื้อ (recipient) ในการทดสอบความเป็นไปได้ของการแพร่เชื้อชนิดนี้ด้วยเซลล์พาหะ จึงนำเซลล์พาหะที่มีเชื้ออยู่มาเลี้ยงในหลุมร่วมกับเซลล์รองรับที่ปราศจากเชื้อเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ทำการนับเชื้อที่อยู่ในหลุมเปรียบเทียบกับหลุมที่มีเซลล์พาหะเพียงอย่างเดียว ผลการทดลองพบว่าจำนวนเชื้อที่อยู่ในเซลล์พาหะน้อยกว่าในหลุมที่มีเซลล์พาหะร่วมกับเซลล์รองรับอย่างมีนัยสำคัญจากการทดลองโดยใช้การย้อมสี Giemsa และสียฟลูออเรสเซนซ์ พบการติดเชื้อในระยะแรกของเซลล์รองรับอยู่ในตำแหน่งเดียวกับที่เซลล์พาหะเกาะติดอยู่ การติดเชื้อจะกระจายทั่วไปในเซลล์รองรับเมื่อเวลาผ่านไปนานขึ้น การทดสอบการเกิดพลาแก (plaque) ในเซลล์รองรับ เพื่อบ่งชี้ว่าการติดเชื้อของเซลล์รองรับมาจากการแพร่เชื้อจากเซลล์พาหะ พบพลาแกเกิดขึ้นในเซลล์รับภายใน 24 ชั่วโมงหลังจากการใส่เซลล์พาหะลงในเซลล์รองรับ เป็นการยืนยันได้ว่าการติดเชื้อในเซลล์รองรับมาจากเชื้อที่มีอยู่ในเซลล์พาหะไม่ได้มาจากเชื้อที่อยู่ภายนอกเซลล์ ข้อมูลที่ได้สนับสนุนว่าเชื้อชนิดนี้สามารถใช้เซลล์เม็ดโครพาจเป็นช่องทางในการแพร่กระจายเชื้อไปยังเซลล์ข้างเคียงได้ และแม้ว่าการเกิดการรวมตัวของเซลล์ (cell fusion) เป็นสิ่งที่เกิดขึ้นในระยะสุดท้ายของเซลล์ที่ติดเชื้อชนิดนี้ แต่การรวมตัวของเซลล์เกิดขึ้นระหว่างเซลล์ชนิดเดียวกันเท่านั้น ไม่เกิดกับเซลล์ต่างชนิดกัน ผลการศึกษาในครั้งนี้ทำให้เกิดความเข้าใจการก่อโรคของเชื้อชนิดนี้ได้บางส่วน ยังมีคำถามอีกมากที่รอคอยคำตอบเพื่อความกระจ่างชัดในแง่ของการก่อโรคของเชื้อชนิดนี้