



UPPSALA  
UNIVERSITET

# Yttre miljöstimuli reglerar virulensen hos *Vibrio cholerae*

En studie av kolerans epidemiologi, mikrobiella  
patogenes och ekologi

Tove Backström

---

Independent Project in Biology  
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, höstterminen 2010  
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

## Innehållsförteckning

|  |    |
|--|----|
| Sammandrag.....  | 1  |
| Förkortningar .....  | 2  |
| Inledning .....  | 2  |
| <i>Vibrio cholerae</i> och dess livsmiljö .....                        | 3  |
| Fylogeni.....  | 3  |
| Morfologi och metabolism .....   | 3  |
| Bakteriens livsmiljöer .....   | 4  |
| Mikrobiell patogenes och virulensfaktorer hos <i>V. cholerae</i> ..... | 6  |
| Patogena stammar .....   | 6  |
| Reglering av virulensfaktorer .....                                    | 6  |
| Kolonisationsfaktorer .....  | 8  |
| Kvorumreglering och bildandet av biofilm .....                         | 9  |
| Biologisk funktion .....   | 12 |
| Kolerans epidemiologi.....   | 13 |
| Pandemier och epidemier .....  | 13 |
| Säsongsvariationer .....   | 15 |
| Diskussion.....  | 16 |
| Kolera, en infektionssjukdom som uppkommer och återkommer .....        | 16 |
| En studie på mikronivå.....  | 16 |
| Tack .....   | 18 |
| Erkännande .....   | 18 |
| Referenser .....   | 19 |

## Sammandrag

Infektion av toxiska *Vibrio cholerae* i tunntarmen visar sig i allvarliga fall som vattnig diarré. Om diarrén inte behandlas i tid kan den snabbt leda till uttorkning och cirkulationskollaps hos patienten på grund av mycket stora vattenförluster. Koleratoxinet är den virulensfaktor hos *V. cholerae* som är orsaken till de kliniska sjukdomssymtomen. Gener som kodar för koleratoxinet är samlade i en profag som endast återfinns hos toxiska *V. cholerae* stammar. Genom horisontell genöverföring har *V. cholerae* breddat sin ekologiska nisch och skapat två toxiska stammar som kan infektera människan samt orsaka pandemier: serogrupperna 01 och 0139. Horisontell genöverföring har medicinsk betydelse då uppkomsten att nya serogrupper gör det allt svårare att hitta nya koleravaccin. *V. cholerae* lever antingen som frilevande planktoniska celler eller som kolonisationsceller. Under sin virulenta fas hittas bakterien i människans tunntarm och under den akvatiska livsfasen är bakterien ofta associerad med plankton. Människan tros vara enda värd för toxiska *V. cholerae* och bakterien sprids lätt mellan sina värdar via kontaminerat vatten. Kolera är vanligt i tredje världen av den orsaken att bristfällig infrastruktur ofta leder till att förorenat avloppsvatten kommer ut i vattendrag. Efter att *V. cholerae* tagits upp av sin värd måste bakterien passera via magtarmkanalen för att slutligen hamna i tunntarmen. Resan genom mage och tarm skickar signaler till bakteriecellerna som då vet att det är tid att bli virulent och aktivera virulensgenerna. Via kommunikation mellan celler kan *V. cholerae* ytterligare öka sin förmåga att framkalla sjukdomssymtom hos sin värd. Kolera har en historia som binder den till specifika geografiska områden och årstider. Forskare har på senare tid kunnat visa på en korrelation mellan klimatfaktorer och kolera. Som infektionssjukdom är kolera på återinträde och sjukdomen har visat sig vara känslig för klimatförändringar. För att i ett tidigt skede kunna upptäcka ett kolerautbrott är det viktigt att förstå hur *V. cholerae* samverkar med sin miljö samt hur nya toxiska stammar uppstår. Denna sammanfattningsartikel syftar till att undersöka hur *V. cholerae* överlever i sin miljö. Vidare kommer jag diskutera varför kolera återkommer samt var *V. cholerae* uppehåller sig mellan epidemier.

Nyckelord: Kolera, *V. cholerae*, mikrobiell patogenes, HGT, epidemiologi, ekologi och plankton.

## Förkortningar

|             |                                     |                        |                                   |
|-------------|-------------------------------------|------------------------|-----------------------------------|
| <b>CT</b>   | koleratoxin                         | <b>EPS</b>             | exopolysackarider                 |
| <b>TCP</b>  | pilus samreglerat med toxinbildning | <b>VPS</b>             | <i>Vibrio</i> polysackarid        |
| <b>LPS</b>  | lipopolysackarider                  | <b>VPI</b>             | <i>V. cholerae</i> patogenicitetö |
| <b>MSHA</b> | mannoskänsligt hemagglutinin        | <b>CTX<sup>o</sup></b> | koleratoxinfag                    |
| <b>HGT</b>  | horisontell genöverföring           | <b>Omp</b>             | yttermembranprotein               |
| <b>HA</b>   | hemagglutinin                       | <b>VNC</b>             | levande men icke-odlingsbara      |

## Inledning

Kolera är en diarré sjukdom som orsakas av bakterien *Vibrio cholerae* (David *et al.* 2004). *V. cholerae* är en akvatisk bakterie som lever i deltaområden, floder och kustvatten (Hashizume *et al.* 2008). Kolerautbrott kan utlösas när det finns tillräcklig mängd av *V. cholerae* i dricksvatten, när människor tvingas dricka vatten som kontaminerats av avföring (Hashizume *et al.* 2008) eller via intagandet av skaldjur som inte tillagats på rätt sätt (Reidl & Klose 2002). Under en infektion av *V. cholerae* koloniserar bakterien tunntarmen och utsöndrar där ett enterotoxin<sup>1</sup> som kan orsaka stora vätskeförluster hos den smittade (Reidl & Klose 2002). Innan bakterien kan orsaka en infektion måste den överleva resan genom magsäcken. Den måste även veta när den kommit till tunntarmen så att kolonisering kan ske och den måste kunna sitta på epitelcellens utsida så att toxinet kan verka och orsaka diarrén. I riktigt allvarliga fall kan en kolerasmittad person förlora mer än 20 liter kroppsvätska per dygn (Smittskyddsinstitutet 2010). Utan behandling skulle denna kraftiga vätskeförlust snabbt leda till uttorkning, cirkulationskollaps och slutligen döden, vilken kan inträffa så snart som inom några timmar från infektionstillfället. Kolera är en sjukdom som mycket effektivt kan behandlas om den upptäcks i tid. Kolerapatienter behandlas med en kraftig vätsketerapi i kombination med en antibiotikakur. Vätskebehandlingen går ut på att ge patienten elektrolyter och vätska för att återställa osmotiskt tryck (Smittskyddsinstitutet 2010). Åtminstone sedan 1800-talet har koleraepidemier härjat och idag är kolera ett stort problem i Bangladesh, Indien, delar av Afrika och Sydamerika. Enligt WHO avlider ungefär 120 000 människor i kolera varje år, denna siffra är troligen en underskattning på grund av att många länder inte rapporterar alla fall av kolera då de är rädda att drabbas av handelssanktioner (WHO 2010c). Idag klassas kolera som en infektionssjukdom som ”uppkommer och återkommer” (Satcher 1995), sjukdomen drabbar främst fattiga länder där bristen på rent vatten är stor. Två epidemiologiska egenskaper hos kolera är dess tendens till explosiva utbrott, som kan uppkomma på flera platser simultant, samt dess förmåga att orsaka pandemier. Kolera uppvisar två sorters utbrott; antingen uppkommer utbrotten hastigt, sjukdomen har då en explosionsartad utveckling, eller så är utbrotten mer dynamiska och uppvisar säsongcykler (Hashizume *et al.* 2008). När utbrotten uppkommer hastigt anses kolera vara epidemisk och när utbrotten är mer dynamiska är sjukdomen endemisk. I Bangladesh, som är ett låglänt land med stor befolkning och hög fattigdom, återkommer sjukdomen säsongsmässigt och man kan se en bimodal fördelning av kolerautbrott under ett år (Hashizume *et al.* 2008). Forskare tror att väder kan vara en viktig faktor för denna fördelning (Hashizume *et al.* 2008).

Det är inte alla *V. cholerae* stammar som är patogena för människa. Det finns två toxiska stammar; serogrupperna 01 och 0139. Gemensamt för dessa är att deras genom innehåller virulensgener som kodar för kolonisationsfaktorer och koleratoxin. Gener för toxinet har *V. cholerae* fått via infektion av en bakteriofag. Genom att ta upp gener från fagen har *V. cholerae* fått en möjlighet att bredda sin nisch, att gå från att vara en marin bakterie till att

---

<sup>1</sup> När ett toxin frisätts av bakterie i tarm kallas toxinet för ett enterotoxin.

vistas inne i människans tunntarm. Fokus i denna sammanfattningsartikel kommer ligga på kolerans epidemiologi, *V. cholerae* mikrobiella patogenes och genetik. Jag kommer även inkludera ekologiska fakta om patogena *V. cholerae*-stammar för att kunna ge en bild av hur *V. cholerae* överlever i sin livsmiljö. Jag kommer särskilt belysa patogenes, hur nya kolerastammar uppkommer samt hur *V. cholerae* anpassar sig till sin ekologiska nisch. Jag vill förstå varför en så gammal infektionssjukdom som man en gång trodde var utdöd plötsligt återuppstår.

## ***Vibrio cholerae* och dess livsmiljö**

### **Fylogeni**

Arten *V. cholerae* tillhör släktet *Vibrio*, familjen Vibrionaceae och stammen Proteobakterier (Ternström & Molin 1994). Inom *Vibrio* hittar man akvatiska och patogena arter. Marina arter lever antingen som frilevande bakterier eller associerade till marina organismer. Släktet har två patogena arter som infekterar människan, *V. cholerae* och *V. parahaemolyticus* (Ternström & Molin 1994). Studier på *V. cholerae* har visat att dessa mikroorganismer uppvisar olika fysiologiska egenskaper. Utifrån detta har man kunnat dela in patogena *V. cholerae* i tre olika kategorier: serogrupper, serotyper och biotyper. Det finns 200 serogrupper av *V. cholerae* men det är endast två som är toxiska och orsakar epidemier, 01 och 0139 (Lipp *et al.* 2002) (tabell 1). Serogruppen 01 kan ytterligare delas in i tre undergrupper: serotyperna Inaba, Ogawa och Hikojima (Faruque *et al.* 1998). Dessutom kan serogrupperna delas in i biotyper på grund av att de uppvisar olika biokemiska egenskaper och känslighet mot bakteriofager (Faruque *et al.* 1998). Serogruppen 01 har två biotyper: Klassisk och El Tor. Serogruppen 0139 har biogruppen Bengal (Faruque *et al.* 1998).

Tabell 1. Serogrupper, serotyper, biotyper samt O-antigenstruktur hos toxiska *V. cholerae*.

| <b>Serogrupp<sup>a</sup></b> | <b>Serotyper<sup>b</sup></b> | <b>Biotyp<sup>c</sup></b> | <b>Struktur på O-antigen<sup>d</sup></b> | <b>Epidemisk</b> |
|------------------------------|------------------------------|---------------------------|--|------------------|
| <b>01</b>                    | Inaba<br>Ogawa<br>Hikojima   | Klassisk<br>El Tor        | Kedja                                    | Ja               |
| <b>0139</b>                  |                              | Bengal                    | Kapsel                                   | Ja               |

<sup>a</sup> Bakteriegrupp som delar samma antigener.

<sup>b</sup> Undergrupp som delar vissa men inte alla antigener. Serotyperna kan skiljas åt med immunologiska analyser, eftersom de binder till olika antikroppar.

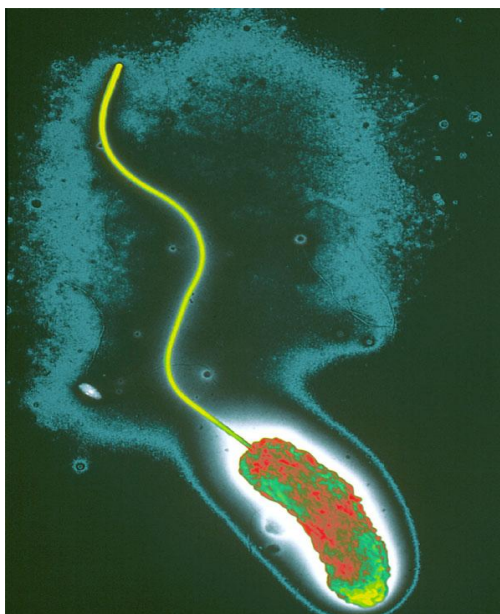
<sup>c</sup> Grupp av individer med analog uppbyggnad och som kan särskiljas då de uppvisar olika biokemiska egenskaper.

<sup>d</sup> Se avsnitt Morfologi och metabolism.

### **Morfologi och metabolism**

*V. cholerae* upptäcktes 1883 av den tyske läkaren Robert Koch när han lyckades isolera bakterien från kolerapatienter (Koch 1883). Koch kallade bakterien för ”*Kommabazillen*” eftersom den hade en böjd stavformad struktur (Prescott *et al.* 1999) (figur 1).

Kännetecknande för *V. cholerae* är förutom formen den polära flagellen. Flagellen omges av en skida av lipopolysackarider (LPS) och ger bakterien motilitet (Ternström & Molin 1994). *V. cholerae* är en fakultativt anaerob gramnegativ bakterie med en respiratorisk och fermentativ metabolism. D-glukos är bakteriens primära kolkälla (Ternström & Molin 1994).



Figur 1. *V. cholerae*, en stavformad böjd akvatisk bakterie med polär flagell (Från Waldor & RayChaudhuri (2002), med tillstånd från upphovsrättsinnehavaren (Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: *Nature* (Matthew K. Waldor and RayChaudhuri 2000), copyright (2000)).

Gemensamt för de toxiska stammarna, serogrupperna 01 och 0139, är att de kan producera koleratoxin, det som skiljer stammarna åt är O-antigenerna (O-sidokedjorna) 01 och 0139 (Kaper *et al.* 1995). Cellväggen hos gramnegativa bakterier består av två tunna skikt, ett inre cellmembran och ett yttermembran, som åtskiljs av ett peptidoglykanskikt i mitten (Carlsson & Linder 2008). O-antigenen sitter i yttermembranet och strukturen är mycket antigenbestämmande. Hos gramnegativa bakterier är det huvudsakligen O-antigenen som utlöser reaktioner med antikroppar. O-antigenen är kopplad till yttermembranet via en artspecifik kärnpolysackarid som i sin tur binder till en lipid A (Carlsson & Linder 2008). Analyser av O-antigener har visat att serogrupperna 01 och 0139 uppvisar olika strukturer på sina antigener. 01 har en lång lipopolysackaridkedja (LPS) (Vinogradov *et al.* 1995), medan 0139 har en kort lipopolysackaridkapsel (Knirel *et al.* 1997) (Tabell 1). Genom att analysera O-antigenen har forskare kunnat konstatera ett nära släktskap mellan serogrupperna 01 och 0139, då O-antigenerna binder till samma basstruktur (Knirel *et al.* 1997).

### Bakteriens livsmiljöer

Det finns en stark association mellan kolera och vatten. *V. cholerae* är en bakterie som lever i akvatiska miljöer, exempelvis marina miljöer eller flodmynningar med bräckt vatten (Colwell *et al.* 1977). Dessa akvatiska miljöer erbjuder lagom vattentemperatur, näringsmängd och koncentration natriumjoner, något toxiska *V. cholerae* behöver för att tillverka koleratoxin (Lobitz *et al.* 2000). Toxiska *V. cholerae* spenderar större delen av sin livscykel utanför sin värd och återfinns då som frilevande organism eller som kolonisatör av vattenlevande organismer (Colwell *et al.* 1977). Studier har visat att *V. cholerae* 01 kan associera med växt- och djurplankton antingen genom att fästa till organismen eller genom att uppehålla sig inne i tarmen (Lipp *et al.* 2002). I en enda hoppkräfta har man hittat så många som  $10^4$  *V. cholerae* celler (Colwell 1996). *V. cholerae* har två faktorer som gör koloniseringen av plankton möjlig, gener som kodar för enzymet kitinas (Connell *et al.* 1998) samt gener som kodar för MSHA typ IV-pili (Reidl & Klose 2002). MSHA typ IV-pilusen gör att *V. cholerae* kan binda till kitin i exoskelettet på zooplankton (Reidl & Klose 2002). Enzymet kitinas gör att bakterien kan bryta ner kitin och använda kitinet som kol- och kvävekälla (Connell *et al.*

1998, Meibom *et al.* 2004). En möjlig förklaring till varför släktet *Vibrio* är viktiga komponenter i det akvatiska ekosystemet kan vara just förmågan att bryta ner kitin, då kitin är en komponent som återfinns hos många akvatiska evertebrater (Colwell *et al.* 1977). MSHA typ IV-pili hittas hos *V. cholerae* biotyp El Tor och *V. cholerae* 0139-stammar (Chiavelli *et al.* 2001), toxiska stammar som är patogena för människan. Däremot hittas den inte hos den klassiska 01 stammen (Chiavelli *et al.* 2001). Troligt är att association med djurplankton erbjuder bakterien en fristad i den akvatiska miljön, en mycket tuff miljö för en planktonisk bakteriecell då den är begränsad på resurser (Chiavelli *et al.* 2001). Flera *in vitro* studier har visat att vid näringsbrist, fel salthalt eller pH, förhållanden som kan uppstå ute i havet, binder *V. cholerae* hårdare till plankton (Huq *et al.* 1984). Kitinas och MSHA typ IV-pili möjliggör således för *V. cholerae* att leva och växa i akvatiska miljöer, dessa faktorer ger även en förklaring till varför kolerautbrott kan uppstå nästan simultant på olika platser. Genom att binda till djurplankton kan *V. cholerae* transporteras långa sträckor med vattenströmmar och genom att använda kitinet i skalet överlever bakterien denna resa och är redo att infektera nya värdar när den anländer till ett nytt mål. Dessa upptäckter har lett till att det har lagts fram hypoteser om ett starkt symbiotiskt förhållande mellan *V. cholerae* och djurplankton (Lipp *et al.* 2002) och att kolerautbrott till viss del kan bero på förmågan hos *V. cholerae* att upprätthålla sig i planktoniska samhällen (Chiavelli *et al.* 2001). Något som kan ha epidemiologisk betydelse för *V. cholerae*, när den ska passera magsäcken för att ta sig till tunntarmen, är att bakterien blir mindre känslig mot lågt pH genom att binda till kitin (Nalin *et al.* 1979). Enligt Meibom *et al.* (2004) aktiverar kitinpolymerer gener för kemotaxi, kvorumsignallering och bildandet av biofilm hos denna bakterie. *V. cholerae* celler i biofilm är 1000 gånger bättre på att överleva i lågt pH än planktoniska celler, sannolikt är det biofilmens fysiska struktur som skyddar cellerna mot en syrachock (Zhu & Mekalanos 2003).

Släktet *Vibrio* är mycket talrikt i marina miljöer och återfinns speciellt i tropiska och subtropiska områden (Lipp *et al.* 2002). Colwell lade 1996 fram en hypotes om en korrelation mellan kolerautbrott och algomning (Colwell 1996). När ytvattnets temperatur stiger ökar algmängden och som följd av detta även mängden zooplankton (Colwell 1996). Eftersom en hoppkräfta kan bära på  $10^4$  *V. cholerae* celler skulle infektionsrisken för människor öka om mängden zooplankton skulle öka, eftersom mängden *V. cholerae* då även skulle tillta (Colwell 1996). Enligt Kaper *et al.* (1995) krävs det en infektionsdos på cirka  $10^{11}$  *V. cholerae* celler för att en frisk människa ska drabbas av diarré. Följaktligen behövs det inte många hoppkräftor i dricksvattnet för att man ska komma upp i en infektionsdos. Algblomning kan således leda till ett kolerautbrott i länder där människor kommer i kontakt med kustvatten och dricker av ytvattnet (Colwell 1996). Kolera sprids dock inte bara via vatten utan även via föda. Om *V. cholerae* kommer in via bristfälligt tillagade skaldjur tillsammans med ris räcker det med  $10^3$ - $10^4$  bakterieceller för att en infektion ska inträffa (Colwell 1996). En förklaring till varför infektionsdosen sänks är att födan skyddar bakteriecellerna mot magsyran (Kaper *et al.* 1995). När *V. cholerae* inte är i sin akvatiska livsfas befinner den sig inne i människans tunntarm. För att en patogen ska orsaka en infektion hos sin värd måste den komma in i värden, kolonisera värden, öka i antal för att fullfölja sin livscykel, komma förbi immunförsvaret samt ha förmågan att skada sin värd (Prescott *et al.* 1999). Allt detta kan *V. cholerae* göra med hjälp av olika virulensfaktorer. Nedan följer en kort sammanfattning av *V. cholerae*s patogenes, de molekylära mekanismer som bakterien använder för att infektera sin värd.

# Mikrobiell patogenes och virulensfaktorer hos *V. cholerae*

## Patogena stammar

För att *V. cholerae* ska vara epidemisk måste bakteriens genom innehålla gener för CT och TCP<sup>2</sup> (Waldor & Mekalanos 1996). Eftersom dessa gener återfinns hos serogrupperna 01 och 0139 är det dessa stammar som orsakar epidemiska kolerautbrott. Någon gång under evolutionen har en icke toxisk *V. cholerae* kommit i besittning av gener för toxicitet (*ctxAB*) och forskarna tror att detta har skett via infektion av CTX<sup>φ</sup>, en filamentös lysogen bakteriofag (Chakraborty *et al.* 2000). För att CTX<sup>φ</sup> ska kunna infektera sin värd måste fagen först fästa till bakterien. Troligt är att CTX<sup>φ</sup> använder proteinet pIII<sup>ctx</sup> för att binda till TcpA (Helipern & Waldor 2003). TcpA kodas från genen *tcpA* och är huvudprotein på TCP (Parge *et al.* 1995) samt receptor för CTX<sup>φ</sup> (Helipern & Waldor 2003). När fagen väl bundit till TCP kan den infektera bakteriecellen (Chakraborty *et al.* 2000) genom att injicera sitt cirkulära enkelsträngade fagDNA in till bakteriens cytoplasma via kanalerna TolA, TolQ och TolR (Val *et al.* 2005). Väl inne i cytoplasman integreras fagDNA:t in i en av *V. cholerae*s kromosomer (Vanden Broeck *et al.* 2007) genom plats-specifik rekombination (Val *et al.* 2005). Integreringen av fagDNA sker med hjälp av värd-specifika enzymer som klipper DNA vid specifika sekvenser. I *V. cholerae*s fall sker integreringen vid *dif1*, en 28 baspar lång region på kromosom I. Eftersom fagens genom saknar gener som kodar för rekombinaser<sup>3</sup> utnyttjar fagen värdens XerCD-rekombinaser, tyrosinrekombinaserna XerC och XerD. När fagDNA:t antar en sekundär struktur inne i cytoplasman skickas en signal till XerCD om att rekombination ska ske. Rekombinationen sker då mellan *attP*-platsen på fagens enkelsträngade DNA och *dif1(attB)*-platsen på bakteriekromosomen (Val *et al.* 2005). Resultatet av rekombinationen blir att *V. cholerae*s genom innehåller en profag<sup>4</sup>, en koleratoxin profag (CTX<sub>φ</sub>) (Val *et al.* 2005). Det är inte ovanligt att bakterier förvärvar nya gener. Bakteriepopulationer tros byta gener med varandra genom horisontell och vertikal genöverföring. Troligen är det via horisontell genöverföring (HGT)<sup>5</sup> som nya toxiska *V. cholerae* har uppstått (Waldor & Mekalanos 1996). Serogrupp 0139 Bengal har sannolikt uppkommit genom utbyte av genetiskt material med 01 El Tor (Rhine & Taylor 1994). Det finns även data som talar för att toxiska stammar av *V. cholerae* kan härstamma från icke-toxiska akvatiska stammar (Waldor & Mekalanos 1996). Genom att ta upp fagens gener har bakterien förmodligen ökat sin evolutionära fitness och breddat sin ekologiska nisch (Waldor & Mekalanos 1996). Väl inne i bakteriegenomet måste fagens gener uttryckas för att bakterien ska bli toxisk. Nedan följer en beskrivning av hur *V. cholerae* uttrycker och reglerar sina virulensgener.

## Reglering av virulensfaktorer

Mycket är okänt när det kommer till patogenesen hos *V. cholerae*, då det är en komplex process som involverar flera gener och faktorer. Vad man känner till i dagsläget är att virulensgenerna är reglerade och det verkar som att de endast uttrycks när bakterien befinner sig inne i sin värd. Det finns flera system men i denna sammanfattningsartikel behandlas endast ToxR-regulonet. Efter att *V. cholerae* tagits upp av sin värd inleder den en resa som går från munnen via magsäcken till tunntarmen. Under resans gång utsätts bakteriecellerna

---

<sup>2</sup> Pilus som bakterien behöver för att kunna kolonisera sin värd.

<sup>3</sup> Enzym som känner igen två specifika sekvenser i DNA. Genom att klippa DNA och sedan återförenera sekvenserna möjliggör dessa enzymer att det bildas nya genkombinationer.

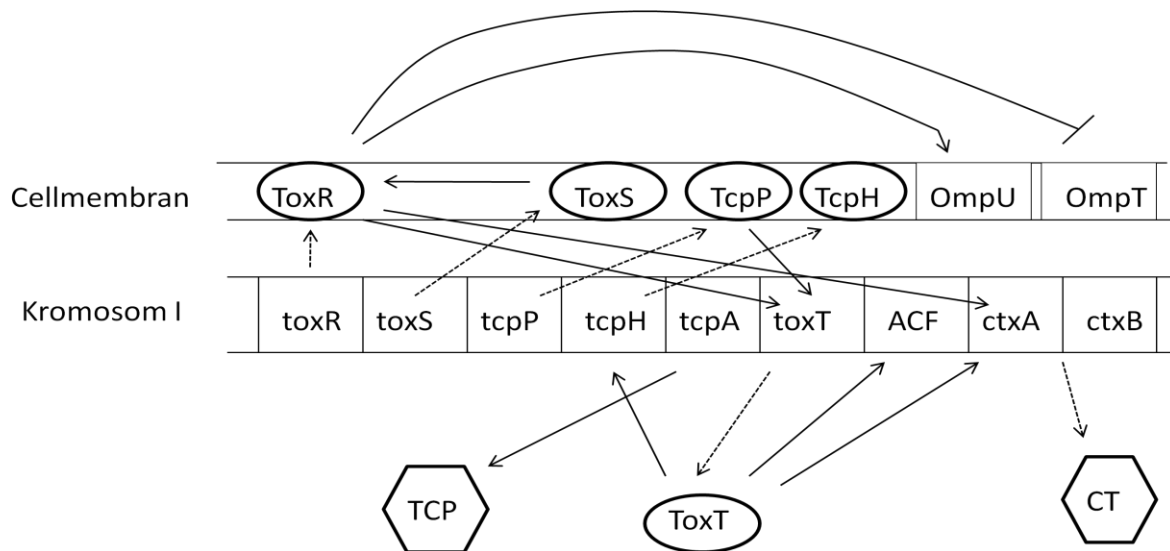
<sup>4</sup> Bakteriofag som hittas i bakteriekromosom och som replikeras tillsammans med kromosomen.

<sup>5</sup> Horisontell genöverföring sker genom: transduktion, transformation och konjugation, tre sätt som bakterier kan erhålla nytt genetiskt material och bilda nya kombinationer.



flera gånger för stor stress av sin värd, till exempel när den ska passera den sura miljön i magsäcken och det giftiga innehållet i gallsyran. Både magsaften och gallan är del av värdens försvarssystem mot bakterier, något *V. cholerae* till del har utvecklat resistens mot och istället använder som signal för att det är tid att gå in i virulent fas (Hung *et al.* 2006). Forskarna tror att det är faktorer som: pH, salthalt, temperatur (Gardel & Mekalanos 1994), bakterietätthet (Zhu 2002) och näringsbrist (Mueller *et al.* 2007), som verkar vid regleringen av virulensgenerna hos *V. cholerae*. Förhöjd salthalt, temperatur och pH leder till ökad produktion av CT hos *V. cholerae* (Gardel & Mekalanos 1994) och under näringsbrist ses *V. cholerae* bilda biofilm på både abiotiska och biotiska ytor (Mueller *et al.* 2007). En hög bakteriecelltätthet leder däremot till minskad virulens hos *V. cholerae* (Zhu 2002).

För att kunna känna och reagera på stimuli från omgivning har många bakterier ett tvåkomponentsystem där en signal överförs från omgivningen in till bakteriecellen i två steg. I *V. cholerae* fall är det membranproteinet ToxR som tar emot signalen och verkar vid signaltransduktionen (Miller *et al.* 1987). ToxR är ett transmembranprotein som är länken mellan *V. cholerae*s utsida och insida eftersom proteinet är förankrat med en helixstruktur i innermembranet. Proteinets C-terminalände befinner sig i bakteriens periplasma och N-terminaländerna i cytoplasman (Miller *et al.* 1987). C-terminaländerna känner av förändringar i den yttre miljön och vidarebefordrar informationen in till cellen genom att skicka signaler till cytoplasman. Proteinets N-terminalände besvarar signalen genom att binda till promotorregioner och aktivera bakteriens virulensgener (Miller *et al.* 1987). Hos *V. cholerae* återfinns de viktigaste virulensgenerna i kluster. *V. cholerae pathogenicity island (VPI)* är ett stort kluster av gener som man hittar på *V. cholerae*s stora kromosom, kromosom I. VPI innehåller bland annat gener som kodar för ACF (accessory colonization factor), ToxT och TCP (Kovach *et al.* 1996). I ett annat kluster hittar man operonet som kodar för koleratoxinet, *ctxAB* (Waldor & Mekalanos 1996). Gemensamt för många av *V. cholerae*s virulensgener är att de regleras av ToxR-regulonet (Yu & DiRita 2002), ett regulon som består av flera operon som alla regleras av samma aktivator, det ovannämnda DNA-bindande transmembranproteinet ToxR (DiRita *et al.* 1991). Inte mindre än 20 stycken av virulensgenerna i *V. cholerae* kontrolleras direkt eller indirekt av regulonet via proteinet ToxR (DiRita *et al.* 1991). Genom att binda till och aktivera *ctxAB*-operonets promotor kan ToxR direkt aktivera generna för koleratoxinet (*ctxAB*) (Miller & Mekalanos 1984) (figur 2). Indirekt reglerar samma protein transkriptionen av virulensgenerna *ctxAB* och *ctpA* (Miller & Mekalanos 1988) genom att verka reglerande på ToxT, *V. cholerae*s sekundära aktivatormolekyl (DiRita *et al.* 1991) och det protein som reglerar transkriptionen av *ctxAB* och *ctpA* (Yu & DiRita 2002) (Figur 2). ToxR reglerar även transkriptionen av *ompT* och *ompU*, två poriner som hittas i yttermembranet (Miller & Mekalanos 1988). *OmpU* aktiveras av ToxR (Crawford *et al.* 1998) och rådande teori är att man tror att porinet *OmpU* är viktig tidigt i infektionsprocessen eftersom den höjer bakteriens motståndskraft mot magsyra och därmed möjliggör överlevnad i magsäck och tarm (Provenzano *et al.* 2000). Även porinet *OmpT* kan ha betydelse för *V. cholerae*s överlevnad i magtarmkanalen, däremot undertrycks *OmpT* av ToxR (Li *et al.* 2000). Troligt är att ToxR är en förutsättning för att *V. cholerae* ska kunna överleva inne i sin värd och kanske är det så att proteinet svarar på den miljöförändring som bakterien upplever när den hamnar i magsyra. Magsyran är det stimulus som talar om för bakterien att den är inne i sin värd och att det är dags att bli virulent (Provenzano *et al.* 2000).



Figur 2. Schematisk modell över ToxR-regulonet i *V. cholerae*. Pil symboliserar positiv effekt medan spärr står som symbol för negativ effekt. Streckad pil betyder bildande av protein och heldragen pil betyder att genprodukten reglerar uttrycket hos en annan gen. Genom att binda till koleratoxinets promotor har proteinet ToxR en direkt effekt vid regleringen av koleratoxinet. ToxR kan även indirekt ha en effekt på uttrycket av generna för TCP genom att verka vid bildandet av ToxT-proteinet. Cirklar i cellmembranet föreställer fyra membranbundna proteiner som kan vara involverade i att känna av stimuli i *V. cholerae*s externa och interna miljö.

Utöver ToxR har *V. cholerae* ytterligare ett membranbundet aktivatorprotein, proteinet TcpP (Häse & Mekalanos 1998). Troligt är att ToxR och TcpP tillsammans känner igen miljösignaler och sedan aktiverar transkriptionen av den cytoplasmatiske genen *toxT*, som i sin tur aktiverar flera virulensgener genom att dess produkt binder till promotorer (Häse & Mekalanos 1998) (figur 2). TcpP aktiverar transkriptionen av *toxT*-genen genom att binda till genens promotor och möjliggör då uttryck av den viktiga virulensfaktorn TCP (Häse & Mekalanos 1998). ToxR-regulonet regleras följaktligen av proteinerna ToxR, TcpP och ToxT. Transkriptionen av dessa proteiner och virulensgener tros aktiveras vid specifika miljöbetingelser som: förändrad temperatur, pH och osmolaritet (Miller & Mekalanos 1988). Hur det går till är dock ännu inte känt. Genom att tillsätta olika aminosyror till ett minimalt medium med glukos som kolkälla har forskare kunnat påvisa att vissa aminosyror aktiverar uttrycket av CT, TcpA, OmpT och OmpU hos *V. cholerae*, vilket tyder på att även miljön inne i tunntarmen talar om för *V. cholerae* att det är dags att bli virulent (Miller & Mekalanos 1988). Aktiviteten hos ToxR förstärks av ett annat transmembranprotein, ToxS (DiRita & Mekalanos 1991) (figur 2). Genen för *toxS* är belägen nedströms från *toxR* och proteinet ToxS stimulerar aktiviteten hos genen *toxR* antingen genom att ha en reglerande funktion eller genom att stabilisera genprodukten ToxR (DiRita & Mekalanos 1991). Kanske är det så att ToxR/S och TcpP/H kan vara involverade i att känna av stimuli i *V. cholerae*s externa och interna miljö (DiRita & Mekalanos 1991). Det finns även teorier om att kvorumsignalering reglerar ToxR-regulonet och därmed virulensen hos *V. cholerae* (Zhu 2002).

### Kolonisationsfaktorer

*V. cholerae* har flera komponenter som är viktiga för att den ska kunna kolonisera sin värd, komponenter som är oumbärliga för att säkerställa bakteriens överlevnad. Jag har valt att ta upp: flagellen, TCP, kvorumreglering samt bildandet av biofilm. Flagellen är polär (Figur 1) och omsluten av en polypeptidskida (Kaper *et al.* 1995). Flagellen är den kolonisationsfaktor som erbjuder *V. cholerae* motilitet och möjliggör rörelse inne i tarmen (Kaper *et al.* 1995). Den ekologiska nisch som människans tunntarm erbjuder kräver en flagell i ett tidigt skede av

infektionscykeln. Studier har visat på att celler utan flagell är sämre på att kolonisera tarmen (Richardson 1991), vilket tyder på att motilitet är en viktig virulens- och kolonisationsfaktor. *V. cholerae* motilitet och kolonisation av tunntarmen är en komplex process och troligt är att motilitet är viktigt just i ett tidigt skede av infektionsprocessen för att den initiera uttryck av virulensgener (Lee *et al.* 2001). Motilitet är dock kostsamt för bakterier vilket kan förklara varför motiliteten hos *V. cholerae* är negativt reglerad av ToxR-regulonet under infektionscykeln (Ottemann & Miller 1997). Genom kemotaxi, den process där en bakteriecell aktivt simmar mot eller bort från en ökad koncentration av ett ämne, kan *V. cholerae* simma till slemhinnan i tunntarmen där kolonisering ska ske (Kaper *et al.* 1995). TCP, den andra kolonisationsfaktorn, är en typ IV-pilus och som i *V. cholerae* fall inte bara verkar som receptor för CTX<sup>φ</sup> (Waldor & Mekalanos 1996) utan även vid fästning till värdceller (Parge *et al.* 1995). Troligt är att TCP är en av de viktigaste koloniseringsfaktorerna då den krävs för att bakterien ska kunna kolonisera tunntarmen (Kaper *et al.* 1995). Än är det inte känt hur interaktionen mellan TCP och epitelcell går till men det finns två teorier. Ena teori går ut på att det finns adhesiner<sup>6</sup> på TcpA-pilusen som gör det möjligt för bakterien att binda till receptorer på epitelcellerna i tunntarmen (Reidl & Klose 2002). Den andra teorin säger att dessa pili gör det lättare för *V. cholerae* att kolonisera tarmen, genom att de förstärker interaktionen mellan bakterieceller och därmed underlättar bildandet av mikrokolonier på slemhinnan i tunntarmen. Några adhesiner eller receptorer har dock ännu inte identifierats (Reidl & Klose 2002).

#### *Kvorumreglering och bildandet av biofilm*

En viktig faktor hos patogena bakterier är förmågan att kunna kommunicera med varandra, då vissa virulensgener endast uttrycks när bakteriecelltätheten är tillräckligt hög (Bassler *et al.* 1997). Kvorumreglering är en täthetsanpassningsprocess som kan styra fenomen som: virulens, motilitet och bildandet av biofilm (Miller & Bassler 2001). Kvorumreglering är den tredje koloniseringsfaktorn hos *V. cholerae* och processen är starkt kopplad till bakteriens virulens (Zhu 2002). Genom att utsöndra små signalmolekyler, som kan diffundera fritt genom cellmembranet och tas upp av andra celler i bakteriens omgivning, kan bakterier på kemisk väg kommunicera med varandra (Bassler *et al.* 1997). Genom att känna av koncentrationen av signalmolekyler kan bakterieceller få en uppfattning av hur det ser ut runt omkring och därefter ändra sitt beteende. Om koncentrationen av signalmolekyler är låg utanför cellen innebär det att det finns få individer i omgivningen, om koncentrationen däremot är hög är detta en signal för att det finns många individer i närheten. När det finns många signalmolekyler är sannolikheten stor att en av signalmolekylerna binder till en cytoplasmatisk regulator, som då aktiveras och reglerar genaktiviteten hos bakterien (Carlsson & Linder 2008). I *V. cholerae* har det identifierats två kvorumsystem, CAI-1 systemet och AI-2 systemet (Miller *et al.* 2002). I denna sammanfattningsartikel behandlas endast AI-2 systemet, ett tvåkomponentsystem med signalmolekylen AI-2. AI-2 molekylen används av många gramnegativa bakterier och molekylen känns igen av sensorproteinerna LuxP och LuxQ som sitter i cellmembranet (Bassler *et al.* 1994). Systemet är i *V. cholerae* fall även beroende av proteinet LuxS (Miller *et al.* 2002), eftersom syntesen av AI-2 är beroende av enzymet LuxS (Surette *et al.* 1999). Kvorumproteinerna LuxO och HapR har en central och viktig roll vid regleringen av virulensgenerna i *V. cholerae*. Genom att studera *luxO*-mutanter av *V. cholerae* har forskare kunnat lägga fram bevis för att ToxR-regulonet regleras genom kvorum, då kvorum verkar undertrycka ToxR-regulerade virulensgener (Miller *et al.* 2002). *LuxO*-mutanter uppvisar kraftigt nedsatt kolonisationsförmåga, vilket tyder på att kvorumregleringen är viktig för *V. cholerae* virulens (Zhu 2002).

---

<sup>6</sup> Adhesiner är ämnen som förmedlar vidhäftning.

Kvorumregleringen hos *V. cholerae* ser inte riktigt ut som den gör hos många andra bakterier. Till skillnad från andra bakterier så aktiverar *V. cholerae* sina virulensgener och bildar biofilm när celltätheten är låg och dämpar uttrycket av virulensgenerna när celltätheten är hög (Zhu 2002). Det är ännu inte helt känt hur kvorum reglerar virulensen hos *V. cholerae*. En förklaringsmodell är att under den initiala koloniseringen, när koncentrationen bakterieceller och signalmolekyler är låg, är det för få AI-2 molekyler så ingen molekyl binder till systemets receptor LuxP (Zhu 2002) (Figur 3). När den membranbundna receptorn inte aktiveras av signalmolekylen kommer *luxO*-generna uttryckas och kvorumproteinet LuxO bildas. LuxO-proteiner dämpar uttrycket av genen *hapR*, vars genprodukt HapR verkar som repressor på genen *tcpP* (Zhu 2002). Utebliven syntes av HapR möjliggör syntes av TcpP, det protein som aktivering virulensfaktorerna i ToxR-regulonet. När koncentrationen av TcpP stiger inne i cellen kommer faktorer som tillåter *V. cholerae* att kolonisera tunntarmen och skapa kliniska symtom hos värden, att uttryckas. Till skillnad från många andra bakteriearter där kvorum aktiverar virulensgener när celltätheten är hög undertrycker kvorum virulensgenerna i ToxR-regulonet när det finns gott om *V. cholerae* celler i tarmen (Zhu 2002) (Figur 3). När *V. cholerae* har lyckats kolonisera tunntarmen och börjat föröka sig kommer mängden signalmolekyler att öka (Bassler *et al.* 1994). När en AI-2 molekyl binder till receptorproteinet LuxP aktiveras det cytoplasmatiske sensorproteinet LuxQ. LuxQ är ett signaltransduktionsprotein som består av två komponenter, ett histidinproteinkinase och en mottagardomän (Bassler *et al.* 1994). I aktiv form deaktiverar LuxQ proteinet LuxU, vilket leder till att kvorumproteinet LuxO inte aktiveras (Zhu 2002). Om kvorumproteinet inte finns i systemet kan proteinet inte verka som repressor på genen *hapR*. Genom fosforyleringar under signaltransduktionen ökar således koncentrationen av HapR inne i cellen. Eftersom HapR tystar genen *tcpP*, vars produkt aktiverar ToxR-regulonet, kommer virulensen hos *V. cholerae* att dämpas (Zhu 2002). HapR gör det även möjligt för bakterierna att lämna sin värd eftersom produkten aktiverar genen som kodar för HA/proteaser<sup>7</sup>, *hapA* (Jobling & Holmes 1997). Genom att inte uttrycka genen som kodar för TCP men tillåta uttryck av *hapA* kan bakteriecellerna släppa från tunntarmen och uppsöka nya infektionsmöjligheter på en annan plats i tarmen eller i en annan värd (Zhu 2002). Det görs ständigt nya upptäckter inom forskningen på hur kvorum- och virulensregleringen ser ut i *V. cholerae*. Det har visat sig att El Tor-stammen har en läsramsmutation i *hapR*-genen vilket kan tyda på en evolutionär anpassning hos *V. cholerae* till sin värd. Eftersom *hapR*-mutanter producerar låga nivåer av HA/proteaser kan de hålla sig fästade till tunntarmen längre än *V. cholerae* utan *hapR*-mutationen. Det är även troligt att spridningen till nya värdar blir mer effektiv med denna mutation, eftersom det anrikas fler celler i avföringen som lämnar värden. *hapR*-mutanter kan även uttrycka virulensfaktorerna CT och CTP vid hög celltäthet, vilket ytterligare förbättrar bakteriens förmåga att överleva och kolonisera sin värd. Det har även visat sig att *hapR*-mutanter bildar kraftigare biofilmer, vilket ytterligare bidrar till att de kan kolonisera sin värd längre eftersom de blir mindre känsliga för yttre stress (Zhu 2002).

---

<sup>7</sup> Enzymer som klyver koleratoxinet så att toxinet kan ha enzymatisk aktivitet inne i värdcellen.

| Låg celltäthet              | Hög celltäthet  |
|-----------------------------|---|
| ↓ -                         | ↓+  |
| AI-2                        | AI-2  |
| LuxP                        | LuxP  |
| LuxQ                        | LuxQ  |
| ↓ +                         | ↓-  |
| LuxU                        | LuxU  |
| LuxO                        | LuxO  |
| ↓ -                         | ↓+  |
| hapR                        | hapR  |
| HapR                        | HapR → hapA → HA/proteaser → <b>Bakterien släpper från tunntarmen</b> |
| ↓ +                         | ↓-  |
| tcpP                        | tcpP  |
| ToxR-regulonet              | ToxR-regulonet  |
| ↓                           | ↓   |
| <b>Virulensen aktiveras</b> | <b>Virulensen dämpas</b>  |

Figur 3. Modell av hur virulensen i *V. cholerae* justeras med kvorumreglering. Minustecken innebär negativ effekt, det vill säga att en gen inte uttrycks och syntes av protein uteblir. Plustecken innebär positiv effekt, att en gen uttrycks och att ett protein syntetiseras. *V. cholerae* aktiverar sina virulensgener vid låg celltäthet och deaktiverar generna vid hög celltäthet. Vid låg celltäthet är det få signalmolekyler (AI-2) som kan binda till LuxP vilket gör att LuxO aktiveras och undertrycker *hapR*-genen. Eftersom HapR är en negativ regulator på ToxR-regulonet kommer avsaknad av detta protein leda till syntes av virulensfaktorerna CT och TCP och kolonisering av bakteriens värd. När celltätheten däremot är hög finns det tillräckligt många signalmolekyler för att en AI-2 ska binda till receptorn LuxP i cellmembranet och därmed aktivera proteinet LuxQ och deaktivera LuxU. När LuxU deaktiveras uteblir aktivering av proteinet som behövs för att tysta *hapR*-genen, kvorumproteinet LuxO. Syntes av proteinet HapR leder till att bakterien släpper från tunntarmen och lämnar sin värd.

Planktoniska celler är bra när bakterier vill kolonisera nya områden (Costerton *et al.* 1995), men för att säkerställa sin existens inne i en värdorganism är strategin att bilda biofilm mer framgångsrik. Genom att fästa till en yta, bilda mikrosamhällen och omge samhället av ett skyddande lager av polymerer skyddas patogena planktoniska bakterieceller från yttre stress som magsyra, gallsyra, immunförsvaret samt från att sköljas bort (Costerton *et al.* 1995). Forskare har i in vitro studier kunnat påvisa att gallsyra kan ha en stimulerande effekt på bildandet av biofilm hos *V. cholerae* (Hung *et al.* 2006). Celler som lever i biofilmsformationer är även bättre koloniserare än planktoniska celler och *V. cholerae* som lever i biofilm har dessutom en lägre infektionsdos än planktoniska celler (Tamayo *et al.* 2010). Den lägre infektionsdosen kan bero på att celler som existerar i biofilm har högre tillväxthastighet under infektion än frilevande celler (Tamayo *et al.* 2010). *V. cholerae* bildar biofilm både när den befinner sig i sin akvatiska livsfas (Yildiz & Schoolnik 1999) och när den är koloniserare av tunntarmen (Tamayo *et al.* 2010). I akvatiska miljöer har man sett att *V. cholerae* bildar biofilm på abiotiska och biotiska ytor (Mueller *et al.* 2007). Stammarna 01 El Tor och 0139 Bengal är båda beroende av VPS-gener vid bildandet av biofilm (Wai *et al.* 1998). VPS-gener kodar för exopolysackarider (EPS) som bakterien använder för att bilda ett matrix. Matrixet gör det möjligt för bakterieceller att binda till ett substrat (Costerton *et al.* 1995). 01 El Tor behöver även MSHA typ IV-pilus för att kunna bilda en biofilm, vilket 0139 Bengal inte behöver (Watnick & Kolter 1999). Watnick och Koltner har förslagit en trestegsmodell för bildandet av biofilm hos El Tor-stammen. Initialt använder El Tor-stammen flagellen till fastsättning, därefter brukas MSHA typ IV-pili för att bilda mikrokolonier och i sista steget används exopolysackarider för att bilda biofilm (Watnick & Kolter 1999). Mogna biofilmer har ofta en tredimensionell struktur med vätskefyllda kanaler (Costerton *et al.* 1995). Både El Tor-stammen och 0139 Bengal-stammen kan in vitro bilda tredimensionella biofilmer. El Tor bildar dock tjockare biofilmer än den klassiska 01-stammen och forskarna tror att den tjockare biofilmen har lett till att El Tor i dag är så vanlig (Watnick & Kolter 1999). *V. cholerae* har under evolutionen ökat sina chanser att överleva

genom att kolonisera människans tunntarm, hoppkräftans tarm samt genom att binda till ytan på växtplankton (Yildiz & Schoolnik 1999), vilket tyder på att biofilmen har gett en selektionsfördel. Kanske är det så att biofilmen gjort det möjligt för patogena *V. cholerae* att bredda sin ekologiska nisch och därmed gett bakterien en möjlighet att överleva tiden mellan kolerautbrott, när bakterien inte är i sin värd. Till skillnad från miljön inne i tunntarmen uppvisar den marina miljön säsongsvariationer och kan vara relativt näringsfattig för *V. cholerae*, vilket ställer stora krav på anpassningar hos bakterien. Genom att bilda biofilm kan *V. cholerae* anpassa sig till bistra förhållanden och därmed säkerställa sin överlevnad. Forskarna saknar fortfarande många pusselbitar när det kommer till *V. cholerae*'s virulens, hur bakterien reglerar sina gener under infektionsfas. Känt är dock att *V. cholerae* har en god förmåga att svara på miljövariationer, vilket förmodligen har lett till bakteriens stora framgång och spridning (Costerton *et al.* 1995).

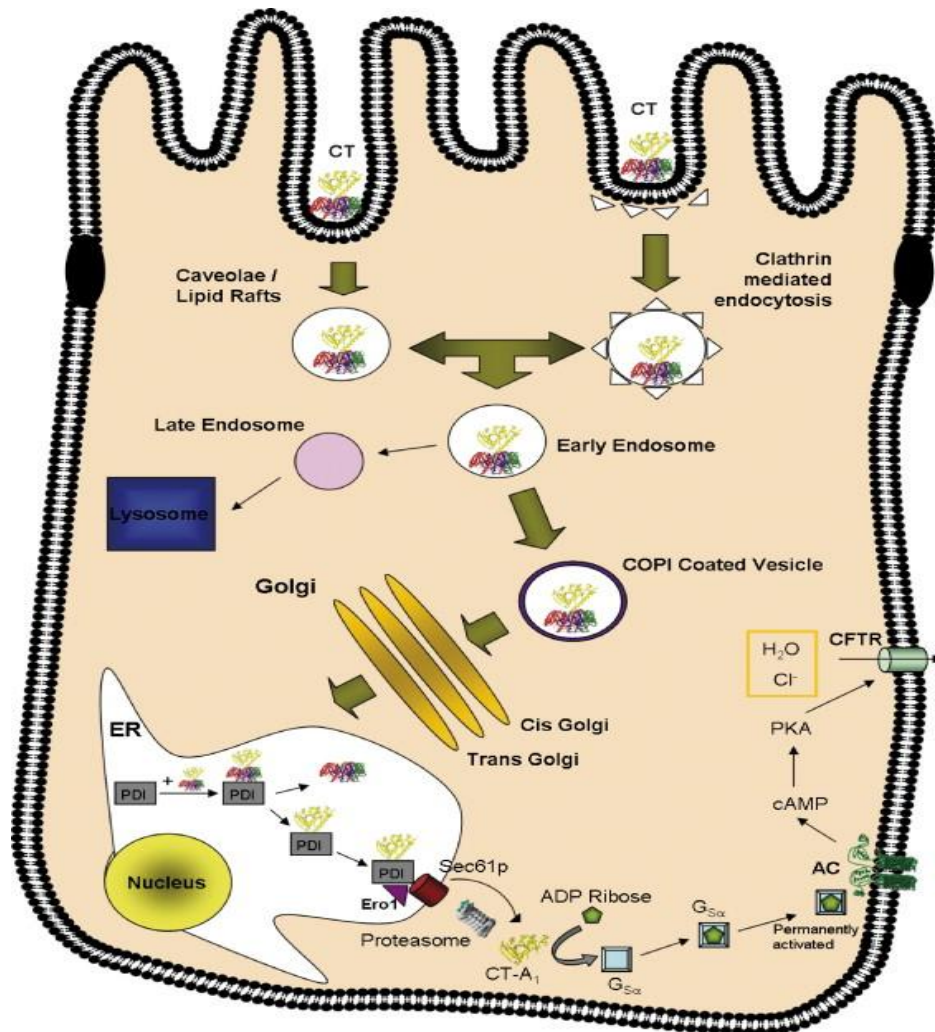
### Biologisk funktion

Detta är ett stycke som är baserat på en sammanfattningsartikel av Kaper *et al.* (1995), när inget annat anges. Kolera drabbar främst fattiga länder med hög befolkningstäthet och dåliga sanitära förhållanden. Värst drabbade är människor med nedsatt immunförsvar, små barn och gamla. När tillgången på nya värdar är god gynnas bakterier med snabb tillväxt och egenskapen att lätt ta sig från värd till värd (Carlson & Linder 2008). *V. cholerae* har inget behov av att hålla sin värd vid liv utan det ligger i bakteriens intresse att snabbt växa till och ge kraftiga symtom hos sin värd för att kunna gå in i en ny infektionscykel. Tiltänkt modell för hur koleratoxinet verkar inne i tarmen ser ut som följande: *V. cholerae* behöver två faktorer för att kunna kolonisera och infektera sin värd. Bakterien behöver TCP för att komma i kontakt med epitelcellerna i tarmen och den behöver koleratoxinet (CT) för att orsaka infektion. Förutom att vara ett enterotoxin som verkar inne i tarmen är CT även ett exotoxin, ett toxin som bakterien frisätter ut från cellen till omgivningen. CT består av två delar, en A(CtxA)-subenhet och en B(CtxB)-subenhet. Det är strukturen på CT som gör det möjligt för bakterien att få in koleratoxinet in i epitelcellerna, eftersom strukturen tillåter bakterien att interagera med apikalt placerade receptorer i cellmembranet, monosialogangliosid GM<sub>1</sub>-receptorer (Figur 4). Via typII-sekretion<sup>8</sup> utsöndras båda enheterna av koleratoxinet tillsammans med HA/proteaser ut från bakteriecellen in i tunntarmen. HA/proteaserna klyver A-subenheten i två polypeptidkedjor, kedjorna är dock efter klyvningen förenade med en disulfidbindning. B-subenheten består av fem delar som sitter ihop i en ringstruktur. B-subenheten är den del som binder till receptorerna i plasmamembranet och A-subenheten är den del med enzymatisk aktivitet inne i epitelcellen. Genom endocytos tas koleratoxinet upp av epitelcellen och toxinet transporteras sedan i endosomer till golgiapparaten och sedan endoplasmatiska nätverket (ER). Inne i ER särskiljs en av A-subenhetens polypeptidkedjor, CT-A<sub>1</sub>, från komplexet med hjälp av enzymet proteindisulfidisomeras (PDI) (Vanden Broeck *et al.* 2007). CT-A<sub>1</sub> är den del av koleratoxinet som verkar toxiskt inne i värden. Från ER transporteras CT-A<sub>1</sub> ut till cytosolen för att förena sig med det basolateralt placerade enzymet adenylatcyklas (AC), vars aktivitet regleras av G<sub>s</sub>-protein. CT-A<sub>1</sub> är en katalytisk polypeptid med ADP-ribosyltransferas aktivitet och som opererar vid aktiveringen av AC genom att överföra ADP-ribos från NAD<sup>+</sup> till G<sub>s</sub>-proteinet (Figur 4). En ökad koncentration av cAMP inne i epitelcellen leder till aktivering av PKA och fosforylering av kloridjonkanaler i epitelcellens plasmamembran (Vanden Broeck *et al.* 2007). Fosforyleringen av dessa jonkanaler startar en osmotisk rörelse av joner och vatten ut till lumen och slutligen diarré hos

---

<sup>8</sup> Sekretionssystem som gör det möjligt för bakterien att genomtränga ett cellmembran utanför det egna membranet.

den infekterade. Genom att frambringa kraftiga diarréer hos sin värd kan *V. cholerae* i länder med bristfällig infrastruktur snabbt komma i kontakt med nya värdar.



Figur 4. Genom att binda till receptorer på epitelceller och låta värdcellen införliva CT i cellprocesser skapas ett flöde av joner och vatten ut ur cellen, vilket resulterar i diarré (Från Vanden Broeck *et al.* (2007), med tillstånd från upphovsrättsinnehavaren (Reprinted from *The Lancet*, 39. 10, Davy Vanden Broeck, Caroline R Horvath, Marc J. S De Wolf, *Vibrio cholerae: Cholera toxin, 1771-1775*, Copyright (2007), with permission from Elsevier)).

## Kolerans epidemiologi

### Pandemier och epidemier

Kolera klassas enligt Smittskyddsinstitutet som en epidemisk sjukdom på grund av att den uppvisar plötsliga ökningsfall över det normala samt att den snabbt sprider sig inom en population, till andra länder och världsdelar (Smittskyddsinstitutet 2010). Enligt Centers for Disease Control and Prevention (CDC) klassas även kolera som en sjukdom som ”uppstår och återuppstår” (WHO 2010b). I mars 2010 rapporterade WHO kolerautbrott i Angola, Etiopien, Somalia, Sudan och i norra Vietnam. I oktober månad samma år drabbades även Haiti av ett kolerautbrott. Kolera visar sig dock inte bara som enstaka utbrott, sjukdomen anses även vara endemisk i södra och sydöstra Asien och i Afrika, vilket innebär att kolerafall ständigt rapporteras från dessa geografiska områden i högre och lägre grad. Sedan 1800-talet

har jorden drabbats av sju kolerapandemier (Colwell 1996) (Tabell 2). De första sex pandemierna spred sig från Gangesdeltat, en relativt avgränsad landmassa i Indien (Sack *et al.* 2004). Gangesdeltat är ett område som ofta drabbas av översvämningar till följd av årliga monsunregn (Hashizume *et al.* 2008). I deltaområdet är kolera i dagsläget en endemisk sjukdom som har fått fäste i populationen och sjukdomsutbrotten kommer i någorlunda regelbundna intervall (Hashizume *et al.* 2008). Efter den sjätte pandemin (1899-1923) försvann kolera från många områden som en följd av förbättrad vattenhantering (Colwell 1996). Många trodde under denna period att det inte skulle bli en till kolerapandemi, det skulle dröja 38 år tills den sjunde pandemin bröt ut (Colwell 1996). Den sjunde pandemin startade 1961 i Indonesien och koleran hade nu fått fäste utanför Gangesdeltat. Från 1961 fram tills idag har den sjunde pandemin hunnit spridit sig till sex kontinenter och agensen, faktorn som orsakat sjukdomen, är den patogena serogruppen 01, även kallad El Tor. Den sjunde pandemin kom att skilja sig från de tidigare pandemierna i sjukdomssymtom, eftersom symtomen inte var lika allvarliga som vid tidigare pandemier (Colwell 1996). Fram tills 1992, året man identifierade en icke-01 serogrupp som orsakade koleraepidemier, trodde forskarna att det endast var serogruppen 01 som orsakade kolera. Den nya patogena epidemiska serogruppen fick namnet 0139 Bengal. Det har visat sig att dessa två serogrupper kan samexistera (Colwell 1996). 0139 Bengal är i dagsläget endemisk i Indien och Bangladesh (Reidl & Klose 2002) och en del forskare anser att världen nu upplever sin åttonde pandemi (Faruque *et al.* 1998).

Tabell 2. Kolerapandemiernas årtal, platser, och serotyper/biotyper av *V. cholerae* (Colwell 1996, Faruque *et al.* 1998, Kaper *et al.* 1995).

| <b>Pandemi</b> | <b>År</b> | <b>Plats</b>                                       | <b>Serotyp/Biotyp</b> |
|----------------|-----------|--|-----------------------|
| 1              | 1817-1823 | Gangesdeltat/Indien                                | 01/Klassisk           |
| 2              | 1829-1851 | Gangesdeltat<br>→ Ryssland → Europa → USA          |                       |
| 3              | 1852-1859 | Gangesdeltat<br>→ USA                              |                       |
| 4              | 1863-1879 | Gangesdeltat<br>→ USA                              |                       |
| 5              | 1881-1896 | Gangesdeltat<br>→ Sydamerika                       | 01/El Tor             |
| 6              | 1899-1923 | Gangesdeltat<br>→ Mellanöstern → Balkanhalvön      |                       |
| 7              | 1961-     | Indonesien<br>→ Mellanöstern → Afrika → Sydamerika | 01/El Tor             |
| 8              | 1992-     | Indien → Bangladesh                                | 0139 Bengal           |

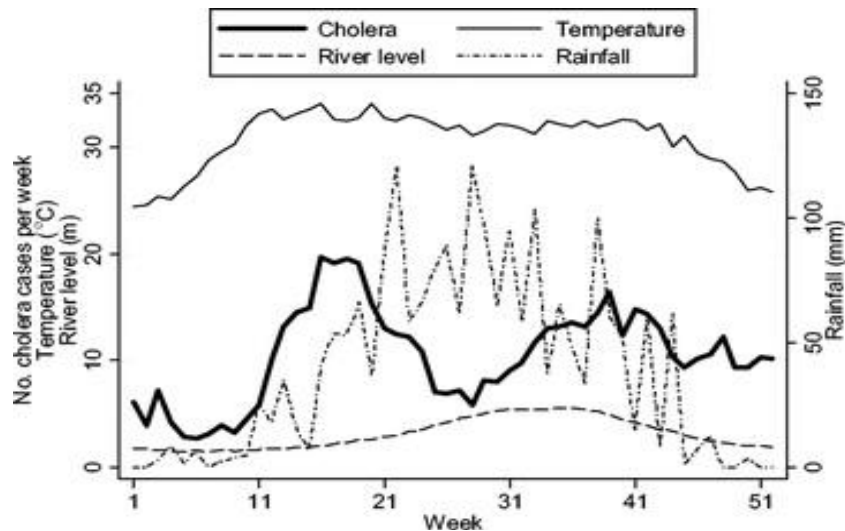
Den tolfte januari 2010 drabbades Haiti av en kraftig jordbävning som tog många människors liv och lämnade huvudstaden Port au Prince i ruiner. Människor som överlevde jordbävningen var tvungna att söka sig ut på landsbygden. På grund av kollapsad infrastruktur i staden och otillräckliga sanitära förhållanden på landsbygden fick människor nu svårt att få tag på rent vatten och ta hand om sin personliga hygien. I oktober månad samma år drabbades landet av en koleraepidemi. Det var mer än 100 år sedan landet senast drabbades av ett kolerautbrott och det är troligt att landet i katastrofens efterdyningar ytterligare en gång blivit ett högriskområde för en koleraepidemi. På grund av jordbävningen har många människor tvingats dricka från samma källa, floden Artibonite, som tros vara kontaminerad med patogena *V. cholerae* (Arie 2010), och ett stort antal människor har drabbats av kolera. Den 27:e oktober rapporterade hälsoministeriet på Haiti 303 dödsfall av totalt 4722 kolerafall



(WHO 2010d). *V. cholerae* har under en kort period kommit i kontakt med en stor mängd värdar vilket har lett till att sjukdomen mycket snabbt kunnat sprida sig inom befolkningen.

### Säsongsvariationer

Det finns en korrelation mellan meteorologiska faktorer och frekvensen kolerafall (Hashizume *et al.* 2008), enligt WHO har klimatet en direkt påverkan på hur många människor som drabbas av sjukdomen (WHO 2010a). Forskare har kunnat konstatera att väderfenomen som El Niño Southern Oscillation (ENSO) har en effekt på förekomsten av kolerautbrott och fenomenet anses därför ha en betydelse för sjukdomens utveckling (Koelle *et al.* 2005). ENSO härstammar från den peruanska kusten men kan påverka variationer av kolerautbrott i Bangladesh (Pascual *et al.* 2002), på grund av att ENSO orsakar väderförändringar över hela jordklotet. Bland annat ses kraftiga regn och översvämningar i Bangladesh när den normalt kalla strömmen utanför den peruanska kusten vissa år byts ut mot varmt vatten från väst (Pascual *et al.* 2002). Normalt ska passadvindarna i området pressa bort varmt ytvatten från kusten så att kallt näringsrikt bottenvatten kan strömma upp, men under år med El Niño försvagas passadvindarna vilket medför att det kalla ytvattnet uteblir (Olofsson 2010). Kolerautbrotten i tredje världen kan således följa säsongsvariationer (WHO 2010a). Epidemiologiska studier av kolera i Bangladesh har varit betydelsefulla för koleraforskningen eftersom man har kunnat visa på en relation mellan kortvariga variationer i klimatet och antalet rapporterade kolerafall (Hashizume *et al.* 2008) (Figur 4). Bangladesh, som ligger i Gangesdeltat, är speciellt känsligt för regnperioder på grund av att landet ligger nära havsytan. Eftersom landet är mycket fattigt, har en stor befolkning och allvarliga sanitära brister är kolera idag ett stort problem. Kolerautbrott är ett ständigt inslag och sjukdomen anses vara endemisk i Bangladesh (Glass *et al.* 1982). Studier från huvudstaden Dhaka visar på en bimodal fördelning av kolerautbrott över året (figur 4). Kolerafallen toppar två gånger per år i samband med monsunregnen. Antalet kolerafall ökar före och i slutet av en monsunperiod (Hashizume *et al.* 2008). Riklig nederbörd under regnperioder leder till översvämningar av avlopp, vilket resulterar i att vattenreservoarer förorenas. Människor som lever i deltaområdet under monsunperioder kommer dessutom i kontakt med kontaminerat flodvatten när de dricker, lagar mat och badar. I mitten på monsunperioden ses dock en nedgång av kolerafall (Figur 4). En förklaring till detta kan vara att det mycket kraftiga regnet skapar en utspädningseffekt, det vill säga att koncentrationen bakterieceller minskar. Det kraftiga regnet kan även skapa en mer ogästvänlig miljö för *V. cholerae* eftersom salthalten i vattnet sänks (Hashizume *et al.* 2008). Kraftiga regn kan dessutom påverka tillväxten hos *V. cholerae* på grund av att pH (Hashizume *et al.* 2008), salthalt och koncentrationen av näringsämnen ändras i ytvattnet där frilevande planktoniska *V. cholerae* vistas (Lobitz *et al.* 2000). Likaså påverkas *V. cholerae* som koloniserar plankton av översvämningar. Ökad mängd näring i ytvattnet resulterar i algblomning i kustområden. Eftersom plankton verkar som reservoar för *V. cholerae* (Colwell 1996) kommer mängden kolera bakterier öka om mängden plankton ökar. I och med att deltaområdet är så låglänt kan tidvatten föra in kustvatten över land, så långt in mot land som Dhaka, vilket resulterar i att plankton hamnar i vattendragen i staden och människor i Dhaka får i sig en tillräckligt hög koncentration av *V. cholerae* för att infektion ska ske (Lobitz *et al.* 2000). Kraftiga regn leder dessutom till att det frisätts mer lösligt järn vilket förbättrar *V. cholerae*'s förmåga att upprätthålla sig i den akvatiska miljön (Lobitz *et al.* 2000). Diarrésjukdomar som kolera kan också få fäste i populationer under torrperioder. När det faller lite regn och temperaturen är hög torkar vattendrag lätt ut, vilket leder till att många människor tvingas använda samma vattenkälla. Om vattenkällan dessutom är kontaminerad med *V. cholerae* kan kolera snabbt sprida sig inom en befolkning (Hashizume *et al.* 2008).



Figur 4. Säsongsvariationer av kolerautbrott per vecka i Dhaka. I undersökningen har man tagit hänsyn till temperaturvariationer, nederbörd, vattennivå i floder och antalet kolerafall som rapporterats från sjukhus under perioden 1996-2002 (Från Hashizume *et al.* (2008), med tillåtelse från upphovsrättsinnehavaren).

## Diskussion

### Kolera, en infektionssjukdom som uppkommer och återkommer

När man studerar en infektionssjukdom som kolera, som ”*uppkommer och återkommer*”, är det viktigt att man studerar sjukdomen ur ett makroperspektiv, eftersom studier visar på en korrelation mellan socioekonomi, demografi och förekomst av kolerautbrott (Ackers *et al.* 1998). Bangladesh är ett tydligt exempel på den nära kopplingen mellan fattigdom och kolera. På grund av bristfällig infrastruktur och brist på rent vatten är kolera ett stort problem i landet. Varför sjukdomen är endemisk i Bangladesh är dock inte helt klart, tydligt är emellertid att epidemierna i områden uppkommer säsongsmässigt vilket har lett till att man tror att klimatet är en nyckelfaktor. Korrelation mellan koleraepidemier och klimatet har även kunnat påvisas genom studier på plankton. Eftersom planktonkoncentrationen regleras av temperaturen i ytvattnet och *V. cholerae* är en kolonisationsdjurplankton kommer kolerautbrotten följa samma periodiska mönster som temperaturen i havsytan. Kopplingen mellan *V. cholerae* och havet är tydlig. Mer studier bör därför läggas inom detta område, för i och med att klimatet ändras finns det en påtaglig risk att nischbredden för *V. cholerae* ökar. Vilket skulle innebära ökad frekvens av bakterien och ökad infektionsrisk för människan (Lipp *et al.* 2002). Havsnivån och planktonkoncentrationen skulle i endemiska deltaområden kunna verka som en indikator för koleraepidemier, och genom att mäta nivån på dessa faktorer kanske en koleraepidemi kan förutses och stoppas (Lobitz *et al.* 2000). I fattiga länder där det inte finns resurser att bygga ut infrastruktur, för att förbättra de sanitära förhållandena, finns möjligheten att minska frekvensen av kolerafall genom att filtrera bort kolera bakterien från dricksvatten med ett filter (Huq *et al.* 2010). Eftersom man hittar höga koncentrationer av *V. cholerae* i djurplankton ökar risken för infektion när människor hämtar sitt dricksvatten från floder och kustområden, där ytvattnet innehåller höga planktonkoncentrationer. Genom att sila detta vatten genom en duk skulle risken för en kolerainfektion minimeras och ett kolerautbrott kunna förebyggas, eftersom det krävs en relativt hög infektionsdos för att man ska drabbas av kolera.

### En studie på mikronivå

Det räcker inte att bara titta på en infektionssjukdom från ett makroperspektiv utan man bör även gå ner på mikronivå för att hitta agensen bakom sjukdomen, i kolerans fall bakterien *V.*

*cholerae*. *V. cholerae* visar ständigt prov på att vara en mästare på att anpassa sig till sin omgivning. Bakterien har genom HGT lyckats bredda sin nisch och två av *V. cholerae*s 200 serogrupper, 01 och 0139, kan gå från att leva i vatten till att verka toxiskt inne i människans tunntarm, två vitt skilda miljöer. Största delen av sin livscykel spenderar toxiska *V. cholerae* i den akvatiska miljön, en miljö som kan vara svår att överleva då den är näringsfattig. Mycket forskning har lagts ner på att försöka förstå hur *V. cholerae* överlever när den är utanför sin värd. Det man vet idag är att *V. cholerae* under sin akvatiska livsfas antingen förekommer som frilevande planktonisk cell eller som kolonisatör av djurplankton. Genom att kolonisera djurplankton i kustområden tror man att bakterien ökar sina chanser att överleva eftersom den kan använda kitin i exoskelettet som kol- och kvävekälla. Den akvatiska miljön är variationsrik. Jämfört med kustmiljön är förhållandena i djuphaven svåra för *V. cholerae* på grund av att temperaturen ofta är låg och mängden näring mycket sparsam. Marina *Vibrio* är väl anpassade till att överleva långa perioder ute till havs (Novitsky & Morita 1977). Den marina *Vibrio*-stammen ANT-300 ändrar under svält sin morfologi, den går från att vara stavformad till att bli klotformad. Att den även sänker sin metabolism och producerar betydligt mindre avkommor (Novitsky & Morita 1976, Novitsky & Morita 1977) tyder på att marina *Vibrio* kan överleva långa perioder utan eller på mycket lite näring och därmed kan driva långa sträckor till havs utan att dö. Samma egenskap har inte identifierats hos *V. cholerae*. In vitro studier har dock visat att *V. cholerae* under stress kan gå in i en vilolikhande fas, en ”levande men icke-odlingsbar”-fas (VNC) (Faruque *et al.* 1998). I VNC-fasen kan *V. cholerae* fortfarande orsaka infektion efter en lång period i näringsfattigt medium (Faruque *et al.* 1998). VNC skulle kunna vara en överlevnadsstrategi hos *V. cholerae* och VNC skulle kunna förklara varför det kan gå långa perioder mellan utbrott. En teori som lagts fram är att toxiska *V. cholerae* mellan kolerautbrott lever i association med akvatiska organismer i en VNC-form tills rätt miljösignal triggar igång ett nytt utbrott (Faruque *et al.* 1998). Kanske finns förklaringen till hur *V. cholerae* kan spridas mellan kontinenter utan sin värd samt hur koleraepidemier kan blossa upp till synes simultant på olika kontinenter i gåtan VNC. I dagsläget anses människan vara *V. cholerae*s enda värd. När man tittar på vad som händer på Haiti, ett land som inte har haft ett kolerautbrott på över hundra år, slås man dock av tanken att det kanske finns flera värdar. Kanske har bakterien funnits i landet sedan 1900-talet och väntat på rätt miljösignal. Som många katastrofer gjort tidigare så kommer även katastrofen på Haiti erbjuda forskare möjligheten att identifiera bakteriens naturliga reservoarer i landet, vilket kanske skulle leda fram till alternativa värdar för *V. cholerae*. Värt att notera är också att i och med att vi reser allt mer blir det även lättare för *V. cholerae* att ”resa” till nya värdar. Kanske ligger förklaringen till koleraepidemin på Haiti i att hjälparbetare tagit med sig *V. cholerae* in i landet. Tiden får utvisa.

Det är inte bara faktorer som samhälle, miljö, demografiska förändringar och infrastruktur som påverkar samspelet mellan *V. cholerae* och dess livsmiljö. Även förändringar och anpassningar hos bakterien påverkar samspelet. Någon gång under evolutionen så infekterade en fag en icke-toxisk akvatisk *V. cholerae* och under transduktionen fick bakterien gener som gjorde det möjligt för *V. cholerae* att kolonisera och infektera människan. När bakterien sedan var virulent verkar det som att miljön inne i tunntarmen har erbjudit en möjlighet för samevolution mellan *V. cholerae*, fag och människa (Waldor & Mekalanos 1996). Den gemensamma nämnaren i denna samevolution är TCP. TCP, den struktur hos bakterien som fagen behöver för att kunna infektera *V. cholerae*, samma komponent som *V. cholerae* behöver för att kolonisera sin värd. Nya patogena stammar av *V. cholerae* kan troligen på grund av TCP uppkomma inne i tarmen (Waldor & Mekalanos 1996). Minst en gång har detta skett, när 0139 Bengal bytte genetiskt material med 01 El Tor och då blev toxisk och epidemisk. Om förhållandena tillåter så är det troligt att HGT kommer ske igen och nya

patogena stammar av kolerabakterien kommer uppstå. HGT driver således evolutionen framåt och bör inte förbises. Ju fler toxiska stammar som uppstår ju svårare blir det för oss att bekämpa och bota kolera. Samlade studier på den mikrobiella patogenesen hos *V. cholerae* ger en bild av en komplex process där många faktorer påverkar och reglerar bakteriens virulens. Förmågan att koordinera genuttrycket med omgivningen gör *V. cholerae* till en god kolonisations i en mycket varierande miljö, och ju fler miljöer bakterien kan uppehålla sig i ju större chans har den att överleva när det är brist på värdar att infektera. Evolutionära anpassningar hos bakterien har även lett till att bakterien kan komma runt världens försvarssystem och istället använda dessa som signaler för att det är tid att gå in i virulent fas. In vitro studier visar på att galla kan vara den signal som *V. cholerae* behöver för att bli virulent. Gallan aktiverar gener som verkar vid bildandet av biofilm, den struktur som möjliggör kolonisering av tarmen. I fattiga länder där kolera är ett vanligt inslag på grund av bristfällig hantering av vatten, skulle en större förståelse för bildandet av biofilm och möjligheten för *V. cholerae* att gå in i VNC-fas eventuellt innebära en möjlighet att avvärja ett kolerautbrott. Genom att eliminera bakteriens möjlighet att bilda biofilm och gå in i VNC-fas kanske man kan ta bort förmågan hos *V. cholerae* att kolonisera och överleva långa perioder i vattenreservoarer (Reidl & Klose 2002). Den dagen vi fullt förstår hur *V. cholerae* överlever i sin ekologiska nisch, hur den reglerar sina virulensgener samt hur generna aktiveras av miljösignaler kanske ett kolerautbrott kan förebyggas och förhindras.

Med denna sammanfattningsartikel har jag försökt förmedla den unika associationen mellan *V. cholerae* och dess livsmiljö, koloniseringen av människan och akvatiska organismer. Mycket forskning har lagts ner och många frågetecken har lyckats rätas ut när det gäller denna gäckande patogena mikrob, trots detta fortsätter *V. cholerae* att överraska och utmana. Tydligt är att det återstår många frågor som måste besvaras för att vi ska förstå varför en sådan gammal infektionssjukdom som kolera fortsätter att ta så många människors liv. Till syvende och sist kanske vi måste lära oss att leva tillsammans med *V. cholerae* av den orsaken att bakterien i och med sin samevolution med människan alltid kommer att ligga steget före i sin virulens.

*“No matter how selfish our motives, we can no longer be indifferent to the suffering of others. The microbe that felled one child in a distant continent yesterday can reach yours today and seed a global pandemic tomorrow.”*

*Joshua Lederberg*

## **Tack**

Jag vill tacka tidsskrifterna Nature och The Lancet för lån av bilder och Ovid Technologies, Inc. för lån av diagram. Jag vill även tacka Lage Cerenius för goda råd, Katariina Kiviniemi för vägledande föreläsningar, Annica Löfling för bra återkoppling samt min fästman Kristoffer Hoflund för allt stöd under arbetets gång.

## **Erkännande**

Min sammanfattningsartikel är i största möjliga mån baserad på originalpublikationer, men för äldre publikationer samt för att minska mängden referenser har jag emellanåt refererat till sammanfattningsartiklar.

## Referenser

- Ackers ML, Quick RE, Drasbek CJ, Hutwagner L och Tauxe RV. 1998. Are there national risk factors for epidemic cholera? The correlation between socioeconomic and demographic indices and cholera incidence in Latin America. *International Journal of Epidemiology* **27**: 330-334.
- Arie S. 2010. Haiti's cholera outbreak could spread to neighbours. doi:10.1136/bmj.c6057.
- Bassler BL, Greenberg EP och Stevens AM. 1997. Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*. *Journal of Bacteriology* **179**: 4043-4045.
- Bassler Bonnie L, Wright M och Silverman MR. 1994. Multiple signalling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway. *Molecular Microbiology* **13**: 273-286.
- Carlson C, Linder C. 2008. Introduktion till mikrobiologi - med inriktning mot naturvetare och farmaceuter. 1:a uppl. Studentlitteratur, Lund.
- Chakraborty, Soumen, Mukhopadhyay AK, Bhadra RK, Ghosh AN, Mitra R, Shimada T och Yamasaki S. 2000. Virulence genes in environmental strains of *Vibrio cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 4022-4028.
- Chiavelli DA, Marsh JW och Taylor R K. 2001. The mannose-sensitive hemagglutinin of *Vibrio cholerae* promotes adherence to zooplankton. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 3220-3225.
- Colwell RR. 1996. Global climate and infectious disease: the cholera paradigm. *Science* **274**: 2025-2031.
- Colwell RR, Kaper J och Joseph SW. 1977. *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and other vibrios: occurrence and distribution in Chesapeake Bay. *Science* **198**: 394-396.
- Connell TD, Metzger DJ, Lynch J och Folster JP. 1998. Endochitinase is transported to the extracellular milieu by the eps-encoded general secretory pathway of *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology* **180**: 5591-5600.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR och Lappin-Scott HM. 1995. Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology* **49**: 711-745.
- Crawford JA, Kaper JB och DiRita VJ. 1998. Analysis of ToxR-dependent transcription activation of *ompU*, the gene encoding a major envelope protein in *Vibrio cholerae*. *Molecular Microbiology* **29**: 235-246.
- DiRita VJ, Mekalanos JJ. 1991. Periplasmic interaction between two membrane regulatory proteins, ToxR and ToxS, results in signal transduction and transcriptional activation. *Cell* **64**: 29-37.
- DiRita VJ, Parsot C, Jander G och Mekalanos JJ. 1991. Regulatory cascade controls virulence in *Vibrio cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 5403-5407.
- Faruque SM, Albert MJ och Mekalanos JJ. 1998. Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**: 1301-1314.
- Gardel CL, Mekalanos JJ. 1994. Regulation of cholera toxin by temperature, pH, and osmolarity. In bacterial pathogenesis part A: identification and regulation of virulence factors. Academic Press **235**: 517-526.
- Glass R, Becker IS, Huq MI, Stoll BJ, Khan MU, Merson MH, Lee JV och Black RE. 1982. Endemic cholera in rural Bangladesh, 1966-1980. *American Journal of Epidemiology* **116**: 959-970.
- Hashizume M, Armstrong B, Hajat S, Wagatsuma Y, Faruque ASG, Hayashi T och Sack DA. 2008. The effect of rainfall on the incidence of cholera in Bangladesh. *Epidemiology* **19**: 103-110.
- Helipern AJ, Waldor KM. 2003. pIII<sup>ctx</sup>, a predicted CTX $\phi$  minor coat protein, can expand the host range of coliphage fd to include *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology* **185**: 1037-

- 1044.
- Hung D, Zhu J, Sturtevant D och Mekalanos J. 2006. Bile acids stimulate biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Molecular Microbiology* **59**: 193-201.
- Huq A, West PA, Small EB, Huq MI och Colwell RR. 1984. Influence of water temperature, salinity, and pH on survival and growth of toxigenic *Vibrio cholerae* serovar O1 associated with live copepods in laboratory microcosms. *Applied and Environmental Microbiology* **48**: 420-424.
- Huq A, Yunus M, Sohel SS, Bhuiya A, Emch M, Luby SP, Russek-Cohen E, Nair GB, Sack RB och Colwell RR. 2010. Simple sari cloth filtration of water is sustainable and continues to protect villagers from cholera in Matlab, Bangladesh. *mBio* **1**, doi:10.1128/mBio.00034-10.
- Häse CC, Mekalanos JJ. 1998. TcpP protein is a positive regulator of virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 730 -734.
- Jobling MG, Holmes RK. 1997. Characterization of *hapR*, a positive regulator of the *Vibrio cholerae* HA/protease gene *hap*, and its identification as a functional homologue of the *Vibrio harveyi luxR* gene. *Molecular Microbiology* **26**: 1023-1034.
- Kaper JB, Morris JG och Levine MM. 1995. Cholera. *Clinical Microbiology Review* **8**: 48-86.
- Knirel YA, Widmalm G, Senchenkova SN, Jansson PE och Weintraub A. 1997. Structural studies on the short-chain lipopolysaccharide of *Vibrio cholerae* O139 Bengal. *European Journal of Biochemistry* **247**: 402-410.
- Koch R. 1883. An address on cholera and its bacillus. *The British Medical Journal* **30**: e augusti: 403-407.
- Koelle K, Rodo X, Pascual M, Yunus M och Mostafa G. 2005. Refractory periods and climate forcing in cholera dynamics. *Nature* **436**: 696-700.
- Kovach ME, Shaffer MD och Peterson KM. 1996. A putative integrase gene defines the distal end of a large cluster of ToxR-regulated colonization genes in *Vibrio cholerae*. *Microbiology* **142**: 2165-2174.
- Lee SH, Butler SM och Camilli A. 2001. Selection for in vivo regulators of bacterial virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 6889 -6894.
- Li CC, Crawford JA, DiRita VJ och Kaper JB. 2000. Molecular cloning and transcriptional regulation of *ompT*, a ToxR-repressed gene in *Vibrio cholerae*. *Molecular Microbiology* **35**: 189-203.
- Lipp EK, Huq A och Colwell RR. 2002. Effects of global climate on infectious disease: the cholera model. *Clinical Microbiology Review* **15**: 757-770.
- Lobitz B, Beck L, Huq A, Wood B, Fuchs G, Faruque ASG och Colwell RR. 2000. Climate and infectious disease: use of remote sensing for detection of *Vibrio cholerae* by indirect measurement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 1438 -1443.
- Meibom KL, Li XB, Wu CY, Roseman S och Schoolnik GK. 2004. The *Vibrio cholerae* chitin utilization program. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **8**: 2524-2529.
- Miller M B, Bassler BL. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology* **55**: 165-199.
- Miller MB, Skorupski K, Lenz DH, Taylor RK och Bassler BL. 2002. Parallel quorum sensing systems converge to regulate virulence in *Vibrio cholerae*. *Cell* **110**: 303-314.
- Miller VL, Mekalanos JJ. 1988. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in

- Vibrio cholerae* requires *toxR*. Journal of Bacteriology **170**: 2575-2583.
- Miller VL, Taylor RK och Mekalanos JJ. 1987. Cholera toxin transcriptional activator ToxR is a transmembrane DNA binding protein. Cell **48**: 271-279.
- Miller VL, Mekalanos JJ. 1984. Synthesis of cholera-toxin is positively regulated at the transcriptional level by *toxR*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **81**: 3471-3475.
- Mueller RS, McDougald D, Cusumano D, Sodhi N, Kjelleberg S, Azam F och Bartlett DH. 2007. *Vibrio cholerae* strains possess multiple strategies for abiotic and biotic surface colonization. Journal of Bacteriology **189**: 5348-5360.
- Nalin DR, Daya V, Reid A, Levine MM och Cisneros L. 1979. Adsorption and growth of *Vibrio cholerae* on chitin. Infection and Immunity **25**: 768-770.
- Novitsky JA, Morita RY. 1976. Morphological characterization of small cells resulting from nutrient starvation of a psychrophilic marine *Vibrio*. Applied and Environmental Microbiology **32**: 617-622.
- Novitsky JA, Morita RY. 1977. Survival of a psychrophilic marine *Vibrio* under long-term nutrient starvation. Applied and Environmental Microbiology **33**: 635-641.
- Olofsson M. 2010. El Niño. WWW-dokument: <http://www.ne.se/lang/el-nino>. Hämtad 2010-12-07.
- Ottmann KM, Miller JF. 1997. Roles for motility in bacterial-host interactions. Molecular Microbiology **24**: 1109-1117.
- Parge HE, Forest KT, Hickey MJ, Christensen DA, Getzoff ED och Tainer JA. 1995. Structure of the fibre-forming protein pilin at 2.6 Å resolution. Nature **378**: 32-38.
- Parsek MR. 2007. Microbiology: bilingual bacteria. Nature **450**: 805-807.
- Pascual M, Bouma MJ och Dobson AP. 2002. Cholera and climate: revisiting the quantitative evidence. Microbes and Infection **4**: 237-245.
- Prescott LM, Harley JP och Klein DA. 1999. Microbiology. 4:e uppl. The McGraw-Hill Companies, Inc., New York.
- Provenzano D, Schuhmacher DA, Barker JL och Klose KE. 2000. The virulence regulatory protein ToxR mediates enhanced bile resistance in *Vibrio cholerae* and other pathogenic *Vibrio* species. Infection and Immunity **68**: 1491-1497.
- Reidl J, Klose KE. 2002. *Vibrio cholerae* and cholera: out of the water and into the host. FEMS Microbiology Reviews **26**: 125-139.
- Rhine JA, Taylor RK. 1994. TcpA pilin sequences and colonization requirements for O1 and O139 *Vibrio cholerae*. Molecular Microbiology **13**: 1013-1020.
- Richardson K. 1991. Roles of motility and flagellar structure in pathogenicity of *Vibrio cholerae*: analysis of motility mutants in three animal models. Infection and Immunity **59**: 2727-2736.
- Sack DA, Sack RB, Nair GB och Siddique AK. 2004. Cholera. The Lancet **363**: 223-233.
- Satcher D. 1995. Emerging infections: getting ahead of the curve. Emerging Infectious Diseases **1**: 1-6.
- Smittskyddsinstitutet 2010. Kolera. WWW-dokument: <http://www.smittskyddsinstitutet.se/sjukdomar/kolera/>. Hämtad 2010-11-03.
- Surette MG, Miller MB och Bassler BL. 1999. Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96**: 1639-1644.
- Tamayo R, Patimalla B och Camilli A. 2010. Growth in a biofilm induces a hyperinfectious phenotype in *Vibrio cholerae*. Infection and Immunity **78**: 3560-3569.
- Ternström A, Molin G. 1994. Bakteriologens guide till taxonomin. 1:a uppl. Anox Educator AB, Lund.

- Wai SN, Mizunoe Y, Takade A, Kawabata SI och Yoshida SI. 1998. *Vibrio cholerae* O1 strain TSI-4 produces the exopolysaccharide materials that determine colony morphology, stress resistance, and biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 3648-3655.
- Val ME, Bouvier M, Campos J, Sherratt D, Cornet F, Mazel D och Barrel FX. 2005. The single-stranded genome of phage CTX is the form used for integration into the genome of *Vibrio cholerae*. *Molecular Cell* **19**: 559-566.
- Vanden Broeck D, Horvath C och De Wolf MJS. 2007. *Vibrio cholerae*: cholera toxin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **39**: 1771-1775.
- Vinogradov EV, Bock K, Holst O och Brade H. 1995. The structure of the lipid A-core region of the lipopolysaccharides from *Vibrio cholerae* O1 smooth strain 569B (Inaba) and rough mutant strain 95R (Ogawa). *European Journal of Biochemistry* **233**: 152-158.
- Waldor MK, Mekalanos JJ. 1996. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science* **272**: 1910-1914.
- Waldor MK, RayChaudhuri D. 2000. Bacterial genomics: treasure trove for cholera research. *Nature* **406**: 469-470.
- Watnick PI, Kolter R. 1999. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Molecular Microbiology* **34**: 586-595.
- WHO 2010a. Assessing the relationship between climatic factors and diarrhoeal and vector-borne disease – a retrospective study generic research protocol. WWW-dokument: [www.searo.who.int/LinkFiles/CDS\\_SEA-CD-205.pdf](http://www.searo.who.int/LinkFiles/CDS_SEA-CD-205.pdf). Hämtad 2010-11-07.
- WHO 2010b. Cholera vaccines: WHO position paper. *Weekly epidemiological record* **13**:117-128.
- WHO 2010c. Cholera. WWW-dokument: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs107/en/>. Hämtad 2010-10-28.
- WHO 2010d. Cholera in Haiti - update. WWW-dokument: [http://www.who.int/csr/don/2010\\_10\\_28/en/](http://www.who.int/csr/don/2010_10_28/en/). Hämtad 2010-10-28.
- Yildiz, Fitnat H och Schoolnik GK. 1999. *Vibrio cholerae* O1 El Tor: Identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 4028 -4033.
- Yu RR, DiRita VJ. 2002. Regulation of gene expression in *Vibrio cholerae* by ToxT involves both antirepression and RNA polymerase stimulation. *Molecular Microbiology* **43**: 119-134.
- Zhu J. 2002. Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 3129-3134.
- Zhu J, Mekalanos JJ. 2003. Quorum sensing-dependant biofilms enhance colonization in *Vibrio cholerae*. *Developmental Cell* **5**: 647-656.