

Właściwości oraz mechanizm działania toksyn A i B *Clostridium difficile*

ZYGMUNT CYGAN, WIESŁAW CYGAN*

Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Słowicza 2, 20-336 Lublin

*Wojewódzki Szpital Specjalistyczny im. Stefana Kardynała Wyszyńskiego, Al. Kraśnicka 100, 20-718 Lublin

Cygan Z., Cygan W.

Properties and action of toxins A and B of *Clostridium difficile*

Summary

The article presents the growing role of *Clostridium difficile* in causing infections in human patients, and, to some extent in animals as well. They occur mainly as the result of antibiotic therapy and anti-cancer chemotherapy which generate the selection of easily spore-forming and resistant pathogenic bacteria. These, in turn, after multiplying in the intestines, may induce antibiotic associated diarrhea, colitis and sometimes even fatal pseudomembranous colitis. The article also discusses different reservoirs of *C. difficile* in the hospital environment and its paths of transmission through patients and hospital staff. Special attention is paid to exogenous sources of infection such as animals and their role as possible vectors of zoonotic infections. Different virulence factors of *C. difficile*, mainly toxin A (enterotoxin) and toxin B (cytotoxin), their biological properties, toxin receptors and the attack mechanisms of enterotoxin on the actin-containing cytoskeleton of the gut epithelium, increased peristalsis and permeability, accumulation of fluid and intestinal damage are also evaluated. General principles of therapy, especially the use of vancomycin together with cholestyramine and a probiotic which deals with *Saccharomyces boulardii* (resistant to antibiotics) are also presented.

Keywords: *C. difficile* – toxins-activity.

W ostatnich latach nieprzerwanie wzrasta, głównie w medycynie (26), rola chorobotwórcza beztlenowca *C. difficile* (3, 7, 44, 46). Wynika to z postępującej umiejętności diagnozowania tego kłopotliwego drobnoustroju (łac. *difficile* – trudny, mozolny), nadto paradoksalnie z dokonanego postępu w zwalczaniu zakażeń człowieka, szczególnie metodą antybiotykoterapii z użyciem coraz to doskonalszych preparatów o szerokim spektrum przeciwbakteryjnych oddziaływań (3, 26, 53). Stymuluje ona selekcjonowanie niewrażliwych na taki wpływ form przetrwalnikujących *C. difficile* (8, 26, 32). Namnożony zarazek, zresztą w różnym czasie od zakończenia leczenia (3, 32), jest głównym u ludzi czynnikiem przyczynowym biegunki poantybiotykowej, zapalenia okrężnicy (*pancolitis*), czasem rzekomoblaniastego (*colitis pseudomembranacea*) z wystąpieniem objawów toksycznych olbrzymiej okrężnicy (*megacolon toxica*, choroba Hirschsprunga) zagrażających perforacją ściany jelita, bakteriami i zejściem śmiertelnym (26, 32, 46). Dowiedziano także w przypadku człowieka możliwości toksycznych oddziaływań w powyższych warunkach niektórych szczepów *C. perfringens* (10) i *C. sporogenes* (21), a u królików *C. spiriforme* (9).

Nosicielstwo *C. difficile* szacowane u osób dorosłych na około 6% wielokrotnie wzrasta w następstwie podawania np. cefalosporyn (do 57%, wg 54). Miara problemu, niesłychanie w medycynie istotnego, jest rozpowszechnienie drobnoustroju w środowisku ze-

wnętrznym (źródłem leczenia pacjenci, wg 42, zatrudniony personel, wg 40, używany sprzęt, wg 11) sprzyjające szerzeniu się zakażeń szpitalnych (nosicielstwo stwierdzone u ponad 20% osób hospitalizowanych w czasie dłuższym niż 7 dni, wg 25). Poza tym niebagatelne są wysokie koszty leczenia powyższych infekcji (jeden przypadek ponad 4000 USD, wg 54) oraz trudność obniżenia potencjału epidemiologicznego poprzez eliminację niezwykle opornych form zarodnikowych *C. difficile* (6, 26, 32).

Drobnoustrój występuje w różnych biotopach (m.in. gleba, osady morskie, torfowiska, wg 35), co więcej w wysokiej koncentracji (rezerwuarem egzogennym gleba: $7,5 \times 10^7$ - $7,5 \times 10^{12}$, wg 18, 40). Poza tym stwierdzany jest w kale zwierząt (źródłem endogennym m.in. konie – wg 27, bydło – wg 35, psy – wg 51, koty – wg 35, zające – wg 15, ptaki – wg 35) wywołując czasem przewlekłą biegunkę psów (5, 51), także poantybiotykową królików (45), niekiedy spontaniczną chomików (13), nawet ze śmiertelnym przebiegiem (źrebięta: krwotoczno-martwicze *enterocolitis*, wg 28). Powszechność występowania *C. difficile* u zwierząt zainspirowała do wysunięcia ostatnio hipotezy o możliwości zoonotycznego zagrożenia tą infekcją człowieka (6).

Wytwarzanie toksyn

Drobnoustrój oddziałuje w jakimś stopniu degradować na struktury tkankowe za pośrednictwem hydrolitycznych enzymów, tj. poprzez proteazę, kolage-

nazę i hialuronidazę, nadto heparynazę oraz chondroityno 4-sulfatazę (48, 49, 55). Niesłuchanie istotną właściwość, która określa możliwość namnożenia się laseczki *C. difficile* stanowi wyjątkowa jej wręcz oporność – warunkowana łatwością wytwarzania *in vivo* form przetrwalnych – na wszystkie niemal antybiotyki (7, 19). Główną jednak rolę w chorobotwórczości zarazka spełniają toksyny A i B (6, 7, 26, 37, 41, 43) będące największymi molekułami spośród jądów bakteryjnych (7). Posiadają cechy toksyn białkowych, tj. ciepłowrażliwość (niszczone w 100°C w ciągu 10 min.), podlegają transformacji w anatoksynę (0,4% formalina w 37°C podczas 36 godz., wg 16) i są wrażliwe na wpływ trypsyny (6), nadto inaktywację chemiczną (przez kwasy i zasady, wg 6). Geny toksyn A i B są zlokalizowane na jednym chromozomie, a jedynie oddzielone obszarem 0,4 kb proteiny o nieznannej jeszcze funkcji (39).

Jady A i B tworzą długie łańcuchy polipeptydowe. Podstawowe ich właściwości zestawiono w tab. 1 (wg 36, 37, 41). Wynika z niej, że toksyny te charakteryzuje podobna aktywność letalna (DL = 50 ng). Toksyna A (c.m. = 308 000) składa się z 2710 grup aminokwasowych i jest enterotoksyną (*dosis enterotoxica* = 1 µg, wg 37), natomiast nieenterotoksynogenny polipeptyd B utworzony z 2366 aminokwasów stanowi wobec komórek nabłonkowych nadzwyczaj silną cytotoksynę (*dosis toxica* = 1 pg, wg 37). Sekwencję tych aminokwasów znamionuje wysoki stopień homologii (17).

Odcinek końcowy N polipeptydów A i B wykazuje szereg podobieństw (17), a ich zakończenia karboksylowe (–COOH) współtworzą układ powtarzających się jednostek (39). W toksynie A pełnią one funkcję receptora wiążącego połączone z galaktozą ugrupowania chemiczne (Galα1-3Galβ1-4GlcNAc) komórek epitelialnych chomików i królików (47). Przypomina to układ receptorowy nabłonka jelit człowieka, w którym antygeny I, X i Y wychwytyją wytworzoną enterotoksynę (52). Zatem struktury te przedstawiają najmniejszą przypuszczalnie jednostkę funkcjonalną (Galβ1-4GlcNAc).

Jeszcze inną, jednak wciąż hipotetyczną strukturę wiążącą komponenty A i B stanowić może hydrofobowy odcinek ich centrum złożony z 50 grup aminokwasowych i 4 cząsteczek cysteiny (39).

Powyższe dane odnoszą się wyłącznie do enterotoksyny – bowiem faktyczny receptor toksyny B nie został jeszcze zidentyfikowany. Interesujące, że nabłonek jelit płodu wykazuje wysoką oporność na chorobotwórczy wpływ polipeptydów A i B (14). Tłumaczy się to niewykształceniem receptorów, przypuszczalnie nie funkcjonujących także u niemowląt znoszących bez klinicznych konsekwencji wysokie nawet dawki jądów *C. difficile* (7).

Chorobotwórcze szczepy wytwarzają znaczną na ogół koncentrację obu toksyn (1). Podkreślany jest związek pomiędzy toksynogenezą a aktywnością kolagenolityczną (31). Izolaty *C. difficile* o wyższej dla chomików patogenności charakteryzuje silniejsza również właściwość proteolityczna (39).

Pewną osobliwością jest podobieństwo cech fizykochemicznych i antygenowych jądów *C. difficile* oraz *C. sordelli* (41). Dotyczy to oddziaływujących enterotoksynogennie toksyny A (*C. difficile*) i HT (*C. sordelli*), nadto letalnie komponentu B (*C. difficile*) oraz LT (*C. sordelli*), aczkolwiek mechanizm tych wpływów na organizm jest odmienny (41).

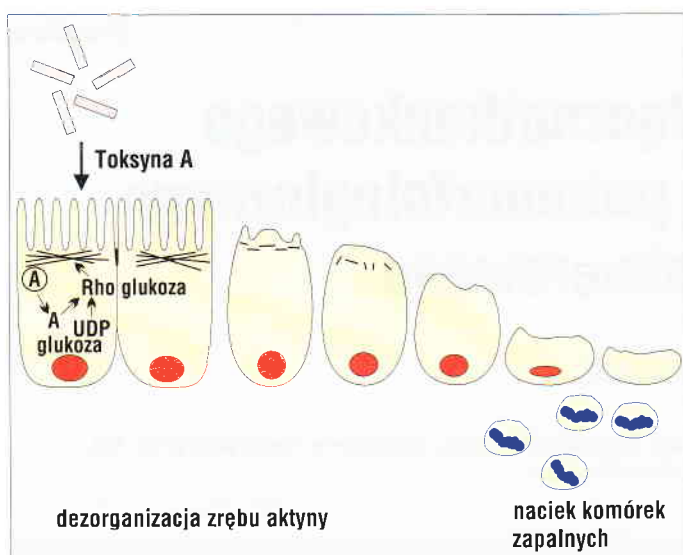
Mechanizm działania

C. difficile jest wręcz niezwykle patogenem, który ujawnia swój chorobotwórczy wpływ głównie w warunkach prowadzonej antybiotykoterapii (22, 36) z użyciem przede wszystkim penicylin, klindamycyny i cefalosporyn (20, 24, 42). Powstała wówczas próżnia mikrobiologiczna (*microbiological void*, wg 2) wypełnia ten łatwo zarodnikujący beztlenowiec – zatem także wyjątkowo oporny na wpływ podawanych leków (26). Natomiast przed sfagocytowaniem zabezpiecza laseczkę *C. difficile* obecność struktury przypominającej otoczkę (1). Rola wytwarzanych fimbrii i stwierdzanych różnic w lepkości śluzu jelitowego nie została dla chorobotwórczości tego drobnoustroju jeszcze rozstrzygnięta (30, 39).

Istnieje szereg doniesień świadczących o jeszcze innym pochodzeniu infekcji występujących w środowisku szpitalnym (25, 32, 35). Chodzi tu głównie o zakażenia przyranne i w obrębie jamy brzusznej (26), nadto pneumologiczne oraz ginekologiczne (24, 32, 50), być może powodowane nawet odpowiednio wyselekcjonowanym w wirulencji szczepem (26).

Wywołane infekcją zmiany są determinowane wpływem toksyn A i B (26, 43). Wstępnie, na poziomie molekularnym, zachodzi proces ich internalizacji (7, 26), drogą uogólnionej pinocytozy (33), lub endocytozy mediowanej przez receptory komórkowe (7). Jednak komponent A nie wpływa bezpośrednio na zrab komórki, ale powoduje UDP – glukozylację i odłączenie glukozy od urydynodwufosforanu (ryc. 1), co doprowadza do zakłócenia funkcji białek regulujących polimeryzację aktyny (proteiny Rho, Rac, CDC42, wg 29). Wywołany stan jej depolimeryzacji w konsekwencji powoduje rozluźnienie złącz międzyenterocytowych zabezpieczających spójność nabłonka jelit (ryc. 1). Zaburza to perystaltykę jelit (41), zwiększa ich przesiekowość (23), głównie dla wody i elektrolitów (7). Komórki ulegają atrakcji i zaokrągleniu, a jądro marginalizacji (43). Indukowaną jednocześnie reakcję zapalną charakteryzuje naciek utworzony z neutrofilów i makrofagów, a stymulowana prostaglandyna E2 i uwolnione cytokiny (interleukiny B4, B8) partycypują w destrukcji jelit (38). Nawet stosunkowo niewielkie jej uszkodzenia umożliwiają cytotoksyczny wpływ toksynie B, która penetrując naruszoną przez enterotoksynę spójność ściany jelit wywiera efekt letalny (41). Zatem w świetle tych danych pierwotna rola komponentu A w zapoczątkowywaniu powyższych zaburzeń wydaje się być niepodważalna (7, 8, 36, 41).

Większość ognisk chorobowych występuje na oddziałach szpitalnych, w których kumuluje się w naj-

Ryc. 1. Mechanizm działania enterotoksyny *C. difficile*Tab. 1. Niektóre właściwości toksyn A i B *C. difficile*

Właściwości	Toksyny	
	A	B
Ciężar molekularny	308 000	270 000
Dawka cytotoksyczna	10 ng	1 pg
Dawka enterotoksyczna	1 pg	-
Dawka letalna	50 ng	50 ng
Hemaglutynacja	+	-
Receptory	Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc, antygeny I, X, Y	nieznane
Zawartość kationów	Zn, Fe	Zn, Fe

wyższym stopniu wpływ zwiększonego zagrożenia w związku z prowadzonym leczeniem przeciwnowotworowym (cytostatyki, radioterapia, wg 28, 32, 52) i stosowaną antybiotykoterapią (22, 24, 26, 36, 42), szczególnie u chorych w podeszłym wieku (sale onkologiczne, chirurgiczne, geriatryczne, wg 4, 12, 30, 48, 49). Poza tym wspomnieć należy, że w zwalczaniu tych jatrogenicznych zakażeń na tle *C. difficile* wykorzystuje się przede wszystkim wankomycynę (enteralnie u człowieka w ciężkich przypadkach 4 × 125 mg, wg 32, 44), rzadziej metronidazol (u psów 200 mg, dwukrotnie dziennie, wg 5), nadto ciprofloksacynę i kwas fusydynowy (34). Efekt terapeutyczny wspomaga użycie cholestyraminy (właściwości wiążące toksyny A, B), poza tym probiotyku zawierającego w swoim składzie niezwykle odporne na antybiotyki drożdże *Saccharomyces boulardii* (Ultra Levure, czas podawania 4 tyg.) dość skuteczne w przeciwdziałaniu nawrotom zachorowań (26, 46). W przypadku toksycznego przerostu okrężnicy (*megalolon toxica*) wymogiem może stać się interwencja chirurgiczna (wycięcie okrężnicy,

colectomia), niezwykle jednak ryzykowna wobec stosunkowo wysokiej śmiertelności samego zabiegu (26).

Piśmiennictwo

- Baldassari L., Donelli G., Cerquetti M.: Microbiologica 14, 295, 1991.
- Bartlett J. G.: Hopkins Med. J. 151, 1, 1982.
- Bartlett J. G.: Rev. infect. Dis. 12, 243, 1990.
- Bartlett J. G.: Clin. infect. Dis. 15, 573, 1992.
- Berry A. P., Levett P. N.: Vet. Rec. 118, 102, 1986.
- Bodin G., Messadi L.: Rev. méd. vét. 149, 109, 1998.
- Bongaerts G. P. A., Lyerly D. M.: Microbiol. Path. 22, 253, 1997.
- Borriello S. P.: J. med. Microbiol. 33, 207, 1990.
- Borriello S. P.: J. clin. Microbiol. 17, 414, 1983.
- Borriello S. P., Welch A. R., Larson H. E.: Lancet 1, 305, 1984.
- Brooks S. E., Yeal R. O., Kramer M.: Infect. Cont. Hosp., Epidemiol. 13, 98, 1992.
- Cartmill T. D., Panigrahi H., Worsley M. A.: J. Hospital Infect. 27, 1, 1994.
- Chang J., Rohwer R. G.: Lab. Anim. Sci. 40, 544, 1990.
- Chang T. W., Sullivan N. M., Wilkins T. D.: Acta Pharmacol. Sin. 5, 448, 1985.
- Dubos F., Martinet L., Debard J.: Am. J. vet. Res. 45, 1242, 1984.
- Ehrich M.: Toxicon 20, 983, 1982.
- Eichel-Streiber C., Laufengerg-Feldman R.: Med. Microbiol. Immun. Berl. 179, 271, 1990.
- Emeruwa A. C.: Bull. Anim. Hlth. Prod. 37, 235, 1989.
- George W. L., Rolfe R. D., Sutter V. L.: Am. J. clin. Nutr. 32, 251, 1971.
- Gerding D. N., Olson M. M., Johnson S.: Am. J. Surg. 159, 212, 1990.
- Hara-Kudo Y., Morishita Y., Nagaoka Y.: J. vet. med. Sci. 58, 1181, 1996.
- Hatheway C.: Clin. Microbiol. Rev. 16, 66, 1990.
- Hecht G., Potkoulakis C., Lamont J. T.: J. clin. Invest. 82, 1516, 1988.
- Hirschhorn L. R., Trnka Y., Onderdonk A.: J. infect. Dis. 169, 127, 1994.
- Johnson S., Clabots C. R., Linn F. V.: Lancet 1, 97, 1990.
- Johnson S., Gerding D. N.: Enterotoxemic infections. (W:) The Clostridia, Molecular Biology and Pathogenesis, ed. J. I. Rood, B. N. McClane, J. G. Songer, R. W. Titball, Acad. Press 1997.
- Jones R. L.: J. vet. diagn. Invest. 1, 84, 1989.
- Jones R. L., Adney W. S., Alexander A. F.: J. Am. vet. med. Ass. 193, 76, 1988.
- Just I., Wilm M., Selzer J.: J. biol. Chem. 270, 1393, 1995.
- Kamthan A. G., Bruckner H. W., Hirschman S. Z.: Arch. Intern. Med. 152, 1715, 1992.
- Karjalainen T., Poilane L., Collingnon A.: Microecol. Ther. 25, 157, 1995.
- Knoop F. C., Owens M., Crocker I. C.: Clin. Microbiol. Rev. 6, 251, 1993.
- Kushnaryov V. M., Sedmak J. J.: Infect. Immun. 57, 3914, 1989.
- Lattau L. A.: J. Am. med. Ass. 260, 2216, 1988.
- Levett P. N.: J. infect. Dis. 12, 253, 1986.
- Lyerly D. M., Krivan H. C., Wilkins T. D.: Clin. Microbiol. Rev. 1, 1, 1988.
- Lyerly D. M., Lockwood D. E., Richardson S. H.: Infect. Immun. 35, 1147, 1982.
- Makida Y. R., Makh S., Hyde S.: Gut 38, 337, 1996.
- Mastrantonio P., Pantosti A., Cerguetti M.: Anaerobe 2, 337, 1996.
- McFarland L. V., Mulligan M. E., Kwok R. Y.: N. Engl. J. Med. 320, 204, 1989.
- Moncrief J. C., Lyerly D. M., Wilkins T. D.: Molecular biology of the Clostridium difficile toxins. (W:) The Clostridium, Molecular Biology and Pathogenesis, ed. J. I. Rood, B. M. McClane, J. G. Songer, R. W. Titball, Acad. Press 1997.
- Pear S., Williamson T., Bettin K.: Ann. Intern. Med. 120, 272, 1994.
- Popoff M. R.: Rev. méd. vét. 147, 425, 1996.
- Ramaswamy R., Grover M., Corpuz M.: Am. J. Gastroenterol. 91, 460, 1996.
- Reh J. E., Pakes S. P.: Lab. Anim. Sci. 32, 253, 1982.
- Rolfe C.: J. Infection 32, 1, 1996.
- Rolfe R. D., Song W.: Clin. infect. Dis. 16, 219, 1993.
- Seddon S. V., Borriello S. P.: J. med. Microbiol. 36, 307, 1992.
- Seddon S. V., Hemingway J., Borriello S. P.: J. med. Microbiol. 34, 169, 1990.
- Stieglbauer K. T., Gruber S. A., Johnson S.: Clin. infect. Dis. 20, 160, 1995.
- Struble A. L., Tang Y. J., Kass P. H.: J. vet. diagn. Invest. 6, 342, 1994.
- Tucker K. D., Wilkins T. D.: Infect. Immun. 59, 73, 1991.
- Wilson K. H.: Clin. infect. Dis. 16, 214, 1993.
- Wilcox M. H., Fawley W. N., Settle C. D.: J. Hospital Infect. 38, 93, 1998.
- Wood-Helie S. J., Dalton S. P., Shadomy S.: Europ. J. clin. Microbiol. 5, 441, 1986.