

# CHOROBY ZAKAŻNE I INWAZYJNE

ZYGMUNT CYGAN, IRENA BARCZ, REGINA CYGAN

## Rola chorobotwórcza, struktura i właściwości toksyn *Clostridium difficile*

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

Wytwarzane przez *Clostridium difficile* toksyny warunkują ekspresję wszystkich objawów klinicznych wywoływanych schorzeń (11). Stąd też wynika zainteresowanie rolą chorobotwórczą, strukturą i właściwościami tych jądów (8). Przedstawienie tej mało znanej problematyki jest celem niniejszego opracowania.

Toksyny *C. difficile* przez kilkadziesiąt lat — od wykrycia tego zarazka w 1934 r. (36) — nie były dokładnie badane (66). Zatem i rola chorobotwórcza drobnoustroju nie mogła być pewnie określona. Zwykle upatrywano ją w sporadycznych zakażeniach, częściej dotyczących zewnętrznych tkanek (33, 35, 49) niż narządów wewnętrznych (61, 67). Podobnie rzadko laseczkom *C. difficile* przypisywano wywoływanie biegunki u młodych zajęcy (22) oraz udział w mechanizmie śmierci na tle niedrożności jelit u psów i królików (2, 13). Niedawno wskazano jednak na szerszy zakres chorobotwórczych oddziaływań beztlenowców *C. difficile*, głównie poprzez udokumentowanie roli ich toksyn w patogenezie — indukowanych przez chemioterapeutyki — jatrogennych powikłań u człowieka, opisanych jako rzekomobłoniaste zapalenie okrężnicy (Pseudomembranous Colitis — PMC, 10, 30, 31, 38, 42, 43, 60) i biegunka poantibiotykowa (Antibiotic — Associated Diarrhoea — AAD, 32, 47). Schorzenia te przebiegają z bólami brzucha, uporczywą biegunką trwającą nawet do kilku tygodni (10—20 wypróżnień dziennie) oraz z gorączką (38°—40°C) i leukocytozą (17 000—45 000 komórek/mm<sup>3</sup> — 8, 50, 72), a wyjątkowo również z zapaleniem stawów (63). Śmiertelność w ciężkich stanach chorobowych osiągała 20% (50). Niekiedy zespół objawów klinicznych, przypominających PMC i AAD, może wystąpić niezależnie od stosowanych chemioterapeutyków (8, 51). Sugeruje to wpływ jeszcze innych niż preparaty przeciwbakteryjne czynników ryzyka odnośnych komplikacji (56, 77). Udział jednak *C. difficile* w powikłaniach polekowych jest wysoki, gdyż dotyczy on 90%—100% przypadków PMC i 20% AAD (5). Częstotliwość występowania powyższych zaburzeń osiągnęła już w Szwecji odpowiednio 0,09% i 0,6% (3).

Podobne komplikacje, związane z *C. difficile* a odpowiadające PMC i AAD, występują również u otrzymujących preparaty przeciw-

bakteryjne chomików i świnek morskich (10, 48, 64). Zwierzęta te zostały nawet uznane za modelowe z uwagi na łatwość reprodukcji u nich takich powikłań (10). U chomików jednak — w przeciwieństwie do człowieka — proces chorobowy lokalizuje się w jelicie biodrowym i ślepym, a więc odpowiada on zaburzeniom typu *enterocolitis* (8, 27). Badaniem mikroskopowym wykrywano wybroczyny i nacieczenia leukocytarne, a ponadto rozrost komórek nabłonka oraz niekiedy owrzodzenia i wysięk (1, 37, 48, 58).

Fekety i wsp. (26) wykazali działanie indukujące PMC i AAD u 15 spośród 24 badanych chemioterapeutyków. Co więcej, okazało się, że analogiczne stany chorobowe mogą powstać po podaniu większości antybiotyków aktualnie wykorzystywanych w lecznictwie (8). Największe jednak zagrożenie stwarza stosowanie klindamycyny, cefalosporyn i penicylin (5). W tym działaniu aktywność klindamycyny i cefalosporyn okazała się 36—63 raza wyższa niż penicylin (3). Najmniej takich właściwości przypisuje się wankomycynie zalecanej w terapii PMC i AAD (8, 73). Antybiotyk ten wykazuje bowiem wyjątkową aktywność wobec szczepów *C. difficile*, a ponadto jest wolno resorbowany z jelit i osiąga w nich po aplikacji doustnej wysoką koncentrację wynoszącą 80—12 000 µg/g kału (73).

Mechanizm indukowanych przez antybiotyki i związanych z *C. difficile* zaburzeń jest złożony, a przy tym niejednorodny. Fakt, że cefalosporyny w wywołującej *enterocolitis* dawce 10 mg osiągają w kale koncentrację 10 µg/g, tj. niższą niż ich MIC wynoszące dla szczepów *C. difficile* 100 µg/ml, sugeruje możliwość oddziaływania poprzez selekcjonowanie opornych mutantów (26). Rozwinięcie się omawianych komplikacji determinuje w dużym też stopniu powszechność nosicielstwa *C. difficile* stwierdzonego u 16%—71% niemowląt (20, 36, 39, 44, 69, 76), 2%—3% osób dorosłych (5, 29, 38, 44, 54, 76) i u 6% chomików (74). Zatem rezerwua-rem tych beztlenowców jest w większości powikłań o charakterze PMC i AAD sam makroorganizm. W tych przypadkach rolę antybiotyków sprowadza się najczęściej do wpływów supresyjnych na konkurencyjną mikroflorę, co ma ułatwiać wytworzenie się w okrężnicy „próżni mikrobiologicznej” (microbiologi-

cal void — 5), gwałtownie wypełnianej przez własne szczepy *C. difficile* (11). Niekiedy jednak przebieg epidemiczny PMC i AAD wydaje się wskazywać na infekcję egzogenną (16, 52). Przemawia za tym wykazywana obecność tych beztlenowców w kurzu pomieszczeń szpitalnych oraz na rękach i w kale zatrudnionego personelu (11, 16), a także skuteczność stosowania barier chroniących przed rozwojem zewnątrzpochoodnych zakażeń (43, 74). W związku z tym zasugerowano nawet możliwość uznania PMC i AAD za schorzenia zaraźliwe (25, 43). Podkreśla się też znaczenie osiąganych w trakcie terapii niezamierzonych, bo subinhibicyjnych dla *C. difficile* stężeń chemioterapeutyków w okrężnicy (26). Stąd też wynika paradoksalna możliwość wywołania PMC i AAD podaniem preparatów aktywnych wobec tych beztlenowców (21). Również antybiotyczna oporność endospor dodatkowo ułatwia ich konwersję do potencjalnie toksynogennych form wegetatywnych (5). Wreszcie niektóre antybiotyki mają osłabiać oporność śluzówki okrężnicy i w ten sposób potencjować wpływ wytworzonych toksyn (26).

Koncentracja laseczek *C. difficile* u osób dotkniętych AAD waha się od  $10^6$  (76) do  $10^9$ /g kału (78). Podobną liczbę zarazka stwierdza się także u bezobjawowych nosicieli (40) oraz u osób zdrowych, otrzymujących cyfoksytynę (52). Niejednorodna jest jednak toksykogenność izolowanych beztlenowców (15, 16, 65). Aktywne pod tym względem szczepy, tworzące najczęściej serotyp I, stanowią tylko 38% całej populacji (53). Od nich jednak wyłącznie zależy rozwój schorzenia (42, 53).

Swoistość antygenowa toksyn *C. difficile*, wykrywanych w filtratach kałowych, stanowiła przez szereg lat dyskutowany problem (11, 46, 59). Początkowo za osobliwość uznawano zubożenie ich aktywności nie tylko surowicą antytoksyczną przeciwko *C. difficile* (9), ale również specyficzną dla *C. sordelli* (45). Fenomen ten, przy nieobecności w kale laseczek *C. sordelli*, ostatecznie wyjaśniono związkiem antygenowym toksyn obu beztlenowców (24, 57).

Wykazywane u osób chorych miana toksycznych wyciągów kałowych odpowiadają zwykle rozcieńczeniom od  $10^{-2}$  do  $10^{-7}$  (6). Podobną aktywność mogą również posiadać ekstrakty pochodzące od ozdrowieńców (7, 19), a nawet od osób zdrowych (28, 76), głównie noworodków (14, 39, 59). Fakt ten usiłuje się tłumaczyć działaniem wytworzonych antytoksyn (53).

Wyniki dotychczasowych badań nad toksynami *C. difficile*, aczkolwiek niepełne, dowodzą jednak ich niejednorodności i są podstawą do wyróżnienia tzw. cytotoksyny i toksyny A (5, 11). Poznanie właściwości tych czynników pozwala lepiej zrozumieć mechanizm wywoływanych przez nie zmian chorobowych.

Cytotoksyna, nazywana też toksyną B, jest białkiem otrzymanym w stanie znacznego już oczyszczenia (37, 62, 70). Jej ciężar molekularny — w zależności od użytych metod izolacyjnych — ustalono na 95 000 (37), 240 000 (70) i 530 000 daltonów (62). W pewnych jednak warunkach może dysocjować na dwa fragmenty o ciężarze 185 000 i 500 000 daltonów (62). Jest ona ciepłochwiejna i niszczona w ciągu 1 godziny przez ogrzanie ( $56^{\circ}\text{C}$ ), zakwaszenie (pH 3) oraz alkalizację (pH 9). W kontrolowanych warunkach ciągłej hodowli *C. difficile* uzyskiwano — przy  $E_h = 100$  mV i w temperaturze  $45^{\circ}\text{C}$  — nawet tysiąckrotny wzrost aktywności cytotoksyny (55). W dawce 12,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  wywołuje ona efekt cytotatyczny w komórkach różnych linii (11). Z koncentracją cytotoksyny w hodowli tkankowej koreluje nasilenie i zasięg zmian komórkowych (18, 19). Przy zawartości już 170  $\text{pg}/\text{ml}$  stymuluje ona aktywność cykazy guanilowej (75). Charakter wywoływanych uszkodzeń w komórkach YI i HeLa przypomina trochę działanie enterotoksyn *V. cholerae* i *E. coli* (23). Zmianom tym nie towarzyszy jednak wzrastający poziom kwasu adenozymonofosforowego.

Toksyna A posiada również właściwości białka, a jej ciężar molekularny został określony na 240 000 daltonów (11). Będąc substancją ciepłochwiejną jest niszczona w ciągu 1 godziny w  $56^{\circ}\text{C}$ . Natomiast jest ona w miarę stabilna w zakresie pH 4—10 (czas ekspozycji — 1 godzina). Toksyna A powoduje w hodowli komórek HeLa i MAT (mouse adrenal tumor) hamowanie ich wzrostu (34). Poza tym daje ona reakcję po wprowadzeniu do podwiązanych pętli jelitowych u chomików i królików (gromadzenie się wysięku i powstawanie martwicy śluzówki). W warunkach doświadczalnego zakażenia chomików odpowiada za powstałe u nich objawy enterocolitis (71). Zatem toksyna A wydaje się posiadać właściwości typowej enterotoksyny (4, 5, 12).

Jeżeli przyjąć aktywność obu wytwarzanych przez *C. difficile* czynników za wskaźnik ich roli chorobotwórczej w PMC i AAD, to porównanie takie przemawia zdecydowanie za toksyną A. Świadczą o tym dawki tych antygenów przedstawiające — przy zakażeniu dootrzewnowym myszy —  $\text{LD}_{50} = 10$  ng (toksyna A — 71) i  $\text{LD}_{50} = 4400$   $\mu\text{g}$  (cytotoksyna — 11). W przypadku wprowadzenia toksyn do jelita ślepego u chomików powstaje w nim krwotoczne zapalenie (*caecitis haemorrhagica*) po inokulacji 50 ng toksyny A i 125 000 ng cytotoksyny (11). Poza tym wspomnieć należy, że aktywność toksyny A charakteryzowana w swojej mocy dawką  $\text{LD}_{50} = 10$ —220 ng (11, 37), nie jest tak dużo słabsza od neurotoksyny *C. botulinum* B ( $\text{LD}_{50} = 0,5$  ng — 41) i D ( $\text{LD}_{50} = 0,4$  ng — 17), a przewyższa działaniem enterotoksynę na przykład *C. perfringens* A ( $\text{LD}_{50} = 140$   $\mu\text{g}$  — 68). Przyznając zatem główną rolę toksynie A w

etiopatogenezie PMC i AAD nie można jednak pominąć znaczenia antybiotyków regulujących skład konkurencyjnej dla *C. difficile* mikroflory jelitowej.

## Piśmiennictwo

- Abrams G. D., Allo M., Lushbank W. B., Condon C. W., Pittman J. C., Fekety R., Silva J.: Gut 21, 493, 1980.
- Allo M.: J. surg. Res. 28, 421, 1980.
- Aronsson B., Molby R., Nord C.: Scand. J. Infect. Dis. 35, 53, 1982.
- Banno Y., Kobayashi T., Watanabe K., Ueno K., Nozawa Y.: Biochem. Int. 2, 629, 1981.
- Bartlett J. G.: J. Hopkins Med. J. 151, 1, 1982.
- Bartlett J. G., Chang T. W., Gurwith M., Gorbach S. L., Onderdonk A. B.: N. Z. med. J. 298, 531, 1978.
- Bartlett J. G., Chang T. W., Moon N., Onderdonk A. B.: Am. J. vet. Res. 39, 1525, 1978.
- Bartlett J. G., Chang T. W., Taylor N. S., Onderdonk A. B.: Revue infect. Dis. 1, 270, 1979.
- Bartlett J. G., Moon N.: Gastroenterology 81, 5, 1981.
- Bartlett J. G., Onderdonk A. B., Cisneros A. B., Kasper D. L.: J. infect. Dis. 136, 701, 1977.
- Bartlett J. G., Taylor N. S.: Medical Microbiology, Ed. Easmon C. S. F., Jelasiewicz J., Acad. Press 1982.
- Bartlett J. G., Taylor N. S., Chang T. W., Dzink J.: Am. J. clin. Nutr. 33, 2321, 1980.
- Bornside R. H., Floyd E., Cohn I.: J. surg. Res. 4, 233, 1964.
- Borriello S. P.: Res. clin. For. 1, 33, 1979.
- Borriello S. P., Honour P.: J. clin. Microbiol. 18, 1006, 1983.
- Burdon D. W.: Infection 10, 293, 1982.
- Cardella M. A., Duff J. T., Wingfield B. H., Gotfried C.: J. Bact. 79, 372, 1960.
- Chang T. W., Lauermann M., Bartlett J. G.: J. infect. Dis. 140, 765, 1979.
- Chang T. W., Lin P. S., Gorbach S. L., Bartlett J. G.: Infect. Immun. 33, 285, 1981.
- Cooperstock M., Riegler L., Woodruff C. W., Onderdonk A.: J. clin. Microbiol. 17, 830, 1983.
- Dabard J., Dubos F., Martinet L., Ducluzeau R.: Infect. Immun. 24, 7, 1979.
- Dzink J. A., Bartlett J. G.: Antimicrob. Ag. Chemother. 17, 695, 1980.
- Donta S. T., Schaffer S. J.: J. infect. Dis. 141, 218, 1980.
- Ehrlich M., Van Tassel R. L., Wilkins T. D.: Infect. Immun. 28, 1041, 1980.
- Eriksson S.: Lakartidningen 30/31, 2630, 1980.
- Fekety R., Silva J., Toshinwal M. A., Armstrong J., Browne R., Ebricht J., Rifkin G.: Revue infect. Dis. 1, 385, 1979.
- George W. L., Rolfe R. D., Harding G. K. M., Klein R., Putnam C. W., Finegold S. M.: Infection 10, 205, 1982.
- George W. L., Rolfe R. D., Mulligan M., Finegold S. M.: Clin. Res. 27, 344, 1979.
- George W. L., Sutter V. L., Finegold S. M.: J. infect. Dis. 136, 822, 1977.
- George W. L., Symonds J. M., Dimock F., Browne J., Arabi D., Shinagawa N., Keigley M. R., Alexander-Williams J., Burdon D. W.: Br. med. J. 1, 695, 1978.
- George W. L., Symonds J. M., Finegold S. M.: Curr. Microbiol. 1, 55, 1978.
- Gilligan P. H., McCarthy L. R., Genta V. M.: J. clin. Microbiol. 14, 26, 1981.
- Gorbach S. L., Thadepalli H.: J. infect. Dis. 131, 581, 1975.
- Gurwith M. J., Langston C., Dunsmore B.: J. can. Microbiol. 28, 100, 1982.
- Hafiz S. L., McEntegart M. G., Morton R. S., Wattkins S. A.: Lancet 1, 420, 1975.
- Hall I. C., O'Toole E.: Am. J. dis. child. 49, 390, 1935.
- Humphrey C. D., Lushbank W. B., Condon C. W., Pittman J. C., Pittman F. E.: Gut 20, 6, 1979.
- Keighley M. R. B., Burdon D. W., Arabi Y., Alexander-Williams J., Thompson H., Youngs D., Johnson M., George R. H., Mogg G. A. G.: Br. med. J. 2, 1667, 1978.
- Kim K. H., Fekety R., Batts D. H., Brown D., Cudmore M., Silva J., Waters D.: J. infect. Dis. 143, 42, 1981.
- Kobayashi T., Isono M., Watanabe K., Ueno K., Sekurat T., Hachisuka K.: J. med. Lab. Technol. 25, 553, 1980.
- Kozaki S., Sakaguchi S., Sakaguchi G.: Infect. Immun. 10, 750, 1974.
- Larson H. E., Parry J. V., Price A. B., Dolby J., Tyrrell D. A.: Br. med. J. 1, 1246, 1977.
- Larson H. E., Price A. B., Borriello S. P.: J. infect. Dis. 142, 408, 1980.
- Larson H. E., Price A. B., Honour P., Borriello S. P.: Lancet 1, 1063, 1978.
- Leigh D. A.: Antimicrob. Ag. Chemother. 15, 195, 1977.
- Leverly D. M., Sullivan N. M., Wilkins T. D.: J. clin. Microbiol. 17, 72, 1983.
- Lishman A. H., Al-Jumaili I. J., Record C. O.: Gut 22, 34, 1981.
- Lusk R. H., Fekety R., Silva J., Browne J., Ringler D. H.: J. infect. Dis. 137, 464, 1978.
- MacLennan J. D.: Bact. Rev. 26, 177, 1962.
- Mogg G. M., Keighley M., Burdon D., Alexander-Williams J., Youngs D., Johnson M., Bentley S., George R.: Br. J. surg. 66, 738, 1979.
- Moskowitz M., Bartlett J. G.: Archs intern. Med. 141, 663, 1981.
- Mulligan M. E., George W. L., Rolfe R. D., Finegold S. M.: Am. J. clin. Nutr. 33, 2533, 1981.
- Nakamura S., Mihawa M., Nakashio S., Takabatake M., Okado I., Yamakawa K., Serikawa T., Okumura S., Nishida S.: Microbiol. Immunol. 25, 345, 1981.
- Nord C. E., Heimdahl A.: J. infect. Dis. 11, 233, 1979.
- Onderdonk A. B., Lowe B. R., Bartlett J. G.: Appl. Microbiol. 38, 637, 1979.
- Peiken S. A., Galdibini J., Bartlett J. G.: Gastroenterology 79, 984, 1980.
- Porton I. R., Byrne M. D.: J. gen. Microbiol. 122, 41, 1981.
- Price A. B., Larson H. E., Crow J.: Gut 20, 467, 1979.
- Rietra P. J., Souters K. W., Zanen H. C.: Lancet 2, 319, 1978.
- Rifkin G. D., Fekety F. R., Silva J., Sack R. B.: Lancet 2, 1103, 1977.
- Riley T. V., Karthigasi K. T.: Br. med. J. 284, 12, 1982.
- Rolfe R. D., Finegold S. M.: Infect. Immun. 25, 191, 1979.
- Rollins D. E., Moeller D.: J. Am. med. Ass. 231, 1228, 1975.
- Rothman S. W.: Med. Microbiol. Immunol. 169, 187, 1981.
- Shuttleworth R., Taylor M., Jones D. M.: J. clin. Path. 33, 1002, 1980.
- Smith L. D., Holdeman L. V.: Pathogenic Anaerobic Bacteria, Ed. Ch. C. Thomas, USA 1968.
- Smith L. D., King E. O.: J. Bact. 84, 65, 1962.
- Stark R. L., Duncan C. L.: Infect. Immun. 6, 662, 1972.
- Stark R. L., Lee A., Parsonage B. D.: Infect. Immun. 35, 895, 1982.
- Taylor N. S., Bartlett J. G.: Rev. infect. Dis. 1, 379, 1979.
- Taylor N. S., Thorne G., Bartlett J. G.: Infect. Immun. 34, 1016, 1981.
- Tedesco F. J., Barton R. W., Alpers H. D.: Ann. Intern. Med. 81, 429, 1974.
- Tedesco F., Markham R., Gurwith M., Christie D., Bartlett J. G.: Lancet 2, 226, 1978.
- Toshinwal R., Silva J., Fekety R., Kim K. H.: J. infect. Dis. 143, 51, 1981.
- Vesely D. L., Straub K. D., Nolan C. M., Rolfe R. D., Finegold S. M., Mouson T. P.: Infect. Immun. 33, 285, 1981.
- Viscidi R., Willey S., Bartlett J. G.: Gastroenterology 81, 5, 1981.
- Wald A., Mendelow H., Bartlett J. G.: Archs intern. Med. 92, 798, 1980.
- Willey S. H., Bartlett J. G.: J. clin. Microbiol. 10, 880, 1979.

Adres autora: prof. dr hab. Zygmunt Cygan, ul. Zelazowej Woli 6 m. 13, 20-854 Lublin

CLIFTON-HADLEY F. A., ALEXANDER T. J. L., UPTON J., DUFFUS W. P. H.: Dalsze badania nad subklinicznym nosicielstwem *Streptococcus suis* typ 2 u świń. (Further studies on the subclinical carrier state of *Streptococcus suis* type 2 in pigs). Vet. Rec. 114, 513-518, 1984 (21).

Ze 106 wymazów z migdałków pobranych od 625 świń z 4 stad wyizolowano w czystej hodowli *Streptococcus suis* typ 2. Wiek świń wahał się od 2 tygodni do 18 miesięcy. Najwyższy odsetek nosicielstwa notowano u prosiąt w wieku 4-10 tygodni życia. Badania hodowlane wykonane pośmiertnie z zeszkrobiny migdałków wykazały jednak wyższy stopień zakażenia, co wskazuje na powszechniejsze nosicielstwo *S. suis* typ 2. Paciorkowiec utrzymuje się w migdałkach mimo występowania w surowicy krwi swoistych przeciwciał, dodawania do parkum penicyliny. Nosicielstwo może utrzymywać się przez 512 dni.

G.

SCOTT P. W.: Zmiany w białkach surowicy pstrąga tęczowego (*Salmo gairdneri* Richardson) w przebiegu proliferacyjnej choroby nerek. (Changes in the serum proteins of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) through an outbreak of proliferative kidney disease). Vet. Rec. 115, 63-64, 1984 (3).

Jakkolwiek ogólny poziom białek w surowicy zdrowych i chorych pstrągów na proliferacyjną chorobę nerek nie różni się istotnie, to jednak występują wyraźne różnice w stężeniu poszczególnych frakcji białek surowicy rozdzielonych metodą elektroforezy. Dotyczy to zwłaszcza szybko migrujących frakcji surowicy ryb, które przebyły chorobę i zakażonych sztucznie. U ozdrowieńców zamiennie obniża się zawartość frakcji 2, 3 i 7, zaś u ryb zakażonych sztucznie frakcji 2 i 3. Uważa się, że u ryb zakażonych doświadczalnie wzrost frakcji 4 jest odzwierciedleniem reakcji odpornościowych organizmu.

G.