

18. Grant I. H., Richardson N. J., Bokkenheuser V. D.: J. Clin. Microbiol. 11, 508, 1980.
19. Griffiths P. L., Park R. W. A.: J. Appl. Bact. 69, 281, 1990.
20. Harvey S. M., Greenwood J. R.: J. Clin. Microbiol. 18, 1278, 1983.
21. Johnsen K., Ostensen M., Christine A., Melby S., Melby K.: Acta Med. Scand. 214, 165, 1983.
22. Jones F. T., Axtell R. C., Rives D. V., Scheideler S. E., Tarver F. R., J. R., Walker R. L., Wineland M. J.: J. Fd. Prot. 54, 259, 1991.
23. Kaijser B., Lind L., Lindblom G. B., Sjögren E.: Report on a WHO Consultation on Epidemiology and Control of Campylobacteriosis, Bilthoven, Niederlande 25-27 April 1994, s. 133.
24. Kaldor J., Speed B. R.: Br. Med. J. 288, 1867, 1984.
25. Kapperud G., Rosef O.: Appl. Environ. Microbiol. 45, 375, 1983.
26. Kazwala R. R., Collins J. D., Hannan J., Crinion R. A. P., O'Mahony H.: Vet. Rec. 126, 305, 1990.
27. Klein B. S., Vergeront J. M., Blaser M. J., Edmonds P.: J. Am. Med. Ass. 255, 361, 1986.
28. Lawson A. J., Linton D., Stanley J., Owen R. J.: J. Appl. Microbiol. 83, 375, 1997.
29. Levy A. J.: Yale J. Biol. Med. 18, 243, 1946.
30. Lindblom G. B., Kaijser B.: Avian Dis. 39, 718, 1995.
31. Matyáš Z.: Medycyna Wet. 47, 7, 1991.
32. Myszewski M. A., Stern N. J.: Avian Dis. 34, 588, 1990.
33. Notermans S.: Report on a WHO Consultation on Epidemiology and Control of Campylobacteriosis, Bilthoven, Niederlande 25-27 april 1994, s. 35.
34. Oosterom J.: Report on a WHO Consultation on Epidemiology and Control of Campylobacteriosis, Bilthoven, Niederlande 25-27 April 1994, s. 49.
35. Oyarzabal O. A., Conner D. E., Hoerr F. J.: Avian Dis. 39, 147, 1995.
36. Patton C. M., Shaffer N., Edmonds P., Barret T. J., Lambert M. A., Perlman D. M.: J. Clin. Microbiol. 27, 66, 1989.
37. Pitkälä A., Kosunen T., Siitonen A., Hintikka E. L., Schildt R., Pönkä A.: Suomen Eläinlääkärilehti 98, 196, 1992.
38. Report on a WHO Consultation on Epidemiology and Control of Campylobacteriosis, Bilthoven, Niederlande 25-27 April 1994, s. 7.
39. Robinson D. A., Jones D. M.: Br. Med. J. 282, 1374, 1981.
40. Rogol M., Shpak B., Rothman D., Sechter I.: Appl. Environ. Microbiol. 50, 125, 1985.
41. Rogol M., Sechter I.: Epidem. Inf. 99, 275, 1987.
42. Rożynek E., Dzierżanowska D., Sieniawska E., Orłowski L., Sędzińska B.: Pol. Tyg. Lek. 41, 1166, 1986.
43. Simor A. E., Wilcox L.: J. Clin. Microbiol. 25, 10, 1987.
44. Skirrow M. B.: Br. Med. J. 2, 9, 1977.
45. Skirrow M. B., Benjamin J.: J. Clin. Path. 33, 1122, 1980.
46. Skirrow M. B.: Epidem. Inf. 99, 647, 1987.
47. Thomas K., Chan K. N., Ribeiro C. D.: Br. Med. J. 280, 1301, 1980.
48. Totten P. A., Fennell C. L., Tenover F. C., Wezenberg J. M., Perine P. L., Stamm W. E., Holmes K. K.: J. Infect. Dis. 151, 131, 1985.
49. Uradziński J., Sztejn J., Kafel S.: Medycyna Wet. 43, 345, 1987.
50. Wallace J. S., Stanley K. N., Currie J. E., Diggle P. J., Jones K.: J. Appl. Microbiol. 82, 219, 1997.
51. Whelan C. D., Monaghan P., Girdwood R. W. A., Fricker C. R.: Epidem. Inf. 101, 259, 1988.
52. Wieliczko A.: Medycyna Wet. 51, 150, 1995.
53. Wieliczko A.: Medycyna Wet. 51, 614, 1995.
54. Wieliczko A.: Medycyna Wet. 52, 191, 1996.
55. Zamorska I., Jabłońska-Kaszewska I.: Wiad. Lek. 43, 672, 1990.

Adres autora: prof. zw. dr hab. Jerzy Rzedzicki, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

ZYGMUNT CYGAN

Właściwości i mechanizm działania enterotoksyny *C. perfringens*

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

Zainteresowanie enterotoksyną *C. perfringens* (ECP) wynika z jej roli chorobotwórczej, zresztą wielorakiej (19), a co więcej dotyczącej zarówno człowieka (19, 36, 37) jak i zwierząt (7, 19, 23, 36). Polega ona głównie na wywoływaniu u ludzi zatruc pokarmowych (7, 19, 38), nadto biegunki z nimi nie związanej (19), także poantybiotykowej (1, 14, 19, 21) oraz na oddziaływaniu w syndromie nagłej śmierci niemowląt (SIDS – Sudden Infant Death Syndrome, wg 19). Znaczenie natomiast tej enterotoksyny (ECP) u zwierząt łączone jest zwykle z biegunką u cieląt (7), psów (7, 20) i prosiąt (7, 16). Rola tej enterotoksyny u świń bywa jednak przez niektórych autorów podważana (5, 20). Dlatego w tej sprawie niezbędne są dalsze badania.

Przyjmuje się, że występowaniu zachorowań sprzyjają nagłe zmiany w żywieniu, zwłaszcza przekarmienie, stres i przedłużona antybiotykoterapia (36). Wtedy bowiem dojść może – w warunkach powstałej stazy jelitowej, nadto selekcji antybiotykowej (19) – do namnożenia się *in situ* enterotoksynogennych szczepów *C. perfringens* (CP), z reguły serotypu A (19, 38),

wyjątkowo C oraz D (4, 28), wytwarzających w stadium przetrwalnikowania enterotoksynę (19, 37).

Intoksykacja alimentarna jest następstwem spożycia pokarmu, najczęściej mięsa, zawierającego CP w liczbie około $10^6/g$ (37) z następowym namnożeniem się zarazka w jelicie (ponad $10^6/g$ kału, wg 1, 21) oraz z dodatkowym wytworzeniem i akumulacją enterotoksyny (miano 1/4 – 1/5120, wg 14). Przejawem jej oddziaływania jest biegunka fermentacyjna (diarrhoea fermentativa), gwałtownie powstająca (w ciągu 7-12 godzin, wg 19), co więcej przeważnie szybko ustępująca (okres 24 godzin), ale z reguły nie dotyczy to niemowląt i osób w podeszłym wieku (w tych grupach wiekowych możliwe niekiedy zejścia śmiertelne).

Biegunkę poantybiotykową w odróżnieniu od spotykanej w zatruciach pokarmowych, charakteryzuje obecność krwi i śluzu w kale, nadto konieczność leczenia (lekiem z wyboru – wankomycyna), poza tym przedłużona inkubacja (często liczona w tygodniach), oraz przewlekły przebieg zachorowań (do 7 dni), wreszcie skłonność do nawrotów (*diarrhoea recurrens*).

Wywołany przez enterotoksynę *C. perfringens* stan zapalny jelit, nie łączący się z powyższymi przedstawionymi procesami chorobotwórczymi, jest ogólnie ujmując wciąż niedostatecznie u człowieka i zwierząt poznany (19). Natomiast podkreśla się, na ogół zgodnie, cięższy przebieg takich zachorowań i dłuższy czas utrzymywania się biegunki (≥ 3 dni, wg 2, 34) w odróżnieniu od spotykanej w typowym obrazie zatruc pokarmowych tej etiologii (2, 3, 16, 27).

Wysunięta ostatnio hipoteza o roli ECP w niektórych przypadkach syndromu nagłej śmierci niemowląt (22, 35), łączona z wywołanym szokiem enterotoksycznym (41), nie została ostatecznie dowiedziona (19).

Właściwości enterotoksyny

Miejscem wytwarzania ECP jest jelito cienkie (6), przede wszystkim biodrowe (19, 30, 32). Poza tym powstaje w hodowlach enterotoksynogennych szczepów *C. perfringens* sporulujących w podłożach zawierających skrobię (pożywka Duncana – Strong, wg 8). Podkreślić należy, że enterotoksynogeneza jest ściśle sprzężona z procesem zarodnikowania (19) sterowanym przez gen *plc* (38), zlokalizowany na chromozomie (37) i przetwarzający w kierunku zarodnikowania sygnał powstający w środowisku namnożenia się zarodka (37). Przetworniki pojawiają się w hodowli między 3 a 4 godziną inkubacji, zwykle w III fazie sporulacji, a liza sporangium kończy akumulację ECP (apogeum po 48 godzinach, wg 43).

Enterotoksyna *C. perfringens* stanowi pojedynczy 319. aminokwasowy polipeptyd o ciężarze molekularnym 36 kDa i punkcie izoelektrycznym 4,3 (19, 30, 36). Analiza sekwencji nukleotydów wskazuje, że enterotoksyny różnych szczepów *C. perfringens* cechuje na ogół pełna homologia aminokwasów tworzących łańcuch polipeptydu, aczkolwiek możliwe są niewielkie odchylenia w ich układzie (4).

Struktura drugorzędowa ECP przedstawiana jest jako przypadkowo pofałdowana kartka (dotyczy 80% elementów), częściowo spiralnie skręcona (w 20%, wg 28). Natomiast trudności związane z uzyskaniem formy krystalicznej enterotoksyny uniemożliwiły poznanie jej struktury trzeciorzędowej (19).

Interesujące, że ECP wykazują duży stopień homologii z nietoksycznym białkiem Antp 70/C₁ tworzącym kompleks C₁ neurotoksyny *C. botulinum* (15). Znaczenie jednak tego związku nie zostało wyjaśnione (19).

Biologicznie aktywna enterotoksyna jest ciepłowrażliwa (całkowita inaktywacja w 60°C po 5 minutach, wg 28) i nieoporna na zmiany kwasowości (utrata oddziaływań przez pH < 5 lub > 10). Trypsyna i chymotrypsyna podnoszą natomiast 2–3-krotnie jej wpływ chorobotwórczy (9). Stwierdzono, że proteazy jelit mogą w nich również aktywować enterotoksynę, co ma występować w przebiegu zatruc pokarmowych (10).

Podana dożylnie oczyszczona CPE szybko zabija myszy (LD₅₀ = 50 µg/kg, wg 44). U człowieka nato-

miast objawy przejściowej biegunki występują po spożyciu 8–10 mg enterotoksyny (42). Efekt letalny u zakażonych CPE myszy jest spowodowany niewydolnością serca w rezultacie podwyższenia się poziomu potasu (hyperkaliaemia, wg 44), endotoksycznym szokiem (41) i interferencyjnym wzrostem potencjału błony postsynaptycznej (25, 45). Poza tym oddziałuje cytotoksycznie niszcząc integralność kosmków w jelitach cienkich (40) doprowadzając do utraty elektrolitów, gromadzenia się płynu, w końcu do biegunki (19, 27, 30).

Mechanizm działania enterotoksyny

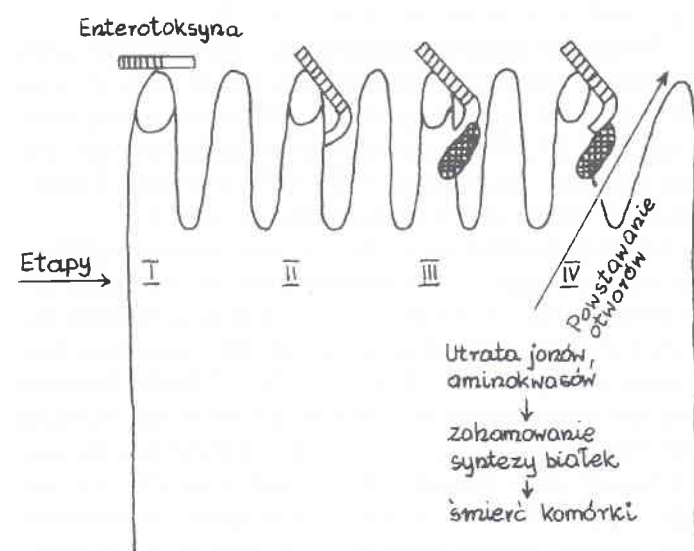
Ustalono, że wpływ CPE na organizm zależy od struktury warunkującej wiązanie i aktywność chorobotwórczą enterotoksyny (11–13, 18, 19). Przedstawia ona pojedynczy, zatem niezłożony z fragmentów, względnie podjednostek, polipeptyd (4), co ilustruje ryc. 1. W tej małej molekułce tworzącej 319. aminokwasowy łańcuch wyróżnić można początkową resztę N (odcinek 1–45) decydującą o cytotoksyczności (18) i region końcowy C (pomiędzy aminokwasami 290–319) determinujący wiązanie z receptorem rąbka oskórkowego nabłonka jelitowego (50 kDa, wg 19).

Czteroetapowy mechanizm oddziaływania enterotoksyny przedstawia ryc. 2. Wynika z niej, że CPE łączy się najpierw z białkowym receptorem (50 kDa, etap I) plazmatycznej błony w enterocycie z wytworzeniem



Ryc. 1. Struktura enterotoksyny *C. perfringens*

I – miejsce przemian fizycznych i cytotoksycznych w małym kompleksie ECP



Ryc. 2. Mechanizm działania enterotoksyny *C. perfringens*

małego kompleksu (90 kDa, wg 46, etap II), którego dipolowe właściwości umożliwiają insercję w dwuwarstwowy lipid, gdzie pozostaje jako sekwester (46), chroniony przed wpływem zewnętrznych proteaz (19). Niemal jednocześnie – w wyniku szybko zachodzących przemian fizycznych (19) – następuje interakcja z inną proteiną błony (receptor 70 kDa, wg 47) prowadząc do powstania dużego kompleksu 160 kDa (ryc. 2, etap III), bardziej stabilnego (29), chociaż po zgotowaniu częściowo dysocjującego (17). Ten właśnie duży kompleks odpowiada za maszyną przepuszczalność błony komórkowej, początkowo dla małych molekuł (28), tj. dla cząstek poniżej 200 Da (24, 28), umożliwiając przepływ przez powstałe pory (funkcjonalne przedziurawienia wg 19, rozmiary 55-91 Å, wg 33) kationów, anionów i aminokwasów, a ostatecznie wody do cytoplazmy (19, 24) doprowadzając do rozciągnięcia komórki i jej lizy (41). Proces ten poprzedza naruszenie równowagi koloidalno-osmotycznej (33), zahamowanie syntezy białek (19), oraz wzrost przepuszczalności dla większych molekuł, głównie nukleotydów (do 5 kDa, wg 26).

Nie jest znany molekularny mechanizm destrukcji błony cytoplazmatycznej. Być może, że jest tylko skutkiem zaburzeń w funkcjonowaniu istniejących kanałów jonowych (19). Niewykluczone również, że sam duży kompleks ma właściwości porotwórcze (functional holes) w następstwie jego przyłączenia do błony enterocytów (19).

Wynikiem cytotoksycznego oddziaływania oczyszczonej enterotoksyny jest destrukcja struktur zapewniających integralność kosmków jelita cienkiego (19, 40) z następową, zwiększoną przepuszczalnością występującą po 2-15 minutach ekspozycji ECP (28), nadto utratą wody i elektrolitów (19, 31), a w konsekwencji w krótkim czasie, zaledwie 0,5 godziny, do biegunki (19, 28). W warunkach naturalnych zachorowań pojawia się ona po 7-12 godzinach, zwykle poprzedzona nudnościami, wyjątkowo wymiotami (14). Zejścia śmiertelne, jakie niekiedy występują dotyczą niemowląt i osób w podeszłym wieku (14, 19).

Biegunka stanowi najbardziej charakterystyczny symptom wszystkich patogenetycznych oddziaływań ECP (19) nie wyłączając zatruc pokarmowych tej etiologii (27, 31, 39) stanowiących w epidemiologii ciągle aktualny problem (w USA 10% wszystkich przypadków intoksykacji alimentarnych, wg 19).

Immunoprofilaktyka, chociaż teoretycznie możliwa do opracowania, o czym mogłaby świadczyć dobra immunogenność ECP (46), nadto swoistość neutralizacyjna stymulowanych przeciwciał (48), pozostaje problemem wyjątkowo złożonym (36). Chodzi bowiem nie tyle o zubożenie enterotoksyny przedostającej się niekiedy także do krwi w następstwie dezintegracji bariery jelit cienkich (19), co nade wszystko o wcześnie, wyprzedzające, co więcej efektywne zahamowanie destrukcyjnego wpływu ECP jeszcze w ich świetle (19). Zatem perspektywiczna szczepionka musia-

łaby stymulować głównie miejscową, w dodatku skuteczną odporność, mediowaną przede wszystkim przez przeciwciała IgA, ale trudną do osiągnięcia, poza tym niedostatecznie wciąż poznaną (36). Nadzieję na postęp w tym kierunku stwarza wykorzystanie nowoczesnych systemów nośnikowych enterotoksyny umożliwiających jej podanie doustne w mikrokapsułkach (liposomalne, polimeryczne – pochodne poliaktydogliukolydu, kompleksy immunostymulacyjne ISCOM itp.).

Piśmiennictwo

- Boriello S. P., Welch A. R., Larson H. E.: Lancet 11, 305, 1984.
- Brett M. M., Rodhouse J. C., Donovan T. J.: J. clin. Pathol. 45, 609, 1992.
- Collins J. E., Bergeland M. E., Bouley D.: J. Vet. Diagn. Invest. 1, 351, 1989.
- Czczulin J. R., Hanna P. C., McClane B. A.: Infect. Immun. 61, 3429, 1993.
- Damme-Jongsten v. M., Haagsma J., Notermans S.: Vet. Rec. 126, 191, 1990.
- Damme-Jongsten v. M., Rodhouse J., Gilbert R.: J. clin. Microbiol. 28, 131, 1990.
- Daube G.: Annl. Méd. vét. 136, 5, 1992 r.
- Duncan C. L., Strong D. H.: Appl. Microbiol. 16, 82, 1968.
- Granum P. E., Richardson M.: Toxicon 29, 445, 1991.
- Granum P. E., Whitaker J. R., Skjelvåle R.: Biochim. biophys. Acta 668, 325, 1981.
- Hanna P. C., McClane B. A.: Mol. Microbiol. 5, 225, 1991.
- Hanna P. C., Mietzner T. A., Schodnik G. K.: J. biol. Chem. 266, 11037, 1991.
- Hanna P. C., Wieckowski E. H., Mietzner T. A., McClane B. A.: Infect. Immun. 60, 2110, 1992.
- Hatheway C. L.: Clin. Microbiol. Rev. 3, 66, 1990.
- Hauser D., Eklund M. W., Boquet P., Popoff M. R.: Mol. Gen. Genet. 243, 631, 1994.
- Jestin A., Popoff M. R., Mahé S.: Am. J. vet. Res. 46, 2149, 1985.
- Kokai-Kun J. F., McClane B. A.: Infect. Immun. 64, 1020, 1996.
- Kokai-Kun J. F., McClane B. A.: Infect. Immun. 65, 1014, 1997.
- Kokai-Kun J. F., McClane B. A.: The Clostridium perfringens enterotoxin. [w:] – The Clostridia: molecular biology and pathogenesis, ed. J. I. Rood, B. A. McClane, J. G. Songer, R. W. Titball, Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto 1997.
- Kruth S. A., Prescott J. F., Welch M. K., Brodsky M. H.: J. Am. vet. med. Ass. 195, 331, 1989.
- Larson H. E., Boriello S. P.: J. infect. Dis. 157, 390, 1988.
- Lindsay J., Mach A., Wilkinson M.: Curr. Microbiol. 27, 51, 1993.
- Manteca C., Daube G.: Annl. Méd. vét. 138, 155, 1994.
- Matsuda M., Ozutsumi K., Ivashi H.: Biochem. biophys. Res. Comm. 141, 704, 1986.
- Matsuda M., Okabe T., Sugimoto N.: N. Y. Acad. Sci. 710, 94, 1994.
- McClane B. A.: Biochim. biophys. Acta 777, 99, 1984.
- McClane B. A.: J. Food Safety 12, 237, 1992.
- McClane B. A.: Toxicology 87, 43, 1994.
- McClane B. A., Wnek A. P.: Infect. Immun. 58, 3109, 1990.
- McDonel J. L.: Toxins of Clostridium perfringens A, B, C, D and E (W) Pharmacology of bacterial toxins, ed. F. Dorner and H. Drews, Pergamon Press, Oxford 1986.
- McDonel J. L., Duncan C. L.: Infect. Immun. 12, 1214, 1975.
- McDonel J. L., Duncan C. L.: J. infect. Dis. 136, 661, 1977.
- Menestrina G.: Electrophysiologic methods for the study of toxin – membrane interaction. (W) Sourcebook of bacterial protein toxins, ed. J. Alouf, J. Freer, Acad. Press, London 1991.
- Mpamugo O., Donovan T., Brett M. M.: J. med. Microbiol. 43, 442, 1995.
- Murrell W. G., Stewart B. J., O'Neil C. O.: J. med. Microbiol. 39, 114, 1993.
- Popoff M. R.: Revue Méd. vét. 147, 425, 1996.
- Rood J. I., Cole S. T.: Microbiol. Rev. 55, 621, 1991.
- Sears C. L., Kaper J. B.: Microbiol. Rev. 60, 167, 1996.
- Shandera W. X., Tacket C. O., Blake P. A.: J. infect. Dis. 147, 167, 1983.
- Sherman S., Klein E., McClane B. A.: J. Diarrheal Dis. Res. 12, 200, 1994.
- Siarakas S., Damas E., Murrell W.: Toxicon 33, 635, 1995.
- Skjelvåle R., Uemura T.: J. appl. Bact. 43, 281, 1977.
- Stark R. I., Duncan C. L.: Infect. Immun. 4, 89, 1971.
- Sugimoto N., Chen Y., Lee S.: Toxicon 29, 751, 1991.
- Sugimoto N., Miyamoto A., Horiguchi Y.: Toxicon 30, 825, 1992.
- Wieckowski E. U., Wnek A. P., McClane B. A.: J. biol. Chem. 269, 10838, 1994.
- Wnek A. P., McClane B. A.: Infect. Immun. 57, 574, 1989.
- Wnek A. P., Strouse R. J., McClane B. A.: Infect. Immun. 50, 442, 1985.

Adres autora: prof. dr hab. Zygmunt Cygan, ul. Żelazowej Woli 6/13, 20-853 Lublin