

Antoni J. Furowicz, Danuta Czernomysy-Furowicz

VERO-CYTOTOKSYCZNE SEROTYPY *E. COLI*, JAKO PRZYCZYNA ZOONOTYCZNYCH ZAKAŻEŃ CZŁOWIEKA

Katedra Immunologii i Mikrobiologii Akademii Rolniczej w Szczecinie

Opracowanie zawiera krótką charakterystykę Verocytotoksycznych szczepów E. coli, ich chorobotwórczość dla człowieka i zwierząt, opis struktury i sposobu oddziaływania toksyny VT oraz diagnostykę laboratoryjną szczepów VTEC.

CHARAKTERYSTYKA OGÓLNA CZYNNIKA ETIOLOGICZNEGO

Pałeczki *E. coli* stanowią fizjologiczną mikroflorę przewodu pokarmowego zwierząt i człowieka. Większość z nich odgrywa pozytywną rolę w organizmie wyższym, determinując m.in. homeostazę wśród bakterii jelitowych i syntetyzując niektóre witaminy, wykorzystywane przez ten organizm. Tylko niektóre szczepy *E. coli* wykazują w pewnych okresach i sytuacjach u ssaków działanie chorobotwórcze, czasami bardzo aktywne, prowadząc do powstawania różnych zespołów chorobowych i niekiedy – zejść śmiertelnych (11). Mikroorganizmy znane aktualnie jako *Escherichia coli*, zostały po raz pierwszy wyosobnione przez Teodora Eschericha z prób kału, małych dzieci z objawami enteritis (6). Wszystkie poznane dotąd, chorobotwórcze szczepy *E. coli* zostały podzielone na cztery grupy, różniące się budową serologiczną i niektórymi właściwościami biochemicznymi oraz sposobem chorobotwórczego oddziaływania na organizmy wyższe (10).

Do grupy enteropatogennych szczepów *E. coli* (EPEC – *enteropathogenic E. coli*) zalicza się drobnoustroje z określonych grup serologicznych, wywołujące różne postacie biegunki u ludzi, zwłaszcza u małych dzieci (m.in. „summer diarrhoea”). Szczepy tej grupy dzięki czynnikowi EAF (EPEC – adherence factor), zasiedlają, w sposób swoisty powierzchnię enterocytów jelita cienkiego, a następnie niszcząc struktury powierzchniowe (mikrokosmki), powodują stan zapalny. Niektóre z nich mogą ponadto oddziaływać toksycznie poprzez syntezę entero- lub Vero- toksyn (10, 11).

Do grupy enterotoksycznych szczepów *E. coli* (ETEC – *enterotoxigenic E. coli*) należy szereg serotypów, wywołujących u noworodków ludzkich i osesków zwierzęcych różne postacie kolibakteriozy jelitowej, manifestujące się objawami biegunki. Elementami odpowiadającymi za zjadliwość tych szczepów są enterotoksyny LT i ST, wiążące się swoiście z receptorami na powierzchni mikrokosmków enterocytów błony śluzowej jelita cienkiego i poprzez stymulację „kaskady biochemicznej”, wywołujące zaburzenia we wchłanianiu wody i elektrolitów ze światła jelita (mikrokosmki) oraz

nadmierne wydzielanie śluzu, wody i elektrolitów przez komórki krypt jelitowych. Rezultatem wymienionych zaburzeń jest biegunka (12). Wymienione szczepy kolonizują się w jelicie cienkim (komplementarność stereochemiczno-elektrostatyczna) za pomocą fimbrii adhezyjnych (10, 34, 58).

Do grupy enteroinwazyjnych szczepów *E. coli* (EIEC – *enteroinvasive E. coli*) należą serotypy, wywołujące u ludzi dyzenterię („bacillary dysentery”) a u zwierząt zakażenia o charakterze systemowym (m.in. *mastitis* i *metritis*) (10).

W grupie Vero-cytotoksycznych szczepów *E. coli* (VTEC-Vero-cytotoxin-producing *E. coli*), określanych także jako – enterokrwotoczne (EHEC – *enterohaemorrhagic E. coli*), występują różne serotypy (u człowieka najczęściej 0157), wywołujące różne, zespoły chorobowe (63). U człowieka najczęściej infekcję biegunkową – VTEC, krwotoczne zapalenie jelita grubego (HC-*haemorrhagic colitis*) oraz hemolityczny zespół mocznicowy (HUS – *haemolytic uraemic syndrome*); u zwierząt – chorobę obrzękową świń, związaną przede wszystkim z serotypami z grup 0139 i 0141 (34, 42, 58). Czynnikiem warunkującym toksyczność VTEC są cytotoksyny z grupy VT (The Vero cytotoxins). Ze względu na różnice w strukturze tych cytotoksyn, wykazują one swoistość w swoim oddziaływaniu na organizmy ludzkie (VT1, VT2) i zwierzęce (SLT-IIv) (10, 42).

ŹRÓDŁO ZAKAŻENIA

Chociaż uważa się, że źródłem zakażenia *E. coli* dla człowieka są produkty spożywcze zwierzęcego pochodzenia oraz woda, z reguły pierwotnym rezerwuarem tych bakterii są ludzie (zwłaszcza kał i zanieczyszczone nim części ciała i przedmioty) (tab. I).

Odmiennie przedstawia się sytuacja z infekcjami VTEC, gdzie głównym źródłem zakażenia człowieka są zdrowe zwierzęta oraz produkty spożywcze z nich uzyskiwane (36). Tak więc, o ile klasyczne kolibakteriozy nie są *de facto* zoonozami, a produkty zwierzęce zakażone „dyspeptycznymi” szczepami *E. coli* nie stanowią zasadniczego problemu epidemiologicznego, Vero-cytotoksyczne pałeczki *E. coli* (produkujące VT1 i VT2) można uznać za groźne, zoonotyczne patogeny człowieka.

CHOROBOTWÓRCZOŚĆ DLA CZŁOWIEKA

W roku 1977 Konowalczuk i wsp. (23), zasugerowali że cytotoksyna (V-T) wytwarzana przez VTEC odgrywa ważną rolę w patogenezie niektórych chorób biegunkowych. Jednakże ważkość zakażeń szczepami VTEC u ludzi została jednoznacznie ustalona po stwierdzeniu ich roli w wywoływaniu dwóch chorób o nieznannej wcześniej etiologii – krwotoczego zapalenia jelita grubego (*haemorrhagic colitis* – HC) i hemolitycznego zespołu mocznicowego (*haemolytic uraemic syndrome* – HUS).

Krwotoczne zapalenie jelita grubego (HC) charakteryzuje się krwawą biegunką i zazwyczaj ma przebieg bezgorączkowy. Często natomiast występują ból brzucha i wodnista biegunka (10). Ogniska HC wywoływane przez VTEC odnotowano w 1982 r. w USA (44) i od tego czasu opisano szereg epidemii i sporadycznych przypadków tej choroby w Kanadzie, Japonii i Wielkiej Brytanii (14, 17, 43, 57).

Tabela 1. Patogenne dla człowieka i zwierząt szczepy *E. coli*; podział na grupy wg Grossa (10)

Grupa	Serogrupy O	Wywoływane choroby	Źródła zakażenia żywności i produkty żywnościowe zawierające dane szczepy
Szczepy enteropatogenne (EPEC)	026, 055, 086, 0111, 0114, 0119, 0125, 0126, 0127, 0128, 0142	różne formy biegunki (najczęściej u dzieci)	ręce nosicieli, ścieki; mięso wieprzowe, przetwory mięsne (paszety), woda
Szczepy enterotoksyczne lub enterotoksyczne (ETEC)	06, 08, 015, 025, 027, 063, 078, 0115, 0138, 0148, 0149, 0153, 0159, 0167	u zwierząt noworodków różne formy kolibakteriozy (w wyniku wytwarzania enterotoksyn LT i ST); u dzieci – biegunka	zwierzęta zdrowe i chore, ścieki; u ludzi – ręce nosicieli; sery, wędzony drób, sałatka jarzynowa, woda; b. znaczna swoistość zakażeń, szczepy „ludzkie” wywołują biegunkę tylko u człowieka, „zwierzęce” tylko u zwierząt
Szczepy enteroinwazyjne (EIEC)	028ac, 0112ac, 0124, 0136, 0143, 0144, 0152, 0164	u ludzi zespół czerwinkowy („bacillary dysentery”); u zwierząt zakażenia o charakterze systemowym,	zwierzęta chore; sery (Brie), konserwowane ryby (tosoś), sałatka jarzynowa, woda.
Szczepy Vero-cytotoksyczne lub enterokrwotoczne (VTEC, EHEC)	0157, 026* (u ludzi), 0139, 0138, 0141 (u zwierząt)	u człowieka – krwotoczne zapalenie okrężnicy, hemolityczny zespół mocznicowy; u zwierząt – choroba obrzękowa świń	mięso zdrowych zwierząt (surowa wołowina, wieprzowina, baranina, drób; hamburgery), mleko i produkty mleczarskie przygotowane z mleka niepasteryzowanego

* – oraz – kilkanaście innych serotypów VTEC

Zakażenie to cechuje zespół dosyć charakterystycznych objawów zwiastunowych. Po okresie wylęgania, trwającym od 3 do 9 dni, występuje krwawa biegunka (w wyniku stanu zapalnego jelita grubego) i ból brzucha. Objawom tym nie towarzyszy podniesienie ciepłoty ciała. Najczęściej wymienione symptomy zanikają po 2–9 dniach. Jednakże u osób starszych i małych dzieci, mogą rozwijać się komplikacje prowadzące m.in. do ostrej niewydolności nerek.

Ta forma zakażenia VTEC, określana jako hemolityczny zespół mocznicowy jest efektem oddziaływania Vero-cytotoksyny (VT) i ma często przebieg ostry, powodując od 3 do 5% zejść śmiertelnych (36). W ogniskach gdzie chorują małe dzieci odsetek zejść śmiertelnych jest znacznie wyższy (w wyniku HC do 30%; w przebiegu „pełno objawowym” nawet ponad 70%). Jak już wspomniano, hemolityczny zespół mocznicowy charakteryzuje się ostrą niewydolnością nerek, ale także – mikroangiopatyczną hemolityczną anemią i trombocytopenią (25). Choroba występuje we wszystkich grupach wiekowych, ale najczęściej u noworodków i małych dzieci. Jest ona uważana w USA za jedną z głównych przyczyn niewydolności nerek w okresie dzieciństwa.

HUS pojawia się w dwóch postaciach klinicznych, „typowej”, kiedy to krwawa biegunka stanowi ważny objaw zwiastunowy, i „atypowej” – bez wcześniejszych objawów biegunkowych (10). Zachorowania rodzinne jak również występowanie choroby wśród małych grup ludzi, przemawia za tym, że przyczyną choroby jest czynnik zakaźny. Świadczą o tym izolacje znacznej liczby VTEC, należących do jednego serotypu *E. coli* (najczęściej 0157:H7).

Ścisłe powiązanie VTEC z HUS, jako pierwsi, określili w 1983 r. *Karmali* i wsp. (20). Od tego czasu wykazywano wielokrotnie etiologiczną rolę VTEC w typowej formie HUS (21, 51).

Objawy zakażeń VTEC u człowieka obejmują szeroki wachlarz zaburzeń, od łagodnych objawów wodnistej biegunki do ostro przebiegającego hemolitycznego zespołu mocznicowego. Ciekawe, że nawet w jednym ognisku choroby, odnotowuje się szerokie spektrum objawów klinicznych. Przykładowo, w 1986 roku w USA obserwowano wybuch tej infekcji w zakładzie dla rekonwalescentów. U 34 pacjentów stwierdzono biegunkę o różnym natężeniu; 14 osób hospitalizowano, z pośród których cztery zmarły (3, 46). Infekcje VTEC mogą towarzyszyć zakrzepowej płamicy małopłytkowej (chorobie *Moschowitz'a*), w przebiegu której kliniczne objawy HUS są później komplikowane przez zespół symptomów neurologicznych i wysoką gorączkę (10).

CHOROBY WYWOŁYWANE PRZEZ VTEC U ZWIERZĄT

Stwierdzono, że VTEC były wielokrotnie wyosabniane od chorych i zdrowych cieląt (36). *Mohammad* i wsp. (32) odnotowali chorobę biegunkową u tych zwierząt, związaną z wytwarzaniem VT. Krowy mleczne, jałowki i cielęta, nie wykazujące najczęściej żadnych objawów chorobowych, mogą być rezerwuarem i źródłem (mleko, mięso) zakażeń VTEC człowieka (10).

Odrębną grupę stanowią natomiast szczepy VTEC, wywołujące groźną chorobę prosiąt po odsadzeniu (w wieku 4–6 tyg.), określaną jako choroba obrzękowa (34). Szczepy te różnią się strukturą antygenową od szczepów wywołujących HC i HUS u człowieka. Należą one najczęściej do serotypów: 0138:K81, 0139:K82, 0141:K85 i wytwarzają Vero-cytotoksynę SLT-IIv (variant), różniącą się znacznie od VT1 zbliżoną natomiast do VT2 (42). Sprawia to m.in., że wymienione serotypy nie wywołują u ludzi infekcji (nie mają charakteru zoonotycznego) i *de facto* są chorobotwórcze tylko dla świń.

EPIDEMIOLOGIA ZAKAŻEŃ SZCZEPAMI VTEC

Stwierdzono, że w Ameryce Północnej HC i HUS związane z VTEC, występują na znacznej przestrzeni geograficznej, u kobiet i mężczyzn w różnym wieku (10). Zakażenia szczepami VTEC są najczęściej wywoływane przez drobnoustroje z grupy serologicznej 0157 i pojawiają się przede wszystkim w miesiącach letnich. Ogniska choroby obserwowano często w zakładach opieki dla starszych ludzi oraz wśród dzieci przebywających w sierocińcach (24, 46, 59). Najostrzejszy przebieg choroby

obserwowano u pacjentów starych oraz u małych dzieci (10, 24, 46). Wybuch HC na znacznym obszarze Wschodniej Anglii odnotowano w 1985 roku; szczep który wywołał epidemię okazał się serotypem *E. coli* 0157:H7 (33). Badania epidemiologiczne występowania HC, wykonane w Anglii i Walii w okresie 12 miesięcy (październik 1985 – październik 1986), wykazały że przypadki tej choroby występowały przede wszystkim na terenach wiejskich. Rzadko natomiast odnotowywano je na obszarze o zabudowie miejskiej i przemysłowej. Stosując testy z DNA, szczepy VTEC oznaczono w 32 próbach (39%) na 83 analizowane; 30 z 32 szczepów VTEC należało do serogrupy 0157, potwierdzając dominującą rolę tego serotypu w etiologii HC na obszarach geograficznie innych aniżeli Ameryka Północna (57). W 1983 roku stwierdzono pojawienie się HUS, związanego z VTEC serogrupy 0157, na terenie Wolverhampton. Miało to miejsce po przypadkach tej choroby w hrabstwie West Midlands, diagnozowanych w okresie 2 lat (1982–1983) (61). W wyniku badań autorów angielskich nad występowaniem HUS u dzieci w wieku do 12 lat stwierdzono szczepy VTEC w 19 (29%) na 66 przypadków; 15 z tych izolatów należało do serogrupy 0157 (51).

BADANIA EPIDEMIOLOGICZNE

W styczniu 1993 r. w USA, w czasie epidemii wywołanej przez szczep *E. coli* 0157:H7, zachorowało 475 osób, z czego zmarło czworo małych dzieci (36). W wyniku badań przeprowadzonych przez Center of Disease Control (CDC), stwierdzono że 65% chorujących stołowało się w jednej restauracji, specjalizującej się w szybkim przygotowywaniu prostych potraw. Co więcej, stwierdzono, że osoby te spożywały beefburgery, z których również wyizolowano szczep *E. coli* 0157 (36).

W okresie ostatnich 10 lat (1985–1994) CDC prowadziło w USA monitorowanie epidemiologiczne przypadków zakażeń VTEC. Odnotowano, iż w okresie tym wystąpiło 16 dużych epidemii, w konsekwencji których zmarły 22 osoby. Badacze amerykańscy twierdzą jednak, iż mimo wielu zachorowań, które odnotowano w ich kraju, znaczenie VTEC jako patogenów jest wciąż niedoceniane. Według CDC, co roku w USA, występuje prawie 20 000 zachorowań wśród ludzi (36).

NAJCZĘŚCIEJ WYSTĘPUJĄCE SEROTYPY

W Europie (poza Wielką Brytanią), izolacje serotypu 0157 nie są tak częste (10). Do spostrzeżeń tych należy się odnieść z dużą ostrożnością. Nie prowadzi się bowiem w tym kierunku dokładnych badań mikrobiologicznych ani też dostatecznie licznych dochodzeń epidemiologicznych. Ponadto uważa się, że w kontynentalnej Europie, infekcje VTEC mogą być wywoływane przez odmienne serotypy *E. coli*, aniżeli 0157 (10, 36). Jak już wspomniano, w Wielkiej Brytanii prowadzi się od kilku lat dokładne monitorowanie epidemiologiczne. Efektem tych badań jest regularne wyosobnianie serotypu *E. coli* 0157 z przypadków krwotocznego zapalenia jelita grubego (10). Stwierdzono, że w 1992 roku nastąpił wzrost liczby zakażeń VTEC. Odnotowano mianowicie 473 przypadki HC, z których wyizolowano wymieniony serotyp (36).

Zasadniczym źródłem infekcji VTEC u człowieka są produkty spożywcze zwierzęcego pochodzenia, zwłaszcza surowe mleko i surowe mięso wołowe (10).

W USA i Kanadzie, w ogniskach HC o ostrym przebiegu, wywołanych przez *E. coli* 0157, serotyp ten był także izolowany z mięsa hamburgerów (44, 45, 46). Ponadto odnotowano ognisko HC oraz 2 przypadki tej choroby u ludzi, powstałe w wyniku spożycia mleka nie poddanego pasteryzacji (1, 31). Od zdrowych krów mlecznych, pochodzących z gospodarstw związanych przyczynowo z wymienionymi wyżej zachorowaniami, wyizolowano serotyp 0157:H7. Wykazano, że w Ameryce Północnej bydło jest głównym rezerwuarem i źródłem szczepów *E. coli* 0157:H7, wywołujących infekcje u ludzi. W USA, w wyniku szeroko zakrojonych badań bakteriologicznych świeżego mięsa oraz drobiu, pochodzących ze sprzedaży detalicznej, odnotowano obecność serotypu 0157:H7 w 1,5–3,7% prób wołowiny, wieprzowiny, drobiu oraz baraniny (5). Występowanie tego serotypu w środkach spożywczych stanowi problem zarówno dla technologów jak i mikrobiologów. Wynika to stąd, że bakterie te wykazują dosyć znaczną oporność na niskie i wysokie temperatury (rozwój w 10°C oraz w przedziale 44–45°; przeżywalność w produktach mrożonych) oraz niskie pH. Ponadto stosunkowo trudno jest je wyizolować z prób mięsa i mleka (10, 36).

Warto podkreślić, iż poza zakażeniami odzwierzęcymi, mogą mieć również miejsce zakażenia człowieka od człowieka, w których źródłem zarazka są z reguły zdrowi nosiciele (36). Poza szczepami z grupy 0157, wielokrotnie wyosobniano z prób ludzkiego kału szczepy VTEC należące do innych serogrup (m.in. 026, 05, 045, 091, 0111, 0145). Jednakże w odróżnieniu od szczepu 0157, izolacje innych serotypów były rzadsze, a w poszczególnych próbach stwierdzano z reguły niewielką liczbę komórek bakteryjnych. Spośród tych serogrup, tylko niektóre typy „H”, można było uznać w pełni za Vero-cytotoksyczne (produkujące VT). Do serotypów tych zaliczono m.in. szczepy *E. coli* z serogrupy 026 z rzęskowym antygenem H11 oraz rzadziej szczepy 026 pozbawione tej frakcji antygenowej (10).

WŁAŚCIWOŚCI BIOCHEMICZNE

Zasadniczo większość biochemicznych właściwości szczepów *E. coli* z tej serogrupy, nie odbiega od cech pozostałych bakterii gatunku *Escherichia coli* (7, 10, 11). Biologiczne i biochemiczne cechy typowe dla drobnoustrojów tej grupy, różne od „klasycznych”, to przede wszystkim: wytwarzanie Vero-cytotoksyn (VT1, VT2) w hodowli komórek Vero i HeLa, brak fermentacji sorbitolu (24h/37°C), ujemna reakcja na glukoronidazę, wzrost w temperaturach 10°C i 44–45°C, przeżywalność w temperaturach minusowych (w zamrożonych produktach spożywczych), znaczna oporność na zmiany pH w czasie procesów fermentacyjnych stosowanych w technologii spożywczej (10, 11, 63). Według *Ewinga* (7) 80,3% szczepów gatunku *Escherichia coli* fermentuje sorbitol w przeciągu 24–48 godz. inkubacji w temp. 37°C; 1% rozkłada ten cukier późno, to znaczy po 3 lub więcej dniach. Szczepy *E. coli* 0157 znajdują się w grupie bakterii tego gatunku, nie fermentujących sorbitolu w czasie 24 godzinnej inkubacji. Uważa się że taką cechą prezentują szczepy należące do serotypu 0157:H7. Nieliczne z nich, rozkładają sorbitol po dłuższej (niż 24 h) inkubacji (10, 11, 63).

STRUKTURA I SPOSÓB ODDZIAŁYWANIA TOKSYNY VT

Konowalczuk i wsp. (23) jako pierwsi wysunęli sugestię, że Vero-cytotoksyna *E. coli* (VT) występuje w więcej aniżeli w jednej formie. Późniejsze badania poświadczyły te przypuszczenia. Stwierdzono, iż VT produkowana przez szczep H30 *E. coli* (026:H11) wykazywała bardzo znaczne podobieństwo do toksyny Shiga, wytwarzanej przez szczepy *Shigella dysenteriae* typu 1. Podobieństwo dotyczyło właściwości biologicznych, fizycznych oraz antygenowości (38, 39). Weissfeld i wsp. (63) określają podobieństwo między tymi toksynami jako istotną identyczność w zakresie poziomu sekwencji aminokwasowych. Tak więc, w celu określenia cytotoksyny wytwarzanej przez szczepy VTEC, używa się zarówno określenia *Shiga-like toxin* (SLT) jak i VT. Vero-cytotoksyna *E. coli* neutralizowana przez surowicę anti-Shiga toxin jest określana jako VT1. Natomiast druga toksyna typu VT, po raz pierwszy odnotowana w szczepach *E. coli* serogrupy 0157, nie ulegająca neutralizacji przez wymienioną surowicę, została oznaczona jako VT2 (49). Okazało się, że toksyny VT1 i VT2 są tymi samymi substancjami toksycznymi, które wcześniej zostały oznaczone przez Strockbine i wsp. (60) jako SLT i SLT II. Wykazują one podobne właściwości biologiczne, takie jak cytotoksyczność w stosunku do linii komórek Vero i HeLa, gromadzenie się płynu w podwiązanych pętlach jelitowych królików oraz wystąpienie symptomów neurologicznych u myszy (41). Jak już wspomniano, zasadniczą różnicą między nimi jest reagowanie z surowicą anti-Shiga toxin (VT1 – neutralizacja; VT2 – brak serozobojętnienia) (10). Natomiast cytotoksyna wytwarzana przez zwierzęce szczepy VTEC (SLT II_v), jest zbliżona antygenowo do VT2. W przeciwieństwie do tej ostatniej, wykazuje tylko słabą toksyczność w stosunku do komórek linii HeLa (30). W celu zbadania jednorodności toksyn VT1 i VT2, zostały one poddane procesom oczyszczania. Okazało się, że są one „holotoksynami” (toksynami kompletnymi), zawierającymi pojedyncze białko enzymatyczne (podjednostkę A) oraz pentamer białkowy (podjednostki B) (41, 63, 66). Opierając się na analizie sekwencji nukleotydów, odpowiedzialnych za proces translacji, określono masę cząsteczkową podjednostek A i B jako 32.210 i odpowiednio – 7.690. Ponadto wykazano, że oba typy podjednostek są syntetyzowane z określonych peptydów (2, 16). Okazało się, że sekwencje aminokwasowe podjednostek B toksyny Shiga są takie same jak sekwencje podjednostek B toksyny VT1 (52). Masa cząsteczkowa podjednostek A i B toksyny VT2 została oznaczona jako 33.135 i odpowiednio 7.817 (15). Yutsudo i wsp. (66) analizując VT2, pochodzącą ze szczepu *E. coli* 0157, określili jej masę cząsteczkową jako 35.000 (A) i 10,700 (B). Wartości te korespondują bardziej ściśle z wartościami przewidywalnymi dla nieprzetworzonych form jednostek VT2 (10). Struktura Vero-cytotoksyn *E. coli* jest bardzo zbliżona do budowy enterotoksyn *Vibrio cholerae* (CT) i *E. coli* (LT). Różnią się one jednak znacznie sekwencją aminokwasową ich podjednostek i w pewnym stopniu ciężarem cząsteczkowym (10). Wykazano, że podjednostki B, Vero-cytotoksyn *E. coli* (VT1 i VT2), są odpowiedzialne za specyficzne związanie toksyny z odpowiednim receptorem komórkowym (10). Chemicznie zbudowany jest on z frakcji α -galaktoza-1-4-galaktoza. Dwusacharyd ten jest u człowieka związany z ceramidem i glikolipidem globotriosylovym, jako antygenami grup krwi PK i P1 (27, 28). Podjednostki A są natomiast odpowiedzialne za aktywność biologiczną cytotoksyn. Po rozłożeniu tej frakcji toksyny przez trypsynę na dwie

części (A1 i A2), aktywny komponent A1 przedostaje się do cytoplazmy komórki, w której (po związaniu z lizosomami) rozpoczyna jej niszczenie. Rozczepia mianowicie resztę adeninową w podjednostce 28SrRNA. Dochodzi do inaktywacji eukariotycznych rybosomów, hamowania syntezy białka i destrukcji komórki (10, 63). Wykazano, że geny kontrolujące wytwarzanie VT są fagami, występującymi i warunkującymi tę cechę w wielu szczepach *E. coli*. Po raz pierwszy wykazano to w szczepie H19, należącym do serotypu 026:H11 (48, 54). Inne lizogenne komórki *E. coli*, w których stwierdzono fagi „VT”, odnotowano wielokrotnie w szczepach serogrup: 0111, 0119, 0128 i 0157 (18, 40, 54, 55, 56, 65). Natomiast w szczepach VTEC, izolowanych od prosiąt, nie stwierdzono wymienionych fagów, geny determinujące syntezę VT były zlokalizowane w chromosomie (30, 54). Wielokrotnie wykazywano w szczepie *E. coli* K12 geny „VT”, przenoszone przez fagi, pochodzące ze szczepów serogrup 026 i 0157 (13, 30, 54).

KOLONIZACJA SZCZEPÓW

Adhezja szczepów ETEC i niektórych EPEC na powierzchni błony śluzowej jelita stanowi ważny czynnik ich zjadliwości. Za efekt ten są odpowiedzialne różne serologicznie antygeny fimbrialne (10). Karch i wsp. (19) wykazali, że w szczepach VTEC z serogrupy 0157 występuje plazmid warunkujący syntezę fimbrii adhezyjnych. Elementy te określały zasiedlanie niewielkiej liczby komórek bakteryjnych na powierzchni enterocytów jelita, pochodzących z hodowli tkankowej (Intestine 407 cells). Natomiast Sherman i wsp. (53), badając adhezję i kolonizację *E. coli* 0157:H7 na powierzchni komórek hodowli tkankowych Intestine 407 i HEp-2, odnotowali, iż za procesy te są odpowiedzialne struktury powierzchniowe, inne aniżeli fimbrie adhezyjne. Plazmid opisany przez Karch'a i wsp. (19) o masie cząsteczkowej 60×10^6 , był wielokrotnie stwierdzany w szczepach *E. coli* 0157, pochodzących z różnych materiałów (17, 50, 64). Przy użyciu testów hybrydyzacyjnych, realizowanych z DNA tego plazmidu, odnotowano, że można było ustalić jako VTEC (fimbrio-dodatnie) aż 196 szczepów na 107, pochodzących z grupy 0157 (26). Natomiast jeżeli chodzi o 70 szczepów należących do innych serogrup, to w teście tym udało się określić tylko 55.

PATOGENEZA INFEKCJI WYWOŁYWANYCH PRZEZ VTEC

W badaniach nad patogenizacją infekcji wywoływanych przez VTEC używano kurcząt, myszy, królików, prosiąt oraz innych gatunków zwierząt. W badaniach ze szczepami *E. coli* 0157:H7, realizowanych na gnotobiotycznych prosiętach (9, 62) stwierdzono, że bakterie przymocowują się na powierzchni mikrosomków enterocytów i następnie wykazują tzw. *effacing effect*, polegający na niszczeniu ich struktury. W tym kontekście, oddziaływanie powyższe było zbliżone do efektów, stwierdzanych w następstwie zakażenia szczepami EPEC. Jednak w przeciwieństwie do tej grupy bakterii, szczepy 0157 po penetracji do komórek nabłonka jelitowego i rozwoju wewnątrz tych komórek, proliferowały w *lamina propia*. Ponadto szczepy te kolonizowały tylko jelito ślepe i okrężnicę prosiąt, podczas gdy EPEC wiązały się z jelitem

na całej jego długości (10, 63). U gnotobiotycznych świń zakażanych szczepem *E. coli* 0157:H7, obserwowano objawy letargu, wodnistą biegunkę i brak łaknienia, ponadto – obrzęk krezki jelita okrężniczego. Objawy kliniczne przypominały symptomy występujące u człowieka, z tym że u ludzi stwierdzano ponadto obecność krwi w kale. U gnotobiotycznych cieląt zakażanych szczepem *E. coli* 05, produkującym VT, bakterie zasiedlały jelito biodrowe i grube, powodując następnie szereg zmian w strukturze mikrokosmków, prowadzących do zatarcia ich budowy (35). Natomiast u myszy zakażanych dootrzewnowo oczyszczonymi preparatami VT1 i VT2, odnotowano objawy porażenia i następnie zejścia śmiertelne (41).

Mechanizm działania VT1 badano także przy użyciu komórek endotelialnych, otrzymanych z ludzkiej pępowiny (37). Odnotowano cytotoksyczny efekt, zależny od dawki toksyny; najbardziej wrażliwe były komórki w stanie podziału. Obserwacje te popierają hipotezę, według której endotelialne komórki naczyń włosowatych stanowią pierwsze elementy docelowe dla VT. Mogą być one pomocne w wyjaśnianiu patogenezы charakterystycznych zmian w nerkach, powstających w przebiegu HUS. Są one określane jako mikroangiopatia naczyń włosowatych (10).

DIAGNOSTYKA LABORATORYJNA ZAKAŻEŃ

Główne kierunki diagnozy zakażeń VTEC w przypadkach biegunki HC lub HUS to oznaczanie szczepów VTEC w próbach kału przy użyciu metod izolacyjno-hodowlanych, określenie VT w ekstraktach kału oraz oznaczanie przeciwciał neutralizujących anty-VT w surowicy krwi pacjentów (10). Ponieważ szczepy VTEC stanowią często nie więcej niż 1% wszystkich „kałowych” szczepów *E. coli*, trudno je wyizolować, stosując klasyczne metody hodowlane. *Willshaw* i wsp. (cyt. wg 10) stosując testy hybrydyzacji kolonii z próbkami DNA dla genów VT1 i VT2, oznaczali setki kolonii bakteryjnych z każdej próby kału, wykazujących znaczną wrażliwość w tej próbie (51).

Szczepy VTEC z grupy 0157, w odróżnieniu od innych *E. coli*, nie fermentują sorbitolu podczas 24 godzinnej inkubacji. Cecha ta została wykorzystana w ich diagnostyce (64). W jednym tylko teście, na podłożu zawierającym sorbitol i surowicę anty-H7, wykazuje się w przypadkach obecności tych szczepów brak rozczepiania sorbitolu i hamowanie reakcji aglutynacyjnej z surowicą diagnostyczną anty-H7 (8). Inną metodą, użyteczną w diagnostyce pierwotnej hodowli jest użycie podłoża Sorbitol-MacConkey Agar i następnie wykonanie testu aglutynacyjnego z surowicą diagnostyczną 0157 (29). Wymienione techniki są bardzo pomocne w diagnostyce szczepów 0157; nie nadają się natomiast do różnicowania szczepów VTEC, należących do innych serogrup. Wytwarzanie VT jest oznaczane poprzez testowanie podejrzanych szczepów *E. coli* na hodowlach komórek Vero lub HeLa. Komórki te zostały wcześniej użyte do realizacji cytotoksycznych testów w badaniach z toksyną *Shiga*. W przypadku toksyny VT wykazują równą czułość diagnostyczną (10). Istnieje wiele informacji, dotyczących metod używanych do przygotowania ekstraktów do testów cytotoksyczności w kontekście czułości tych prób. *O'Brien* i wsp. (38) podają, że wiele szczepów *E. coli* hodowanych w środowisku ubogim w związki żelaza, po zniszczeniu ich struktury komórkowej, prezentuje ekstrakty, wykazujące cytotoksyczny efekt w hodowli komórek HeLa.

Ekstrakt ten jest neutralizowany przez surowicę anty-toksyna Shiga. Niektóre szczepy VTEC wytwarzały toksynę w stężeniu porównywalnym do stężenia w wyniku jej syntezy przez szczepy *S. dysenteriae* typu 1. Poziom tej cytotoksyny był z reguły wystarczająco wysoki aby można było wykryć ją w supernatantach hodowli analizowanych szczepów. Natomiast hodowle bakteryjne, w których cytotoksyna była wykrywalna tylko w lizatach bakteryjnych, należały z reguły do drobnoustrojów grupy EPEC (najczęściej wyisobnianych od zdrowych ludzi) oraz do laboratoryjnych szczepów *E. coli* K12 (10). Badacze z Central Public Health Laboratory do określania produkcji VT, używali supernatantów z hodowli prowadzonej na podłożu Trypticase-Soy-Broth (47). Następnie w celu wykazania syntezy VT1 lub VT2 (lub też obu toksyn), wykorzystywano neutralizujące testy z surowicami króliczymi anty-VT1 i -VT2 (49, 50). Najwyższe miana toksyny były odnotowywane po 12–16 godzinnej inkubacji, jednakże jej wytwarzanie obserwowano w czasie całej wykładnikowej (logarytmicznej) fazy wzrostu (4). Istnieją doniesienia, iż prowadzenie hodowli *E. coli* w warunkach ograniczonej podaży związków żelaza nie zapewnia dostatecznie efektywnej syntezy Vero-toksyny. Uważa się, że w tych warunkach uzyskuje się tylko nieznaczny wzrost komórek bakteryjnych wytwarzających tę toksynę (10). Vero-cytotoksynę oznaczano także w supernatantach niektórych szczepów z grupy EPEC, poddając je hybrydyzacji z jednym lub obu typami VT. Z kolei inne szczepy EPEC, u których oba testy hybrydyzacyjne były negatywne, wykazywały właściwości cytotoksyczne w stosunku do komórek Vero i Y1, o ile badaniom poddano ich komórkowe ekstrakty, a nie hodowlane supernatanty (4). Sądzi się, że ten cytotoksyczny efekt nie mógł być spowodowany oddziaływaniem klasycznej Vero-toksyny, która nie wykazuje powinowactwa do komórek Y1 (10, 23). Uważa się, że stwierdzenie wolnej Vero-cytotoksyny w filtratach kałowych również świadczy o infekcji VTEC. Opracowana przez *Karmali* i wsp. (20, 21) metoda skryningu hodowli kałowych w kierunku VT, została następnie zmodyfikowana przez tych autorów (22). Modyfikacja ta polega na dodawaniu do hodowli polymyksyny B, która stymuluje syntezę cytotoksyny przez kolonie bakteryjne. Wykazanie VT1 lub VT2 (albo też obu toksyn) w filtratach kałowych wymaga użycia specyficznych surowic (anty-VT1, VT2), w celu neutralizacji mechanizmów cytotoksyczności. Wytwarzanie jednej lub obu toksyn wykazano w próbach kału, pochodzących od osób z przypadkami HUS (51). Zakażenia VTEC były również diagnozowane poprzez stwierdzenie wzrostu poziomu przeciwciał neutralizujących VT w surowicy pacjentów (20, 21).

A.J. Furowicz, D. Czernomysy-Furowicz

VERO-CYTOTOXIN-PRODUCING *ESCHERICHIA COLI* AS A CAUSE OF THE ZOONOTIC INFECTIONS OF MAN

SUMMARY

Based on the published data the following issues are covered in the present review: short characterization of Vero-cytotoxin-producing *E. coli*, VTEC infections (haemorrhagic colitic, haemolytic uraemic syndrome), epidemiology and pathogenesis of VTEC-infections, laboratory diagnosis of VTEC strains and VT toxins.

PIŚMIENICTWO

1. *Borczyk A.A., Karmali M.A.* et al.: *Lancet*, 1987, 1, 98. – 2. *Calderwood S.B., Auclair F.* et al.: *Proceed. Nation. Ac. Scien. USA* 1987, 84, 4364. – 3. *Carter A.O., Borczyk A.A.*: *New England J. Med.*, 1987, 317, 1496. – 4. *Chart H., Scotland S.M., Rowe B.*: *FEMS Microbiol. Lett.*, 1987, 48, 385. – 5. *Doyle M.P., Schoeni J.L.*: *Appl. Envir. Microbiol.*, 1987, 53, 2394. – 6. *Escherich T.*: *Fortschritte der Medizin* 1885, 3, 515. – 7. *Ewing W.H.*: *Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae*, Elsevier, New York- Amsterdam- Oxford 1986. – 8. *Farmer J.J., Davis B.R.*: *J. Clinical Microbiol.*, 1985, 22, 620. – 9. *Francis D.H., Collins J.E., Duinstra J.R.*: *Infect. Immun.*, 1986, 51, 953. – 10. *Grosz R.J.*: *Escherichia coli diarrhoea*, w: *Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity*. Red. G.R. Smith, Ch.S.F. Easomn, t. 3, Adivision of Hodderl and Staughton, London 1990, s. 470.

– 11. *Holmes B., Gross R.J.*: *Coliform bacteria; various other members of the Enterobacteriaceae*, w: *Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity*. Red. M.T. Parker, B.J. Duerden t. 2, Adivision of Hodder and Staughton, London 1990, s. 415. – 12. *Holmgren J.*: *Toxins affecting intestinal transport proceses*, w: *The Virulence of Escherichia coli*. Red. *M. Sussman*, Academic Press, London 1985, s. 177. – 13. *Huang A., De Grandis S.* et al.: *J. Bacteriol.*, 1986, 166, 375. – 14. *Itoh T., Kai A.*: *Annual Report of Tokyo Metropolitan Res. Lab. Pub. Health*, 1985, 36, 16. – 15. *Jackson M.P., Neill R.J.* et al.: *FEMS Microbiol. Lett.*, 1987, 44, 109. – 16. *Jackson M.P., Newland J.W.* et al.: *Microbiol. Path.*, 1987, 2, 147. – 17. *Johnson W.M., Lior H., Bezanson E.S.*: *Lancet*, 1983, 1, 76. – 18. *Karch H., Heesemann J., Laufs R.*: *J. Infect. Dis.*, 1987, 155, 707. – 19. *Karch H., Heesemann J.* et al.: *Infect. Immun.*, 1987, 55, 455. – 20. *Karmali M.A., Petric M.* et al.: *Lancet*, 1983, 1, 619.

– 21. *Karmali M.A., Petric M.*: *J. Infect. Dis.*, 1985, 151, 775. – 22. *Karmali M.A.*: *Clinical Microbiol News Lett.*, 1987, 9, 65. – 23. *Konowalchuk J., Spiers J.I., Stavric S.*: *Infect. Immun.*, 1977, 18, 775. – 24. *Krishnnan C., Fitzgerald V.A.* et al.: *J. Clinical Microbiol.*, 1987, 25, 1043. – 25. *Levin M., Barratt T.M.*: *Arch. Dis. Childhood*, 1984, 59, 397. – 26. *Levine M.M., Xu J.* et al.: *J. Infec. Dis.*, 1987, 156, 175. – 27. *Lindberg A.A., Brown J.E.* et al.: *J. Biolog. Chem.*, 1987, 262, 1779. – 28. *Lingwood C.A., Law H.*, et al.: *J. Biolog. Chem.*, 1987, 268, 8834. – 29. *March S.B., Ratnam S.*: *J. Clinical Microbiol.*, 1986, 23, 869. – 30. *Marques L.R.M., Peiris J.S.M.* et al.: *FEMS Microbiol. Lett.*, 1987, 44, 33.

– 31. *Martin M.L., Shipman L.D.* et al.: *Lancet*, 1986, 2, 1043. – 32. *Mohammad A., Peiris J.S.M.* et al.: *FEMS Microbiol. Lett.*, 1985, 26, 281. – 33. *Morgan G.M., Newman C.* et al.: *Epidem. Infect.*, 1988, 101, 83. – 34. *Moris J.A., Sojka W.J.*: *Escherichia coli as a pathogen in animals*, w: *Virulence of Escherichia coli*. Red. *M. Sussman*, Academic Press, London 1985, s. 47. – 35. *Moxley R.A., Francis D.H.*: *Infect. Immun.*, 1986, 53, 339. – 36. *New Pathogenes: E. coli O157:H7, the new threat*, w: *bioMerieux News (Industry)* 1995, 1, 13. – 37. *Obrig T.G., Del Vecchio P.J.* et al.: *Lancet*, 1987, 2, 687. – 38. *O'Brien A.D., La Veck G.D.* et al.: *J. Infect. Dis.*, 1982, 146, 763. – 39. *O'Brien A.D., La Veck G.D.*: *Infect. Immun.*, 1983, 40, 675. – 40. *O'Brien A.D., Newland J.W.* et al.: *Science*, 1984, 226, 694.

– 41. *O'Brien A.D., Holmes R.K.*: *Microbiol. Rev.*, 1987, 51, 206. – 42. *Osek J.*: *Medycyna Wet.*, 1995, 51, (6), 327. – 43. *Pai C.H., Gordon R.*: *Annals Inter. Med.*, 1984, 101, 738. – 44. *Riley L.W., Remis R.S.* et al.: *New England J. Med.*, 1983, 308, 681. – 45. *Reilej W.*: *Ann. Rev. Microbiol.*, 1987, 41, 383. – 46. *Ryan C.A., Tauxe R.V.* et al.: *J. Infect. Dis.*, 1986, 154, 631. – 47. *Scotland S.M., Day N.P., Rowe B.*: *FEMS Microbiol. Lett.*, 1980, 7, 15. – 48. *Scotland S.M., Smith H.R.* et al.: *Lancet*, 1983, 2, 216. – 49. *Scotland S.M., Smith H.R., Rowe B.*: *Lancet*, 1985, 2, 885. – 50. *Scotland S.M., Wilshaw G.A.* et al.: *Epidem. Infect.*, 1987, 99, 613.

– 51. *Scotland S.M., Rowe B.* et al.: *J. Med. Microbiol.*, 1988, 24, 237. – 52. *Seidah N.G., Donohue-Rolfe* et al.: *J. Biol. Chem.*, 1986, 261, 13928. – 53. *Sherman P., Soni R.*, et al.: *Infect. Immun.*, 1987, 55, 1824. – 54. *Smith H.W., Huggins M.B.*: *J. Gen. Microbiol.*, 1983, 129, 2659. – 55. *Smith H.R., Day N.P.* et al.: *Lancet*, 1984, 1, 1242. – 56. *Smith H.R., Scotland S.M., Rowe B.*

- Genetics of *E. coli* Virulence, in: *The Virulence of E. coli*. Red. *M. Sussman*, Academic Press, London 1985, s. 227. – 57. *Smith H.R., Rowe B.*: *Lancet*, 1987, 1, 1062. – 58. *Sojka W.J.*: *Escherichia coli* in domestic animals and poultry. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal 1965. – 59. *Spika J.S., Parsons J.E.* et al.: *J. Pediatr.*, 1986, 109, 287. – 60. *Strockbine N.A., Marques L.R.M.* et al.: *Infect Immun.*, 1986, 53, 135.
- 61. *Taylor C.M., White R.H.C.*: *Be. Med. J.*, 1986, 292, 1513. – 62. *Tzipori S., Wachsmuth I.K.* et al.: *J. Infect. Dis.*, 1986, 154, 712. – 63. *Weussfeld A.S., McNamara A.M., Tesh V.L., Horward B.J.*: *Enterobacteriaceae*, w: *Clinical and Pathogenic Microbiology*. Red. *B.J. Horward* et al., Mosby S. Louis 1994, s. 299. – 64. *Wells J.G., Davis B.R.* et al.: *J. Clinical Microbiol.*, 1983, 18, 512. – 65. *Willshaw G.A., Smith H.R.* et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 1985, 131, 3047. – 66. *Yutsudo T., Nakabayashi N.* et al.: *Microbiol. Pathogenesis*, 1987, 3, 21.

Adres: Katedra Immunologii i Mikrobiologii Akademii Rolniczej,
71-466 Szczecin, ul. Dr Judyma 24