

Anna Pobucewicz*¹, Danuta Czernomysy-Furowicz¹

Katedra Immunologii i Mikrobiologii, Wydziału Biotechnologii i Hodowli Zwierząt,
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, ul. Doktora Judyma 24, 71-466 Szczecin

Wpłynęło w lipcu 2009 r.

1. Wprowadzenie. 2. Chorobotwórczość rodzaju *Citrobacter*. 3. Czynniki wirulencji *Citrobacter freundii*. 3.1. Shiga-like toksyny. 3.2. Ciepłostale enterotoksyny – ST. 3.3. Ciepłolabina enterotoksyna – LT oraz toksyna homologiczna do toksyny CT. 4. Podsumowanie

Characteristics of *Citrobacter freundii* strain with special focus on its ability to produce toxins

Abstract: The *Citrobacter* genus comprises a group of Gram-negative rods, which morphologically, biochemically and serologically resemble *Salmonella* spp. These bacteria are commonly present in the environment and are opportunistic bacteria that cause many infections.

Their characteristic feature is the lack of ability to ferment lactose or ferment this sugar after prolonged incubation. What is more, their antigenic structure resembles that of *Salmonella* spp. (O and H antigens) and some strains may possess Vi antigen, which is similar to Vi antigen of *Salmonella* rods.

Within *Citrobacter* genus, *Citrobacter freundii* is considered the most pathogenic species. This microorganism may produce many toxins: heat-stable (ST) and heat-labile (LT) enterotoxin, Shiga-like toxin (SLT-II) which are characteristic for enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. These bacteria may also produce a toxin, which is homologous to the toxin produced by *Vibrio cholerae* strains (CT).

1. Introduction. 2. Pathogenicity of *Citrobacter* genus. 3. Virulence factors of *Citrobacter freundii*. 3.1. Shiga-like toxins. 3.2. Heat-stable enterotoxins – ST. 3.3. Heat-labile enterotoxin – LT and a toxin homologous to CT toxin. 4. Summary

Słowa kluczowe: chorobotwórczość, *Citrobacter freundii*, toksyny

Key words: pathogenicity, *Citrobacter freundii*, toxins

1. Wprowadzenie

Citrobacter spp. to Gram-ujemne, oksydazo-ujemne pałeczki jelitowe [10, 15, 26], które morfologicznie [2], biochemicznie [4, 5] i serologicznie [15, 17] przypominają rodzaj *Salmonella*. Wiele szczepów z tego rodzaju reaguje krzyżowo z surowicą wykorzystywaną do identyfikacji pałeczek *Salmonella* spp. [15]. Samuel i wsp. dowodzą, że niektóre szczepy *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli* oraz *Salmonella enterica* posiadają albo identyczne, albo o wysokim stopniu homologii, antygeny somatyczne – O [22]. Do podobnych wniosków doszli Vinogradov i wsp., wskazując na podobieństwo antygeny O *C. freundii* do *E. coli* O157, pomimo, że posiadał on unikalną strukturę różną od antygeny *E. coli* O157 [27]. Także Bettelheim i wsp., którzy wyizolowali pośmiertnie z jelit 2,5 miesięcznego niemowlęcia szczep bakteryjny, profilem biochemicznym odpowiadający gatunkowi *C. freundii* oraz posiadający antygen somatyczny typowy dla *E. coli* O157 [3]. Cechą charakterystyczną tych bakterii jest brak zdolności do fermentowania laktozy bądź też opóźniona jej fermentacja [5, 9]. Jako

jedyne źródło węgla potrafią wykorzystywać cytryniany. Dodatkowo posiadają dwie cechy odróżniające je od innych członków rodziny *Enterobacteriaceae*, a mianowicie brak zdolności do wytwarzania acetylokarbinolu (reakcja Voges-Proskauer) oraz dekarboksylazy lizyny [5, 15, 26].

2. Chorobotwórczość rodzaju *Citrobacter*

Drobnoustroje te poza naturalnym miejscem swojego występowania są oportunistami i wywołują szereg infekcji, od zatruc pokarmowych, zakażeń układu moczowego i zakażeń ran, aż po posocznice, zapalenie opon mózgowych u noworodków [1, 11, 14, 15, 18, 26] oraz zakażenia w obrębie układu oddechowego, otrzewnej, wsierdza i krwioobiegu [18]. Zachorowalność na zapalenie opon mózgowych i w konsekwencji związana z nim śmiertelność, jest bardzo wysoka. Wskaźnik śmiertelności sięgać może 25–50%, a neurologiczne następstwa mogą pojawiać się u 75% osób [1]. Guarino i wsp. donoszą, że pałeczki z rodzaju *Citrobacter* mogą być powodem

* Autor korespondencyjny: Katedra Immunologii i Mikrobiologii, Wydziału Biotechnologii i Hodowli Zwierząt, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, ul. Doktora Judyma 24, 71-466 Szczecin, tel. (091) 449-67-11, e-mail: kompan7ania@wp.pl

zapalenia jelit u ludzi [10], a także mogą uszkadzać komórki układu moczowego [14].

Spośród wszystkich gatunków z rodzaju *Citrobacter*, za najbardziej znaczące czynniki etiologiczne infekcji oportunistycznych u hospitalizowanych pacjentów uważa się: *C. koseri* (dawniej *C. diversus*) oraz *C. freundii*. Mikroorganizmy te charakteryzują się wysokim stopniem oporności na antybiotyki [18]. M o h a n t y i wsp. [18] zaobserwowali, że izolowane od hospitalizowanych pacjentów szczepy *C. freundii* były bardziej wrażliwe na antybiotyki (z wyjątkiem imipenemu i meropenemu), niż *C. koseri*. Odnotowali oni oporność badanych szczepów, m. in. na cefalosporyny III generacji (cefotaksim i ceftazydim), piperacylinę, cyprofloksacynę oraz amikacynę.

C. freundii jest izolowany z wody, gleby, produktów żywnościowych [24], ale także od zwierząt domowych i gospodarskich [6, 14, 24, 25]. Bytując w fizjologicznych warunkach w przewodzie pokarmowym, szczepy *C. freundii* są stale związane z przypadkami biegunek u ludzi [10–12, 14, 24]. Pałeczki te mogą wykorzystywać różne mechanizmy przenikania i/lub namnażania w komórkach centralnego układu nerwowego [1]. Co więcej, inwazyjność tych szczepów może zapoczątkować przełamanie bariery krew-mózg, a tym samym prowadzić do wywołania zapalenia opon mózgowych [14].

3. Czynniki wirulencji *Citrobacter freundii*

U *C. freundii* zidentyfikowano kilka czynników wirulencji. Były to: toksyna Shiga (-like) II [7, 8, 13, 14, 16], ciepłostąła enterotoksyna homologiczna do 18-aminokwasowej enterotoksyny ST Ia produkowanej przez pałeczki *E. coli* [10, 11, 14, 16, 24] oraz otoczka bakteryjna z antygenem powierzchniowym Vi, wykazującym ścisłe pokrewieństwo do antygeny Vi obecnego u pałeczek *Salmonella* Typhi [14]. Drobnoustroje te zdolne są do wywoływania efektu cytotoksycznego na komórki HeLa [14, 24] oraz komórki linii Vero [24], a produkowane przez nie toksyny działały letalnie na wykorzystywane w doświadczeniach myszy [24]. Podobny efekt powodowała verocytotoksyna (Shiga-like toksyna), znajdująca się w komórkach *E. coli* [24]. Niektóre szczepy *C. freundii* mogą także posiadać ciepłolabilną enterotoksynę LT, typową dla *E. coli* [10, 16, 21, 28] oraz toksynę homologiczną do toksyny produkowanej przez *Vibrio cholerae* – CT [16].

H e s s i i wsp. [14] w swoich badaniach zidentyfikowali i scharakteryzowali u *C. freundii* region genu *fim*, który wykazuje homologię do regionu genu *fim* u *Salmonella* Typhimurium. Geny *fim* u obu gatunków są odpowiedzialne za kodowanie fimbrii typu 1, czyli czynnika wirulencji umożliwiającego drobnoustrojom wtargnięcie do komórek organizmu wyższego i znaj-

dują się w tej samej grupie genów. Gen *fim* u *C. freundii* charakteryzuje się także wysoką homologią sekwencji nukleotydów w porównaniu do tego samego genu u *S. Typhimurium*. Może to wskazywać na fakt, że mogą one być przekazywane drogą transferu horyzontalnego od *Salmonella* spp. do *Citrobacter* spp. lub też odwrotnie. Istnieje też możliwość ich dziedziczenia w obrębie rodzaju.

3.1. Shiga-like toksyny

Toksyny Shiga oraz prawie identyczne z nimi, Shiga-like toksyny składają się z dwóch podjednostek. Jedna z nich wiąże się z powierzchnią atakowanej przez bakterię komórki, natomiast druga – po wnikięciu do cytozolu komórki powoduje zahamowanie syntezy białek, a przez to śmierć komórki. Toksynę Shiga wytwarza *Shigella dysenteriae*, natomiast Shiga-like toksyny są syntetyzowane w komórkach niektórych szczepów *E. coli* [23].

Udowodniono, że geny odpowiedzialne za kodowanie obu toksyn znajdują się w komórkach *C. freundii* [7, 8, 13, 23, 24], *Enterobacter cloacae*, *Aeromonas caviae* czy *Aeromonas hydrophila* [23].

S c h m i d t i i wsp. [24] w swoich badaniach stwierdzili u *C. freundii* obecność genów *slt-IIcA* i *slt-IIcB*. Sekwencja nukleotydowa genu kodującego podjednostkę B – *slt-IIb*, toksyny SLT-II u *C. freundii*, była identyczna z sekwencją genu *slt-IIvhc*, występującego u wzorcowego szczepu *E. coli* O157:H7 7279. Natomiast, sekwencja genu kodującego podjednostkę A – *slt-IIa*, u *C. freundii* była bardzo podobna do sekwencji genu *slt-IIvhc* z *E. coli*. Oba geny różniły się między sobą czterema parami zasad azotowych. Autorzy ci zaobserwowali ponadto, że utrata obecnych w plazmidach genów *slt-IIc*, odpowiadających za wytwarzanie toksyny SLT-II przez szczepy bakteryjne izolowane od ludzi oraz z próbek mięsa wołowego, skutkowałą utratą ich cytotoksycznych właściwości [24].

Plazmidowe geny kodujące wytwarzanie Shiga toksyn (Shiga-like toksyn) – *stx* mogą występować w komórkach szczepów *C. freundii*, posiadających antygen powierzchniowy Vi [13] lub u szczepów *C. freundii*, izolowanych od pacjentów z HUS – zespołem hemolityczno-mocznicowym [8].

3.2. Ciepłostąłe enterotoksyny – ST

Ciepłostąłe enterotoksyny (heat-stable enterotoxin – ST), to małe, bogate w cysteinę białka wiążące receptory na powierzchni jelit ssaków [20] i będące przyczyną biegunek u ludzi i zwierząt [10, 11, 20]. Ich cechą charakterystyczną jest duża heterogenność. Wśród toksyn ST wyróżniono toksyny STa (STI) i STb (STII) [20]. Toksyna STa może występować w dwóch spo-

krewnionych ze sobą, ale genetycznie odmiennych formach: STp i STh. STp jest 18-aminokwasowym białkiem wyosobnionym z enterotoksycznych (ETEC) szczepów *E. coli*, wyizolowanych od ludzi, świń oraz bydła, natomiast STh jest 19-aminokwasowym białkiem izolowanym tylko z ETEC, od ludzi [10, 20]. Wśród STa znajdują się toksyny STa produkowane przez enterotoksyczne szczepy *E. coli*, toksyny M-ST produkowane przez *Vibrio mimicus*, czy też C-ST wytwarzane przez *C. freundii* [16, 20]. Również wśród pałeczek *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica*, *E. cloacae*, *A. hydrophila* czy *Proteus* spp. izolowano szczepy zdolne do produkcji tejże toksyny [10, 20]. Geny odpowiedzialne za syntezę STa, podobnie jak geny kodujące Shiga toksyny, czy też ciepłolabilne enterotoksyny są genami plazmidowymi [10, 11, 21].

Guarino i wsp. [10] przebadali dzieci zdrowe oraz dzieci z objawami zatrucia pokarmowego i tylko od dzieci z biegunką izolowali szczepy *C. freundii*, które produkowały toksynę ST. Według tychże autorów, zdolność do syntetyzowania toksyn ST można uznać za marker patogenności szczepów *C. freundii*, izolowanych z przypadków biegunek u dzieci, w sytuacji gdy nie izoluje się żadnych innych, poza *C. freundii* patogenów [10]. Podjęli się oni również porównania parametrów biologicznych i immunologicznych toksyny ST produkowanej przez *C. freundii* z toksyną STa produkowaną przez *E. coli* i dowiedli, że wykazuje ona typowe dla toksyny STa cechy, a mianowicie: jest ciepłostała, rozpuszczalna w metanolu, posiada małą masę cząsteczkową i ulega inaktywacji w pH powyżej 8,0. Enterotoksyna *C. freundii* reaguje także z przeciwciałami monoklonalnymi, skierowanymi przeciwko 18-aminokwasowej toksynie STa *E. coli*. Wskazuje to na identyczną budowę obu toksyn, która różni się od toksyny STb wytwarzanej przez *E. coli*. Toksyna STb nie reaguje z przeciwciałami skierowanymi przeciwko STa [10, 11]. Badacze ci zauważyli, że u kilku dzieci z biegunką oprócz *C. freundii*, występowały jednocześnie enterotoksyczne pałeczki *E. coli* wytwarzające ST. Geny kodujące ST są pochodzenia plazmidowego a plazmid z wbudowanym genem może być przekazywany z jednej bakterii do drugiej na drodze transdukcji bądź też koniugacji. Tym sposobem drobnoustroje mogą nabywać cech toksynotwórczych, nawet jeśli wcześniej takowych nie posiadały [10]. Według Guarino i wsp. [11] nie istnieją konkretne dowody na to, że geny kodujące toksyny ST są pochodzenia plazmidowego.

3.3. Ciepłolabilna enterotoksyna – LT oraz toksyna homologiczna do toksyny CT

Ciepłolabilne enterotoksyny (heat-labile enterotoxin – LT) tworzą rodzinę polimerycznych białek powiązanych ze sobą w budowie oraz funkcjach. Wśród

nich wyróżniono toksynę LTI i LTII. W skład wariantu LTI wchodzi LTh-I (toksyna produkowana przez ludzkie enterotoksyczne szczepy *E. coli*) i LTp-I (toksyna produkowana przez świńskie enterotoksyczne szczepy *E. coli*), natomiast wariant LTII dzieli się na LTIIa i LTIIb. Szczepy produkujące LTII są najczęściej izolowane od świń, bydła oraz z żywności, a rzadko od ludzi [19].

Neil i wsp. [21] zauważyli, że pałeczki *E. coli* posiadające plazmidy z genem kodującym toksyny LT, mogą go przekazywać innym gatunkom bakterii, np. *C. freundii*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *S. Typhimurium* czy *Shigella sonnei*, dzięki czemu bakterie te nabywają właściwości enterotoksycznych.

Karasa i wsp. [16] w swoich badaniach zidentyfikowali u *C. freundii* geny kodujące wytwarzanie podjednostek A i B toksyny LT i podjednostek A i B toksyny homologicznej do toksyny produkowanej przez przecinkowca cholery – CT. Zauważyli oni także, że sekwencja aminokwasów w podjednostce B toksyny CT *C. freundii* jest w większości identyczna z sekwencją aminokwasów w podjednostce B toksyny LT z *E. coli* i toksyny CT. Jednak toksyna ta nie była aktywna biologicznie, gdyż nie było homologii wśród podjednostek A tych toksyn [16].

4. Podsumowanie

Pałeczki *Citrobacter* spp. to powszechnie występujące w środowisku drobnoustroje przypominające rodzaj *Salmonella*. Nie są uznawane za groźne patogeny ludzi i zwierząt, jak choćby wspomniane wcześniej *Salmonella* spp., nawet pomimo bliskiego ich pokrewieństwa pod względem wielu cech. Mając jednak na uwadze fakt, że są one zdolne do syntetyzowania wielu czynników wirulencji, a przede wszystkim kilku rodzajów toksyn (SLT, ST, LT czy toksyny homologicznej do toksyny CT), powinny być za takie uznane.

Piśmiennictwo

1. Badger J.L., Stins M.F., Kim K.S.: *Citrobacter freundii* invades and replicates in human brain microvascular endothelial cells. *Infect Immun.* **67**, 4208–4215 (1999)
2. Bennett A.R., MacPhee S., Betts R., Post D.: Use of pyrrolidonyl peptidase to distinguish *Citrobacter* from *Salmonella*. *Lett. Appl. Microbiol.* **28**, 175–178 (1999)
3. Bettelheim K.A., Evangelidis H., Pearce J.L., Sowers E., Strockbine N.A.: Isolation of a *Citrobacter freundii* strain which carries the *Escherichia coli* O157 antigen. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 760–761 (1993)
4. Crosa J.H., Brenner D.J., Ewing W.H., Falkow S.: Molecular relationships among the *Salmonellae*. *J. Bacteriol.* **115**, 307–315 (1973)

5. Ewing W.H.: Identification of *Enterobacteriaceae*, fourth edition, red. W.H. Ewing, Elsevier Science Publ. New York 1986, s. 341–364
6. Farmer III J.J., Davis B.R., Hickman-Brenner F.W., McWhorter A., Huntley-Carter G.P., Asbury M.A., Riddle C., Wathen-Grady H.G., Elias C., Fanning G.R., Steigerwalt A.G., O'Hara C.M., Morris G.K., Smith P.B., Brenner D.J.: Biochemical identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **21**, 46–76 (1985)
7. Garcia-Aljaro C., Muniesa M., Blanco J.E., Blanco M., Blanco J., Jofre J., Blanch A.R.: Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from aquatic environments. *FEMS Microbiol. Lett.* **246**, 55–65 (2005)
8. Gavin P. J., Thomson R. B.: Diagnosis of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection by detection of Shiga toxins. *Clin. Microbiol. Newsl.* **26**, 49–54 (2004)
9. Goodman R. E., Pickett M. J.: Delayed lactose fermentation by *Enterobacteriaceae*. *J. Bacteriol.* **92**, 318–327 (1966)
10. Guarino A., Capano G., Malamisura B., Alessio M., Guandalini S., Rubino A.: Production of *Escherichia coli* STa-like heat-stable enterotoxin by *Citrobacter freundii* isolated from humans. *J. Clin. Microbiol.* **25**, 110–114 (1987)
11. Guarino A., Gianella R., Thompson M.: *Citrobacter freundii* produces an 18-amino-acid heat-stable enterotoxin identical to the 18-amino-acid *Escherichia coli* heat stable enterotoxin (ST Ia). *Infect. Immun.* **57**, 649–652 (1989)
12. Guerrant, R.L., Dickens M.D., Wenzel R.P., Kapikian A.Z.: Toxicogenic bacterial diarrhea: nursery outbreak involving multiple bacterial strains. *J. Pediatr.* **89**, 885–891 (1976)
13. Hamabata T., Tanaka T., Ozawa A., Sima T., Sato T., Takeda Y.: Genetic variation in the flanking regions of Shiga toxin 2 gene in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolated in Japan. *FEMS Microbiol. Lett.* **215**, 229–236 (2002)
14. Hess P., Altenhöfer A., Khan A.S., Daryab N., Kim K.S., Hacker J., Oelschlaeger T.A.: A *Salmonella fim* homologue in *Citrobacter freundii* mediates invasion in vitro and crossing of the blood-brain barrier in the rat pup model. *Infect. Immun.* **72**, 5298–5307 (2004)
15. Janda J.M., Abbott S.L., Cheung W.K.W., Hanson D.F.: Biochemical identification of *Citrobacter* in the clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.* **32**, 1850–1854 (1994)
16. Karasawa T., Ito H., Tsukamoto T., Yamasaki S., Kurazono H., Faruque S.M., Nair G.B., Nishibuchi M., Takeda Y.: Cloning and characterization of genes encoding homologues of the B subunit of Cholera toxin and the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin from clinical isolates of *Citrobacter freundii* and *E. coli*. *Infect. Immun.* **70**, 7153–7155 (2002)
17. Kocharowa N.A., Knirel Y.A., Stanislavsky E.S., Kholodkova E.V., Lugowski C., Jachymek W., Romanowska E.: Structural and serological studies of lipopolisaccharides of *Citrobacter* O35 and O38 antigenically related to *Salmonella*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **13**, 1–8 (1996)
18. Mohanty S., Singhal R., Sood S., Dhawan B., Kapil A., Das B.K.: *Citrobacter* infections in a tertiary care hospital in Northern India. *J. Infect.* **54**, 58–64 (2007)
19. Nair G.B., Takeda Y.: The heat-labile and heat-stable enterotoxins of *Escherichia coli*. W *Escherichia coli*: mechanisms of virulence, first edition, red. M. Sussman, Cambridge University Press, 1997 237–256
20. Nair G. B., Takeda Y.: The heat-stable enterotoxins. *Microb. Pathog.* **24**, 123–131 (1998)
21. Neill R.J., Twiddy E.M., Holmes R.K.: Synthesis of plasmid-coded heat-labile enterotoxin in wild-type and hypertoxinogenic strains of *Escherichia coli* and in other genera of *Enterobacteriaceae*. *Infect. Immun.* **41**, 1056–1061 (1983)
22. Samuel G., Hogbin J.-P., Wang L., Reeves P.R.: Relationships of the *Escherichia coli* O157, O111, and O55 O-antigen gene clusters with those of *Salmonella enterica* and *Citrobacter freundii*, which express identical O antigens. *J. Bacteriol.* **186**, 6536–6543, (2004)
23. Sandvig K.: Shiga toxins. *Toxicon*, **39**, 1629–1635, (2001)
24. Schmidt H., Montag M., Bockemuhl J., Heesemann J., Karch H.: Shiga-like toxin II-related cytotoxins in *Citrobacter freundii* strains from humans and beef samples. *Infect. Immun.* **61**, 534–543 (1993)
25. Sedlak J.: Present knowledge and aspects of *Citrobacter*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **62**, 41–59 (1973)
26. Talaro K.P.: Foundations in microbiology, fifth edition, red. M.J. Lange, McGraw-Hill, New York 2004, s. 614–625
27. Vinogradov E., Conlan J.W., Perry M.B.: Serological cross-reaction the lipopolisaccharide O-polysaccharide antigens of *Escherichia coli* O157:H7 and strains of *Citrobacter freundii* and *Citrobacter sedlakii*. *FEMS Microbiol. Lett.* **190**, 157–161 (1998)
28. Wadstrom T., Aust-Kettis A., Habte D., Holmgren J., Meeuwisse G., Mollby R., Soderlind O.: Enterotoxin producing bacteria and parasites in stools of Ethiopian children with diarrheal disease. *Arch. Dis. Child.* **51**, 865–870 (1976)