

TAJEMNICA CHOROBOTWÓRCZOŚCI *VIBRIO CHOLERAE* PRZECINKOWCA CHOLERY W STO LAT PO ŚMIERCI ROBERTA KOCHA

*Skrót wykładu przedstawionego na Konferencji naukowej „Mikrobiologia 100 lat po Robertie Kochu”
Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Warszawie w dniach 30–31 sierpnia 2010 r.*

Hanna Stypułkowska-Misiurewicz*

Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa

Wpłynęło w 2010 r.

1. Wprowadzenie. 2. *V. cholerae* gatunkiem chorobotwórczym. 3. Toksyny *V. cholerae*. 4. *V. cholerae* non-O1. 5. Pochodzenie epidemicznych szczepów *V. cholerae*. 6. Podsumowanie

The mystery of *Vibrio cholerae* pathogenic activity a hundred years after the Robert Koch's death

Abstract: In his rapport from Calcutta published in 1884 in German press of Berlin Robert Koch described *Vibrio* as an etiological agent of cholera, in spite that the germ did not caused cholera symptoms in the animals infected in laboratory [9]. The research works connected with VII pandemic of cholera that started in 1961 solved the problem by the demonstration of the toxic activity of the *V. cholerae* on biological models. New important information concerning the bacteriological media for isolation of cholera vibrio, vibrio genetics, cholera toxins, vibrio virulence and survival of cholera vibrio in the environment brought new solutions for surveillance, prevention and control of cholera in the world. The epidemic outbreaks of cholera in some European countries, in Slovakia and Ukraine in 1970 caused the conditions that a group of workers of National Institute of Hygiene in Warsaw started to work on microbiological methods for examination for *V. cholera* the patients and healthy contacts, water and food, as well as to instruct the sanitary stations staff for epidemiological and laboratory investigation. The cooperation with researchers in Europe and other countries were developed to exchange the most important news. The pandemic of cholera faded but still remained several unsolved problems that actually are investigated by researchers in countries developed as well as underdeveloped working together as cholera remain a heavy burden to many poor regions in the world.

1. Introduction. 2. *V. cholerae* the pathogenic genus. 3. The *V. cholerae* toxins. 4. *V. cholerae* non-O1 strains. 5. Origin of *V. cholera* epidemic strains. 6. Summary

Słowa kluczowe: Przecinkowce, *Vibrio cholerae*, pandemie cholery, toksyny choleryczne

Key words: *Vibrio*, *V. cholerae*, cholera pandemics, cholera toxins

„W nauce ważniejsze jest, aby pomysł był
użyteczny i ciekawy niż by był słuszny”
Wilfred Trotter (1941) [29]

1. Wprowadzenie

Cholera, należy do tych zakaźnych chorób jelitowych, które ze względu na częstość występowania i liczbę ofiar odegrały największą rolę w historii ludzkości. W Europie w okresie od 1817 r. do 1896 r. wystąpiło pięć pandemii, szósta od 1899 r. do 1923 r. [14]. Lęk z powodu znacznej śmiertelności i liczby chorych spowodował mobilizację środków społecznych do walki z cholera. Dwie naukowe ekspedycje: francuską i niemiecką wysłano w 1883 r. do Egiptu, kraju endemicznego występowania cholery. Ich celem było wykrycie bakteryjnego czynnika etiologicznego, jako podstawy do znalezienia metod walczenia z epi-

demią cholery w Europie. Niemiecką ekspedycją kierował Robert Koch. Już w 1883 r. z Egiptu, zawiadomił, że w badaniu mikroskopowym zauważył bakterię, zakrzywioną pałeczkę, w preparatach ściany jelitowej osób zmarłych z powodu cholery. Jednak nie był w stanie wywołać objawów cholery u zakażonych nią zwierząt laboratoryjnych. Badania kontynuował w Indiach, w Kalkucie i 2.02.1884 r. doniósł, że wyizolowany przez niego drobnoustrój *Vibrio comma* jest zarazkiem cholery, ponieważ występuje tylko u chorych zmarłych z objawami cholery [9]. Brak jednego z tzw. „postulatów Kocha”, wystąpienia objawów cholery u zwierząt zakażanych w laboratorium, był powodem nie uznania tego odkrycia przez niemieckich uczonych m.in. Pettenkofera. Zachorowanie pracowników laboratoryjnych potwierdziło słuszność opinii Kocha i stało się podstawą do uznania cholery za zakaźną chorobę bakteryjną szerzącą się pomiędzy

* Autor korespondencyjny: Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa; tel. 22 5421-376; e-mail: hstypulkowska@pzh.gov.pl

ludźmi i za pośrednictwem wody i żywności. Wprowadzono przepisy kwarantannowe, również w Polsce [17] i sanitarne, niektóre nadal obowiązujące [3, 15]. W latach 1884–1892 opracowano szczepionkę przeciwko cholercie (K o c h i G a f f k i n) stosowaną m.in. wojsku, a produkowaną aż do 2000 r. [5]. Problem laboratoryjnego dowodu na chorobotwórczość *V. cholerae* rozwiązano dopiero w okresie VII pandemii cholery.

2. *V. cholerae* gatunkiem chorobotwórczym

Chorobotwórczość (patogenność), jest to właściwość jednostki taksonomicznej drobnoustroju, który zdolny jest do wywołania zachorowania zakażonego nim gospodarza. Określana jest na podstawie obserwacji laboratoryjnych, klinicznych i epidemiologicznych dotyczących występowania danego typu, gatunku lub rodzaju, którego obecność wykrywana jest badaniami diagnostycznymi w próbkach materiału pobranego od chorego na określoną chorobę zakaźną. W odróżnieniu od chorobotwórczości, zjadliwość jest właściwością szczepu ocenianą na podstawie reakcji na zakażenie określonego zwierzęcia lub odpowiedniego modelu biologicznego. *Vibrio cholerae* uznano za gatunek chorobotwórczy i zdolny do powodowania epidemicznego, a nawet pandemicznego szerzenia się zachorowań w populacji ludzkiej. Od ponad 100 lat badania mikrobiologiczne ukierunkowane są na poszukiwanie właściwości biochemicznych i antygenowych umożliwiających odróżnienie *V. cholerae* chorobotwórczego i wywołującego epidemiczne zachorowania u ludzi od nie chorobotwórczych gatunków i rodzajów bakterii wolno żyjących w wodach naturalnych [22]. Odczyn z „czerwienią choleryczną” nitrozoindolowy różnicujący *V. cholerae* od przecinkowców wodnych, opracowany przez Odo B u j w i d a, pierwszego polskiego lekarza bakteriologa, ucznia R. K o c h a był w użyciu aż do lat 70-tych XX wieku.

Komitet Taksonomii i Nomenklatury Międzynarodowego Zrzeszenia Towarzystw Mikrobiologicznych (IAMS) porządkując taksonomię rodzaju *Vibrio* zredukował liczbę gatunków z opisanych ponad 180 do 36. Według *Bergey's Manual* (wyd. 2005 r.) rodzaj *Vibrio*, zaliczono do rzędu *Vibrionales*, rodziny *Vibrionaceae*, a 12 gatunków z rodzaju *Vibrio*, uznano za chorobotwórcze dla człowieka, ponieważ bywają izolowane z zachorowań z objawami biegunki, zatrucia pokarmowego lub zakażenia ran, a nawet posocznicy [27]. *V. cholerae* uznano za gatunek wzorcowy i poszukiwano właściwości charakteryzujących jego odmiany szerzące się epidemicznie.

Pod względem zróżnicowania struktury antygeny somatycznego O wśród szczepów *V. cholerae* wykazano obecność już 139 różnych antygenowych grup.

Międzynarodowej rejestracji podlegają zachorowania powodowane przez szczepy grupy O1, a od 1992 r. również O 139 [18]. Stwierdzono, że nie tylko szczepy grupy O1, ale również szczepy *V. cholerae* grupy O 139 mają zdolność do produkcji toksyny cholerycznej i mogą stać się przyczyną pojawienia się nowej pandemii [18].

Wśród szczepów *V. cholerae* O1 Japończycy wyróżnili 3 odmiany o różnym składzie ilościowym 3 fragmentów antygeny somatycznego O: Ogawa (AB), Inaba (AC) i Hikojima (ABC) [23].

Ostatnio, metody genetyczne m.in. sekwencjonowania genomu, wykorzystano do określania przynależności izolowanych szczepów do gatunku *V. cholerae* i rozpoznawania genetycznej struktury warunkującej ewentualną zjadliwość. Wśród szczepów wyizolowanych z wody rozpoznano dwa nowe gatunki, bardzo blisko spokrewnione z *V. cholerae* i podobnie wyposażone w genetyczne elementy i wyspy zjadliwości VSP-I i VSP-II. Przypuszcza się, że w odpowiednich warunkach zakażenie się nimi mogłyby powodować zachorowanie [8].

Diagnostyka laboratoryjna cholery opiera się na ograniczonej liczbie właściwości umożliwiających szybkie rozpoznanie *V. cholerae*. W preparacie mikroskopowym są to Gram-ujemne pałeczki, różnej wielkości (0,3–1,3 × 1,4–5,0 μm), często lekko zagięte, najczęściej ruchliwe posiadające pojedynczą, umieszczoną biegunowo wici [22]. Przecinkowce, w odróżnieniu od *Pseudomonadaceae* uzyskują energię na obu drogach metabolicznych: utleniania i fermentacji glukozy do produktów kwaśnych, bez wytwarzania gazu. Mają zdolność do wzrostu w warunkach tlenowych i względnie beztlenowych [23]. W odróżnieniu od pałeczek jelitowych *Enterobacteriaceae* wytwarzają oksydazę indofenolową. Tabela I przedstawia różnicowanie podobnych do siebie bakterii Gram-ujemnych spotykanych w próbkach materiału od chorych. Już R. K o c h stwierdził, że zarazki cholery są wrażliwe na wysychanie i kwaśny odczyn środowiska. Ich tolerancję na odczyn zasadowy środowiska, zastosowano w podłożu wybiórczo-namnażającym *V. cholerae* – alkalicznej wodzie peptonowej AWP o pH 8,5–9,0. Oporność na działanie żółci wykorzystano w podłożu stałym wybiórczym i różnicującym TCBS. Podłoże to zawiera żółć wołowa lub duże stężenie glikocholanu sodu (nie dezoksycholalanu), sacharozę i barwny wskaźnik kwasowości [32]. Metoda dwu stopniowej hodowli przez zastosowanie obu wymienionych podłoży przyczyniła się do zwiększenia czułości ukierunkowanego badania bakteriologicznego i możliwości wykrywania u ludzi nosicielstwa przecinkowca cholery [15, 23]. *V. cholerae* są w Polsce bardzo rzadko wykrywane, między innymi dlatego, że nie wyrastają na podłożach bakteriologicznych

Tabela I

Uproszczony schemat różnicowania w badaniach rutynowych Gram-ujemnych pałeczek izolowanych z materiału klinicznego i pochodzących ze środowiska

Rodzina	Glukoza			Oksydaza
	Utlenianie	Fermentacja gaz –	Fermentacja gaz +	
<i>Vibrionaceae</i> – bakterie wodne	+	+	–	+*
<i>Enterobacteriaceae</i> – bakterie-pałeczki jelitowe	+	+	+/-	–
<i>Aeromonadaceae</i> – bakterie wodne, wytwarzające gaz	+	+	+	+
<i>Pseudomonadaceae</i> – bakterie wodno-ziemne	+	–	–	+

* wyjątek *V. metschnikovii* nie wytwarza enzymu oksydazy cytochromowej (ściślej: indofenolowej).

stosowanych do posiewu próbek kału w rutynowych badaniach chorób biegunkowych: SS i SF.

Diagnostyka laboratoryjna cholery ulegała zmianom na skutek obserwacji epidemiologicznych np. VII pandemii cholery. Od początku XX wieku, na podstawie właściwości fenotypowych wyróżniano 2 biotypy. *V. cholerae*: klasyczny, chorobotwórczy czynnik etiologiczny sześciu pandemii cholery, występujący endemicznie w Indiach, opisany przez R. Kocha. *V. cholerae* El Tor, wykryty w 1906 r. w stacji kwarantannowej El Tor na półwyspie arabskim u zdrowego pielgrzyma do Mekki i uważany za odmianę nie wywołującą cholery. W 1961 r. okazało się, że odmiana El Tor pochodząca z Indonezji, *V. cholerae* O1 Inaba, stała się czynnikiem VII pandemii cholery [1]. Od odmiany klasycznej różniła się niektórymi właściwościami wykorzystywanymi w biochemicznym różnicowaniu szczepów np.: zdolnością do tworzenia acetylmetylkarbinolu (odczyn VP+), hemolizyny, a również opornością na polimiksynę B (Tabela II). Oporność związana była z odmienną budową ściany komórkowej i błony cytoplazmatycznej, jak stwierdził Noworyta [16]. Na modelach doświadczalnych udowodniono, że nabyła ona zdolność do produkcji toksyny cholerycznej CT, a powstała prawdopodobnie ze szczepów pochodzących ze środowiska wodnego [10]. Aktualnie przyjmuje się, że obie odmiany mogą wywołać zachorowania o ciężkim przebiegu, jednak zachorowania o lekkim przebiegu, lub zakażenia bezobjawowe, znacznie częściej występują przy zakażeniu *V. cholerae* El Tor [2].

VII pandemia cholery narodziła się na wyspie Sulawesi (Indonezja), a nie jak sześć poprzednich w delcie

Tabela II

Wybrane cechy różnicujące odmiany biochemiczne *V. cholerae*

Właściwość	<i>Vibrio cholerae</i> O1 – odmiana:	
	klasyczna	El Tor
Hemoliza krwinek baranich	–	d
Odczyn Voges-Proskauera	–	+
Wrażliwość na polimiksynę	S	R

Objaśnienia: d – reakcje różne S – wrażliwy R – oporny

Gangesu. W 1961 r. zachorowania pojawiły się w Azji, w 1971 r. w Afryce i w Europie, aby w latach 1991 dotrzeć do Peru i krajów Ameryki Łacińskiej. Aktualne badania genetyczne szczepów, nie dają jednoznacznej odpowiedzi skąd pochodziły szczepy występujące w Peru [12]. Istnieją podstawy do przypuszczenia, że z Afryki, co nie przeczy hipotezie, że być może przecinkowce cholery zostały przetransportowane z wodą balastową pobieraną przez statki powracające po wyładowaniu obciążenia w związku z wojną w Zatoce Perskiej (ustna informacja nie opublikowana).

3. Toksyny wytwarzane przez *V. cholerae*

Dopiero w 1953 r. rozszyfrowano tajemnicę wywoływania objawów cholery przez *V. cholerae*. W badaniach laboratoryjnych stosowano różne testy i modele biologiczne [23]. Najbardziej przydatnym okazał się test na gromadzenie się płynu w podwiązany odcinek wyosobnionej przy życiowo pętli jelita cienkiego królika. Wykazano, że płyn po hodowli *V. cholerae* podany do jelita powoduje gromadzenie się w nim płynu i elektrolitów. Wykazano więc obecność i działanie czynnika toksycznego powodującego objawy cholery. Określono go mianem enterotoksyny, nazywano także cholergenem. Wykazano, że toksyna choleryczna (CT) jest wytwarzana przez szczepy *V. cholerae* należące do grupy O1, izolowane od chorych, natomiast nie wytwarzały jej niektóre szczepy grupy O1 izolowane ze środowiska. Chociaż rzadko, ale pojawiały się szczepy przecinkowców cholery non-O1 i non-O139 produkujące toksynę cholery i wywołujące u ludzi sporadycznie występujące zachorowania cholero-podobne.

Metodami molekularnymi wykazano, że toksyna cholery (CT) należy do toksyn AB, składa się z jednej podjednostki A i trzech podjednostek B. Przyjmuje się, że podjednostki B po związaniu się (2 lub więcej) z receptorami komórek nabłonka jelita cienkiego powodują, że prawdopodobnie cała cząsteczka toksyny CT ulega endocytozie i (podobnie jak ciepło-chwiejna enterotoksyna *E. coli* LT oraz toksyna Shiga) jest

transportowana w endosomach do aparatu Golgiego i do retikulum endoplazmatycznego ER, gdzie podjednostka A zostaje uwolniona do cytozolu lub według innej hipotezy, jest odpowiednio wyeksponowana, tak że może zająć reakcja enzymatyczna. Efekt działania zależy od przetransportowania toksyny z aparatu Golgiego do ER.

Podjednostka A działa wewnątrz komórki nabłonka jelit i zaburza kaskadę sygnałów przenoszonych przez białko G. W warunkach fizjologicznych białko GDP, które po przyłączeniu fosforu (fosforylowaniu) staje się aktywne jako GTP, tworzy aktywny kompleks z cyklazą adenylową – enzymem, który przekształca ATP w przekąźnikowy c-AMP (cykliczny adenozylo mono-fosforan). Podjednostka A toksyny CT, (CTA) jest ADP-rybozylazą, która katalizuje rybozylację białka G. Traci ono aktywność GTP-azy, przez co enzym cyklaza adenylowa wykazuje przetrwałą aktywację i nieustannie wpływa na syntezę c-AMP. W efekcie działania c-AMP następuje aktywne wydzielanie elektrolitów i wody z organizmu do światła jelita cienkiego, określane jako „odwrócenie działania pompy wodnej”.

Wyniki badań molekularnych wyjaśniły przebieg reakcji w komórce nabłonka jelita. Wykazano, że aktywacja c-AMP – zależnej kinazy białkowej fosforylującej białka powoduje zaburzenia w wydzielaniu jonów tzn. wzrost poziomu wydzielania jonów Cl^- oraz brak absorpcji jonów Na^+ i Cl^- . Wysoki poziom jonów wydanych do światła jelita wywołuje przez osmozę gromadzenie się wody wewnątrz jelita i jej ewakuację na zewnątrz w postaci obfitej wodnistej biegunki. Kliniczne objawy cholery spowodowane są odwodnieniem – utratą nawet 1–2 litrów płynów na godzinę, zaburzeniami elektrolitowymi, skąpomoczem, skurczami mięśni, zapaścią krążenia i śmiercią. Uzupełnienie płynów i elektrolitów przez podanie doustnie ORL, czasem drogą dożylną, jest działaniem ratującym życie. Ilość niezbędna może sięgać 24 litrów płynów na dobę, przez kilka dni. Podanie antybiotyku – tetracykliny, skraca okres niezbędnego nawadniania przez hamowanie produkcji enterotoksyny przez mnożące się komórki przecinkowca cholery [2].

W wyniku badań na modelach biologicznych wykryto działanie również innych substancji toksycznych wytwarzanych przez *V. cholerae*. Należy do nich neuraminidaza, która wykazuje działanie pomocnicze w procesie patogenezy cholery: zwiększa miejsce dostępności receptorów GM1 dla toksyny cholery poprzez przekształcanie gangliozydów o wyższych numerach w GM1.

Kompleks LPS – lipidowo-białkowo-cukrowy działa toksycznie przy dootrzewnowym podaniu np. myszom. Może powodować objawy uogólnionego szoku septycznego, utratę wagi, ale nie klasyczne objawy cholery.

Poznano już wyposażenie genetyczne szczepu pandemicznego *V. cholerae* EL Tor O1 Inaba i rozpoznano geny, których obecność warunkuje wytwarzanie czynników wirulencji, które w większości zablokowane są w tzw. „kasecie wirulencji”, lub tzw. wyspie VP1 ograniczonej przez elementy RS1 umożliwiające przeniesienie tego odcinka. W obrębie „kasety wirulencji” zidentyfikowano co najmniej 4 geny kodujące elementy odpowiedzialne za zjadliwość szczepu pandemicznego:

1. *ctx AB* – kodujące toksynę cholery CT; podjednostki A i B.
2. *zot* – toksynę ZOT (zonula occludens toxin) zamykającą przestrzeń międzykomórkową i zwiększającą przepuszczalność jelita cienkiego
3. *ace* – toksynę pomocniczą (accessory cholera toxin) powodującą akumulację płynu w jelicie
4. *cep* – fimbrie ułatwiające kolonizację jelita cienkiego

Udowodniono, że fimbrie TCP odgrywają kluczową rolę w kolonizacji jelita cienkiego i są receptorami dla bakteriofaga CTX ϕ , zwanego cholerafagiem, przenoszącego kasetę wirulencji pomiędzy komórkami bakteryjnymi rodzaju *Vibrio* [7]. Ostatnio stwierdzono także możliwość transferu „kasety wirulencji” za pośrednictwem innego vibriofaga tzw. „493” faga wykorzystującego jako receptory MSHA-pili, tj. pili mannozo-wrażliwej hemaglutynacji kodujące czynniki wirulencji w większości zablokowane są w tzw. „kasecie wirulencji”, lub wyspie VP1. Jest to fragment chromosomu ograniczony przez elementy RS1 umożliwiające przeniesienie tego odcinka. Istnieją mechanizmy zmian długo- i krótko-terminowych dokonujących się w pandemicznych klonach [4].

Są to wyniki badań prowadzonych w warunkach laboratoryjnych, na wybranych szczepach *V. cholerae*, przy użyciu modeli zwierzęcych i hodowli linii komórkowych. Badani wskazują również na elementy w komórce *V. cholerae*, które regulują na ekspresję genów w zależności od warunków środowiska [11]. Wyniki modelowych badań laboratoryjnych tłumaczą przebieg procesu patogenetycznego oraz powstawanie szczepów zjadliwych.

4. *V. cholerae* non-O1

Wprawdzie czynnikiem etiologicznym pandemii cholery były *V. cholerae* O1, ale w piśmiennictwie coraz częściej pojawiają się doniesienia o szczepach *V. cholerae* non-O1, lub „non cholera” *Vibrio*, które izolowano od chorych lub ze środowiska [3]. Istnieją sugestie, że nie tworzące toksyny CT szczepy *V. cholerae* non-O1 ze środowiska mogą taką zdolność uzyskać i stać się szczepami pandemicznymi [10]. Stąd, gdy na półwyspie indyjskim pojawiła się nowa, epi-

demiczna odmiana *V. cholerae* oznaczono ją w 1992 r. jako O 139 i uznano, że być może stać się ewentualnym czynnikiem VIII pandemii, nie rozpoznawanym z powodu braku surowic diagnostycznych [18]. Stwierdzono, że zachorowania spowodowane przez odmiany antygenowe *V. cholerae* non-O1, pojawiają się również w Europie [21], a również w Polsce [26].

Pierwsze duże ognisko zachorowań z objawami zatrucia pokarmowego wywołane przez *V. cholerae* non-O1 wystąpiło na Słowacji (w okolicy Koszyc) u osób korzystających ze stołówki i stało się powodem badań epidemiologicznych. Szczepy *V. cholerae* non-O1 sporadycznie izolowano od chorych zakażonych nimi również w Polsce. Np. w Płocku izolowano z żółci z wyciętego w szpitalu zapalnego pęcherzyka żółciowego, w Gdańsku z zakażenia przyrannego, w Warszawie z krwi pacjenta zmarłego, z objawami septycznej hemolizy, a zakażonego w jeziorze Czerniakowskim [26]. Importowany nietypowy szczep izolowano od chorej z objawami cholery po powrocie z Indii. Okazjonalnie stwierdzano szczepy *V. cholerae* non-O1 w wodach naturalnych, a pojawienie się *V. cholerae* non-O1 w rzece Bug w okresie upałów letnich i zgłoszonych zachorowań na cholere na Ukrainie [25] zaowocowało cyklem badań dotyczących ich potencjalnej chorobotwórczości dla człowieka i ew. spowodowania zagrożenia epidemicznego dla ludzi [19, 20].

Vibrio cholerae non-O1 najczęściej mają właściwości podobne do odmiany biochemicznej El Tor, rosną przy niewielkim stężeniu Na Cl 0,5%, i są odporne na sole żółci. U szczepów *V. cholerae*, non-O1, non O-139, izolowanych od osób chorych z objawami cholery, wykrywano obecność kasety wirulencji i zdolność do wytwarzania toksyny CT, a niekiedy jeszcze innych toksyn np. 1) ciepłochwiejnej toksyny Shiga-like, 2) toksyny ST – ciepłostajęcej toksyny o 50% homologii z ST *E. coli*, (stwierdzono jej obecność u 41% szczepów izolowanych z granicznego odcinka rzeki Bug [20], 3) hemolizyny/cytolizyny-, bezpośredniej ciepłostajęcej hemolizyny (hemolizyna Kanagawy = TDH). Szczepy *V. cholerae* non-O1 należy uważać za szczepy z utajoną zdolnością do wywoływania zachorowań również epidemicznych [19]. Zachorowanie ludzi na cholere mogłoby wystąpić jeżeli szczep uzyska genetyczną „wyspę wirulencji”, która może być przekazywana horyzontalnie, np. drogą konjugacji pomiędzy szczepami bytującymi w środowisku naturalnym [4]. Istnieje hipoteza, aktualnie sprawdzana laboratoryjnie, że tą reakcję wspomaga obecność w wodzie chityny z pancerzyków drobnych skorupiaków planktonu z wodnego [13] i że znaczne rozmnożenie się planktonu na skutek korzystnych zmian ekologicznych może wpływać na pojawianie się odmian epidemicznych przecinkowców cholery (np. spłynięcie ścieków ko-

munalnych bogatych w substancje odżywcze i florę jelitową do zbiorników wód naturalnych). Obecność bakteriofagów litycznych, które z jednej strony obniżają liczebność komórek bakteryjnych, z drugiej przyczyniają się do powstania szczepów opornych na lityczne działanie bakteriofaga może wpływać na przetrwanie szczepów *V. cholerae* w naturalnym środowisku wodnym [30].

Hipoteza, że zjadliwe szczepy *V. cholerae* wydalane przez chorego człowieka posiadają taki zapas substancji odżywczej w postaci glikogenu, który umożliwia im przetrwanie w środowisku i ponowne zakażenie człowieka jest badana laboratoryjnie [1]. R. Colwell, stwierdza, że w niekorzystnych warunkach w środowisku szczepy bakteryjne, a więc i zjadliwe szczepy *V. cholerae*, mogą stosunkowo długo pozostawać żywe bez przejawiania aktywności (jakby w „hibernacji”) i wymagają czasu zanim w odpowiednich warunkach uda się je „ożywić”. Takim stanie poszukiwane bakterie mogą być niewykrywalne w rutynowych badaniach.

5. Pochodzenie epidemicznych szczepów *V. cholerae*

Na temat jak w warunkach naturalnych, w środowisku wodnym powstają szczepy epidemiczne istnieje szereg hipotez opartych o wyniki badań prowadzonych w warunkach laboratoryjnych. Podobnie badane są warunki niezbędne dla zakażenia jelita człowieka i dla wywołania procesu patogenetycznego powodującego objawy cholery. Badania prowadzone na oseskach mysich wykazały, że pewien wpływ blokujący aktywność chorobotwórczą *V. cholerae* może wywierać towarzysząca im flora jelitowa [6].

W patogenezie cholery odgrywa rolę naturalna oporność przecinkowca na zasadowy odczyn środowiska (do pH 9,0) włączanie oraz naturalna oporność przecinkowca cholery na sole żółci nawet w znacznym stężeniu. Oraz bardzo krótki czas pomiędzy podziałami komórki bakteryjnej jest czynnikiem, ułatwiającym zasiedlenie przez jelita cienkiego (zwykle wyjąławanego przez żółć) i szybkie rozmnożenie w nim przecinkowców.

V. cholerae jest drobnoustrojem wodnym, który występuje również i w Polsce. Jak cały ekosystem środowiska wodnego podlega presjom m.in. klimatycznym Ocieplenie się klimatu i zasolenie rzek może wpływać na pojawienie się warunków korzystniejszych dla rozmnażania się przecinkowców w tym *V. cholerae* w różnych zbiornikach wodnych [31]. Czy i jak może się to wiązać ze wzrostem odmian wyposażonych w czynniki zjadliwości? Na czym polegają zmiany i jak przebiegają nadal niewiele wiemy.

Cholera nadal stanowi znaczne obciążenie w wymiarze światowym ponieważ zachorowania na nią nadal szerzą się epidemicznie wśród ludności w wielu ubogich regionach Afryki, Azji i Ameryki Południowej. Najwyższa śmiertelność pojawia się w okresach klęsk naturalnych, wojen i niepokojów społecznych. Zachorowania są też zawlekane do krajów rozwiniętych przez turystów, emigrantów i uciekinierów, niekiedy zakażenie bywa zawlekane z importowaną żywnością (do USA z mleczkiem kokosowym). Toteż badania dotyczące ewentualnego pojawiania się potencjalnie chorobotwórczych odmian *V. cholerae*, leczenia chorych i sposobów ochrony ludności przed zachorowaniem są nadal aktualne.

6. Podsumowanie

Chociaż w Polsce problem cholery jest nadal marginalnym, w 2005 r. zgłoszono i potwierdzono rozpoznanie jednego zachorowania importowanego z Indii, to we Francji w latach 1973 do 2005 zarejestrowano 129 zachorowań importowanych, około 3,9 średnio rocznie, głównie rozpoznawanych w szpitalach prowincjonalnych, nie akademickich [28].

Problemem opanowania epidemii cholery, zapobiegania powstawaniu szczepów epidemicznych nadal zajmuje badaczy w różnych placówkach na świecie pracujących w ramach wspólnych projektów badawczych krajów rozwiniętych CDC w Atlancie, i krajów rozwijających się (Instytut Cholery w Kalkucie w Indiach i ICDDR w Dhaka w Bangladeszu). Do badań włączyły się również Japonia i Chiny. Jak w to upamiętniono na tablicy w ICCDR” wierząc, że rozwiązanie problemu cholery w krajach rozwijających się leży w zasięgu ludzkich możliwości

Pismienictwo

- Bourassa L., Camilli A.: Glycogen Contributes to the Environmental Persistence and Transmission of *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* **72**(1), 124–138 (2009)
- Cholera. (w) The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, red. M.H. Beers, wyd. Merck Research Laboratories, Whitehouse Station, N.J., 2006, s. 1459
- Cholera and other Vibrios (w) Control of Communicable Diseases Manual, red. D.L. Heymann, wyd. 18, American Public Health Association, 2004, s. 103
- Chun J., Grim C.J., Hassan N.A., Lee J.H., Choi S.Y., Haley B.J. i wsp.: Comparative genomics reveals mechanism for short-term and long-term clonal transition in pandemic *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 15442–15447. (2009)
- Czerwiński M.: Szczepionka przeciwko cholercie (w) Wakcynologia, red W. Magdzik, D. Naruszewicz-Lesiuk, A. Zieliński, wyd. II poszerzone, alfa-medica press, Bielsko-Biała, 2007, s. 342
- Faping D., March J.C.: Engineered bacterial communication prevents *Vibrio cholerae* virulence in an infant mouse model. <http://www.pnas.org/content/107/25/11260>, abstract (2010)
- Faruque S.M., Tam T.C., Chowdhury N., Dirapha P., Dzeiman M., Heidelberg J.F. i wsp.: Genomic analysis of the Mozambique strain of *Vibrio cholerae* O1 reveals the origin of El Tor strains carrying classicalCTX prophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 5151–5156 (2007)
- Haley B.J., Colwell R.R. i wsp.: Comparative genomic analysis reveals evidence of two novel *Vibrio* species closely related to *V. cholerae*. *BMC Microbiol.* **10**, 154 (2010)
- Howard-Jones N.: Robert Koch and the cholera vibrio, a centenary. *BMJ*, **288**, 379 (1984)
- Karaolis D.K., Lan R., Reeves R.R.: The sixth and seventh cholera pandemics are due to independent clones separately derived from environmental, nontoxigenic, non-O1 *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **177**, 3191–3198 (1995)
- Kovacikova G., Lin W., Skorupski K.: The LysR-type virulence activator AphB regulates the expression of genes in *Vibrio cholerae* in response to low pH and anaerobiosis. *J. Bacteriol.* (on line) (2010) Jun 18, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20562308> (14 lipca 2010)
- Lam C., Octavia S., Reeves P., Wang L., Lan R.: Evolution of Seventh Cholera Pandemic and Origin of 1991 Pandemic Latin America. *Emerg. Infect. Dis.* **16**, 1130 (2010)
- Marvig R.L., Blokesch M.: Natural transformation of *Vibrio cholerae* as a tool-Optimizing the procedure. *BMC Microbiology*, **10**, 155 28.05.2010, <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/10/155> (23.06.2010)
- Naruszewicz-Lesiuk D.: Cholera (w) Choroby zakaźne i ich zwalczanie na ziemiach polskich w XX wieku, red. J. Kustrzewski, W. Magdzik, D. Naruszewicz-Lesiuk, Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa, s. 166–172 (2001)
- Naruszewicz-Lesiuk D.: Cholera. (w) Choroby zakaźne i pasożytnicze-epidemiologia i profilaktyka, red. W. Magdzik, D. Naruszewicz-Lesiuk, A. Zieliński A., wyd. 6, alfa-medica press, Bielsko-Biała, 2007, s. 58.
- Noworyta J.: Próba wyjaśnienia przyczyn różnic we wrażliwości na polimiksynę E przecinkowców cholery biotypów klasycznego i El Tor. Rozprawa doktorska (maszynopis powielony) PZH, Warszawa 1977
- Okolska M.: O tak zwanej epidemii cholery w Baranowiczach w roku 1922, wraz z uwagami o badaniach na nosicielstwo. *Med. Dośw. Społ.* **1**, 353–359 (1923)
- Pancer K., Stypułkowska-Misiurewicz H. *Vibrio cholerae* O139 Bengal etiologiczny czynnik VIII pandemii cholery. *Post. Mikrobiol.* **35**, 67–78 (1966)
- Pancer K.: Wybrane właściwości taksonomiczne i biologiczne szczepów *Vibrio cholerae* non-O1 izolowanych z próbek wody z rzeki Bug, rozprawa doktorska (maszynopis powielony), Państwowy Zakład Higieny, Warszawa 2000
- Pancer K., Stypułkowska-Misiurewicz H., Jarząbek Z.: Ocena cytotoksycznej aktywności filtratów hodowli *Vibrio cholerae* non-O1 na ciągłe i diploidalne linie komórkowe. *Med. Doś. Mikrobiol.* **52**, 139–150 (2000)
- Rozemeijer W., Korswagen L.A., Voskuyl A.E., Budding A.E.: *Vibrio cholerae* non-O1 non-O139 infection in an immunocompromised patient returning from Spain, July 2009. *Eurosurveillance*, **14**, 492–493 (2009)
- Seas C., Gottuzo E.: *Vibrio*. (w) Mandell, Douglas, Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, red. G.D Mandell, J.E. Bennett, R. Dolin, wyd. 6, Elsevier, Churchill Livingstone, 2005, s. 2536

23. Stypułkowska-Misiurewicz H.: Postęp w badaniach nad przecinkowcem cholery (*Vibrio cholerae*) *Post. Mikrobiol.* **12**, 29–53 (1973)
24. Stypułkowska-Misiurewicz H., Gardocka H., Siczka Z.: Szczep *Vibrio cholerae* oporny na vibriostatyczny czynnik O/129 izolowany od chorego na cholere w Polsce. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **46**, 313–321 (1994)
25. Stypułkowska-Misiurewicz H., Stasiak J., Janczyk M., Tomaszewska E., Pancer K.: Przecinkowce cholery (*Vibrio cholerae*) non-O1 izolowane zwody rzeki Bug. *Przeg. Epid.* **49**, 237–243 (1995)
26. Stypułkowska-Misiurewicz H., Pancer K., Roszkowiak A.: Two unrelated cases of septicaemia due to *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 in Poland, July and August 2006. *Euro. Surveill.* **11**(48): pii = 3088 (2006)
27. Stypułkowska-Misiurewicz H.: Choroby wywołane przez *Vibrio cholerae* i inne gatunki *Vibrio* (w) Choroby zakaźne i pasożytnicze, red. J. Cianciara, J. Juszczak, Wydawnictwo Czelej Sp. z o.o., Lublin, 2007, s. 686
28. Tarantola A, Ioos S., Rotureau B., Paquet Ch., Quilici M.-L., Fournier J.-M.: Le cholera importe en France metropolitaine de 1973 a 2005. *BEH*, nr 34, 2978 (2007)
29. Trotter W.: Collected Papers of Wilfried Trotter, Oxford University Press. London 1941, wg W.L.B. Beveridge: Sztuka Badań Naukowych, PZWL, Warszawa, 1960, s. 64
30. Wei Y., Ocampo P., Levin B.R.: An experimental study of the population and evolutionary dynamics of *Vibrio cholerae* 01 and bacteriophage JSF4. *Proc. Biol. Sci.* 2010 Jun 10, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20538647> (14 lipca 2010 r.)
31. Wilson N., Lush D., Baker MG.: Meteorological and climate change themes at the 2010 International Conference on emerging Infectious Diseases. *Euro Surveill.* 2010; **15**(30): pii = 19627. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19627> (2010-08-10)
32. Załęska H., Stypułkowska-Misiurewicz H., Noworyta J.: Modyfikacja suchego podłoża TCBS do diagnostyki cholery. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **27**, 25–29 (1975)