

Některé znaky cholerového onemocnění

Prof. MUDr. DrSc. FRANTIŠEK PATOČKA

člen korespondent ČSAV

Doc. MUDr. CSc. CTIRAD JOHN

Ústav pro lékařskou mikrobiologii a imunologii FVL UK
Praha

Cholera, podobně jako mor, je bakteriální infekcí katastrofického charakteru. Decimovala lidstvo od nepaměti v rozsáhlých epidemiích až pandemiích. Postihovala sociálně slabé společenské vrstvy, chudinu. Protože nemoc kosila lidi za několik hodin po prvních příznacích, byla považována za zásah boží.

I když je dnes známa epidemiologie cholery a nemoc se úspěšně léčí, řada laboratoří dosud velmi intenzivně studuje její patogenезi, imunogenезi a možnosti aktivní imunizace. Cholera zůstává obtížným problémem. Zatím co u moru jsou rezervoárem infekce hlodavci, žijící v přírodních ohniscích nákazy, a civilizačními zásahy lze přenos infekce omezit, je cholera onemocněním přenosným pouze mezilidským kontaktem (i když zprostředkovaným). Cholerové vibrio je mikrob velmi plastický. Jednotlivé kmeny se od sebe liší virulencí. Rozdílnost ve virulenci umožňuje rozvoj mírných netypických forem nemoci a její obtížně kontrolovatelné šíření.

Šíření cholery

Asijská cholera má svoji pravlast v deltě řeky Gangy v Indii a Brahmaputry v Pákistánu. Je pravděpodobné, že podobné ložisko bylo i v Číně kolem řeky Jang-c'ťiang. Z ložisek se choroba šířila v epidemiích do Evropy. Prvně byly evropské kraje ohroženy v r. 1823, kdy se cholera dostala přes Írán a Kaspické moře na hranice evropského Ruska. V r. 1829 překročila hranice Evropy a během r. 1830 se šířila několika směry v evropském Rusku. Přes Atlantický oceán byla zanesena do Spojených států a způsobila zde epidemie v letech 1832 až 1835, 1848–1850, 1854, 1865–1867 a 1873. Cholerové vibrio izoloval Robert Koch v Indii v roce 1883. Prvé studie o patogenезi a imunogenезi choroby vykonali též Evropané (Sanarelli a Pfeiffer). V průběhu prvé světové války se nemoc objevila i v zajateckých táborech v našich krajích. Od začátku 19. století do dob prvé světové války bylo lidstvo ohroženo celkem šesti choleroými pandemiemi.

Před druhou světovou válkou se cholera začala hojněji objevovat v Indonésii, kde vzniklo nové ohnisko. Z něho se po r. 1960 šířila na sever na Filipiny a na Hongkong. Toto rozšíření je začátkem sedmé pandemie, která na severu zasáhla do Koreje, projevila se epidemiemi v 15 indických státech (1964) a Pákistánu, zasáhla do Afghánistánu, Íránu (1965), Iráku, Uzbecké SSR (1966), Sýrie a dále až po okraj Turecka a Egypta. V r. 1970 se objevilo několik případů na našem území. Původce cholerového onemocnění, které se před 2. světovou válkou objevilo na Celebesu a šířilo se v epidemiích probíhajících po r. 1960, je novým biotypem

vibria. I během epidemie vyvolané tímto novým biotypem bylo onemocnění postihující obyvatelstvo Západního Pákistánu vyvoláno klasickým biotypem druhu *Vibrio cholerae*.

Studiu šíření cholery se dnes věnují odborníci, kteří ve spolupráci s epidemiology Světové zdravotnické organizace vypracovali konkrétní program „epidemiologické bdělosti“ nad choleroým onemocněním. Plněním programu „bdělosti“ lze zastavit epidemii v jejím rozběhu a zamezit přenesení původce do vzdálených krajů.

Onemocnění

Mírné formy cholery, které jsou časté především v poslední pandemii, napodobují běžnou střevní infekci. Onemocnění může trvat jeden či několik dnů, pacient není oslaben, nemusí se uchýlit na lůžko. Z epidemiologického hlediska jsou mírná onemocnění nejzákladnější. Jsou krátkodobým zdrojem nekontrolovatelného přenosu nákazy.

Pojmem „asijská cholera“ rozumíme příležitostné vystupňování souboru příznaků cholery. Každá mírná forma může přejít v „cholera asijskou“. Prudké cholerové stadium však může vypuknout i najednou po bezpříznakové inkubační době, která se u cholery odhaduje na několik dnů. Dostaví se zvracení, průjem je nepřetržitý, stolice se mění v typickou tekutinu podobnou rýžovému odvaru. Vzácně je k tekutině přimísen i hlen a krev. Pacient při stálých ztrátách tekutiny a minerálních složek ochabne, klesá mu tělesná teplota, má blízko ke kolapsu. Během několika hodin kůže ztrácí turgor, svažuje se, oči jsou vpádlé, rty, jazyk i konečky prstů jsou cyanotické. Dehydratace vyvolává bolestivé křeče v lýtkovém a břišním svalstvu. Puls nemocného je rychlý, obtížně hmatný, krevní tlak klesá. Pacient přestane vyměšovat moč, v krvi je výrazná acidóza. Trvá-li toto stadium algidum dlouho, pacient umírá. Dokud nebyla známa léčba, umíralo v algidním stadiu 70 % nemocných. Dnes lze prakticky zachránit každého, pokud kolaps není příliš hluboký. Pacient se vrací do života bez známek postinfekčních komplikací. Celá symptomatologie algidního stadia cholery je dána ztrátou vody a minerálních složek z krevní plazmy, aniž by byl zasažen některý z orgánů důležitých pro život.

Původce cholery

Původcem asijské cholery je lehce zakřivená gramnegativní tyčinka (vibrio), velmi čile se pohybující za pomoci jediného bičíku. Růstově je velmi nenáročná, citlivá na nízké pH a rezistentní na pH alkalické. Její nenáročnosti na živiny a tolerance k alkáliím se využívá při selektivních kultivačních postupech. V povrchových kontaminovaných vodách vibrio přežívá nejdéle 2 dny, v čistých vodách týden i déle, na kontaminovaných plodech 1–3 dny, na čerstvé zelenině týden. Relativně déle se vibria udrží v mořské vodě a mléce. Přenos cholery potravinami je tedy možný, není to však hlavní cesta přenosu.

Pro identifikaci zachyceného vibria je významné určení jeho tělových antigenů. Všechny kmeny cholerového vibria mají společný skupinový tělový antigen A. Vedle něho má sérotyp Ogawa typově specifický antigen B (formule AB), sérotyp Inaba C (formule AC). Byly popisovány i sérotypy o antigenní tělové formuli ABC (Hikojima). V přírodě se vyskytují i slanomilná vibria, z nichž některá jsou komensály mořských ryb. Tato parahemolytická vibria vyvolávají u člověka střevní onemocnění, která mohou být podobná gastroenterální formě cholery.

Poslední (sedmá) pandemie cholery byla vyvolána vibriem, které se v některých znacích liší od původce klasické asijské cholery. Toto vibrio se nazývá *El Tor*, jméno mu bylo dáno před 2. světovou válkou na Celebesu. Vyvolává enteritidu, často i nosičský stav. Algidní stadium se vyvine u onemocnění jím vyvolaných jen v jednom z deseti, někdy pouze ze sta případů. Vibrio *El Tor* není zvláštním druhem cholerového vibria, ale je odlišným biotypem, fixovanou variantou druhu

Cholera nikdy nepropukne sama od sebe; žádný zdravý člověk nemůže být napaden cholero, nepozře-li kommbacila, a tento zárodek se zase může vyvinout jen ze sobě podobných – nemůže být zplozen něčím jiným ani vyroben z ničeho. A může růst jen v lidských vnitřnostech anebo ve velmi znečištěné vodě.

ROBERT KOCH

Vibrio cholerae. S klasickým vibriem má stejnou antigenicitu. Je velmi rezistentní k nepříznivým vlivům vnějšího prostředí a necitlivé na fága, k němuž je vnímavé klasické cholerné vibrio.

Cholerný toxin

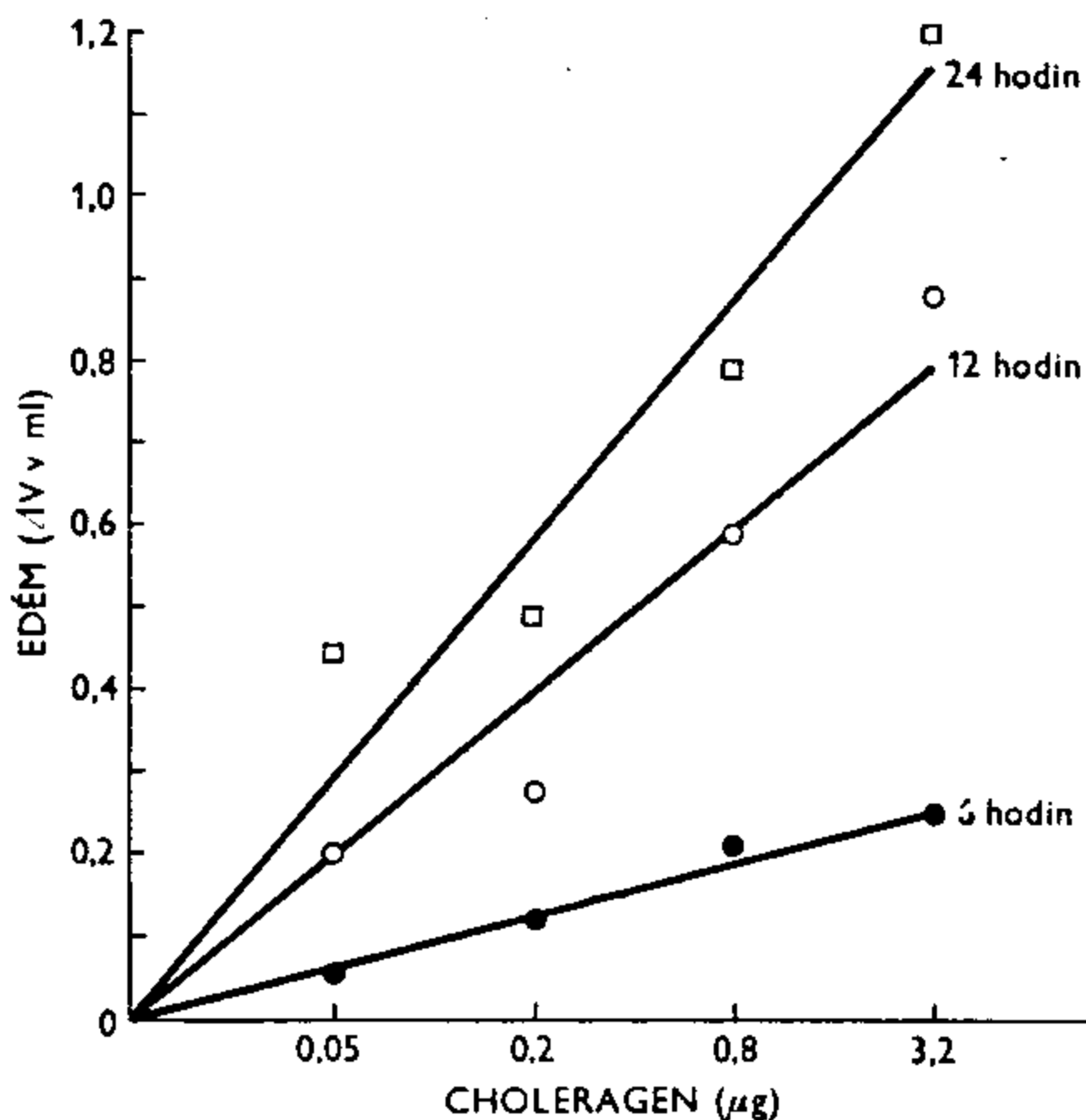
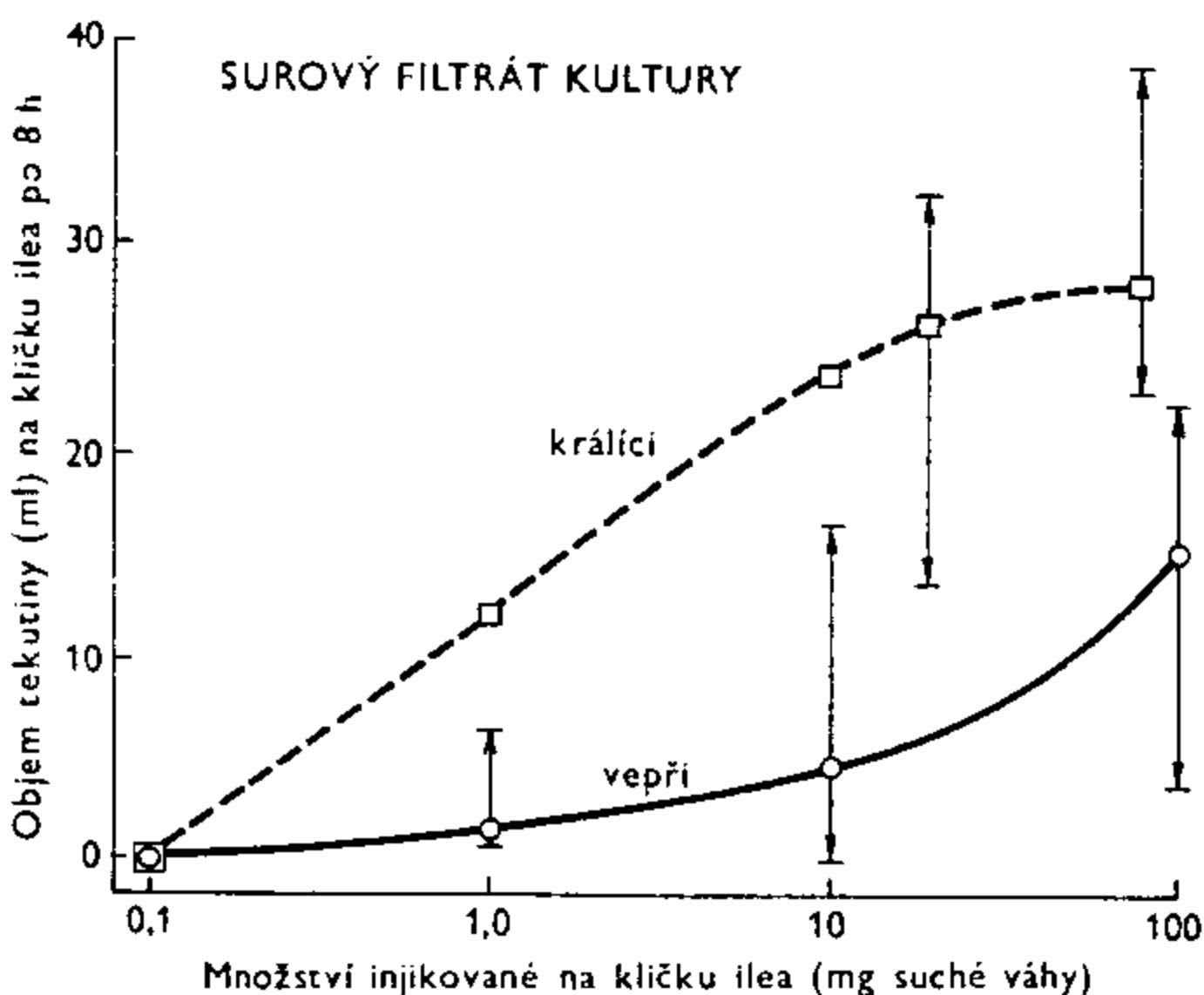
Rada autorů se již dávno snažila vyložit klinický obraz cholery účinkem specifického toxinu. Předpokládaná toxická látka však dlouho nebyla purifikována a její účinek nebyl vyjasněn. Až v posledních letech bylo prokázáno (Felsenfeld, Finkelstein, Craig, Carpenter, Burrows), že *Vibrio cholerae* obou typů tvoří toxickou bakteriální bílkovinu (exotoxin), která vyvolává funkční změny střevního epitelu. Důsledkem je hyperexkrece tekutiny izotonické s krevní plazmou do střevního lumen. Cholerný exoenterotoxin byl dříve nazýván cholerný toxin 2 (jako cholerný toxin 1 byl označován endotoxin), dnes je nazýván cholerný gen. Tento název mu byl dán Finkelsteinem a spolupracovníky (1964), kteří jej prvně izolovali z filtrátů vibriových kultur.

Patofyziologický účinek exoenterotoxinu (cholerný gen) není zcela objasněn. V pokusech na citlivém zvířeti, jímž je pro cholerný králiček, se nepodařilo ani elektronopticky prokázat podstatné změny na střevním epitelu po působení cholerný genu. Pozorované změny byly pouze druhotného rázu a byly vyvolány vylučováním velkého množství tekutiny do střeva. Většina autorů se shoduje v názoru, že velké ztráty tekutiny střevem jsou podmíněny nefyziologicky zvýšeným vylučováním tekutiny do střeva, ne tedy nedostatečnou absorpcí střevem. Není zcela vyjasněno, zda exoenterotoxin působí pouze po lokální aplikaci na střevní sliznici, či též při parenterálním podání. Některé pokusy ukázaly, že u králičete je toxin účinný i při nitrožilním zavedení.

Pro studium patogeneze cholery se používá králičích mláďat. Prvně jich užil Mečnikov, po něm Sanarelli. Podáním cholerných vibrií do žaludku mláďat lze vyvolat onemocnění velmi podobné cholere. Ve Finkelsteinově laboratoři bylo králičete využito pro studium toxického filtrátu bujónových kultur cholerného vibria. Za několik hodin po ingesci filtrátu se dostavil trvalý průjem, který vedl k dehydrataci a k uhynutí v kolapsu. Symptomatologie naprosto odpovídala algidnímu stadiu lidské cholery.

Účinek cholerného exoenterotoxinu se studuje i na dospělém králičku na podvázané kličce ilea (De a Chatterje, Burrows). Po paracentéze se vyjme tenké střevo a dvojitým podvázáním se na něm vytvoří několik slepých vaků. Při podvázání nesmí být

1 Účinek surového filtrátu kultury vibrio cholerae na kličku ilea králičků a vepřů (miniaturní kmen). Klička vepře je mnohem méně citlivá na exoenterotoxin než klička králička. (Podle Hecklyho, Wolochowa a Christiansena, 1969)



2 Vztah mezi dávkou cholerný genu velikostí edému ve vybraných časových intervalech po vstříknutí toxinu. Obrázek shrnuje pokusy provedené na tlapkách krys. (Podle Finkelsteina, Jehla a Gotha, 1969)

porušena mesenterická céva. Do vzniklých vaků se vstříkne exoenterotoxin, popřípadě kultura vibrií. Střevo se vsune zpět do peritonea a břišní dutina se zašije. Králiček se za 24 hodin zabije. Klička, do níž byl vstříknut exoenterotoxin, je nápadně ztlustělá, překrvená a obsahuje velké množství tekutiny. V tekutině se nachází hlen, odloupané epitelie a relativně značné množství bílkovin. (Účinek surového filtrátu kultury cholerného vibria na střevní kličku králičků a vepřů znázorňuje obr. 1.) Metody izolované kličky lze využít k titraci exoenterotoxinu i průkazu specifických neutralizačních protilátek.

Na cholerný exoenterotoxin je vnímavý i pes. Na novorozelých myškách, které jsou velmi citlivé na perorální zavedení cholerného exoenterotoxinu, lze studovat rozvoj kolostrální imunity, byly-li matky před vrhem aktivně imunizovány. Velmi vhodným zvířetem pro studium účinku cholerný genu i patogeneze cholery je činčila.

Pro titraci cholerný genu byl Finkelsteinem adaptován test edému krysí tlapky, jehož se užívá ve farmakologii k titraci protizánětlivých léků. Po vstříknutí cholerný genu do tlapky vzniká zánětlivý edém. Jeho rozvoj lze blokovat chemoterapeutickými látkami i neutralizačními protilátkami. (Vztah mezi dávkou cholerný genu a velikostí edému po různých časových intervalech ukazuje obr. 2.)

Craig zjistil, že v cholerné stolici a ve filtrátu bujónové kultury vibrií je přítomen faktor, který navodí výraznou permeabilitu kapilár za 24 hodin po injekci do kůže morčete nebo králička. Tento faktor byl podle účinku na kapiláry nazván faktorem permeability (PF faktor). Protože faktor permeability nelze oddělit od faktoru účinného na střevní kličku dospělého králička či střevo králičího mláďete, lze předpokládat, že různými metodami se zjišťuje v podstatě jediný exotoxin. Kdyby PF faktor byl zcela identický s exoenterotoxinem, bylo by možné používat metody navození edému a erytému v králičí kůži pro studium antitoxické imunitní odpovědi.

V některých laboratořích byla získána data, podle nichž lze po sloupcové chromatografii získat enterotoxický produkt, který nejeví aktivitu faktoru permeability. Jiní autoři naproti tomu dokazují, že čištěný exoenterotoxin má obě aktivity. Aktivita podle jejich nálezů narůstá či klesá v jednotlivých purifikátech zcela paralelně. Otázku dnes nelze jednoznačně definitivně uzavřít.

Většina autorů se snaží prokázat, že exoenterotoxin a PF faktor jsou jedinou látkou s dvojitou aktivitou. Nelze ovšem prozatím vyloučit možnost, že jde o dvě blízké bílkoviny, které vibria tvoří a uvolňují paralelně a jejichž účinek na makroorganismus se doplňuje, popř. i potencuje.

Relativně málo vyčištěný cholerový exotoxin lze formalinem změnit ve formalin-toxoid, který má menší množství dílčích bílkovinných složek než aktivní exotoxin. Lze jím navodit výraznější tvorbu protilátek než při imunizaci exotoxinem.

V choleroých vibriích byly zjištěny i další faktory, které se podílejí na patogenezi onemocnění. „Faktory adherence“ umožňují vibriím adherovat k povrchu červených krvinek či buněk střevní sliznice. Tento jev podává vysvětlení koncentrovaného výskytu vibrií na sliznici tenkého střeva. Vysoká koncentrace vibrií na slizničních buňkách umožňuje působení vysokých koncentrací účinného exoenterotoxinu.

Již dlouho známé enzymy, tvořené choleroým vibriem (elastináza, mucináza) hrají v patogenezi cholery podružnou úlohu. Bezvýznamná je pravděpodobně i mucináza RDE (receptor destroying enzyme), která působí na mukoproteinové receptory erytrocytů a jiných buněk tak intenzívně, že se na buněčný povrch nemohou adsorbovat myxoviry. Tohoto jevu se využívá ve virologické laboratorní technice.

Nabízela se též otázka, zda jedním z faktorů toxicity není i hemolysin vibria El Tor. Ukázalo se však, že hemolysin je netoxickou lecitinázou, kterou jednotlivé kmeny vibria El Tor tvoří velmi variabilně.

V imunogenezi cholery hraje podstatnou roli cholerový endotoxin. Původně byl označován jako cholerový toxin 1 (substance KS). Byl připraven ve stavu vysoké čistoty (KS lipopolysacharid, LPS antigen). Jako všechny endotoxiny izolované z gramnegativních bakterií je termostabilní. Je typově specifickým antigenem. Obsahuje determinanty, které podnítl tvorbu vibriocidních protilátek. Lze jej navázat na erytrocyty a užít ho tak v testu pasivní hemaglutinace pro průkaz vibriocidních protilátek. V patogenezi choroby může hrát druhotnou roli. Zcela bezpečně není faktorem, který je příčinou zvýšeného vylučování tekutin a minerálních iontů do lumen střeva. V LPS antigenu byla zjištěna i bílkovinná složka, která může vyvolat tvorbu vibriocidních protilátek. Je netoxická.

Léčení cholery

Antibiotika jsou velmi účinnými vibriostatickými až vibriocidními látkami. Nejúčinnější je chloramfenikol a tetracyklin. Jejich samotné podání má význam při lehké cholerové infekci s gastrointestinálními příznaky, či příznaky připomínajícími bacilární úplavici. Antibiotiky lze eliminovat původce onemocnění, nelze jimi však zlepšit letální šok a acidózu. Při léčbě algidního stadia jsou jen pomocným lékem, který může podstatně zkrátit délku poruchy v regulaci tekutin. V pokusech na zvířeti se ověřuje účinnost látek, které by byly schopny redukovat patologické vylučování tekutiny do střevního lumen. Aktivitu tohoto typu má cykloheximid (aktidion), který v pokusu na kryse výrazně zmenšuje edém krysí tlapy, vyvolaný zavedením cholera genu. Vedle cykloheximidu byl zkoušen i natriumacetazolamid (diamox). Je-li podán současně s glukózou do izolované klíčky králičího ilea, do níž byl napřed vstříknut cholerový exoenterotoxin, zastaví vylučování tekutiny do lumen střeva a obnoví v ileu normální absorpci.

Hlavním prostředkem léčby algidního stadia je rehydratační postup. Cílem tohoto léčení je náhrada izotonické tekutiny, která je vylučována do střeva. Hypotenzivnímu pacientovi se ihned zavede infúze tekutiny, která je tvořena směsí (v poměru 2:1) fyziologického roztoku a roztoku kyselého uhličitanu sodného. Podobně lze podat infúzi izotonické směsi fyziologického roztoku a 1/6 M mléčnanu sodného. Infúzi se na počátku léčení zavádí až 1 litr tekutiny během 15 minut.

K úpravě kritického stavu je zapotřebí průměrně 3 až 5 litrů tekutiny. Po úpravě krevního tlaku a pulsu se množství podané tekutiny redukuje. Tekutina se začne podávat perorální cestou. Roztok podávaný perorálně je stejného složení jako roztok pro nitrožilní infúzi. Přidává se však k němu glukóza a kaliové ionty. Rehydratační léčba se kombinuje s podáváním tetracyklinu. Dosáhne se tak zkrácení léčby a rychlejší likvidace vibrií vylučovaných stolicí.

Imunita a specifická prevence cholery

K očkování proti choleře se používá ne zcela standardních usmrcených bakteriálních vakcín. Vakciny připravené z různých kmenů a inaktivované různým způsobem (teplem, fenolem) nedávají zcela uspokojivé výsledky. Účinek imunizace není dlouhodobý. Imunita jimi navozená není dostatečně hluboká.

Pro ověření imunizační potence používaných vakcín mají význam především modelové infekce pokusných zvířat, u nichž lze vyvolat stav analogický lidskému choleroému onemocnění. Při sledování proticholerové imunity se sledují vedle cirkulujících protilátek i protilátky tvořené ve střevním traktu. Pracovníci se snaží vytvořit v laboratořích vakcinu, která by blokovala množení vibrií na povrchu střevního epitelu a současně chránila před účinkem cholerového exoenterotoxinu.

Základním pokusem prokazujícím funkci protilátek je pokus na izolované králičí klíče, v němž byl protilátkami blokován výše zmíněný „faktor adherence“ vibrií. Zavedou-li se sérové protilátky vibriocidního charakteru do infikované králičí klíčky, nedojde k adherenci vibrií. Adherence se neprojeví ani tehdy, bylo-li k pokusu použito imunizovaného králíka. Lze tedy usuzovat, že vedle sérových protilátek se v imunitě vůči choleře uplatňují i sekretorické IgA protilátky.

Sleduje-li se u imunizovaných i experimentálně infikovaných zvířat dynamika tvorby protilátek namířených proti vibriím, zjistí se, že v séru i ve stolicí se nacházejí protilátky náležející do tří hlavních imunoglobulinových tříd. Jsou zde protilátky vznikající na samém počátku imunitní odpovědi, imunoglobuliny o molekulové váze 900 000 (IgM). Později jsou prokazovány běžné gammaglobulinové protilátky o molekulové váze 150 000, patřící do třídy IgG. Zvláštní pozornost se věnuje při studiu imunogeneze cholery protilátkám o molekulové váze 150 000, jejichž molekuly mají tendenci polymerizovat (IgA).

Jako imunogeny se uplatňují dvě antigenní složky choleroých vibrií. Cholerový endotoxin a s ním sdružená netoxická bílkovinná složka navodí tvorbu vibriocidních protilátek, které v pokusu *in vitro* vibria usmrcují. Jejich průkaz se provádí testem, při němž se živá vibria inkubují s různě ředěnými séry za přítomnosti komplementu. Vibria jsou protilátkami usmrcována. Cidní účinnost sér ověřujeme vyočkováním směsí vibrií a protilátek na pevné kultivační půdy. Vibria rostou jen na těch plotnách, na něž byla vyočkována suspenze mikrobů, inkubovaná s vysoce naředěným sérem. Druhým imunogenem je exoenterotoxin, jenž navodí tvorbu protilátek antitoxických.

O rozvoji protilátkové odpovědi při experimentálně vyvolané choleře podává informaci pokus na psech. U infikovaných psů vrcholila hladina vibriocidních protilátek za 2 až 5 týdnů po odeznění akutního onemocnění. Za tři měsíce protilátky téměř vymizely. V období vysokých protilátkových hladin byli psi chráněni před novou experimentální infekcí. Podobný stav imunity lze u psů navodit i vakcinací komerční cholerovou vakcinou. Zcela odlišně od imunizovaných psů se chovají imunizované čičky. Tato na cholerové vibrio velmi vnímavá zvířata nelze před infekcí chránit komerční proticholerovou vakcinou, která je schopna navodit i velmi vysoké hladiny vibriocidních protilátek. Z pokusů lze uzavřít, že vibriocidní protilátky samy neochrání vysoce vnímavý organismus před infekcí.

Řada autorů se dnes domnívá, že pro navození antibakteriální imunity proti choleře mají největší význam

střevní IgA protilátky. Jejich imunoglobulinová část je produkována v plazmatických buňkách, vyžívajících v imunologicky aktivní lymfatické tkáni, přítomné ve střevě; sekretorická bílkovinná část je tvořena v epitelových buňkách střevních žlaz. Dosud není nashromážděno dost dat, která by umožnila stanovit, zda imunita proti choleře má pouze humorální charakter, či zda se zde uplatňuje i buněčná imunita (oddálená přecitlivělost) a zda imunita je zajišťována především intestinálními protilátkami.

Velmi obtížné je sledování imunity proti choleroému

exoenterotoxinu. Některé pokusy naznačují, že antitoxin proniká do střeva z krve a jeho lokální tvorba není prokazována. Pacienti mají po prodělané choleře relativně vysoký titer antitoxinu v krvi. Vysoké titry se někdy udržují i rok po odeznění onemocnění. Není zde tedy korelace mezi titrem antitoxinu a titrem vibriocidních protilátek.

Pokusy na zvířatech i „terénní šetření“ ukáží, zda v budoucnu bude vhodné nahradit korpuskulární bakteriální vakcínu proti choleře toxoidem, či zda bude vhodnější korpuskulární vakcínu s toxoidem kombinovat.