

Detekcia génov adherencie u *Escherichia coli* izolovaných z rôzneho klinického materiálu od imunokompromitovaných pacientov

Kmeťová, M., Čurová, K., Lovayová, V., Sabol, M., Siegfried, L.

Ústav lekárskej a klinickej mikrobiológie, UPJŠ LF v Košiciach

Abstrakt

Kľúčovú úlohu pri uplatnení *E.coli* v patogenéze črevných a mimočrevných infekcií zohráva schopnosť prichytiť sa a pomnožiť na hositeľských povrchoch. Na základe prítomnosti špecifických adhezínov je možné *E.coli* zatriediť do známych patotypov a predpokladať ich ďalšie uplatnenie pri vzniku črevných, či mimočrevných infekcií, v koexistencii s ďalšími faktormi virulencie. V práci sme vyšetrili 222 kmeňov *E. coli* izolovaných z klinického materiálu. Zaznamenali sme vysoký výskyt génov *fimA* pri *E. coli* izolovaných z pošvy (100%) a z rekta (86%). Pri výteroch z pošvy sme zistili rovnaké zastúpenie génov *bfp* a *sfa* (30%). U *E. coli* izolovaných z hemokultúr pri urosepse sa najčastejšie vyskytovali gény *pap* gény (37%) a afimbriálne adhezíny *afa* (26%). Najviac kmeňov, vybavených *eae* génmi, sme zaznamenali pri kmeňoch *E.coli* izolovaných z moču (30%) a najmenej pri *E.coli* izolovaných z hemokultúr (9%).

Kľúčové slová: *Escherichia coli*, adherencia, fimbrie, afimbriálny

V ostatných rokoch sa veľká pozornosť venuje výskumu bakteriálnej adherencie na povrchy hositeľských buniek (Antão a kol. 2009). *Escherichia coli* kolonizuje ľudské črevo krátko po narodení a táto kolonizácia je obmedzená na distálnej ileum a hrubé črevo. Väčšina kmeňov *E. coli* je s ľudským aj zvieracím organizmom v komenzálnom vzťahu. Avšak, niektoré kmene *E. coli* získali v priebehu evolúcie vlastností spojené s virulenciou. V patogenéze črevných a mimočrevných infekcií, v patogenéze ktorých sa uplatňuje *Escherichia coli*, zohráva kľúčovú úlohu schopnosť týchto baktérií prichytiť sa a pomnožiť na hositeľských povrchoch. Táto schopnosť adherencie a kolonizácie je u väčšiny patogénnych kmeňov *E. coli* sprostredkovaná bielkovinovými vláknitými štruktúrami na povrchu ich bunky, ktoré sa označujú fimbrie. Iný spôsob prichytenia na hositeľské bunky, významný zvlášť u extraintestinálnych kmeňov, je pomocou adhezínov afimbriálnej povahy (Hernandes a kol., 2011). V súčasnosti je známych niekoľko typov tak adhezínov fimbriovej povahy, ako aj afimbriálnych adhezínov (Pereira & Giugliano, 2013). Prehľad najvýznamnejších adhezínov je v Tab. 1.

Prototypom fimbrií, zodpovedných za lokalizovaný typ adherencie (LA), sú Bfp fimbrie, vyskytujúce sa u enteropatogénnych (EPEC) kmeňov *E. coli*. Pre tento typ adherencie je charakteristická tvorbu mikrokolónií na povrchu hositeľskej bunky

(Saldana a kol. 2009). Pri agregatívnom spôsobe adhérence (AA), ktorý na tkanivových kultúrach pripomína spôsob prichytenia v tvare naukladaných tehličiek, sa uplatňujú agregatívno-adherenčné fimbrie AAF1-IV. Za ďalší, difúzny typ adhérence, zodpovedajú afimbriálne adhezíny zo skupiny Afa/Dr. Bakteriálne bunky sú pri tomto spôsobe prichytenia náhodne rozptýlené po povrchu hostiteľských buniek, respektíve na abiotických povrchoch. Heterogénnou skupinou sú fimbriové adhezíny enterotoxigénnych *E. coli* (ETEC), u ktorých sa označujú ako kolonizačné faktory (CFA) a je ich známych okolo 21 typov resp.

Tab. 1 Prehľad najvýznamnejších adhezínov *E.coli*

Adhezíny	Gén	Receptor	Cieľové miesto/ najčast. klin. diagnóza
Fimbrie typu 1	<i>fim</i>	α - D- mannozid	erytrocyty/ cystitída
P-fimbrie	<i>pap</i>	digalaktózid Gal (α 1-4) β Gal	obličky/ pyelonefritída,
Bfp fimbrie	<i>bfp</i>	β ₁ integríny	tenké črevo / hnačky novorodencov
intimín	<i>eae</i>	receptor Tir (Translocated intimin receptor), integrin)	hrubé črevo/ dyspepsie, hemoragická kolitída, HUS
S-fimbrie	<i>sfa</i>	sialyl(alpha 2-3)laktóza	mozgové endoteliálne bunky /novorodenecké meningitídy, sepsa
CFA I-CFA V fimbriae	<i>cfa</i>	sialylglykoprotein, glykosfingolipid	tenké črevo /cestovateľské hnačky
AAF/I - AAF/III - aggregative fimbriae	<i>aggA</i> <i>aafA</i> <i>AAG-3A</i>	Fibronektin, endoplazmin GRP-94/Gp96 glykozylfosfatidylinozitol	tenké črevo/ chronické hnačky
nefimbriové adhezíny - bližšie necharakterizované	<i>neurčený</i>	AfaE-III a F1854 (CEA- related cell adhesion molecule)	rôzne / detské hnačky, infekcie urinárneho traktu

Pre patotypy enteropatogénnych (EPEC) a šigatoxigénnych *E.coli* (STEC) je charakteristická adhéncia typu AE (attachment and effacement), za ktorú sú zodpovedné adhezíny typu intimínu (α u EPEC, γ u STEC), kódované génmi *eae*. Mechanizmus vzniku infekcie je však u oboch odlišný.

Na základe prítomnosti špecifických adhezínov vieme *E.coli* nielen zatriediť do patotypov, ale aj predpokladať možnosť ich ďalšieho uplatnenia v patogeneze, v koexistencii s ďalšími faktormi virulencie (Tab. 2).

Tab. 2 Najčastejšia asociácia génov adherencie s patotypom humánných *E.coli*

Patotyp <i>E.coli</i>	Gény adherencie							
	<i>fimA</i>	<i>pap</i>	<i>bfp</i>	<i>eae</i>	<i>sfa</i>	<i>cfa</i>	<i>aggA</i> <i>aafA</i>	Neur-čené
Uropatogénne <i>E.coli</i> (UPEC)	++	+++			+			
Enteropatogénne <i>E.coli</i> (EPEC)	+		+++	+++				
Šigatoxigénne/(STEC), enterohemoragické (EHEC)				+++				
Vyvolávajúce neonatálnu meningitídu (NMEC)	+				++			
Septikemické (SEPEC)	+				++			
Enterotoxigénne (ETEC)						+++		
Enteroinvazívne (EIEC)								+
Enteroagregatívne (EAggEC)							+++	
Fyziologická mikroflóra	+++							

Materiál a metódy

Vyšetrili sme 222 kmeňov *E.coli* izolovaných z rôzneho klinického materiálu (výter z pošvy (n= 10) výter z rany (n= 40), hemokultúra (n=90), moč (n=39), výter z rekta pacientov (n= 43). Od jedného pacienta bol do súboru zaradený jeden kmeň *E. coli*. Metódou PCR sme v študovanom súbore *E.coli* zisťovali prítomnosť šiestich génov adherencie: *fimA*, *bfpA*, *pap*, *sfa*, *eae*, *afa*. Prehľad použitých primerov a použitých protokolov je v Tab. 3

Tab. 3 Primery použité na detekciu génov adherencie

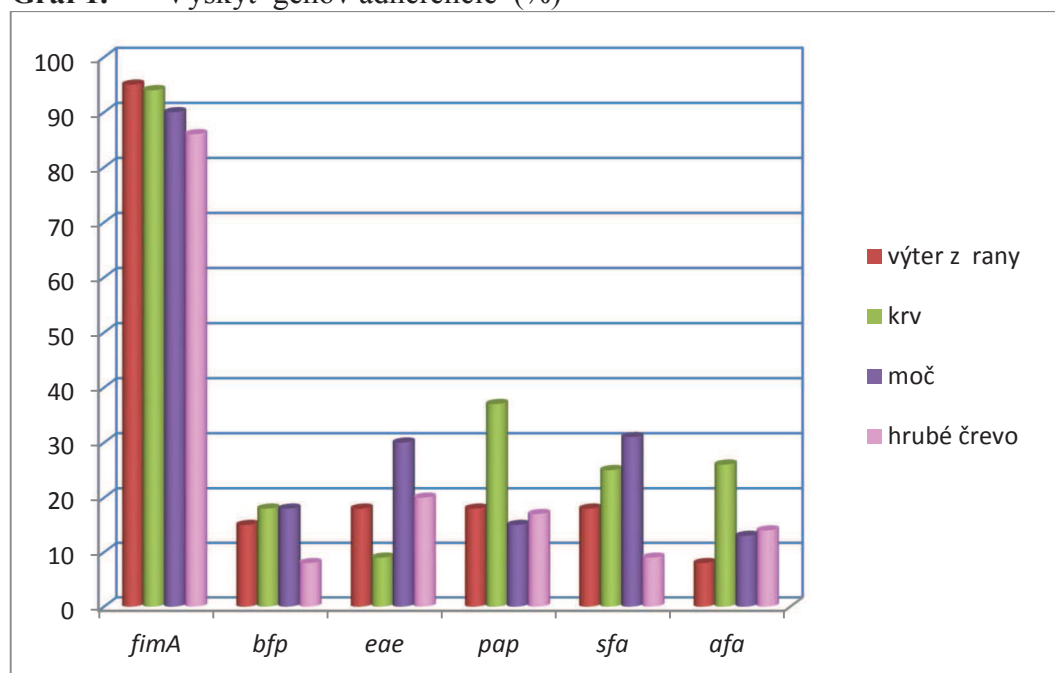
	Sekvencie 5' - 3'	Veľkosť (bp)	Produkt génu	Podľa autorov
<i>fim A</i>	F: GCGAATTCTGTTCTGTCGGCTCTGTC	510	Fimbrie typu 1	Kuhnert, (1997)
	R: TTGGAATTCAACCTTGAAGGTGCGCATC			
<i>afa</i>	F: GCTGGGCAGCAAACCTGATAACTCTC	750	afimbriálny adhezín	Yamamoto a kol.(1995)
	R: CATCAAGCTGTTTGTTCGTCGCCG			
<i>sfa</i>	F: CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC	410	S-fimbrie	Yamamoto a kol.(1995)
	R: CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA			
<i>pap</i>	F: GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT	328	P-fimbrie	Yamamoto a kol.(1995)
	R: AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA			
<i>eaeA</i>	F: GACCCCGCACAAAGCATAAGC	384	intimín	Lopez-Saucedo a kol.(2003)
	R: CCACCTGCAGCAACAAGAGG			
<i>bfpA</i>	F: AATGGTGCTTGCCTTGCTGC	324	Zväzky formujúce fimbrie	Lopez-Saucedo a kol.(2003)
	R: GCCGCTTTATCCAACCTGGTA			

Výsledky a diskusia

U všetkých vyšetovaných kmeňov *E.coli*, uplatňujúcich sa v etiologii humánných infekcií, sme dokázali prítomnosť aspoň jedného génu, kódujúceho schopnosť adherencie na hostiteľské bunky. V súlade s poznatkami autorov () sme zaznamenali v našom súbore klinických izolátov *E. coli* vysoký výskyt génov *fim A*,

ktoré kódujú fimbrie typu 1. Pri *E.coli*, izolovaných z rekta, sme tieto gény dokázali v 86% a v skupine kmeňov, izolovaných z pošvy, až v 100% (Graf 1). Fimbrie typu 1, ktoré patria medzi nešpecifické adhezíny, sa môžu vyskytovať tak u kmeňov *E.coli*, patriacich k fyziologickej mikroflóre, ako aj u patogénnych kmeňov. Vyskytujú sa často v asociácii s prítomnosťou jedného alebo viac hostiteľsko-špecifických adhezínov. Podľa autorov Bateman a spol. (2013) fimbrie typu 1 vykazujú vysoko pozitívnu koreláciu s výskytom faktorov virulence, čo naznačuje ich potenciálnu úlohu v patogenetickom procese. Pri výteroch z pošvy boli v našom súbore kvantitatívne rovnako zastúpené (30 %) gény *bfp*, vyskytujúce sa u enteropatogénnych patotypov *E. coli*, gény *sfa*, kódujúce adhezíny, typické pre *E. coli*, podieľajúce sa na vážnych, až život ohrozujúcich infekciách, súvisiacich s neonatálnou meningitídou a septikémiou a gény pre afimbriálny adhezín *afa*, ktorý je najčastejšie prítomný u rôznych extraintestinálnych izolátov. *E. coli*, izolované z hemokultúr pri urosepse, mali z génov, kódujúcich hostiteľsko-špecifické fimbrie, najčastejšie prítomné *pap* gény, kódujúce P fimbrie (37 %) a afimbriálne adhezíny *afa* (26 %). P fimbrie sa primárne vyskytujú u uropatogénnych kmeňov *E. coli* vyvolávajúcich pyelonefritídu. K vyplaveniu týchto kmeňov do krvného riečišťa zrejme došlo v dôsledku urosepsy. Podobne vysoký výskyt P fimbrií pri bakteriémii, ako sme dokázali v našej štúdií, udávajú autori Moreno a spol. (2005). Detekcia P fimbrií potvrdzuje predpoklad, *E. coli* izolované pri vážnych, život ohrozujúcich septických infekciách, boli urinárneho pôvodu. Prítomnosť EA adhezínu (odvodené z ang. attachment and effacement) označovaného aj ako intimín, je kódovaná génmi *eae*. Najviac kmeňov vybavených génmi pre tento typ adherencie sme zaznamenali pri kmeňoch izolovaných z moču (30 %) a najmenej z hemokultúr. Výskyt génov adherencie je znázorňuje Graf 1.

Graf 1. Výskyt génov adherencie (%)



Pod'akovanie

Práca vznikla v rámci riešenia projektu CEMIO (Centrum excelentnosti pre výskum faktorov ovplyvňujúcich zdravie so zameraním na skupinu marginalizovaných a imunokompromitovaných osôb (26220120058) (80%) a grantu VEGA 2/0014/13 (20%).

Použitá literatúra

1. Antão, E. M., Wieler L. H., Ewers, Ch. a kol. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Pathogens*, 2009, 1-22, doi:10.1186/1757-4749-1-22.
2. Bateman, S. L., Stapleton, A. E., Stamm, W. E. a kol. Typ 1 Pili Regulátor Gene *fimX* a patogenity Island PAI-X ako molekulárne markery Uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology*, 2013, 159, 1606-1617.
3. Bien, D. J., Sokolova O., Bozko, P. a kol. Role of Uropathogenic *Escherichia coli* Virulence Factors in Development of Urinary Tract Infection and Kidney International Journal of Nephrology, 2012, ID 681473, 15 s., <http://dx.doi.org/10.1155/2012/681473>
4. Connell, H., Agace, W., Klemm, P. a kol. Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. *Proceed. Nat. Acad. Scien. USA*, 1996, 93, 9827-9832.
5. Hegde, A., Ballal, M., Shenoy, S. a kol. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. *Indian J. Med. Microbiol.*, 2012, 30, 279-284.
6. Hernandez, R., Velsko, I., Suely, S. a kol. Fimbrial adhesins produced by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *Applied Environ. Microbiol.*, 2011, 77, 8391-8424.
7. Chattopadhyay, S., Tchesnokova, V., McVeigh a kol. Adaptive evolution of class 5 fimbrial genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* and its functional consequences. *J. Biological Chemistry*, 2012, 9, 6150-6158.
8. Kuhnert, P., Hacker, J., Muhldorfer, I. a kol. Detection system for *Escherichia coli*-specific virulence genes: absence of virulence determinants in B and C strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, 63, 703-709.
9. Lopez-Saucedo C., Cerna J.F., Villegas-Sepulveda N. a kol: Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.* 2003, 9, 127-131.
10. Marschall, J., Zhang, L., Foxman, B. a kol. Both Host and Pathogen Factors Predispose to *Escherichia coli* Urinary-Source Bacteremia in Hospitalized Patients, 2012, 19, doi: 10.1093/cid/cis252.
11. Moreno, E., Planells, I., Prats, G. a kol. Comparative study of *Escherichia coli* virulence determinants in strains causing urinary tract bacteremia versus strains

- causing pyelonephritis and other sources of bacteremia. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.*, 2005, 53, 93–99.
12. Pereira, A. L., Giugliano, L. G. Adhesion of Diarrheagenic *Escherichia coli* and Inhibition by Glycocompounds Engaged in the Mucosal Innate Immunity. *Biology*, 2013, 2, 810-831, doi:10.3390/biology2020810.
 13. Saldana, Z., Erdem, A. L., Schuller, S. a kol. The *Escherichia coli* common pilus and the bundle-forming pilus act in concert during the formation of localized adherence by enteropathogenic *E. coli*. **J. Bacteriol.** 2009. 191, 3451 – 3461.
 14. Shruthi, N., Kumar, R., Kumar, R. a kol. Study of Virulence Factors in *Escherichia coli* isolated from antenatal cases, catheterized patients, and faecal flora *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*, 2012, 6, 1699-703.
 15. Tchesnokova, V., Aprikian, P., Kisiela, D. a kol. Type 1 fimbrial adhesin FimH elicits immune response which enhances cell adhesion of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 2011, 79, 3895-3904.
 16. Yamamoto S., Terai A., Yuri K. a kol. Detection of virulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immuno. Med. Microbiol.*, 1995. 12, 85-90.