

Pôvodné práce

Vplyv probiotík na virulenciu kmeňov *Escherichia coli* izolovaných pri ulceróznej kolitíde

Kmelová, M., Frankovičová, L., Hrabovský, V., Sabol, M., Lazúrová, I., Gombošová, L., Siegfried, L.,
Univerzita P. J. Šafárika, Lekárska fakulta, SNP 1, Košice

Luminálne baktérie zohrávajú podstatnú úlohu v patogenéze zápalových ochorení čreva (inflammatory bowel diseases = IBD). Pri týchto ochoreniach dochádza k zmenám v črevnej mikroflore, pričom dominantnými sa stávajú agresívne baktérie (patogénne *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*) a znižuje sa počet baktérií, ktoré majú protektívnu úlohu (Darteuille-Michaud a spol., 2004, Fava & Danes, 2011, Walker a spol., 2011). Pri vzniku IBD ochoreni (Crohnova choroba, ulcerózna kolitída) zohráva úlohu aj súhrn ďalších faktorov, ako je genetická predispozícia, poruchy imunity, vplyv vonkajšieho prostredia, zmeny stravovaciech návykov, či psychologické faktory.

V roku 1999 bola v časopise *Infection and Immunity* publikovaná práca o invazívnych schopnostiach *E. coli* izolovaných z mukózy ilea pacientov s Crohnovou chorobou (Boudeau J. a spol., 1999). Skupina francúzskych výskumníkov na čele s Darteuille-Michaud-om (2004) pomenovala tieto kmene ako adherentno-invazívne a označila ich za nový patotyp enterovirulentných *E. coli*.

Určiť rozdiel medzi komenzálnymi a patogénnymi kmeňmi *E. coli* je ťažké, pretože *E. coli* sú súčasťou endogénnej mikrofloxy pacienta. K posúdeniu ich patogenetického uplatnenia je potrebné zistiť, či sú tieto kmene vybavené faktormi virulencie, zahŕňujúcimi rôzne adhezíny (fimbriové alebo neřimbriové), produkciu toxínov (napr. hemolýzinov, cytotoxického nekrotizujúceho faktora a cytolétného toxínu), rôzne iné povrchové antigény (napr. puzdro,

Pôvodné práce

lipopolysacharid), invazíny, systémy vychytávajúce železo, prítomnosť sekrečného systému III. typu, ich patotypovú a fylogenetickú príslušnosť. Všetky tieto faktory uľahčujú kmeňom *E. coli* uplatniť sa pri vzniku a progresii ochorenia.

Po zistení genetického potenciálu izolovaných kmeňov *E. coli* je možné ich zaradiť k ôsmim, dobre definovaným enterovirulentným patotypom: enteropatogénne (EPEC), enterotoxigénne (ETEC), enteroinvazívne (EIEC), enteroagregatívne (EAggEC), shiga-toxín produkujúce (STEC), difúzo-adherentné (DAEC), adherentno-invazívne (AIEC) a *E. coli* spôsobujúce odľupovanie buniek na TK (CDEC). Jednotlivé patotypy sa odlišujú mechanizmom účinku, spôsobom adhérence k hositeľským povrchom a prítomnosťou faktorov virulencie (Croxen & Finlay, 2010).

Určenie fylogenetickej príslušnosti kmeňov *E. coli* do štyroch fylogenetických skupín (A, B1, B2 a D) (Clermont a spol., 2000) je zvlášť významné za podmienok, keď sa tieto baktérie izolujú ako jediné patogény pri infekciách. Tieto kmene môžu mať rovnaké vlastnosti ako komenzálne kmene, ale môžu sa od nich odlišovať fylogenetickou príslušnosťou a z toho vyplývajúcimi ekologickými nárokmi a schopnosťou vyvolať ochorenie (Bailey a spol., 2010).

Pri IBD sa na zmiernenie nešpecifického črevného zápalu, normalizáciu dysfunkcie črevnej mukózy, utlmenie hypersenzitívnych reakcií a na obnovenie mikrobiálnej rovnováhy v čreve okrem štandardne zaužívanj protizápalovej liečby využívajú aj probiotická terapia.

V našej práci sme študovali fenotypové aj genotypové vlastnosti kmeňov *E. coli* s ohľadom na aplikovanú terapiu.

Material a metódy

V práci boli použité ako referenčné kmeny *E. coli* EB 28 (*hly*⁺, *cnf1*⁺, *pap*⁺, *sfa*⁺, *aer*⁺), *E. coli* 248/65 (*ial*⁺, *ipaH*⁺, *incC*⁺), *E. coli* 378/80 (*lt*⁺, *st*⁺), *E. coli* O291/A (*eaeA*⁺, *bfpA*⁺), *E. coli* F46 (*pCVD432*⁺), *E. coli* KS 52 (*afa*⁺, *aer*⁺, *pap*⁺, *fimA*⁺), *E. coli* Nissle 1917 (*fimA*⁺, *aer*⁺, *incC*⁺), *E. coli* C 600^{K16} (*hly*⁺, *cnf1*⁺, *pap*⁺, *sfa*⁺, *afa*⁺, *aer*⁺, *ial*⁺, *ipaH*⁺, *incC*⁺, *pCVD432*⁺, *eaeA*⁺, *bfpA*⁺, *lt*⁺, *st*⁺).

Výšetrované kmeny *E. coli* boli izolované z biopitických vzoriek hrubého čreva, odoberaných pri kolonoskopii na I. internej klinike Lekárskej fakulty UPJŠ v Košiciach od pacientov s ulceróznou kolitídou (UC). Kmeny boli rozdelené do dvoch skupín. Prvú skupinu (n=39) tvorili kmeny izolované od pacientov, ktorí popri štandardnej terapii (5-aminosalicyláty, azathioprin, blokátory protónovej pumpy, perorálne podávané preparáty železa, kortikosteroidy, antibiotiká, p. o., methotrexát, acidum folicum) užívali aj probiotické prípravky (PR+) na báze laktobacilov a bifidobaktérií. Druhú skupinu tvorili *E. coli* (n=53) izolované od pacientov s UC, ktorí neužívali probiotické preparáty (PR-). Kmeny boli biochemicky identifikované pomocou ENTERO-Rapid 24.

K fenotypovej charakterizácii kmeňov *E. coli* sme použili metódu manózo-senzitívnej (MSHA) a manózo-resistentnej hemaglutinácie (MRHA) ľudských a morčacích erytrocytov a tvorbu hemolýzy na krvnom agaré (Siegfried a spol., 2004).

Z génov virulencie sme metódami multiplexnej PCR dokazovali prítomnosť *fimA* (fimbrie typu I), *bfpA* (zväzky tvoriace fimbrie), *pap* (P fimbrie), *sfa* (S fimbrie), *eae* (intimin), *afa* (afimbriálny adhezín), *a-hly* (α-hemolýzín), *cnf1* (cytotoxický nekrotizujúci faktor), *lt*, *st* (produkcia enterotoxínov), gény invazivity (*ial*, *ipaH*) a *aer* (produkcia aerobaktínu), *incC* (aerobaktínsytetázy) podľa metodických postupov, ktoré sme opísali v prácach Kmeľová a spol. (2005), Čurová a spol. (2009).

Kmeny sme zatriedili k známym patotypom *E. coli* na základe získaného spektra génov virulencie. Fylogenetické zatriedenie kmeňov do skupín B2, D, B1 a A sme určili na základe identifikácie génov *chuA*, *yjaA* a fragmentu TSPE4.C podľa Clermont a spol. (2000).

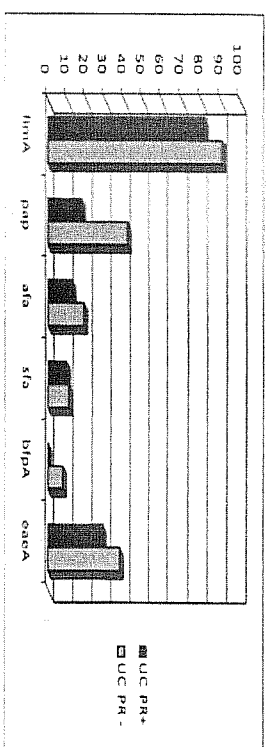
Výsledky

Z hľadiska fenotypových vlastností kmeňov *E. coli* izolovaných od pacientov s ulceróznou kolitídou sme zaznamenali v skupine (PR+) výrazne nižší výskyt MRHA (5%) oproti kmeňom druhej skupiny (43%). Schopnosť spôsobiť MSHA morčacích erytrocytov bola naopak vyššia v skupine (PR+) (80% vs. 61%). Rozdiely sme zaznamenali aj vo výskyte hemolytických kmeňov (11%) v skupine PR (+) oproti 40% výskytu v skupine (PR -).

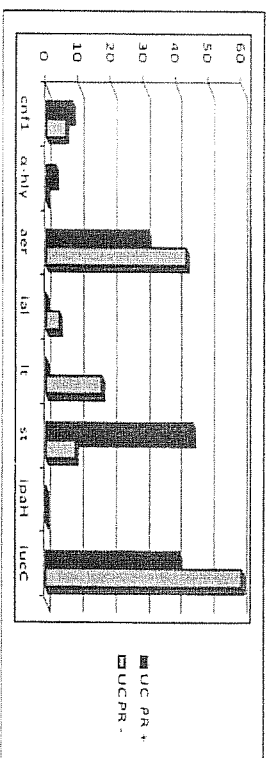
Výskyt génov, kódujúcich rôzne adhezíny patogénnych *E. coli* (*pap*, *afa*, *sfa*, *bfpA*, *eae*) a génov spojených s toxicitou a invazivitou (*cnf1*, *a-hly*, *aer*, *ial*, *lt*, *st*, *ipaH*, *incC*) znázorňujú Grafy 1 a 2.

Dominujúcim patotypom pri kmeňoch *E. coli* izolovaných z biopitických vzoriek bol adherentno-invazívny patotyp (Graf 3), ktorý bol zistený pri 54% (PR +) vs. 66% (PR-). Najviac kmeňov izolovaných pri UC patrilo k fylogenetickej skupine B2 (48% pri PR+ a 60% pri PR-). Zatriedenie do ďalších fylogenetických skupín je zrejme z grafu 4.

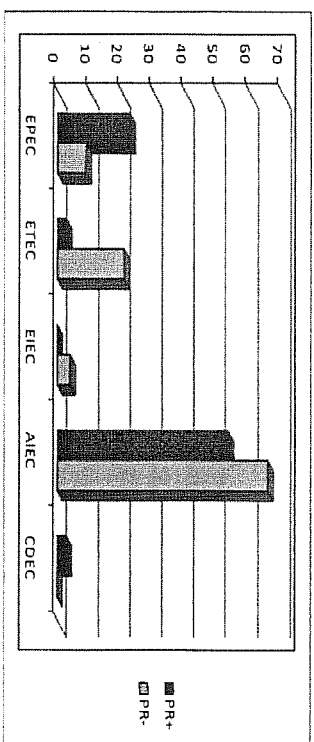
Graf č. 1: Prítomnosť génov, kódujúcich adhérenčné vlastnosti kmeňov *E. coli* (%)



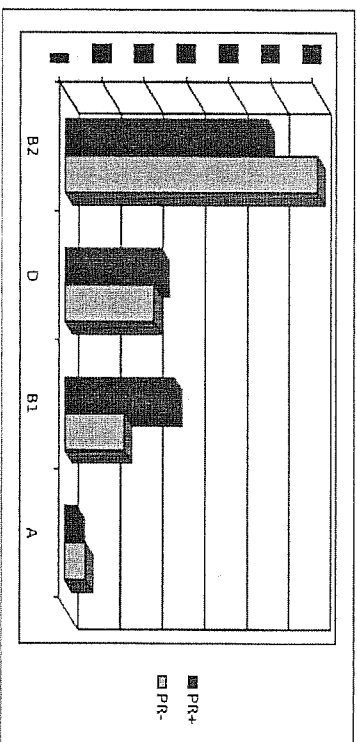
Graf č. 2: Prítomnosť génov virulencie v študovanom súbore kmeňov *E. coli* (%)



Graf č. 3: Zatriedenie vyšetovaných kmeňov *E. coli* k známym enterovirulentným patotypom (%)



Graf č. 4: Fylogenetická príslušnosť kmeňov *E. coli* (%)



Diskusia

Celulárne a molekulárne mechanizmy interakcii medzi črevnou mukózou a oportúnnymi *E. coli* sú v súčasnosti predmetom intenzívneho výskumu na celom svete. Je však pomerne málo prác, študujúcich vlastnosti *E. coli* izolovaných z bioprických vzoriek čreva. K významným zisteniam tejto štúdie patrí z hľadiska fenotypových vlastností zistenie nižšieho výskytu MRHA (+) ľudských erytrocytov, v prípade zaradenia probiotík v terapii UC. Vlastnosť MRHA sa spája s prítomnosťou špecifických adhezínov u patogénnych *E. coli*. Naopak, častejší výskyt MSHA moréacií erytrocytov v tejto skupine svedčí o určitej modulácii virulencie *E. coli* probiotikami, pretože táto schopnosť sa spája predovšetkým s prítomnosťou fimbrií typu I u fyziologických kmeňov *E. coli*. Porovnanie výskytu génov virulencie (*cnfI*, *a-hly*, *acr*, *ial*, *li*, *st*, *ipaH*, *incC*) v oboch skupinách kmeňov a ich častejší výskyt u kmeňov (PR-) umožňuje tiež vysloviť predpoklad, že sa aj v tomto prípade pravdepodobne uplatnil pozitívny vplyv probiotickej terapie.

Najčastejšie detegovaným patotypom *E. coli* pri UC bol adherentno-invazívny patotyp (54% vs. 66%), čo poukazuje na to, že práve tieto kmene sú najvýznamnejšie z hľadiska ich uplatnenia v patogenéze IBD. Tieto výsledky sú v súlade s literárnymi údajami (Swidsinski a spol. 2002, Darfeuille-Michaud A. a spol., 2004).

Z hľadiska fylogenetického zatriedenia kmeňov bolo významnejšie zistenie, že väčšina kmeňov izolovaných pri UC patrí do fylogenetického skupiny B2, charakteristickej pre najvirulentnejšie *E. coli*, pričom nižší výskyt tejto skupiny bol pri kmeňoch (PR+).

Záver

Práca je príspevkom k možnosti objasnenia uplatnenia sa *E. coli* v patogenéze ulcerózneho kolitidy, čo je v popredí záujmu tak klinických pracovníkov - gastroenterológov, ako aj výskumných pracovníkov.

Literatúra

1. Bailey, J.K., Pinyon, J.L., Anantham, S, Hall, R.M. (2010): Commensal *Escherichia coli* of healthy humans: a reservoir for antibiotic-resistance determinants. *J. Med. Microbiol.*, **59**, 1331-1339.
2. Boudreau J., Glasser A.L., Masseret E., Joly B., Darfeuille-Michaud A. (1999): Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infect. Immun.*, **67**, 4499-4509.
3. Clermont, O., Bonacorsi, S. & Bingen, E. (2000): Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol.*, **66**, 4555-4558.
4. Croxen, A.M & Finlay B.B. (2010): Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Rev. Microbiology*, **8**, 26-38.
5. Darfeuille-Michaud A., Boudreau J., Bulois P., Neut C., Glasser A.L., Barnich N., Bringer M.A., Swidsinski A., Beaugerie L., Colombel J.F. (2004): High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology*, **127**, 412-421.
6. Čurová, K., Kmetová, M., Sabol, M., Gombošová L., Lazurová, I., Stegried, L. (2009): Enterovirulent *E. coli* in inflammatory and noninflammatory bowel diseases. *Folia microbiologica*, **54**, 81-86.
7. Danes, S. (2011): Intestinal microbiota in inflammatory bowel disease: Friend of foe? *World J. Gastroenterol.*, **7**, 557-566.
8. Fava F., Danes, S. (2011): Intestinal microbiota in inflammatory bowel disease: Friend of foe? *World J. Gastroenterol.*, **7**, 557-566.
9. Kmetová, M., Havrišová, K., Sabol, M., Liptáková, A., Bubánová, M., Zákuciová, M., Gombošová, L., Petrovičová, J., Lazurová, I., Stegried, L. (2005): *Escherichia coli* strains

- isolated from patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Biologia*, 60, 717-721.
10. Kmet'ová, Frankovičová, L., Molokáčová, M., Takáčová, V., Kmet', V., Siegfried, L. (2010): Molekulárno-biologický dôkaz faktorov virulencie a fylogenetických skupín u klinických izolátov *Escherichia coli*. Zborník príspevkov. Využitie experimentálnych metód pri ochrane a podpore zdravia obyvateľstva, ISBN 978-80-7097-846-7, 241-245.
 11. Siegfried, L., Kmet'ová, M., Puzová, H., Molokáčová, M., Filka, J. (1994): Virulence-associated factors in *Escherichia coli* strains isolated from children with urinary tract infection. *J. Med. Microbiol.*, 41, 127-132.
 12. Swidsinski A., Ladhoff A., Penthaler A., Swidsinski S., Loening-Baucke V., Ormer M., Weber J., Hoffmann U., Schreiber S., Diefel M., Lochs H. (2002): Mucosal flora in inflammatory bowel disease *Gastroenterology*, 122:44-54.
 13. Walker A.W., Sanderson, J.D., Churcher, C., Parkes, G.C., Hudspith, B.N., Rayment, N., Brostoff, J., Parkhill, J., Dougan, G., Petrovska, L. (2011): High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease. *BMC Microbiology* 11, doi:10.1186/1471-2180-11-7.

Práca bola riešená s podporou projektov: Centrum excelentnosti CENIO, ITMS: 26220120058 (30%), projektin PROBIO ITMS: 26220220104 (40% a grantin VEGA 1/0495/10 (30%).

Kolonizácia novorodencov kmeňmi *Streptococcus agalactiae* a ich nosičstvo u gravidných žien

Bereghazyová, E., Bojňanský, J, Pavlík, P., Žáková, A.
HPL spol. s r.o., Bratislava

Súhrn

Streptococcus agalactiae je beta-hemolytický streptokok skupiny B (ďalej HSB). Je pôvodcom závažných infekcií novorodencov (sepsa, meningitída, pneumónia), ktoré sa môžu vyvinúť u 1% až 2% novorodencov kolonizovaných týmto patogénnym mikroorganizmom.

V období od 1. januára 2008 do 30. júna 2010 sme sledovali kolonizáciu novorodencov kmeňmi HSB na novorodeneckom oddelení FNŠP akadémika Ladislava Déjera v Bratislave (súčasť Univerzitetnej nemocnice v Bratislave). Zároveň sme získané údaje porovnávali s výsledkami predpôrodného skríningu HSB matiek novorodencov kolonizovaných kmeňmi HSB.

Z celkového počtu 1220 novorodencov, u ktorých bol realizovaný skrínig, bolo 172 novorodencov s pozitívnym nálezhom HSB (14%). Porovnaním zoznamu novorodencov a žien vyšetrených na nosičstvo HSB pred pôrodom sme zistili, že skrínig HSB bol realizovaný u 138 zo 172 matiek HSB pozitívnych novorodencov (80%). Zo 138 vyšetrených gravidných žien bolo 103 HSB pozitívnych (75%).

U HSB kmeňov izolovaných od novorodencov sme testovali citlivosť na vybrané antibiotiká: penicilín, klindamycín, erytromycín, ofloxacin, ceftriaxon.

SPRÁVY KLINICKEJ MIKROBIOLÓGIE

Vydávajú :

Slovenská spoločnosť klinickej mikrobiológie,
Slovenskej lekárskej spoločnosti a

Sekcia klinickej mikrobiológie
Slovenskej lekárskej komory

ako informačný bulletin pre svojich členov.

Redakčná rada:

doc. MUDr. Sylvia Bazovská, CSc., Bratislava sylvia.bazovska@fmed.uniba.sk

RNDr. Jaroslav Bojnanský, Bratislava bojnansky@hpl.sk

MUDr. Rudolf Botek, Piešťany botek@laboratoria.sk

MUDr. Juraj Hanzen, Bratislava hanzen@hpl.sk

MUDr. Dušan Krkoška, CSc., Martin krkoska@mfn.sk

RNDr. D. Lacková, PhD, Levice dlackova@zoznam.sk

prof. MUDr. Anna Lišková, PhD, Nitra liskova@fhnitra.sk

doc. MUDr. Milan Nikš, CSc., Bratislava niks.m@gmx.at

doc. RNDr. František Ondriška, PhD, Bratislava ondriska@hpl.sk

MUDr. A. Petrovičová, CSc., Bratislava anna.petrovicova@szu.sk

RNDr. Martin Sojka, Bratislava martin.sojka1@gmail.com

Vedúci redaktor:

MUDr. A. Petrovičová, CSc., Bratislava

Zástupca vedúceho redaktora:

doc. MUDr. Milan Nikš CSc., Bratislava

Technický redaktor:

RNDr. Jaroslav Bojnanský, Bratislava

Adresa redakcie:

Oddelenie virológie

VVZ SZU Limbová 12, 833 03 Bratislava

Tlač: **PHH**

Toto číslo bolo vydané z podporou
SEKCIE KLINICKEJ MIKROBIOLÓGIE
SLOVENSKEJ LEKÁRSKEJ KOMORY.

SPRÁVY KLINICKEJ MIKROBIOLÓGIE

ISSN 1335-8219
EV 2992/09

Ročník XI.
Číslo 2/2011

Časopis

*Slovenskej spoločnosti klinickej mikrobiológie
Slovenskej lekárskej spoločnosti*

a

*Sekcie klinickej mikrobiológie
Slovenskej lekárskej komory*



Obsah:

- 1 príhovor redakčnej rady
- 2-10 Vplyv probiotík na virulenciu kmeňov *Escherichia coli* izolovaných pri ulceróznej kolitide, *Kmetová, M., Frankovičová, L., Hrabovský, V., Sabol, M., Lazárová, I., Gombašová, L., Siegfried, L.*
- 11-22 Kolonizácia novorodencov kmeňmi *Streptococcus agalactiae* a ich nosičstvo u gravidných žien, *Beregházyová, E., Bojnanský, J., Pavlík, P., Žáková, A.*
- 23-30 Invazívne meningokokové ochorenia v SR a čo je (relatívne) nové v diagnostike a identifikácii meningokokov, *Vaculíková, A., Černická, J.*
- 31-34 Zápisnica z výboru SSKM SLS (11. 03. 2011, Žilina)
- 35-38 Zápisnica z výboru SSKM SLS (17. 06 2011, Bratislava)
- 39-40 Informácia – Klasifikačný systém DRG
- 41-46 Správy z odborných podujatí
- 47-52 Abstrakty Bobrovec