

Virulentný profil a rezistencia *Escherichia coli* izolovaných od imunokompromitovaných pacientov pri urosepse

M. Kmeťová, E. Kendrovská, V. Takáčová, M. Sabol, L. Siegfried

SOUHRN

Študovali sme vlastnosti kmeňov *E. coli* izolovaných z krvi imunokompromitovaných pacientov pri urosepse. Od každého pacienta ($n = 25$) bol testovaný jeden kmeň. U kmeňov sme najčastejšie zaznamenali prítomnosť génov adhérencie *fimA* (96 %) a *pap* (56 %). Z génov, kódujúcich produkciu toxínov, sme v našom súbore kmeňov dokázali prítomnosť *cnf* (20 %), *α -hly* (16 %), *lt* (12 %) a *st* (8 %). Výskyt génov *aer* a *iucC*, podporujúcich prežitie *E. coli* v extracelulárnych priestoroch hostiteľa a spojených z užitím Fe^{2+} , bol potvrdený v 84 % a 80 %. Fylogeneticky boli študované *E. coli* najčastejšie zatriedené k fylogenetickým skupinám B₂ a D (53 %, 32 %). Najvyššiu rezistenciu proti antibakteriálnym látkam sme zaznamenali proti trimetoprim/sulfamethoxazolu a ciprofloxacínu (32 %) a proti ampicilín/sulbaktamu (20 %). Všetky kmene boli citlivé voči piperacilín/tazobactamu, kolistínu, amikacínu a meropenemu.

SUMMARY

VIRULENT PROFILE AND RESISTANCE OF ESCHERICHIA COLI ISOLATED IN IMMUNOCOMPROMISED PATIENTS WITH UROSEPSIS

We have been studying the characteristics of *E. coli* strains isolated from blood of immunocompromised patients suffering from urosepsis. In each patient ($n = 25$) a different strain has been tested. In the tested strains we have most often found gene adherence *fimA* (96%) and *pap* (56%). From the genes coding toxin production we have found *cnf* (20%), *α -hly* (16%), *lt* (12%), and *st* (8%) in our set of strains. The incidence of *aer* and *iucC* genes supporting the survival of *E. coli* in host extracellular space and associated with Fe^{2+} utilization was 84% and 80%, respectively. From the phylogenetic perspective the studied *E. coli* strains most often belonged to phylogenetic groups B₂ and D (53% and 32%, respectively). The highest resistance against antibacterial agents we have found against trimethoprim/sulfamethoxazol and ciprofloxacin (32%) and against ampicillin/sulbaktam (20%). All the strains were sensitive to piperacillin/tazobactam, colistin, amikacin and meropenem.

Escherichia coli je súčasťou fyziologickej mikrobioty hrubého čreva. Patrí k oportúnnym patogénom, ktoré sa za určitých okolností uplatňujú v etiológii črevných a mimočrevných infekcií. S izoláciou patogénnych *E. coli* sa v našich podmienkach najčastejšie stretávame pri infekciách urinárneho traktu (UTI), pyogénnych infekciách, sporadicky sa vyskytuje pri gastrointestinálnych infekciách. Infekcie *E. coli* môžu byť sprevádzané komplikáciami, ktoré vyúsťujú do vážnych klinických stavov, spojených s bakteriémiou, neonatálnou meningitídou, ascendentnou cholangitídou, spontánnou peritonitídou, nozokomiálnou pneumóniou, resp. inými klinickými prejavmi [1,2].

Na základe klinických príznakov u pacienta, vyšetrovaného klinického materiálu, fenotypových vlastností izolovaných kmeňov *E. coli* a spektra dokázaných génov virulencie sa kmene *E. coli* rozdeľujú na enterovirulentné (EVEC) a extraintestinálne (ExPEC). Medzi enterovirulentné patotypy patria enteropatogénne *E. coli* (EPEC), enterotoxigénne (ETEC), enteroinvazívne (EIEC), enteroagregatívne (EAggEC), šigatoxigénne (syn. verotoxigénne, enterohemoragické) (STEC, VTEC, EHEC), difúzne-adherentné *E. coli* (DAEC), adherentno-invazívne (AIEC) a *E. coli* spôsobujúce odlupovanie buniek na tkanivových kultúrach (CDEC) [3]. V roku 2011 pribudol nový patotyp enteroagregatívnych hemoragic-

KLÍČOVÁ SLOVA

Escherichia coli
urosepsa
virulencia
rezistencia
fylogenetická príslušnosť

KEY WORDS

Escherichia coli
urosepsis
virulence
resistance
phylogenetic group

doc. RNDr. Marta Kmeťová, CSc.,
mim. prof.

Univerzita Pavla Jozefa Šafárika
Ústav lekárskej a klinickej
mikrobiológie LF a UN L. Pasteura
Trieda SNP 1, 040 11 Košice

Tab. 1. Základné informácie o pacientoch, od ktorých boli izolované vyšetované kmene *E. coli*.

<i>E. coli</i>	Údaje o pacientovi klinická diagnóza	Rok narodenia	Pohlavie
H3	stav po transplantácii obličky	1972	ž
H10	akútna tubulointerstiálna nefritída	1979	ž
H12	akútna tubulointerstiálna nefritída	1932	ž
H14	mimotelová dialýza	1933	m
H21	akútna tubulointerstiálna nefritída	1936	ž
H22	chronické zlyhanie obličiek	1926	ž
H24	akútna tubulointerstiálna nefritída	1951	ž
H25	akútna tubulointerstiálna nefritída	1956	ž
H29	akútna tubulointerstiálna nefritída	1939	ž
H34	akútne zlyhanie obličiek	1963	ž
H40	akútna tubulointerstiálna nefritída	1927	ž
H41	akútna tubulointerstiálna nefritída	1943	ž
H44	tubulointerstiálna choroba obličiek	1943	ž
H45	akútna prostatitída	1949	m
H51	zápalové choroby prostaty	1958	m
H54	akútna tubulointerstiálna nefritída	1978	ž
H57	akútna tubulointerstiálna nefritída	1928	ž
H58	akútna tubulointerstiálna nefritída	1934	m
H62	akútna tubulointerstiálna nefritída	1948	ž
H63	nešpecifikovaná obličková kolika	1931	ž
H66	anúria a oligúria	1941	m
H74	neuromuskulárna dysfunkcia močového mechúra	1933	m
H76	zápalova choroba prostaty	1934	m
H81	akútna tubulointerstiálna nefritída	1940	m
H83	akútna tubulointerstiálna nefritída	1986	ž

kých *E. coli* (EAHEC) [4]. Z extraintestinálnych sú najvýznamnejšie uropatogénne *E. coli* (UPEC), neonatálnu meningitídu vyvolávajúce (NMEC) a septikémiu vyvolávajúce *E. coli* (SEPEC) [5,6].

Širokú ekologickú diverzitu patogénnych *E. coli* umožňuje ich genomová plasticita. Patogénne kmene obsahujú o 10–20 % viac genetickej informácie ako nepatogénne referenčné kmene *E. coli* K-12. Každý kmeň izolovaný pri infekciách sa môže vyznačovať unikátnou kombináciou génov virulencie, pričom niektoré sú jedinečné a vyskytujú sa iba u virulentných kmeňov [7,8]. Faktory virulencie v konečnom dôsledku poškadzujú hostiteľa

a prispievajú k vzniku a klinickej manifestácii ochorenia [9,10]. Najväčšiemu riziku nákazy sú vystavení novorodenci, deti, starší ľudia a pacienti po operačnom zákroku. Zvýšené riziko nákazy je u ľudí so zavedeným močovým katétrom, transplantovanou obličkou, poškodenou chrbticou, diabetes mellitus a u pacientov s nádorovým ochorením, zvlášť v období ťažkej neutropénie, ktorá vzniká ako následok chemoterapie či celkovej imunodeficiencie [11,12].

Cieľom našej práce bolo otestovať kmene *E. coli* izolované z krvi pacientov pri urosepse. Pre pacientov s urosepsou bola charakteristická prítomnosť UTI (Urinary

Tract Infection), sprevádzaná celkovou systémovou reakciou organizmu na infekciu.

PACIENTI A POUŽITÉ METÓDY

Pacienti

V štúdiu boli zahrnuté kmene *E. coli* izolované od 25 pacientov hospitalizovaných v Univerzitnej nemocnici L. Pasteura v Košiciach, u ktorých došlo k diseminácii *E. coli* do krvného riečišťa po primárnej infekcii urinárneho traktu. Údaje o primárnej klinickej diagnóze, pohlaví a veku pacientov sú v tab. 1.

Testované kmene

Študovali sme vlastnosti 25 kmeňov *E. coli* izolovaných z hemokultúr (od každého pacienta bol testovaný jeden kmeň). U kmeňov sme vyhodnotili prítomnosť faktorov virulencie, fylogenetickú príslušnosť, prevalenciu virulentných patotypov a citlivosť voči pôsobeniu antibakteriálnych látok.

V práci sme použili tieto referenčné kmene: *E. coli* C 600^{ref} (*hly*⁻, *cnf1*⁻, *pap*⁻, *sfa*⁻, *afa*⁻, *aer*⁻, *ial*⁻, *ipaH*⁻, *iucC*⁻, *pCVD432*⁻, *eaeA*⁻, *bfpA*⁻, *lt*, *st*)⁻, *E. coli* 248/65 (*ial*⁺, *ipaH*⁺, *iucC*⁺), *E. coli* 378/80 (*lt*⁺, *st*⁺), *E. coli* O29/A (*eaeA*⁺, *bfpA*⁺), *E. coli* F46 (*pCVD432*⁺), *E. coli* EB 28 (*hly*⁺, *cnf1*⁺, *pap*⁺, *sfa*⁺, *aer*⁺), *E. coli* KS 52 (*afa*⁺, *aer*⁺, *pap*⁺, *fimA*⁺), *E. coli* Nissle 1917 (*fimA*⁺, *aer*⁺, *iucC*⁺).

Hemokultivácia

Na hemokultiváciu sme použili automatizovaný hemokultivačný systém (Bactec 9050). Kmene *E. coli* z pozitívnej hemokultúry boli izolované a identifikované štandardnými mikrobiologickými postupmi.

Dôkaz génov virulencie

K detekcii génov virulencie u *E. coli* bola použitá reakcia PCR. Metodické postupy sú popísané v prácach Kmetová et al [13], Čurová et al [14]. Z génov, ktoré sú zodpovedné za schopnosť prichytenia *E. coli* na mukózne povrchy, sme metódou PCR dokazovali prítomnosť: *fimA* (fimbrie typu 1), *bfpA* (zväzky tvoriace fimbrie), *pap* (P fimbrie), *sfa* (S fimbrie), *eae* (intimín), *pCVD* (agregatívny typ adherencie), *afa* (afimbriálny adhezín). Z génov, kódujúcich tvorbu toxínov, boli detegované gény: α -hly (α -he-

molyzín), *cnf1* (cytotoxický nekrotizujúci faktor), *lt* a *st* (produkcia enterotoxínov). Invazivitu sme posudzovali na základe detekcie génov invazivity *ipaH*. Z ďalších génov virulencie sme sledovali výskyt génov *iucC* (aerobaktínsyntetáza) a *aer* (produkcia aerobaktínu), ktoré súvisia so schopnosťou baktérií utilizovať železo viazané v telových tekutinách:

- **Fylogenetické zatriedenie** – kmene izolované od pacientov sme zatriedili do fylogenetických skupín B₂, D, B₁ a A na základe identifikácie génov *chuA*, *yjaA* a fragmentu TSPE4 C podľa Clermonta et al [15].
- **Rezistenciu proti antibiotikám** – rezistenciu proti antibakteriálnym látkam (ampicilin, piperacilin/tazobactam, trimetoprim/sulfam, cefepim, cefotaxim, ceftazidim, cefuroxim, ciprofloxacín, aztreonam, tobramycín) sme zisťovali štandardnou mikrodilučnou metódou. Rezistenciu proti cefoperazónu a imipenemu sme určili difúznou metódou.

VÝSLEDKY

Na Oddelení klinickej mikrobiológie Ústavu lekárskej a klinickej mikrobiológie Lekárskej fakulty UPJŠ a Univerzitnej nemocnice L. Pasteura v Košiciach sa *E. coli* izoluje z hemokultúr ako druhý najčastejší gramnegatívny patogén (po *Klebsiella pneumoniae*) (tab. 1). Prítomnosť génov virulencie a rezistenciu sme študovali u 25 klinických izolátov *E. coli*. Až 24 kmeňov *E. coli* (96 %), bolo vybavených fimbriami typu 1, ktoré sme detegovali na základe prítomnosti génov *fimA*. U 14 z testovaných kmeňov boli prítomné P fimbrie, ktoré sú kódované *pap* génmi (56 %). Výskyt ďalších génov, asociovaných so schopnosťou adhérence, klesal v poradí *sfa* 7 kmeňov (28 %) a *afa* 4 kmene (16 %), *bfpA* 5 kmeňov (20 %) a gén *eae* u jedného kmeňa (4 %). Z génov kódujúcich produkciu toxínov sme dokázali v našom súbore kmeňov prítomnosť *cnf* (5 kmeňov), α -hly (4 kmene), *lt* (3 kmene) a *st* (2 kmene). Výskyt génov *aer* a *iucC*, podporujúcich prežívanie *E. coli* v extracelulárnych priestoroch hostiteľa a spojených z utilizáciou Fe²⁺, bol potvrdený u 21 kmeňov (84 %) a 20 kmeňov (80 %). Gény, kódujúce invazívne vlastnosti

Tab. 2. Najčastejšie gramnegatívne baktérie izolované z hemokultúr (%).

Gramnegatívne baktérie	Rok 2009	Rok 2010
<i>Klebsiella spp.</i>	96	144
<i>Escherichia coli</i>	72	118
<i>Enterobacter spp.</i>	15	22
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37	64
<i>Acinetobacter spp.</i>	30	26
<i>Serratia spp.</i>	12	2
iné	15	24

Tab. 3. Rezistencia kmeňov *E. coli* izolovaných pri urosepse.

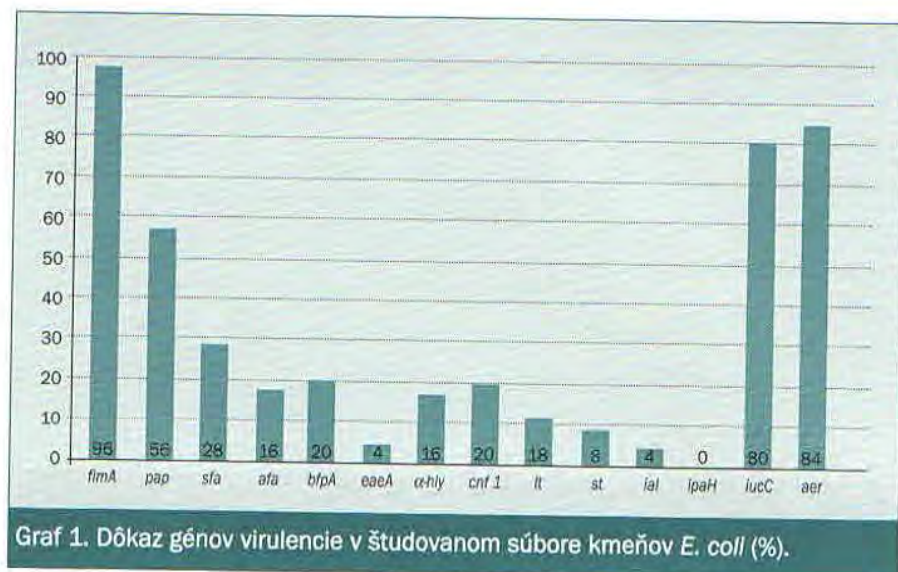
Antibakteriálna látka	Rezistencia <i>E. coli</i> (n = 25)		
	rezistentné	stredne citlivé	citlivé
ampicilin	5	3	17
piperacilin/tazobactam	0	2	23
trimetoprim/sulfam	8	1	16
cefepim	1	0	24
cefotaxim	2	0	23
ceftazidim	1	0	24
cefuroxim	2	0	23
ciprofloxacín	8	0	17
kolistin	0	0	25
gentamicín	2	1	22
amikacín	0	1	24
meropenem	0	0	25
aztreonam	1	0	25
tobramycín	1	0	24

ipaH neboli v študovanom súbore dokázané (obr. 2). Fylogeneticky boli študované *E. coli* najčastejšie zatriedené k skupinám B₂ a D (53 %, 32 %). Príslušnosť k fylogenetickému skupine B1 bola zistená v 11 % a k skupine A v 4 %. Desiat z testovaných kmeňov bolo na základe spektra dokázaných faktorov virulencie zatriedených medzi typické uropatogénne patotypy, 5 patrilo k EPEC patotypu, 1 kmeň k ETEC a 1 kmeň bol EIEC patotypu. Sedem kmeňov nebolo na základe charakteristických génov zatriedených k známym patotypom *E. coli*. Najvyššiu rezistenciu proti antibakteriálnym látkam sme zaznamenali proti trimetoprim/sulfamethoxazolu a ciprofloxacínu (32 %) a proti ampi-

cilin/sulbaktamu (20 %). Všetky kmene boli citlivé voči piperacilín/tazobactamu, kolistinu, amikacínu a meropenemu (tab. 3).

DISKUSIA

Urosepsa je ochorenie spojené s vysokou morbiditou a mortalitou u imunokompromitovanej populácie [16]. Vzniká na podklade ťažkej močovej infekcie hematogénnym rozsevom pôvodcu ochorenia [17]. Pre *E. coli*, vyvolávajúce urosepsu, je typická prítomnosť génov virulencie, ktoré im umožnia uplatniť sa v patogenéze [18]. Nešpecifické a špecifické adhezíny umožňujú uropatogénnym kmeňom *E. coli* adherovať na epitel urinárneho traktu a kolonizovať ho. Prítomnosť špecifických



Graf 1. Dôkaz génov virulencie v študovanom súbore kmeňov *E. coli* (%).

adhezínov je jedným z najdôležitejších kritérií pri patotypovom zatriedovaní *E. coli*. V našom súbore kmeňov, izolovaných z hemokultúr, sme nezaznamenali žiadny kmeň bez prítomnosti aspoň jedného z génov adhérence. Prítomnosť špecifických génov adhérence sme využili ako charakteristický dominantný gén pri patotypovom zatriedení *E. coli*. Najčastejšie detegované špecifické gény adhérence boli *pap* gény (56 %), kódujúce tvorbu P fimbrií. Tieto fimbrie sú primárne asociované s kmeňmi vyvolávajúcimi pyelonefritidu. Ich prítomnosť svedčí o urinárnom pôvode sepsy [19]. V skupine patotypovo nezatriedených kmeňov sme najčastejšie dokázali prítomnosť fimbrií typu 1 (*fimA*), ktoré sa môžu vyskytovať tak u kmeňov fyziologickej mikroflóry, ako aj u patogénnych kmeňov (96 % výskyt). Tieto kmene však patrili k fylogenetickému skupine B. Podľa literárnych údajov už samotné zaradenie k fylogenetickému skupine B₂ postačuje k uplatneniu *E. coli* v patogentickom procese [20]. Prítomnosť ďalších génov virulencie môže byť pri sepe alternatívna a je ovplyvňovaná rôznymi faktormi, napr. štádiom infekcie. Počet faktorov virulencie bol pri jednotlivých kmeňoch jedinečný, pohyboval sa od jedného do ôsmich. V asociácii s rezistenciou kmeňov proti antibiotikám môže táto skutočnosť ovplyvniť stupeň infekčného procesu a terapeutické možnosti. Aj keď niekoľko kmeňov z nášho súboru mohlo

byť potenciálne toxigénnych, o čom svedčí detekcia génov pre produkciu toxínov (*lt*, *st*, *cnf1*), tieto gény nie sú, podľa autorov Mokady et al [16], rozhodujúce pri rozvoji sepsy. Vyšetované kmene *E. coli*, ktoré boli pôvodcami urosepsy, sme na základe fylogenetického analýzy najčastejšie zatriedili do fylogenetických skupín B₂ a D (53 %, 32 %), ktoré sa vyznačujú najvyššou virulenciou. Zistenie genetického profilu *E. coli* na základe detekcie génov virulencie prispieva k epidemiologickým štúdiám a zisteniu podstaty ich patogentického pôsobenia [21]. Patogénu ovplyvňuje tiež veľkosť infekčnej dávky a lokalizácia infekcie. Naše výsledky rezistencie proti antibakteriálnym látkam korelujú so zisteniami autorov Beerepoot et al [22].

Práca bola riešená s podporou projektu Centrum excelentnosti CEMIO, ITMS: 26220120058 (100 %).

Literatúra

- Wiles TJ, Kulesus RR, Mulvey MA. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp Molec Pathol* 2008; 85(1): 11-19.
- Jadhav S, Hussain A, Devi S et al. Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics* 2008; 9: 560-574.
- Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 2008; 11(1): 142-201.
- Brzuszkiewicz E, Thürmer A, Schuldes J et al. Genome sequence analyses of two isolates from the recent *Escherichia coli* outbreak in Germany reveal the emergence of a new pathotype: Enteroggregative-Haemorrhagic *Escherichia coli* (EAHEC). *Arch Microbiol* 2011; 193(12): 883-889.

- Oliveira FA, Paludo KS, Arend LN et al. Virulence characteristics and antimicrobial susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Genet Mol Res* 2011; 10(4): 4114-4125.
- Li G, Kariyawasam S, Tivendale KA et al. *tkt1*, located on a novel pathogenicity island, is prevalent in avian and human extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *BMC Microbiology* 2012; 12: 51-69.
- Ananias M, Yano T. Serogroups and virulence genotypes of septicaemic *E. coli*. *Brazilian J Med Biol Res* 2008; 41(10): 877-883.
- Kmeťová M, Frankovičová L, Molokáčová M et al. Molekulárno-biologický dôkaz faktorov virulencie a fylogenetických skupín u klinických izolátov *Escherichia coli*. Zborník príspevkov. Využitie experimentálnych metód pri ochrane a podpore zdravia obyvateľstva. Košice 2010: 241-245.
- Siegfried L, Kmeťová M. Role of virulence factors in pathogenesis of *Escherichia coli* infections. *Biologia* 1997; 52(6): 697-705.
- Gudiol C, Calatayud L, Garcia-Vidal C et al. Virulence Plasmid Harbored by Uropathogenic *Escherichia coli* Functions in Acute Stages of Pathogenesis. *Infect Immun* 2010; 78(4): 1457-1467.
- Hilali F, Ruimy R, Saulnier P et al. Prevalence of Virulence Genes and Clonality in *Escherichia coli* Strains That Cause Bacteremia in Cancer Patients. *Infect Immun* 2000; 68(7): 3983-3989.
- Köhler DC, Dobrindt U. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? *Internat J Med Microbiol* 2011; 3(1): 642-647.
- Kmeťová M, Havrišová K, Sabol M et al. *Escherichia coli* strains isolated from patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Biologia* 2005; 60: 717-721.
- Čurová K, Kmeťová M, Sabol M et al. Enterovirulent *E. coli* in inflammatory and noninflammatory bowel diseases. *Folia Microbiol* 2009; 54(1): 81-86.
- Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66(10): 4555-4558.
- Mokady D, Gophna U, Ron E. Virulence factors of septicemic *Escherichia coli* strains. *Internat J Med Microbiol* 2005; 295(6-7): 455-462.
- Worth L, Slavin MA. Bloodstream infections in haematology: Risks and new challenges for prevention. *Blood Reviews* 2009; 23(3): 113-122.
- Jauregui F, Landreau L, Passet V et al. Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics* 2008; 9: 560-574.
- Kmeťová M, Frankovičová L, Molokáčová M et al. Resistance to antibiotics, phylogeny group and virulence genes in *Escherichia coli* isolated from blood in critically diseased patients. 7 th World Congress of the Pediatric Infectious Diseases (WSPID), Melbourne, Australia 2011, 782.
- Cooke NM, Smith SG, Kelleher M et al. Major Differences Exist in Frequencies of Virulence Factors and Multidrug Resistance between Community and Nosocomial *Escherichia coli* Bloodstream Isolates. *J Clin Microbiol* 2010; 48(4): 1099-1104.
- Kmeťová M, Frankovičová L, Hrabovský V et al. Vplyv probiotik na virulenciu *E. coli* izolovaných pri ulceróznej kolitíde. *Správy klin mikrobiol* 2011; XI: 2-10.
- Beerepoot MAJ, den Heijer CDJ, Penders J et al. Predictive value of *Escherichia coli* susceptibility in strains causing asymptomatic bacteriuria for women with recurrent symptomatic urinary tract infections receiving prophylaxis. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18: E84-E90.