PRODUKCIJA HEMOLIZINA I HEMAGLUTINACIJA KOD URINARNIH IZOLATA *ESCHERICHIA COLI*

PRODUCTION OF HEMOLYZIN AND HEMAGGLUTINATION IN URINARY *ESCHERICHIA COLI* ISOLATES

Tatjana Marković, Aleksandra Šmitran, Duško Vasić*, Miroslav Petković

Sažetak. *Escherichia coli* (*E.coli*) je najčešći uzročnik urinarnih infekcija vanbolničkih pacijenata. Cilj rada bio je da se utvrdi produkcija hemolizina i hemaglutinacija, kao faktora virulencije uropatogene *E.coli* (UPEC). Produkcija hemolizina i manosa senzitivna (MSHA) i manosa rezistentna (MRHA) hemaglutinacija ispitivani su kod 200 urinarnih i 50 kontrolnih intestinalnih izolata *E.coli*. Hemolizu na krvnom agaru je pokazalo 80 (40%) urinarnih i 5 (10%) kontrolnih intestinalnih izolata. U ispitivanoj grupi MSHA je pokazalo 39 izolata (19,5%), a MRHA 83 (41,5%). U kontrolnoj grupi MSHA je pokazalo 9 izolata (18%), a MRHA 4 (8%). Nađena je statistički visoko značajna razlika između ispitivane i kontrolne grupe i u produkciji hemolizina ($p < 0,0001$) i u hemaglutinaciji ($p < 0,0001$). Urinarni izolati *E.coli* koji produkuju hemolizin i pokazuju MSHA i MRHA mogu da se smatraju UPEC.

Ključne riječi: *Escherichia coli*, Hemaglutinacija, Bakterijski hemolizini, Urinarne infekcije

Uvod

Najčešći uzročnik urinarnih infekcija kod vanbolničkih pacijenata je *Escherichia coli* (*E.coli*). Žene su podložnije infekcijama, zbog blizine završnog dijela urogenitalnog i intestinalnog trakta. Određeni izolati intestinalne *E.coli*, koji mogu da kolonizuju periuretralnu regiju, da prodru u urinarni trakt i izazovu oboljenje, označeni su kao uropatogeni izolati *E.coli* (UPEC) [1]. Oni raspolažu čitavim spektrom adhezivnih proteina i molekula, koje im omogućavaju adheziju za urinarni epitel i spriječavaju njihovo ispiranje urinom. Serotipizacijom je utvrđeno da se određene serogrupe *E. coli* češće javljaju kod UPEC izolata, pri čemu je dokazano da somatski O antigen, bitan za serotipizaciju, ne doprinosi nastanku oboljenja ili većoj virulenciji.

UPEC serogrupe raspolažu brojnijim i značajnijim faktorima virulencije, koji se mogu koristiti za identifikaciju UPEC izolata, te se na

osnovu njih mogu bez serotipizacije da razlikuju UPEC od ostalih izolata *E.coli* [1,2].

Materijal i metode

Ispitivanjem je obuhvaćeno 200 uzoraka urina, prikupljenih tehnikom srednjeg mlaza, koji su prispjeli u Mikrobiološku laboratoriju Instituta za zaštitu zdravlja Republike Srpske u Banjoj Luci u periodu od 1. jula 2007. do 31. decembra 2008.

Svi uzorci urina su bili zasijani na hromogene podloge CPS-ID 3 (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France) kalibrisanom ezom (10 μ L) za jednokratnu upotrebu prema uputstvu proizvođača. Nakon inkubacije u aerobnim uslovima u trajanju od 24 sata, na temperaturi od 37°C, očitavanje se vršilo prema uputstvu proizvođača. Značajnom bakteriurijom smatrao se broj bakterija od $\geq 10^5$ bakterija u 1 mL urina [3]. Izolati *E.coli* u čistoj kulturi (kolonije bordo boje na CPS-ID 3 podlozi) su

zasijani na duboki hranjivi agar i čuvani na sobnoj temperaturi [1].

Prije daljih ispitivanja, izolati su supkultivisani na krvnom agaru, tokom 16 do 18 časova, u aerobnim uslovima na temperaturi od 37°C. Za ispitivanje fenotipske ekspresije faktora virulencije kontrolnu grupu činilo je 50 izolata *E.coli* intestinalnog porijekla zdravih osoba.

Produkcija α -hemolizina

Test hemolize na krvnom agaru korišćen je za provjeru produkcije α -hemolizina ispitivanih izolata *E.coli*. Ispitivani izolat je zasijan na krvni agar (5% ovčje krvi) i inkubiran na 37°C tokom 24 časa. Pojava zone hemolize oko kolonija ispitivanog izolata označena je kao produkcija α -hemolizina.

Produkcija adhezina

Fenotipska ekspresija adhezina ispitivanih izolata utvrđena je testom hemaglutinacije prema uputstvu Sunanda i sar. [4]. Korišćena je humana krv O krvne grupe. Ispitivani izolati su supkultivisani u peptonskoj vodi na 37°C tokom 24 sata. Eritrociti su isprani fiziološkim rastvorom koji je puferisan fosfatima (pH 7,2), a zatim je pripremljena 3% suspenzija eritrocita u istom rastvoru. Test hemaglutinacije izvođen je u paru na aglutinacionim pločicama. Kap (~50 μ L) suspenzije eritrocita dodana je kapi bakterijske kulture ispitivanog izolata, a u parnom testu dodana je i 2,5% manzoa. Aglutinaciona pločica je rotirana na sobnoj temperaturi tokom 5 minuta. Hemaglutinacija je označena kao MRHA kada se javljala i u prisustvu i u odsustvu manoze, a kao MSHA kada ju je dodavanje manoze inhibiralo.

Dobijeni podaci obrađeni su odgovarajućim statističkim metodama (χ^2 test).

Rezultati

Hemaglutinacija je urađena za 200 ispitivanih urinarnih izolata *E.coli* i 50 kontrolnih intestinalnih izolata. Hemaglutinacija u prisustvu ili odsustvu manoze je utvrđena kod 122 ispitivana izolata (61%), te kod 13 (26%) kontrolnih (tabela 1).

Hemolizu na krvnom agaru je pokazalo 80 (40%) ispitivanih izolata i 5 (10%) kontrolnih intestinalnih izolata (tabela 2).

Od 200 ispitivanih izolata *E.coli* oba faktora (Hly- α i MSHA) virulencije pokazalo je 20 (10%) izolata, a u kontrolnoj grupi nijedan. Hly- α i MRHA pokazalo je 37 (18,5%) ispitivanih izolata, a u kontrolnoj grupi samo jedan izolat.

Tabela 1. Rezultati testa hemaglutinacije ispitivanih izolata *E.coli*

Hemaglutinacija	Urinarni izolati n (%)	Intestinalni izolati n (%)
Hemaglutinišući	122 (61)	13 (26)
MSHA	39 (19,5)	9 (18)
MRHA	83 (41,5)	4 (8)
Nehemaglutinišući	78 (39)	37 (74)
Ukupno	200 (100)	50 (100)

$$\chi^2=23,6; DF=2; P<0,0001$$

MSHA-manoza senzitivna hemaglutinacija;

MRHA-manoza rezistentna hemaglutinacija,

Tabela 2. Produkcija hemolizina ispitivanih izolata *E.coli*

Produkcija hemolizina	Urinarni izolati n (%)	Intestinalni izolati n (%)
Pozitivna	80 (40)	5 (10)
Negativna	120 (60)	45 (90)
Ukupno	200 (100)	50 (100)

$$\chi^2=14,73; DF=1; P<0,0001$$

Rasprava

Uropatogeni izolati *E.coli* imaju niz različitih faktora virulencije kojim se bore protiv odbrambenog odgovora domaćina. Ovi faktori su podijeljeni u tri velike grupe: toksini, faktori adhezije i siderofori.

Izolati *E.coli* luče nekoliko toksina: α -hemolizin (Hly- α), citotoksični nekrotizirajući faktor 1 (CNF-1) i autotransporterne toksine (vakuolizirajući-Vat i sekretujući-Sat). U radu je ispitivano prisustvo α -hemolizina. Hemolizin proizvodi oko 50% UPEC izolata, a njegova ekspresija je povezana sa ozbiljnijom kliničkom slikom kod pacijenata sa urinarnim infekcijama.

U radu je nađena statistički visoko značajna razlika između prisustva hemolizina kod UPEC (40%) u odnosu na intestinalne izolate (5%). Gotovo identične rezultate su dobili Raksha i sar, koji su utvrdili prisustvo hemolizina kod 41,36% UPEC i kod 6% intestinalnih izolata [2]. Kod drugih autora, prisustvo hemolizina je variralo od 16,6% do 41% [5-7].

E.coli ima sposobnost hemaglutinacije u prisustvu i odsustvu manoze. Hemaglutinaciju vrše pili. Postoji nekoliko vrsta pila: tip 1, P, S, F1C i Dr pili. Za izolate *E.coli* sposobne da hemaglutiniraju

eritrocite u prisustvu manoze (MRHA pozitivni) se pretpostavlja da, najvjerovatnije, imaju P pile, ali MRHA može biti posredovana i F1C, S ili Dr pilima [8]. Wullt i sar. su dokazali da P pili povećavaju kolonizaciju urinarnog trakta i olakšavaju uspostavljanje bakteriurije UPEC izolatima za koje se zna da izazivaju asimptomatsku bakteriuriju [9]. Epidemiološke studije pokazuju da su P pili važan faktor virulencije za inicijaciju pijelonefritisa u urinarnom traktu bez anomalija.

U ovdje prikazanom ispitivanju, 41,5% UPEC izolata je imalo P pile. Izolati *E.coli* koji nisu sposobni za hemaglutinaciju u prisustvu manoze (MSHA) imaju na površini tip 1 pila. Tip 1 pila prisutan je kod 19,5% UPEC izolata. Tip 1 pili su od svih adhezina koje proizvode UPEC najzastupljeniji, a smatraju ih najvažnijim faktorom virulencije za uspostavljanje urinarne infekcije. U ispitivanju je potvrđena činjenica da UPEC izolati imaju statistički značajno veći broj pila (61%) na svojoj površini u odnosu na kontrolne intestinalne izolate (26%), što se slaže sa podacima drugih autora [2,5,6].

Utvrđeno je da su Hly geni za kodiranje α -hemolizina često lokalizovani na istom ostrvcu patogenosti (*engl. Pathogenicity Associated Islands, PAIs*) u blizini gena za P pile [10]. U radu je ispitivana hemoliza kao fenotipski indikator prisustva PAI koji, vjerovatno, sadrži i gene za P pile. Od 200 ispitivanih izolata *E.coli* oba faktora, Hly- α i MRHA, pokazalo je 37 (18,5%) ispitivanih izolata, a u kontrolnoj grupi samo jedan soj (2%). S obzirom da su geni za α -hemolizin smješteni na dva PAIs, a na samo jednom od njih su i geni za P pile, za potvrdu prikazanih rezultata neophodno je dokazati prisustvo gena za α -hemolizin i P pile PCR metodom.

Rezultati ovog ispitivanja su u saglasnosti sa tvrdnjama drugih autora da UPEC izolati imaju faktore virulencije koji doprinose njihovoj sposobnosti da opstanu u urinarnom traktu i izazovu oboljenje.

Zaključak

Urinarni izolati *E.coli* su pokazali značajno veću produkciju hemolizina u odnosu na kontrolne intestinalne izolate.

Urinarni izolati *E.coli* su pokazali značajno veći procenat hemaglutinacije u odnosu na kontrolne intestinalne izolate.

Literatura

1. Vagrati MA, Karadesai SG, Patil CS, Metgud SC, Mutnal MB. Haemagglutination and siderophore production as the urovirulence markers of uropathogenic *Escherichia coli*. *Indian J Med Microbiol.* 2008; 26: 68-70.
2. Raksha R, Srinivasa H, Macaden S. Occurrence and characterization uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract infections. *Indian J Med Microbiol.* 2003; 21: 102-7.
3. Škerk V, Tambić-Andrašević A, Andrašević S i sar. Antimikrobno liječenje i profilaksa infekcija mokraćnog sustava odraslih osoba. *Medicus* 2006; 15: 251-6.
4. Sunanda NS, Chhaya AC, Pathak AA. Virulence factors in uropathogenic *E. coli*. *Indian J Pathol Microbiol.* 1999; 42: 321-5.
5. Srikanth NS, Macaden R. Uropathogenic *Escherichia coli* – a preliminary study. *Indian J Med Microbiol.* 2003; 46: 145-6.
6. Mandal P, Kapil A, Goswami K, Das B, Dwivedi SN. Uropathogenic *Escherichia coli* causing urinary tract infections. *Indian J Med Res.* 2001; 114: 207-11.
7. Rizvi M, Kumar S. Serum resistance *Escherichia coli* strains causing urinary tract infection & diarrhea in relation to alpha haemolysin production & O type. *Indian J Pathol Microbiol.* 2003; 46: 504-6.
8. Johnson JR. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev.* 1991; 4: 81-128.
9. Wult B, Bergsten G and Connel H. P fimbriae enhances the early establishment of *Escherichia coli* in human urinary tract. *Mol Microbiol.* 2000; 38: 456-64.
10. Oelschlaeger TA, Dobrindt U, Hacker J. Pathogenicity islands of uropathogenic *E.coli* and the evolution of virulence. *Int J Antimicro Ag.* 2002; 19: 517-21.

Summary. *Escherichia coli* (*E.coli*) is the most frequent agent of urinary infections in the outpatients. The aim of the work was to determine the production of hemolysin and hemagglutination as the virulence factors of uropathogenic *E.coli* (UPEC). Production of hemolysin and mannose-sensitive (MSHA) and mannose-resistant (MRHA) hemagglutination were examined in 200 urinary and 50 control intestinal isolates of *E.coli*. Hemolysis on blood agar was shown by 80 (40%) urinary isolates and 5 (10%) control intestinal isolates. In the examined group, MSHA was shown by 39 isolates (19,5%), and MRHA was shown by 83 isolates (41,5%). In control group, MSHA was shown by 9 isolates (18%), and MRHA was shown by 4 isolates (8%). It was found a statistically highly significant difference between the examined and control group, both in production of hemolysin ($p < 0,0001$) and in hemagglutination ($p < 0,0001$). Urinary isolates of *E.coli* which produce hemolysin and show MSHA and MRHA, may be considered UPEC.

Key words: *Escherichia coli*, Haemagglutination, Bacterial haemolysins, Urinary infections

Tatjana Marković, Aleksandra Šmitran, Miroslav Petković,

Katedra za mikrobiologiju, Medicinski fakultet Banja Luka

*Duško Vasić,

Odjeljenje za urologiju, Opšta bolnica "Sveti apostol Luka", Doboj