

Производња пила, хемолизина и сидерофора код уринарних изолата *Escherichia coli*

Татјана Марковић¹, Александра Шмитран², Мирослав Петковић²

¹Јавна здравствена установа Институт за јавно здравство, Бања Лука, Република Српска;

²Медицински факултет, Универзитет у Бањој Луци, Бања Лука, Република Српска

КРАТАК САДРЖАЈ

Увод *Escherichia coli* (*E. coli*) је најчешћи узрочник инфекција уринарног тракта. Уропатогени изолати *E. coli* (UPEC) производе факторе вируленције који им омогућавају опстанак у уринарном тракту и изазивање инфекције.

Циљ рада Циљ рада је био да се утврди фенотипска карактеризација уропатогене *E. coli* изоловане из мокраће ванболничких пацијената у региону Бање Луке током трогодишњег периода. У складу с циљем истраживања формулисани су следећи задаци: утврђивање производње пила тип 1, P-пила, α-хемолизина и сидерофора.

Методе рада Производња фактора вируленције испитивана је код 417 уринарних и 100 контролних интестиналних изолата *E. coli*. Производња адхезина утврђена је тестом хемаглутинације. Тест хемоллизе на крвном агару коришћен је за проверу производње α-хемолизина, а тестирање производње сидерофора рађено је применом хромасурул-сулфонат агар дифузионог теста.

Резултати У групи уринарних изолата скоро 60% изолата ствара два или три фактора вируленције, а само 3,8% не производи ниједан фактор. У групи интестиналних изолата, чак 43% не производи ниједан фактор вируленције, док један фактор ствара 48%, а два фактора 9% испитаних сојева.

Закључак Уринарни изолати *E. coli* статистички значајно више производе P-пиле, α-хемолизин и сидерофоре у односу на интестиналне изолате ($p < 0,001$). Није утврђена статистички значајна разлика у производњи пила тип 1 између уринарних и интестиналних изолата.

Кључне речи: уропатогена *Escherichia coli*; бактеријски адхезини; хелати гвожђа

УВОД

После респираторних инфекција, инфекције уринарног тракта (ИУТ) су најчешћи узрок посета лекару амбулантно лечених пацијената [1]. *Escherichia coli* (*E. coli*) се изолује као узрочник у 70–95% случајева ових инфекција [2]. Уринарни изолати *E. coli* су развили бројне факторе вируленције и стратегије које им осигуравају раст и опстанак у различитим условима у уринарном тракту домаћина. Ови изолати су названи уропатогеним изолатима *E. coli* (UPEC), а претпоставка је да су то заправо интестинални изолати са додатним генетским материјалом који кодира факторе вируленције неопходне за патогенезу ИУТ [3].

Најзначајнији фактори вируленције су пили тип 1, P-пили, α-хемолизин и сидерофори. Пили омогућавају ефикасну адхезију за епителне ћелије уринарног тракта. P-пили се фенотипски могу доказати маноза-резистентном хемаглутинацијом (MRHA), а пили тип 1 се могу доказати маноза-сензитивном хемаглутинацијом (MSHA) [4]. Алфа-хемолизин омогућава разарање еритроцита и ослобађање гвожђа, те делује цитотоксично на фагоците и епителне ћелије, доводећи до упалног процеса. Сидерофоре су секретујуће молекуле које снабдевају бактерије гвожђем у срединама сиромашним овим металом, као што је мокраћа, чиме

омогућавају тако успешну репликацију бактерија.

ЦИЉ РАДА

Циљ рада је био да се утврди фенотипска карактеризација уропатогене *E. coli* изоловане из мокраће ванболничких пацијената у региону Бање Луке током трогодишњег периода. У складу с циљем истраживања формулисани су следећи задаци: утврђивање производње пила тип 1, P-пила, α-хемолизина и сидерофора.

МЕТОДЕ РАДА

У Микробиолошкој лабораторији Института за заштиту здравља Републике Српске у Бањој Луци током трогодишњег периода (2007–2009. година) значајна бактериурија ($\geq 10^5$ бактерија/ml урина) утврђена је у 4.024 узорка мокраће ванболничких пацијената. Сви узорци мокраће били су засејани на хромогене подлоге CPS-ID 3 (*bioMérieux, Marcy-l'Étoile*, Француска). Од укупно 2.195 изолата идентификованих као *E. coli*, изолованих у чистој култури и знатном броју, методом случајног избора одабрано је 417 изолата за које су испитивани фактори вируленције: фенотипска експресија адхезина

Correspondence to:

Tatjana MARKOVIĆ
Knežopoljska 1/4
78000 Banja Luka
Republika Srpska
marktatjana@gmail.com

и производња хемолизина и сидерофора. За испитивање фенотипске експресије фактора вируленције контролну групу чинило је 100 интестиналних изолата *E. coli* од здравих особа. Нису узимани у обзир понављани узорци пацијената. Узорци мокраће са две врсте бактерија, од којих је једна била *E. coli*, такође нису укључени у испитивање.

За упоређивање учесталости обележја у оквиру групе коришћен је χ^2 -тест сагласности, а за упоређивање између група χ^2 -тест контингенције.

Испитивање производње адхезина

Фенотипска експресија адхезина испитиваних изолата утврђена је извођењем теста хемаглутинације према Сунанди (*Sunanda*) и сарадницима [5]. Коришћена је хумана крв О крвне групе. Испитивани изолати су супкултивисани у пептонској води чија је вредност *pH* била 7,0 (Торлак, Београд, Србија) на 37°C током 24 часа. Суспензија еритроцита (3%) у физиолошком раствору припремљена је након испирања еритроцита у физиолошком раствору пуферисаном фосфатима до вредности *pH* од 7,2. Хемаглутинација је извођена у пару на аглутинационим плочицама. Кап (~50 μ l) суспензије еритроцита је додата капи бактеријске културе испитиваног изолата, а у парном тесту, пре додавања суспензије еритроцита, додата је кап двоипроцентне манозе (*Merck*, Њујорк, САД). Аглутинациона плочица је ротирана на собној температури пет минута, а затим је макроскопски утврђивано постоји ли хемаглутинација. Она је тумачена као *MRHA* (постојање *P*-пила) када се јављала и у присуству и у одсуству манозе, а као *MSHA* (постојање пила тип 1) када ју је додавање манозе инхибирало.

Испитивање производње α -хемолизина

Тест хемолитиса на крвном агару коришћен је за проверу производње α -хемолизина испитиваних изолата *E. coli*. Испитивани изолати су били засејани на крвни агар (Торлак, Београд, Србија) са додатком 5% овчје крви и инкубирани у термостату на 37°C током 18–24 сата. Појава зоне комплетне хемолитиса око колонија испитиваног изолата тумачена је као продукција α -хемолизина.

Испитивање производње сидерофора

Тестирање производње сидерофора рађено је приликом хромазуол-сулфонат агар дифузионог теста (енгл. *chrome azurol sulfonate agar diffusion assay* – *CASAD*) према Вагралију (*Vagralli*) [6]. *CASAD* тест се заснива на принципу диск-дифузионог теста, при чему сидерофоре из јамица у агару дифундују радијално стварајући градијент концентрације. Гвожђе које је претходно било везано за хромазуол-сулфонат везују сидерофоре које стварају испитивани изолати. Ово доводи до промене боје агара из плаве у наранџасту

око јамица са суспензијом изолата који производи сидерофоре.

Испитивани изолати су засејани у храњиви бујон (*Difco*, Њујорк, САД) и инкубирани у термостату на 37°C током 24 сата. Изолати су супкултивисани у храњиви бујон десфералом (*Novartis*, Базел, Швајцарска), који је двоструко серијски разблажен, почевши од 2,5 *mM*, и поново инкубирани у термостату на 37°C током 24 сата. Културе испитиваних изолата су центрифугиране на 4000 \times g пет минута. Супернатант бујонске културе испитиваног изолата и десферала у укупној количини од 100 μ l инокулисан је у јамице на *CAS* агару. Бујон без десферала је коришћен као негативна контрола.

Након инкубације подлоге у термостату на 37°C током 4–8 часова, промена боје агара из плаве у наранџасту око јамице са суспензијом испитиваног изолата сматрала се позитивном реакцијом.

РЕЗУЛТАТИ

У раду је испитивана фенотипска карактеризација уропатогене *E. coli* утврђивањем производње пила тип 1, *P*-пила, α -хемолизина и сидерофора. У табели 1 приказана је учесталост испитиваних фактора вируленције у експерименталној (уринарни изолати) и контролној (интестинални изолати) групи. Производња α -хемолизина и сидерофора, те *MRHA* (*P*-пили) су у статистички значајно већем броју утврђени код уринарних изолата *E. coli* у односу на интестиналне изолате ($p < 0,001$). Статистички значајна разлика није утврђена када је у питању *MSHA* (пили тип 1) између уринарних и интестиналних изолата.

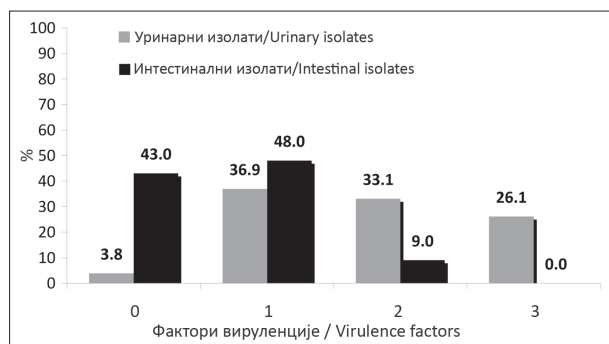
Поређење производње фактора вируленције испитиваних уринарних и интестиналних изолата приказано је на графикону 1. У групи интестиналних изолата чак 43% није производило ниједан фактор вируленције. У групи уринарних изолата само 3,84% није производило ниједан фактор вируленције, а готово 60% изолата стварало је два или три фактора вируленције. Ове разлике су биле статистички високо значајне ($\chi^2 = 153,538$; $df = 3$; $p < 0,001$).

Фенотипска експресија појединачних фактора вируленције испитиваних изолата *E. coli* код којих је утврђен само један испитивани фактор вируленције приказана

Табела 1. Уринарни и интестинални изолати који производе факторе вируленције

Table 1. Urinary and intestinal isolates producing the virulence factors

Фактори вируленције Virulence factors	Број изолата (%) Number of isolates (%)	
	Уринарни Urinary	Интестинални Intestinal
Пили тип 1 Type 1 pili	82 (19.7)	22 (22.0)
<i>P</i> -пили <i>P</i> -pili	153 (36.7)	6 (6.0)
α -хемолизин α -hemolysin	139 (33.3)	14 (14.0)
Сидерофоре Siderophores	383 (91.8)	24 (24.0)



Графикон 1. Поређење производње фактора вируленције уринарних и интестиналних изолата

Graph 1. Comparison of the virulence factors production among the urinary and intestinal isolates

Табела 2. Фенотипска експресија појединачних фактора вируленције изолата *E. coli* код којих је утврђен само један фактор вируленције

Table 2. Phenotype expression of the individual virulence factors of *E. coli* isolates in which only one virulence factor was present

Фактори вируленције Virulence factors	Број изолата (%) Number of isolates (%)	
	Уринарни Urinary	Интестинални Intestinal
Пили тип 1 Type 1 pili	1 (0.7)	15 (31.3)
<i>P</i> -пили P-pili	9 (5.8)	4 (8.3)
α -хемолизин α -hemolysin	0 (0.0)	12 (25.0)
Сидерофоре Siderophores	144 (93.5)	17 (35.4)
Укупно Total	154 (100.0)	48 (100.0)

је у табели 2. Најчешћи појединачни фактор вируленције изолата *UPEC* био је производња сидерофора, која је забележена код чак 93,5% изолата (144 од 154). У групи интестиналних изолата се подједнако често јављају производња сидерофора и *MSHA* (око 30%), а α -хемолизин производи 25% интестиналних изолата. Ове разлике у стварању појединачних фактора вируленције између уринарних и интестиналних изолата биле су статистички високо значајне ($\chi^2=97,607$; $df=3$; $p<0,001$).

У табели 3 је приказана расподела удружених фактора вируленције код испитиваних изолата код којих је утврђена производња два фактора вируленције. Од укупно 138 уринарних изолата који производе два фактора вируленције, 66 (47,8%) истовремено производе сидерофоре и даје *MRHA*, 42 (30,4%) истовремено производе сидерофоре и даје *MSHA*, 22 (15,9%) производе α -хемолизин и сидерофоре, док само осам изолата (5,8%) ствара α -хемолизин и даје *MRHA*. Производња α -хемолизина и *MSHA* у комбинацији није забележена ни код једног изолата. У групи испитиваних уринарних изолата утврђена је статистички високо значајна разлика између удруженог појављивања појединих фактора вируленције ($\chi^2=103,594$; $df=4$; $p<0,001$). У групи интестиналних изолата само девет изолата дало је истовремено два фактора вируленције, што је недовољан број да би се обезбедила поузданост статистичког испитивања разлика.

Табела 3. Расподела удружених фактора вируленције изолата *E. coli* код којих је утврђена производња два фактора вируленције

Table 3. Distribution of the associated virulence factors in *E. coli* isolates in which two virulence factors were present

Фактори вируленције Virulence factors	Број изолата (%) Number of isolates (%)	
	Уринарни Urinary	Интестинални Intestinal
α -хемолизин, пили тип 1 α -hemolysin, type 1 pili	0 (0.0)	0 (0.0)
α -хемолизин, <i>P</i> -пили α -hemolysin, P-pili	8 (5.8)	2 (22.2)
α -хемолизин, сидерофоре α -hemolysin, siderophores	22 (15.9)	0 (0.0)
Пили тип 1, сидерофоре Type 1 pili, siderophores	42 (30.4)	7 (77.8)
<i>P</i> -пили, сидерофоре P-pili, siderophores	66 (47.8)	0 (0.0)
Укупно Total	138 (100.0)	9 (100.0)

Табела 4. Расподела удружених фактора вируленције изолата *E. coli* код којих је утврђена производња три фактора вируленције

Table 4. Distribution of the associated virulence factors in *E. coli* isolates in which three virulence factors were present

Фактори вируленције Virulence factors	Број изолата (%) Number of isolates (%)	
	Уринарни Urinary	Интестинални Intestinal
α -хемолизин, пили тип 1, сидерофоре α -hemolysin, type 1 pili, siderophores	39 (35.8)	0 (0.0)
α -хемолизин, <i>P</i> -пили, сидерофоре α -hemolysin, P-pili, siderophores	70 (64.2)	0 (0.0)
Укупно Total	109 (100.0)	0 (0.0)

У табели 4 приказана је расподела удружених фактора вируленције код испитиваних изолата код којих је утврђена производња три фактора вируленције. Од укупно 109 уринарних изолата који производе сва три фактора вируленције, 70 (64,2%) ствара α -хемолизин, сидерофоре и даје *MRHA*, а 39 (35,7%) производи α -хемолизин, сидерофоре и даје *MSHA*. Ова разлика међу уринарним изолатима била је статистички високо значајна ($\chi^2=8,817$; $df=1$; $p=0,003$). У групи интестиналних изолата ниједан испитивани изолат *E. coli* није истовремено производио три фактора вируленције.

ДИСКУСИЈА

Постојање фактора вируленције код изолата *UPEC* потврђује везу између *UPEC* и патогенезе ИУТ. У овом истраживању је потврђено да су испитивани фактори вируленције знатно чешћи у групи уринарних изолата у односу на контролну групу интестиналних изолата *E. coli*.

Први корак у патогенези ИУТ свакако представљају адхеренција *UPEC* за уринарни епител и последична колонизација. Изолати *UPEC* експримирају већи број површинских структура, названих пили или фимбрије, као и адхезивних молекула, којима се везују за различите рецепторе на епителним ћелијама уринар-

ног тракта. Два најчешћа и највише проучавана типа адхезивних органа изолата *UPEC* су *P*-пили и пили тип 1. *P*-пили су првобитно били препознати по својој способности да аглутинишу хумане еритроците крвне групе О у присуству манозе и изазивају *MRHA*, за разлику од пила тип 1, који изазивају *MSHA* [7].

Експресија пила тип 1 и *P*-пила је међусобно генетски условљена и инверзно регулисана, а зависи од услова околине и потреба бактерија. Гени који кодирају синтезу пила тип 1 смештени су у оквиру оперона *fim*, а гени за експресију *P*-пила налазе се на оперону *pap*. Експресију *P*-пила кодира ген *papB*, који делује као корегулаторни ген, те истовремено инхибира ген *fimB*, а активира ген *fimE*, што заједно доводи до инхибиције експресије пила тип 1 [8, 9]. Ова фазна варијација – дакле, промена експресије једне врсте пила у односу на друге – подразумева да бактерија на својој површини може имати или *P*-пиле или пила тип 1. Ова регулација гена изгледа да је у вези с патогенезом јер омогућава *E. coli* секвенционалну колонизацију различитих делова уринарног тракта. Наиме, доказано је да су пили тип 1 битни за успостављање почетне адхеренције за епителне ћелије доњег дела уринарног тракта [10], док су *P*-пили важан фактор вируленције за иницијацију пијелонефритиса [11, 12, 13], стога оба типа пила играју важну улогу у преживљавању *UPEC* и патогенези, најпре у колонизацији, а затим у инвазији ћелија уринарног тракта.

У нашем истраживању доказана је фенотипска експресија *P*-пила код 36,7% уринарних изолата *E. coli*, а пила тип 1 код 19,7% изолата. У објављеним студијама уочава се разлика у добијеним резултатима који се односе на учесталост експресије пила тип 1 код изолата *UPEC*. Резултати неких истраживања говоре о значајној експресији пила тип 1 код пијелонефритиса, циститиса и интестиналних изолата, док резултати других говоре о подједнакој експресији и код циститиса и код пијелонефритиса [14, 15]. Групе испитаника укључених у различите студије нису хомогене, а разликују се и методе култивисања испитиваних изолата *E. coli*, што су врло вероватно фактори који утичу на варирање резултата. Фазна варијација са *P*-пилима могла би бити одговорна за различиту производњу пила тип 1 између *E. coli* изолованих код циститиса и пијелонефритиса, као и за варирање резултата између студија.

У нашем истраживању није утврђена статистички значајна разлика у производњи пила тип 1 између уринарних (19,7%) и интестиналних (22%) изолата. И други аутори добили су сличне резултате [16, 17, 18]. Иако су пили тип 1 подједнако заступљени и код комензалних и код изолата *UPEC*, сматра се да између те две групе изолата постоје алелске варијације *fimH* у афинитету везивања за гликопротеинске рецепторе за мономанозу и триманозу. Наиме, код изолата *UPEC* доминира мономаноза-везујући фенотип, који обезбеђује већи тропизам за гликопротеинске рецепторе на уроепителним ћелијама и омогућава колонизацију уротракта бактеријама [16].

P-пили су били статистички значајно чешће експримирани код уропатогених (36,7%) у односу на интести-

налне изолате (6%). Многе студије су потврдиле овакве резултате [16, 18, 19].

Алфа-хемолизин је цитотоксин који се јавља код око 50% изолата који изазивају инфекције горњег и 30% изолата који изазивају инфекције доњег дела уринарног тракта, као и код 10% комензалних интестиналних изолата [20]. Поред лизе еритроцита и хуманих бубрежних епителних ћелија, α-хемолизин је токсичан за многе ћелије јер доводи до запаљења, оштећења ткива и ометања функције фагоцита. Алфа-хемолизин се сматра битним фактором вируленције код изолата *UPEC* који изазивају инфекције горњег дела уринарног тракта, као што је пијелонефритис [4]. У нашем раду је α-хемолизин производило 33% уринарних изолата, што је у складу с наведеним подацима и чињеницом да су наши изолати узрочници инфекција доњег дела уринарног тракта. Производња α-хемолзина је утврђена код 14% интестиналних изолата, што је слично подацима других аутора (2–16%) [16, 17, 21].

Док траје инфекција, смањује се концентрација гвожђа доступна бактеријама смањењем апсорпције из црева и унутарћелијским смештањем слободног гвожђа [22]. Бактерије се против овога боре тако што стварају цитотоксичне супстанце, попут хемолзина, који лизом еритроцита ослобађа гвожђе, и производњом сидерофора. Сидерофоре су секретујуће молекуле мале молекуларне масе с врло високим афинитетом за фери-јоне, које омогућавају бактеријама преузимање гвожђа када се бактерије нађу у средини с ниским концентрацијом овога метала, као што је мокраћа или серум. Изолати *UPEC* производе аеробактин и ентерохелин. Доказано је да је производња аеробактина уско повезана с пијелонефритисом, циститисом и бактеријемиијом, за разлику од асимптоматске бактериурије и интестиналних изолата [4]. Гени који кодирају производњу сидерофора могу се налазити на хромозому, када су удружени са генима за друге факторе вируленције, или на плазмиду, са генима за мултиплу резистенцију. Готово сви изолати (91,9%) у нашем раду су стварали сидерофоре, што је у складу с резултатима других аутора [23, 24].

Значај постојања различитих фактора вируленције је потврђује и податак из нашег рада који каже да у групи интестиналних изолата више од 90% изолата не производи више од једног фактора вируленције (чак 43% ниједан фактор вируленције), док у групи уринарних изолата само 3,84% изолата не производи ниједан фактор вируленције, а готово 60% ствара два или три таква фактора. Ови резултати су у складу с истраживањима других аутора [17, 25, 26]. Значајно већа учесталост испитиваних фактора вируленције код уринарних изолата у односу на интестиналне упућује на то да различити фактори вируленције делују синергијски у изазивању ИУТ.

Многи фактори вируленције су кодирани флексибилним генетским елементима који нису присутни код непатогених изолата *E. coli*. Ови мобилни региони ДНК су названи „острва удружена с патогеношћу“ (енгл. *pathogenicity-associated islands* – *PAI*). *PAI* се стичу хоризонталним преносом гена. Генетска информација

за исту фенотипску одлику може се истовремено наћи на више од једног PAI (нпр. PAI I и PAI II *E. coli* 536 кодирају производњу α -хемолизина) [27]. Неки аутори су ишли корак даље, па су показали применом молекуларних метода да су се одређене секвенце једног истог PAI чешће налазиле код изолата који су изазвали само циститис, док су друге секвенце биле чешће код изолата који су изазвали само пијелонефритис, а трећи тип секвенци код оних изолата који су изазвали и циститис и пијелонефритис [28]. Оваква различита учесталост одређених секвенци једног истог PAI међу изолатима *E. coli* који изазивају ИУТ могла би бити узрок различитих клиничких исхода. Услед недостатка молекуларних метода којима бисмо код испитиваних изолата открили ове генске локусе, у овом раду смо настојали да фенотипски утврдимо који фактори вируленције се најчешће јављају удружено. Код изолата UPEC са два фактора вируленције установљено је да се најчешће јављају комбинација сидерофора и P-пила, те сидерофора и пила тип 1. Код изолата UPEC који су производили сва три фактора вируленције утврђено је да је већи број изолата (64,2%) стварао α -хемолизин, сидерофоре и P-пиле, а мањи број (35,7%) α -хемолизин, сидерофоре и пиле тип 1. У нама доступној литератури нису пронађени радови аутора који су се бавили фенотипском карактеризацијом UPEC утврђивањем производње управо ових фактора вируленције (пила тип 1, P-пила, α -хемолизина и сидерофора), па самим тим ни њиховим удруженим појављивањем.

ЛИТЕРАТУРА

- Najar MS, Saldanha CL, Bandy KA. Approach to urinary tract infections. *Indian J Nephrol.* 2009; 19(4):129-39.
- Kucheria R, Dasgupta P, Sacks SH, Khan MS, Sheerin NS. Urinary tract infections: new insights into a common problem. *Postgrad Med J.* 2005; 81(952):83-6.
- Ranjan KP, Ranjan N, Chakraborty A, Arora DR. An approach to uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract infections. *J Lab Physicians.* 2010; 2(2):70-3.
- Johnson JR. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev.* 1991; 4:81-128.
- Sunanda NS, Chaya AC, Pathak AA. Virulence factors in uropathogenic *E. coli*. *Indian J Pathol Microbiol.* 1999; 42(3):321-5.
- Vagrli MA. Siderophore production by uropathogenic *Escherichia coli*. *Indian J Pathol Microbiol.* 2009; 52(1):126-7.
- Salyers AA, Whitt DD. *Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach.* Washington, DC: ASM Press; 2002. p.247-262.
- Xia Y, Gally DL, Forsmann-Semb K, Uhlin BE. Regulatory cross-talk between adhesion operons in *Escherichia coli*: inhibition of type 1 fimbriae expression by the papB protein. *EMBO J.* 2000; 19:1450-7.
- Holden NJ, Uhlin BE, Gally DL. PapB paralogues and their effect on the phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 2001; 42(2):319-30.
- Martinez JJ, Mulvey MA, Schilling JD, Pinkner JS, Hultgren SJ. Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *EMBO J.* 2000; 19(12):2803-12.
- Snyder JA, Haugen BJ, Lockatell CV, Maroncle N, Hagan EC, Johnson DE, et al. Coordinate expression of fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 2005; 73(11):7588-96.
- Holden NJ, Totsika M, Mahler E, Roe AJ, Catherwood K, Lindner K, et al. Demonstration of regulatory cross-talk between P fimbriae and type 1 fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology.* 2006; 152(Pt 4):1143-53.
- Nowrouzian FL, Adlerberth I, Wold AE. P fimbriae, capsule and aerobactin characterize colonic resident *Escherichia coli*. *Epidemiol Infect.* 2001; 126:11-8.
- Gunther IV NW, Lockatell V, Johnson DE, Mobley HLT. In vivo dynamics of type 1 fimbria regulation in uropathogenic *Escherichia coli* during experimental urinary tract infection. *Infect Immun.* 2001; 69:2838-46.
- Abraham SN, Shin JS, Malaviya R. Type 1 fimbriated *Escherichia coli*-Mast cell interactions in cystitis. *J Infect Dis.* 2001; 183(Suppl 1): S51-5.
- Katouli M, Vollmerhausen TL. Population structure of gut *Escherichia coli* and its role in development of extra-intestinal infections. *Iranian J Microbiol.* 2010; 2(2):59-72.
- Jadhav S, Hussain A, Devi S, Kumar A, Parveen S, Gandham N, et al. Virulence characteristics and genetic affinities of multiple drug resistant uropathogenic *Escherichia coli* from a semi urban locality in India. *PLoS One.* 2011; 6(3):e18063.
- Najar GA, Nejad MM, Mansouri S. The comparison between virulence factors of *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections and fecal flora. *Res Pharm Sci.* 2007; 1(2):99-103.
- Jacobsen SM, Stickler DJ, Mobley HL, Shirliff ME. Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clin Microbiol Rev.* 2008; 21(1):26-59.
- Slavchev G, Pisareva E, Markova N. Virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *J Cult Collect.* 2009; 6:3-9.
- Kausar Y, Chunchanur SK, Nadagir SD, Halesh LH, Chandrasekhar MR. Virulence factors, serotypes and antimicrobial susceptibility pattern of *Escherichia coli* in urinary tract infections. *Al Ameen J Med Sci.* 2009; 2(1):47-51.
- Litwin CM, Calderwood SB. Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin Microbiol Rev.* 1993; 6(2):137-49.
- Vagrli 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(1):68-70.

Утврђивање PAI код UPEC применом молекуларних метода омогућило би откривање UPEC патотипова и помогла у препознавању нових циљних места за терапијско деловање. Ово би уједно могао бити предмет неког будућег истраживања.

ЗАКЉУЧАК

Уринарни изолати *E. coli* статистички значајно чешће експримирају P-пиле у односу на интестиналне изолате, док у фенотипској експресији пила тип 1 није уочена статистички значајна разлика између уринарних и интестиналних изолата. Уринарни изолати статистички значајно чешће производе α -хемолизин и сидерофоре у односу на интестиналне изолате. Такође, чешће истовремено стварају α -хемолизин, сидерофоре и P-пиле, а ређе α -хемолизин, сидерофоре и пиле тип 1. Код уринарних изолата код којих није доказан ниједан испитивани фактор вируленције вероватно постоје други фактори удружени с острвом патогености.

НАПОМЕНА

Рај део магистарске тезе првоименованог аутора под називом „Фактори вируленције и осјетљивост на антимикробне лијекове уринарних изолата *Escherichia coli*“.

24. 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.
25. Johnson JR. Microbial virulence determinants and the pathogenesis of urinary tract infection. *Infect Dis Clin North Am.* 2003; 17(2):261-71.
26. Raksha R, Srinivasa H, Macaden RS. Occurrence and characterization of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract infections. *Indian J Med Microbiol.* 2003; 21(2):102-7.
27. Ritter A, Blum G, Emödy L, Kerényi M, Böck A, Neuhierl B, et al. tRNA genes and pathogenicity islands: influence on virulence and metabolic properties of uropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 1995; 17(1):109-21.
28. Rasko DA, Philips JA, Li X, Mobley HL. Identification of DNA sequences from a second pathogenicity island of uropathogenic *Escherichia coli* CFT073: probes specific for uropathogenic population. *J Infect Dis.* 2001; 184(8):1041-9.

Production of Pili, Hemolysin and Siderophores in the Urinary Isolates of *Escherichia Coli*

Tatjana Marković¹, Aleksandra Šmitran², Miroslav Petković²

¹Public Health Institute, Banja Luka, Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina;

²Faculty of Medicine, University of Banja Luka, Banja Luka, Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina

SUMMARY

Introduction *Escherichia coli* (*E. coli*) are the most frequent cause of the urinary tract infections. Uropathogenic *E. coli* (UPEC) produce virulence factors which enable them to survive in the urinary tract and cause an infection.

Objective The objective of this study was to determine phenotype characterization of *E. coli* isolated from outpatients' urine in the region of Banja Luka over three-year period. In line with the objective, the following research tasks were set up: determining the production of type 1 fimbriae, P-pili, α -hemolysin and siderophores.

Methods A total of 417 urinary isolates and 100 control intestinal isolates were screened for virulence factors. Production of adhesions was confirmed by haemagglutination test. Plate haemolysis test was done for the detection of α -hemolysin, and

siderophores production assay was carried out by using the method named chrome azurol sulfonate agar diffusion assay.

Results In the group of urinary isolates, almost 60% of isolates produced two or three virulence factors; only 3.8% produced none of the virulence factors. In the group of intestinal isolates, even 43% of isolates produced none of the virulence factors while 48% of isolates produced a single virulence factor and 9% produced two virulence factors.

Conclusion Urinary isolates *E. coli* express significantly more P-pili, α -hemolysin and siderophore than intestinal isolates ($p < 0.001$). There was no significant difference in production of type 1 fimbriae among the urinary and intestinal isolates.

Keywords: uropathogenic *Escherichia coli*; bacterial adhesions; iron chelating agents

Примљен • Received: 04/06/2012

Прихваћен • Accepted: 28/08/2012