

СУДАЛГАА, ШИНЖИЛГЭЭ

БИОАНАГААХ

Шээсний замын халдвар үүсгэгч *Escherichia coli*-ийн адгезийн хоруу шинжийг илрүүлсэн дүн

Я.Мөнхдэлгэр¹, С.Даваасүрэн¹, Б.Долгоржав², А.Гэрэлээ³,
Р.Оюунчимэг³, Ж.Сарантуяа¹

¹АШУҮИС, ²Шастины нэрэмжит улсын гуравдугаар төв эмнэлэг, ³Улсын нэгдүгээр төв эмнэлэг
E-mail: munkhdelger@hsum-ac.mn

The detection of adherence factors by *Escherichia coli* cause of urinary tract infections in Ulaanbaatar, Mongolia

Munkhdelger.Ya¹, Davaasuren.S¹, Dolgorjav.B², Gerelee.A³,
Oyunchimeg.R³, Sarantuya.J¹

¹MNUMS, ²State Third Central Hospital, ³State First Central Hospital
E-mail: munkhdelger@hsum-ac.mn

Introduction

Urinary tract infections among the most common bacterial infectious diseases encountered at all ages. *Escherichia coli* are being the etiologic agent in 50–80%. Therefore, it is an important public health problem. *E.coli* causing urinary tract infections express pili, fimbriae and others adherence virulence factors.

Goal

To detect the some adherence virulence factors of *Uropathogenic Escherichia coli (UPEC)* in Ulaanbaatar, Mongolia

Materials and Methods

A total of 76 *E.coli* samples were collected. These samples were positive bacteriological examination of urine, performed at the bacteriological laboratory of the State Central Third Hospital and State Central First Hospital, Ulaanbaatar, Mongolia. The biofilm formation was evaluated by the growth rate of *E.coli* on plastic surface. The detection of the virulence factors type 1 fimbriae (*fimA* gene) and P-fimbriae (*papC*) was performed by multiplex PCR using gene specific primers. Curli expression was determined by using congo red agar.

Results

The evaluation of bacterial biofilm formation using 96 well plates showed 40 negative (52.6%), 32 weak biofilm (42.1%) and 4 moderate biofilm (5.3%) formation for *E.coli* and no strong biofilm forming strain was detected. The cell surface protein (curli) was detected by Congo red agar. The result was 71% positive for studied *E.coli* strains. The detection result of pili genes by multiplex PCR showed that *fimH* gene detected for 73 (96.1%) and *papC* gene detected for 18 (23.7%) *E.coli* cultures.

Conclusion: Almost half of surveyed *Uropathogenic E.coli* isolated in Ulaanbaatar, Mongolia had ability of biofilm formation and it has been determined by the bacterial surface protein (*curli*), which is one of bacterial adherence factors, may cause biofilm formation.

Keywords: biofilm formation, cell surface protein (*curli*), *UPEC (uropathogenic E.coli)*
Pp. 5-8, Table 1, Figures 3, References 14

Үндэслэл:

Хүний хэвийн бичил биетэн *E.coli* нь гадны хүчин зүйлийн үйлчлэлээр байршлаа сэлгэвэл нөхцөлт эмгэг төрөгч шинж чанартай болно.

Нөхцөлт эмгэгтөрөгч шинжтэй *E.coli* шээс ялгаруулах эрхтэний эд эсийг эмгэгшүүлэх шинж чанартай болсноор илэрч буй өвчнийг *E.coli*-ийн шалтгаант оппортунист халдвар гэдэг.¹

Шээсний замын халдвар үүсгэгч *E. coli* (UPEC) нь цистит, нефрит зэрэг шээсний замын халдвар (ШЗХ)-ын анхдагч шалтгаан болдог бөгөөд ШЗХ-ын 70–95%-ийг үүсгэдэг.² ШЗХ нь бүх насны хүнд, өндөр хувьтай тохиолддог халдварт өвчин юм.^{3,4} Насанд хүрсэн эмэгтэйчүүдийн 40-50%, эрэгтэйчүүдийн 20% орчим нь цистит, нефрит болон бактериуригаар өвддөг ба хүн амын нас хүйснээс хамаараад тодорхой хувь нь шинж тэмдэггүй бактериуриболж байдаг.^{5,6} АНУ-д жил бүр *E.coli*-аар үүсгэгдсэн ШЗХ 6-7 сая бүртгэгддэг.⁷

UPEC нь шээсний замын хучуур эсэд Р болон type 1 сормуус, эсийн гадаргуугийн уураг гэх мэт адгезийн эрхтэнцэрүүдийн тусламжтайгаар холбогдон биофильмийг үүсгэж, үрэвслийн урвалыг өрнүүлдэг.² Нянууд нь хоруу чанарын олон хүчин зүйлүүдийн тусламжтайгаар эсийн гадаргууд адгези болж өөр хоорондоо холбогдон эсийн гаднах матриксийн полимерийг нийлэгжүүлэн гадаргууд бүрхүүл үүсгэх үйл явцыг биофильм гэнэ.⁸ Нянууд нь биофильм үүсгэснээрээ антибиотик тэсвэрт чанар нь 10-1000 дахин нэмэгдэж нянгийн эсрэг антибиотик эмчилгээ үр дүн муутай болдог байна.^{2,9}

Зорилго: Шээсний замын халдвар үүсгэгч *E.coli*-ийн зарим адгезийн хоруу чанарын хүчин зүйлийг илрүүлэх

Материал, арга зүй:

УНТЭ болон Шастины нэрэмжит улсын гуравдугаар төв эмнэлгийн нян судлалын лабораторт 2013 оны 11 сараас 2014 оны 2 сарын хугацаанд хийгдсэн шээсний ариун чанар тодорхойлох шинжилгээгээр илэрсэн 76 *E.coli*-ийн өсгөврийг цуглуулсан.

Биофильм үүсгэхэд оролцдог эсийн гадаргуугийн уургийг (*curli*) илрүүлэхдээ конго улаан будаг болон сахарозыг нэмэлтээр агуулсан тархи-зүрхний шөл бүхий тэжээлт орчин бэлтгэн нянг тарьж өсгөвөрлөн колонийг хүрээлэн тод хар өнгө өгснийг эерэг гэж үнэлэв.⁸

Нянгийн хуванцар гадаргууд адгези болж биофильм үүсгэх шинжийг тодорхойлохдоо 96 хоногтой, хавтгай ёроолтой, бичил урвалын самбарт 0,45%-ийн глюкоз бүхий DMEM агуулсан орчинд нянгийн булингаас хийж 18-24 цагийн турш 37°C хэмд өсгөвөрлөн 0,5%-ийн кристал виолетоор будаад ELISA аппаратад уншуулж дүгнэсэн.¹⁰

E.coli нянгийн ДНХ-г халааж буцалгах аргаар ялгаж *fimH* F:TGCAGAACGGATAAGCCGTGG, R:GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA; *papC* F:GTGGCAGTATGAGTAATGACCCGTTA, R:ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA дараалал бүхий өвөрмөц праймеруудыг (COSMO GENETECH) ашиглан 508 х.н (*fimH*) болон 200 х.н (*papC*) урттай хэрчмүүдийг дараах нөхцлөөр олшрууллаа (Table 1).¹¹

Table 1. Condition of Multiplex PCR

	Temperature	Time	Total cycle
	94	5 min	
Denaturation	94	1 min	35 cycle
Annealing	60	1 min	
Extension	72	2 min	
	72	10 min	

Үр дүн:

96 худагтай хавтгай ёроолт тавгийг ашиглан нянгийн биофильм үүсгэх шинжийг үнэлэхдээ сорьц тус бүрийг тус бүр 3 худагт хийж дундаж утгыг тооцон сөрөг хяналттай харьцуулан үнэлсэн. Сөрөг хяналт бүхий 3 худагны дундаж утгыг ($OD_{mean\ negative}$) тооцон стандарт хазайлтыг (SD) нэмж босго хэмжээг тооцоход 0,12 байлаа. Нянгийн биофильм үүсгэх шинжийг Сөрөг <0.12, Бага биофильм 0.12-0.24, Дунд биофильм 0.24-0.48, Хүчтэй биофильм >0.48 гэж үнэлэв (Table 2).

Table 2. Biofilm formation in Uropathogenic *E.coli*

Biofilm formation	OD	<i>E.coli</i> (UPEC)	
Negative	<0.12	40	52,6%
Weak	0.12-0.24	32	42,1%
Moderate	0.24-0.48	4	5,3%
Total		76	100%

Шинжилгээгээр шээсний замын халдвар үүсгэгч *E.coli* (76)-ийн 40 (52.6%) сөрөг, 32 (42.1%) бага зэргийн биофильм үүсгэх идэвхитэй, 4 (5.3%) дунд зэргийн биофильм үүсгэх чадвартай байсан бөгөөд хүчтэй биофильм үүсгэх шинжтэй нян илэрсэнгүй.

Эсийн гадаргуугийн утаслаг уураг (*curli*)–ийг илрүүлэхдээ Конго улаан агар бэлтгэн өсгөврөө өсгөвөрлөж хар өнгө өгснийг эерэг, өнгө өөрчлөгдөөгүй бол сөрөг (зураг 1) гэж үнэлэхэд ШЗХ үүсгэгч *E.coli* нянгийн 54 (71%) нь эсийн гадаргуугийн утаслаг уураг (*curli*) эерэг, 22 (29%) нь сөрөг байна.

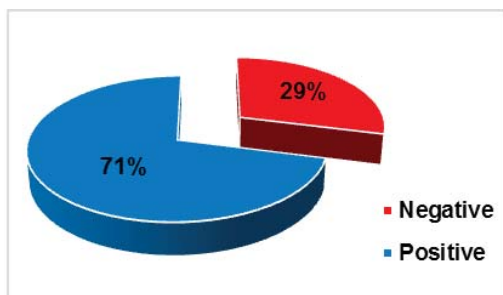


Figure 1. Detection of curli fiber

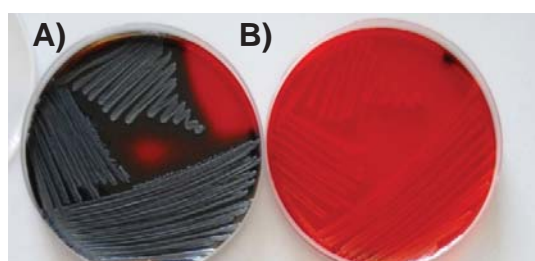


Figure 2. The investigation of the biofilm production by the Congo Red agar
A) positive B) negative

Биофильм шинж эерэг (40) тодорхойлогдсон нийт нянгийн 80%-д эсийн гадаргуугийн утаслаг уураг (*curli*) илэрч байсан бөгөөд энэ нь биофильм үүсгэх шинжтэй хамааралтай байна ($p=0,04$).

E.coli нянгийн хамгийн өндөр хувьтай тодорхойлогддог *typeI* сормуусыг кодлогч *fimH*, *PAP* сормуусыг кодлогч *rapC* генүүдийг мультиплекс ПГУ–аар олшруулж, олширсон бүтээгдэхүүнийг 1.5%-ийн гель ашиглан хэвтээ гелийн электрофорезийн аппаратад 135V 30 минутгүйлгэж *UVI* микроскопт зургийг авч тодорхойлсон.



Figure 3. Agarose gel-electrophoresis of Multiplex PCR. *Sm*-size marker, *nc*-negative control, 2643-2684 samples.

E.coli нянгийн *fimH*, *rapC* генүүдийг мультиплекс ПГУ–аар илрүүлэхэд *fimH* ген 73(96,1%), *rapC* ген 18(23,7%) сорьцонд эерэг илэрсэн. Биофильм шинж эерэг (40) тодорхойлогдсон нийт нянгийн 95%-д *fimH*, 25%-д *rapC* ген илэрсэн бөгөөд *E.coli* нянгийн *fimH*, *rapC* генүүд эерэг байх нь биофильм үүсгэх шинжтэй хамааралгүй байна ($p=0,645$; $p=0,746$).

Хэлцэмж:

Эмнэлгээс шалтгаалах халдвар нь дэлхий дахинд эрүүл мэндийн салбарт тулгамдсан асуудлын нэг болж байгаа ч манай оронд 1998-2007 оны хооронд эмнэлгээс шалтгаалах халдварын нийт 2141 тохиолдол (нийт хэвтэн эмчлүүлэгчдийн 0.02%) бүртгэгдсэн нь бодит байдалтай үл нийцсэн тоо билээ. Энэ тоо баримт нь манай оронд уг нянгийн халдварын тархалт бага байгаа бус уг халдварыг илрүүлэх, оношлох, бүртгэх, тандалт мэдээллийн тогтолцоо сул байгааг харуулж байна.¹² Бид манай оронд тохиолдож буй шээсний ариун чанар тодорхойлох шинжилгээнд эерэг тодорхойлогдсон *E.coli*-ийг цуглуулж биофильм үүсгэх шинжийг үнэлэхэд 48% эерэг тодорхойлогдсон нь *Niveditha.S* (2012) Hancock. V (2007) нарын судалгааны дүнтэй ойролцоо байгаа юм.^{6,8}

Шээсний замын халдвар үүсгэгч *E.coli*-ийн хоруу чанарын хүчин зүйлүүдийг кодолсон генүүдийг энгийн болон мультиплекс ПГУ–аар илрүүлэх шинжилгээ болон судалгаанууд дэлхий дахинд хийгдсээр байна. Хэдийгээр бусад улс орнуудад ихээр хийгдсэн судалгаа боловч манай орны хувьд хийгдэж байгаагүй учраас эмнэл зүйн сорьцноос илэрч байгаа *E.coli*-ийн хоруу чанар ямар байгаа, аль филогенетик бүлгийн болох, ямар хэв шинж нь их тархалттай байгаа зэрэг олон асуудлууд тодорхойгүй байна.

Бид *E.coli* нянгийн хамгийн өндөр хувьтай тодорхойлогддог *type I* сормуусыг кодлогч *fimH*, *PAP* сормуусыг кодлогч *rapC* генүүдийг мультиплекс ПГУ–аар олшруулж илрүүлэхэд *fimH* ген 96,1%, *rapC* ген 23,7% сорьцонд эерэг байсан бол MounaTarghouina (2013)³ болон Ki WookYun (2013)¹³ нарын судалгаагаар *fimH* ген 83%, 96.9%; *rapC* ген 20%, 3,1%-д тустус илэрсэн байна. Эдгээр сормуусны тусламжтайгаар нян эсийн гадаргууд адгези болохыг халдварын эхний шат гэж үздэг. Бидний судалгаагаар *E.coli* нянгийн *fimH*, *rapC* генүүд эерэг байх нь биофильм үүсгэх шинжтэй хамааралгүй байгаа нь магадгүй судалгаанд хамруулсан сорьцны тоо харьцангуй цөөн байгаатай холбоотой байж магадгүй юм. Сүүлийн үед *E.coli* нянгийн

эдгээр сормуусны эсрэг үйлчлэх механизмтай байхаар шээсний замын халдвараас сэргийлэх анхны вакциныг гаргахэмнэл зүйн туршилт судалгаанууд ч хийгдэж байна.¹⁴

Дүгнэлт:

Судалгаанд хамруулсан ШЗХ үүсгэгч *E.coli*-ийн тал хувь нь биофильм үүсгэх чадвартай байсан бөгөөд нянгийн адгезийн хүчин зүйлийн нэг болох эсийн гадаргуугийн утаслаг уураг (*curli*) нь биофильм үүсгэхэд оролцож байгаа нь тодорхойлогдов.

Ном зүй:

1. Johnson JR. Virulence factors in Escherichia coli urinary tract infection. *Clinical microbiology reviews*. Jan 1991;4(1):80-128.
2. Wiles TJ, Kulesus RR, Mulvey MA. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic Escherichia coli. *Experimental and molecular pathology*. Aug 2008;85(1):11-19.
3. Tarchouna M, Ferjani A, Ben-Selma W, Boukadida J. Distribution of uropathogenic virulence genes in Escherichia coli isolated from patients with urinary tract infection. *Int J Infect Dis*. Jun 2013;17(6):e450-453.
4. Nazemi A, Mirinargasi M, Merikhi N, Sharifi SH. Distribution of Pathogenic Genes *aatA*, *aap*, *aggR*, among Uropathogenic Escherichia coli (UPEC) and Their Linkage with *StbA* Gene. *Indian J Microbiol*. Jul 2011;51(3):355-358.
5. Mabbett AN, Ulett GC, Watts RE, et al. Virulence properties of asymptomatic bacteriuria Escherichia coli. *International journal of medical microbiology : IJMM*. Jan 2009;299(1):53-63.
6. Hancock V, Ferrieres L, Klemm P. Biofilm formation by asymptomatic and virulent urinary tract infectious Escherichia coli strains. *FEMS Microbiol Lett*. Feb 2007;267(1):30-37.
7. Reuter BM. *Cloning and mutational analysis of the FimB promoters in uropathogenic escherichia coli*, University of WISCONSIN-LA CROSSE; 2012: 3-4
8. Niveditha S, Pramodhini S, Umadevi S, Kumar S, Stephen S. The Isolation and the Biofilm Formation of Uropathogens in the Patients with Catheter Associated Urinary Tract Infections (UTIs). *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*. Nov 2012;6(9):1478-1482.
9. Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in microbiology*. Jan 2001;9(1):34-39.
10. Wakimoto N, Nishi J, Sheikh J, et al. Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for enteroaggregative Escherichia coli. *Am J Trop Med Hyg*. Nov 2004;71(5):687-690.
11. Johnson JR, Stell AL. Extended virulence genotypes of Escherichia coli strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *The Journal of infectious diseases*. Jan 2000;181(1):261-272.
12. Дашиймаа Л, Мөнхтуяа Ш, Хосбаярт, Гэлэгжамц Х, Малчинхүү Ч. Хүүхдийн пиелонефрит өвчний шалтгаан, эмнэл зүй болон үүсгэгчийн антибиотикт даслын судалгаа. *Монголын анагаах ухаан*. 2010;3(153)
13. Yun KW, Kim HY, Park HK, Kim W, Lim IS. Virulence factors of uropathogenic Escherichia coli of urinary tract infections and asymptomatic bacteriuria in children. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi*. Sep 21 2013.
14. Johnson JR, Russo TA. Extraintestinal pathogenic Escherichia coli: "the other bad E coli". *The Journal of laboratory and clinical medicine*. Mar 2002;139(3):155-162.

Танилцаж, нийтлэх санал өгсөн:
Академич П.Нямдаваа