

İshalli Hastalarda Patojenik *Escherichia coli* Kökenlerinin Araştırılması*

Investigation of Pathogenic *Escherichia coli* Strains in Patients with Diarrhea

Gülten AYDIN TUTAK¹, Hamdi Murat TUĞRUL²

¹ Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Bölümü, İstanbul.

¹ Okmeydanı Training and Research Hospital, Department of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Istanbul, Turkey.

² Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Edirne.

² Trakya University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Edirne, Turkey.

* Bu çalışma, XIII. International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology (6-10 Eylül 2011, Sappora, Japonya) Kongresinde poster olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 15.09.2014 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 30.12.2014

ÖZ

Escherichia coli'nin bazı serogrup ve serotiplerinin gastroenterit etiyolojisindeki rolü her geçen gün daha iyi anlaşılmaktadır. Patojen *E.coli* kökenlerini normal bağırsak flora elemanlarından ayıran virülans faktörlerinin tespiti, hastalığın tanı ve tedavisi açısından önem taşımaktadır. Bu çalışmada, gastroenterite yol açan *E.coli* kökenlerinin serotiplendirilmesi ve virülans genlerinin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, Şubat-Ekim 2009 tarihleri arasında Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Sağlık Araştırma ve Uygulama Hastanesi kliniklerine ishal şikayeti ile başvuran hastalardan alınarak Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen sulu, kanlı veya mukuslu 202 dışkı örneği dahil edilmiştir. Örneklerde baskın olarak üreyen ve konvansiyonel yöntemlerle tanımlanan toplam 254 *E.coli* kökeni, enteropatojenik *E.coli* (EPEC), enterotoksijenik *E.coli* (ETEC) ve enteroinvazif *E.coli* (EIEC)'ye ait O serogruplarını içeren 6 adet polivalan antiserum kullanılarak lam aglütinasyonu (LA) ile taranmıştır. Serolojik yöntemle pozitif sonuç veren örnekler ile kontrol olarak negatifler arasında haritalama metodu ile seçilen aynı sayıda dışkı örneği, EPEC, ETEC ve EIEC'ye ait virülans genlerinin varlığı açısından konvansiyonel PCR yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışmamızda, örneklerin %14.3'ü (29/202) LA ile serogruplandırılmış; bunların 13 (%6.4)'ü EPEC, 11 (%5.4)'i EIEC ve 5 (%2.4)'i ETEC olarak tanımlanmıştır. Monovalan antiserumlar ile EPEC serogrubundaki beş bakterinin tiplendirilmesi yapılabilmiş ve bu kökenlerin O1 serogrubunda olduğu tespit edilmiştir. Serogruplandırılan 29 patojen *E.coli*'den 3 (%10.3)'ünde diyarejenik suşlara ait virülans genleri saptanmıştır. Bir izolat EPEC'e ait *eaeA* geni pozitif bulunmasına rağmen, *bfpA* ve *stx* geni içermediğinden atipik EPEC olarak tanımlanmıştır.

İletişim (Correspondence): Uzm. Dr. Gülten Aydın Tutak, Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Bölümü, 34384 Şişli, İstanbul, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 212 221 7777, **E-posta (E-mail):** gltutak59@yahoo.com

Diğer iki örnekten birinde ETEC'e ait *estA* geni, diğerinde ise EIEC'e ait *ial* geni pozitif bulunmuştur. EPEC olarak sero gruplandırılan bir kökenin PCR ile ETEC'e ait *estA* genini taşıdığı gösterilmiştir. Polivalan antiserumlarla negatif sonuç veren 29 kontrol suşunun hiçbirisinde virülans geni saptanmamıştır. Sonuç olarak, patojen *E.coli* kökenlerinin tanımlanmasında sero gruplandırma ve klasik PCR yöntemlerinin benzer sonuçları vermediği izlenmiştir; bu amaçla çok merkezli ve çok sayıda örneğin standardize yöntemlerle incelendiği ileri çalışmalara gereksinim olduğu kanısına varılmıştır.

Anahtar sözcükler: İshal; patojenik *Escherichia coli*; serotiplendirme; virülans genleri; PCR.

ABSTRACT

The role of certain serogroups and serotypes of *Escherichia coli* in the etiology of gastroenteritis is increasingly appreciated. It is important to detect the virulence factors of diarrheagenic *E.coli* strains that differentiate them from nonpathogenic members of normal intestinal flora for the diagnosis and treatment. The aims of this study were to determine the serotypes of *E.coli* isolates that cause gastroenteritis and to investigate the presence of virulence genes by polymerase chain reaction (PCR). A total of 202 watery, bloody or mucoid stool samples sent to microbiology laboratory collected from patients with diarrhea who were admitted to outpatient clinics of Trakya University Health Research and Application Hospital between February to October 2009, were included in the study. A total of 254 predominantly grown *E.coli* strains have been isolated and identified with conventional methods from the cultures of those 202 samples. All strains were tested by slide agglutination (SA) that includes 6 units of O serogroups polyvalent antisera of enteropathogenic *E.coli* (EPEC), enterotoxigenic *E.coli* (ETEC) and enteroinvasive *E.coli* (EIEC). The samples which yielded positive results with SA test and the same number of negative samples selected with mapping method as controls were studied for the presence of virulence genes belonging EPEC, ETEC and EIEC by conventional PCR. In the study, 14.3% (29/202) of the samples were serogrouped with SA, of them 13 (6.4%) were identified as EPEC, 11 (5.4%) as EIEC and five (2.4%) as ETEC. Only five isolates belonging to EPEC serogroup could be defined by monovalent antiserum and they were all in O1 serogroup. Out of 29 pathogenic *E.coli* serotyped, 3 (10.3%) of them harbored the virulence genes of diarrheagenic strains. One sample which was positive for *eaeA* gene of EPEC, did not harbor *bfpA* and *stx* genes and was defined as atypical EPEC. Out of other two samples, one was positive for *estA* gene of ETEC and the other one for *ial* gene of EIEC. One strain serotyped as EPEC detected to carry *estA* gene of ETEC with PCR. All of the 29 control isolates that give negative results with polyvalent antisera were also negative for the presence of virulence genes. In conclusion, since serotyping and conventional PCR methods did not reveal similar results for the identification of pathogenic *E.coli*, multicenter and large-scaled studies performed with standardized methods are needed.

Keywords: Diarrhea; pathogenic *Escherichia coli*; serotyping; virulence genes; PCR.

GİRİŞ

İshal oluşturan (diarrheagenic) *Escherichia coli* dünya genelinde endemik ve epidemik ishali önemli nedenlerindendir¹. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda ishale neden olan altı farklı *E.coli* serotipi tanımlanmıştır. Bunlar; Shiga toksini üreten *E.coli* (STEC) [ya da verotoksijenik *E.coli* (VTEC)], enteropatojenik *E.coli* (EPEC), enterotoksijenik *E.coli* (ETEC), enteroinvazif *E.coli* (EIEC), enteroagregatif *E.coli* (EAEC) ve difüz aderan *E.coli* (DAEC) olarak sayılabilir^{1,2}.

İshalli bir olguda, başka bir patojen etken saptanmaması halinde izole edilen *E.coli*'nin normal flora üyelerinden farklı olarak patojen olup olmadığının belirlenmesi tanı ve teda-

vi açısından önemlidir³. *E.coli*'nin birbirinden farklı klinik tablolara yol açan ve bir dizi özgün virülans faktörü taşıyan patojen tipleri mevcuttur. Her bir patojen tipte yer alan *E.coli* kökenlerinin serogrupları o tipe özgüdür^{4,5}. Bu amaçla birçok laboratuvar da tercih edilen tanı yöntemi serotip tayinidir. Belli bazı serotiplerin diyarejenik *E.coli* kökenleri ile sıkı korelasyonunun olduğu gösterilmiş olsa da, bir *E.coli* suşunun ishal etkeni olduğunu kesin olarak söyleyebilmek için organizmanın virülans faktörlerinin gösterilmesi gereklidir. Bu nedenle *E.coli*'nin virülans faktörünün tayini, diyarejenik *E.coli*'nin ishal etkeni olarak tanımlanmasında giderek artan güvenilir bir laboratuvar yöntemi halini almıştır⁶. Virülans faktörlerini içeren genler; EPEC'te *eae* (effacing and attaching gene) ve *bfpA* (bundle forming pilus gene), ETEC'te *eltB* (labile toxin gene) ve *estA* (stabil toxin gene), EHEC'te *stx1* ve *stx2* (Shiga toxin genes) ve EIEC'de *ial* (invasion associated locus) genleridir. Günümüzde bu özgün virülans genlerinin varlığını tespit eden birçok moleküler yöntem kullanılmakla birlikte, bunlardan bazıları henüz rutin kullanıma uygun değildir^{7,8}.

Ülkemizde ishale neden olan patojen *E.coli*'lerin prevalansı ve önemi konusundaki veriler sınırlı olup, bu suşların tanımlanması tedaviye önemli katkılar sağlayacaktır. Bu çalışmada, gastroenterite yol açan *E.coli* suşlarının serotiplendirilmesi ve virülans genlerinin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi (Hastanesi), Merkez Laboratuvarı Mikrobiyoloji Bölümü Laboratuvarına, Şubat-Ekim 2009 tarihleri arasında, çeşitli kliniklere ishal şikayeti ile başvuran, farklı yaş gruplarındaki hastalardan dışkı kültürü istemi ile gönderilen, sulu, kanlı, mukuslu ve EMB agarda baskın *E.coli* üremesi olan 202 dışkı örneği alındı. Rutin testlerle *Salmonella*, *Shigella*, rotavirus ve adenovirus pozitifliği saptanan örnekler çalışma dışı bırakıldı. Dışkı örneklerinden izole edilen *E.coli* suşları konvansiyonel yöntemlerle tanımlandı; tanımlamada güçlük çekilen kolonilerde VITEK-2 cihazı ve VITEK-2 GN tanımlama kartı (BioMérieux, Fransa) kullanıldı⁹.

Serogruplandırma için izolatlar nutrient agar ve beyin-kalp infüzyon buyyonu (Brain-heart infusion broth) besiyerlerinde üretildi. Tüm suşlar, EPEC, ETEC ve EIEC'e ait O serogruplarını içeren 6 adet polivalan antiserum (Denka Seiken, Japonya) kullanılarak lam aglütinasyonu ile test edildi. Polivalan antiserumlarla pozitif sonuç veren örnekler aynı gruptaki mevcut monovalan antiserumlar (Statens Serum Institut, Danimarka) ile çalışıldı. Lam aglütinasyonunda pozitif bulunan örnekler ile haritalama metodu ile seçilen aynı sayıdaki negatif örnek (kontrol grubu), klasik PCR ile EPEC, ETEC ve EIEC'e ait virülans genleri açısından tarandı.

PCR için DNA izolasyonu, nutrient agarda taze olarak üretilmiş kolonilerden High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, ABD) kullanılarak üreticinin önerilerine göre yapıldı. EPEC'in tanımlanması için *eaeA*, *bfpA* ve *stx* primerleri, ETEC'in tanımlanması için *estA* ve *eltB* primerleri ve EIEC'in tanımlanması için *ial* primeri kullanıldı¹⁰.

İstatistiksel analiz ki-kare önemlilik testi ve Kolmogrov-Smirnov iki örnek testi ile yapıldı; $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

Tablo 1. *E.coli* Suşlarında Serogrup ve Virülans Genlerinin Dağılımı.

Serogrup	Sayı (%) ^a	Virülans geni						Sayı (%) ^b
		<i>eaeA</i>	<i>bfpA</i>	<i>estA</i>	<i>eltB</i>	<i>ial</i>	<i>stx</i>	
EPEC	13 (6.4)	+	-	-	-	-	-	1 ^c (3.4)
ETEC	5 (2.4)	-	-	+	-	-	-	1 ^d (3.4)
EIEC	11 (5.4)	-	-	-	-	+	-	1 (3.4)
Toplam	29 (14.3)							3 (10.3)

^a Yüzdeler, toplam suş sayısına (n= 202) göre alınmıştır.
^b Yüzdeler, serogruplandırılan suş sayısına (n= 29) göre alınmıştır.
^c Bu suş, *eaeA* pozitif iken *bfpA* negatif olduğundan atipik EPEC olarak tanımlanmıştır.
^d Bu suşun serogrubu EPEC'tir.

BULGULAR

Çalışmamızda, toplam 9 aylık süre içinde 1318 dışkı kültürü örneğinden seçilen 202 örnek değerlendirmeye alınmış; bu örneklerden toplam 254 *E.coli* kökeni izole edilmiştir. Örneklerden izole edilen *E.coli* suşlarının 29 (29/202; %14.3)'ü polivalan antiserumlarla pozitif reaksiyon vermiştir. Serogruplandırmada bunların 13 (%6.4)'ü EPEC, 11 (%5.4)'i EIEC, 5 (%2.4)'i ise ETEC olarak tanımlanmıştır. Monovalan antiserumlar ile EPEC serogrubundaki 5 bakterinin tiplendirilmesi yapılabilmiş ve bu kökenlerin O1 serogrubunda olduğu tespit edilmiştir.

Serogruplandırılan 29 patojenik *E.coli* suşundan 3 (%10.3)'ünde PCR ile virülans genlerinin varlığı saptanmıştır (Tablo 1). Çalışmada, *eaeA* geni pozitif olan bir EPEC örneği, *bfpA* ve *stx* geni içermediğinden atipik EPEC olarak tanımlanmış; EPEC olarak serogruplandırılan bir kökenin ise ETEC'e ait *estA* geni taşıdığı saptandığından, bu köken ETEC olarak kabul edilmiştir. Polivalan antiserumlarla negatif sonuç veren 29 kontrol suşunun hiçbirisinde virülans geni saptanmamıştır.

TARTIŞMA

Patojenik *E.coli* suşlarının tanımlanmasında serolojik ve moleküler yöntemlerin karşılaştırıldığı çalışmalarda, diyarejenik izolatların tespitinde serolojik testlerin yanlış pozitif sonuç verdiği belirtilmektedir^{9,11}. Örneğin Taiwan'da yapılan bir çalışmada, 261 *E.coli* kökeninin 137'si serogruplandırılmış, bunlardan sadece 15 (%10.9)'i PCR ile patojen köken olarak tespit edilmiştir⁹. Japonya'da yapılmış bir diğer çalışmada da, lam aglütinasyonu ile ishale neden olduğu tespit edilen *E.coli* izolatlarının %17.5'inde moleküler yöntemlerle pozitiflik elde edildiği bildirilmiştir¹¹. Serolojik testlerin duyarlılık ve özgüllüğünün düşüklüğüne karşın, virülans genlerinin PCR ile gösterilmesi tanıdaki duyarlılığı oldukça artırmıştır¹². Ancak ishale neden olan *E.coli* serogrupları zaman içinde değişebileceğinden, epidemiyolojik araştırmalar için moleküler çalışmaların yanı sıra serogruplamanın yapılması da gereklidir. Serotiplendirme ile birlikte moleküler taramanın kullanıldığı yurdumuzda muhtemelen ilk olan bu çalışmada, 202 *E.coli* kökeninin serotiplendirme ile 29 (%14.3)'ünün diyarejenik *E.coli* olduğu gösterilmiş; bunların sadece 3 (%10.3)'ünde PCR ile virülans

genleri saptanmıştır (Tablo I). Virülans genlerinin incelendiği PCR çalışmalarında şüpheli *E.coli* kolonilerinin seçimi konusunda önemli farklar vardır. Bu konuda bir standardizasyonun olmaması prevalans çalışmalarında önemli farklılıklara neden olmaktadır. Nitekim ülkemizde, serotiplendirme ile yapılan epidemiyolojik çalışmalarda diyarejenik etken olarak *E.coli* prevalansının %0.2-21 arasında olduğu ifade edilmektedir¹³. Çalışmalardan elde edilen farklı izolasyon oranları, kullanılan yöntemlere bağlı olabileceği gibi, belli bölgelerde, belli bir süre içindeki salgınları da işaret ediyor olabilir.

Duyarlılık ve özgüllüğünün yüksek olması ve konvansiyonel PCR'ye göre rutin çalışmalar için daha uygun olması nedeniyle, patojenik *E.coli* suşlarının tanısında multipleks PCR (M-PCR) yönteminin kullanılması önerilmektedir¹⁴. Buna karşın, M-PCR ile amplifiye edilen sırasıyla 376 ve 367 baz çifti (bç) boyutundaki *eae* ve *bfpA* genleri ile, sırasıyla 322 ve 320 bç boyutundaki *eltB* ve *ial* gen parçalarının büyüklüklerinin birbirine çok yakın olması nedeniyle, sonuçların klasik PCR kullanılarak doğrulanması gerektiği de vurgulanmaktadır¹⁴. Chen ve arkadaşları¹⁵ ise yaptıkları çalışmada, diyarejenik *E.coli*'nin tanısında klasik PCR ile karşılaştırıldığında M-PCR'nin özgüllüğünün %100, duyarlılığının %99 olduğunu bildirmişlerdir. Flora bakterileri ile patojen *E.coli*'lerin ayrılmasındaki güçlükler nedeniyle, PCR çalışmalarında en azından dört laktoz pozitif ve iki laktoz negatif koloninin çalışmaya alınması veya en az 10 koloni içeren bir sürüntünün petri kutusundan seçilmesinin patojen bakterilerin yakalanma olasılığını artıracığı söylenebilir^{9,14}. İshal yapan *E.coli*'lerin tanımlanmasında daha önce yapılmış çalışmalar incelendiğinde, bu konuda halen bir standardın olmadığı görülmektedir. Bu nedenle patojen *E.coli*'lerin ishaller hastalıklar içindeki gerçek yerinin belirlenmesi için çok merkezli ve çok sayıda örneğin incelendiği standardize çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca rutin laboratuvarlarda kullanılabilecek, kolay uygulanabilir bir yöntemin geliştirilmesi için daha ileri araştırmaların yapılması gereklidir.

KAYNAKLAR

1. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 1998; 11(1): 142-201.
2. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS (eds). Gastrointestinal tract infections, pp: 873-90. In: Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 2007, 12th ed. Mosby Elsevier, Philadelphia.
3. Pickering LK, Cleary TG. Approach to patients with gastrointestinal tract infections and food poisoning, pp: 567-601. In: Feigin RD, Cherry JD (eds), Textbook of Pediatric Infectious Diseases. 1998, 4th ed. W.B Saunders Co., Philadelphia.
4. Orskov F, Orskov I. Serotyping of *Escherichia coli*, pp: 43-112. In: Bergan T (ed), Methods in Microbiology. Vol: 14, 1984. Academic Press Inc., London.
5. Campos LC, Franzolin MR, Trabulsi LR. Diarrheagenic *Escherichia coli* categories among the traditional enteropathogenic *E.coli* O serogroups--a review. Mem Inst Oswaldo Cruz 2004; 99(6): 545-52.
6. Öngen B. *E.coli* ishallerinin laboratuvar tanısı. ANKEM 2008; 22(Ek 2): 197-210.
7. Aranda KR, Fagundes-Neto U, Scaletsky IC. Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. J Clin Microbiol 2004; 42(12): 5849-53.
8. Persson S, Olsen KE, Scheutz F, Krogfelt KA, Gerner-Smidt P. A method for fast and simple detection of major diarrhoeagenic *Escherichia coli* in the routine diagnostic laboratory. Clin Microbiol Infect 2007; 13(5): 516-24.

9. Yang JR, Wu FT, Tsai JL, et al. Comparison between O serotyping method and multiplex real-time PCR to identify diarrheagenic *Escherichia coli* in Taiwan. *J Clin Microbiol* 2007; 45(11): 3620-5
10. Svenungsson B, Lagergren A, Ekwäl E, et al. Enteropathogens in adult patients with diarrhea and healthy control subjects: a 1-year prospective study in a Swedish clinic for infectious diseases. *Clin Infect Dis* 2000; 30(5): 770-8.
11. Nishikawa Y, Zhou Z, Hase A, et al. Diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from stools of sporadic cases of diarrheal illness in Osaka City, Japan between 1997 and 2000: prevalence of enteroaggregative *E.coli* heat-stable enterotoxin 1 gene-possessing *E.coli*. *Jpn J Infect Dis* 2002; 55(6): 183-90.
12. Kozub-Witkowski E, Krause G, Frankel G, Kramer D, Appel B, Beutin L. Serotypes and virotypes of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains from stool samples of children with diarrhoea in Germany. *J Appl Microbiol* 2008; 104(2): 403-10.
13. Willke A. *Escherichia coli* ishallerinde etyoloji ve patogenezi. *ANKEM* 2008; 22(Ek 2): 188-91.
14. Aranda KR, Fabbrocetti SH, Fagundes-Neto U, Scaletsky IC. Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in Brazilian children. *FEMS Microbiol Lett* 2007; 267(2): 145-50.
15. Chen Q, Shi X, Li Y, et al. Rapid genetic typing of diarrheagenic *Escherichia coli* using a two-tube modified molecular beacon based multiplex real-time PCR assay and its clinical application. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2014; 13: 30.