

WPŁYW TEMPERATURY NA PRZEŻYWAŁNOŚĆ, WŁAŚCIWOŚCI FENOTYPOWE I ANTYGENOWE SZCZEPÓW *ESCHERICHIA COLI* O157 WYIZOLOWANYCH Z WODY I MATERIAŁU KLINICZNEGO

THE INFLUENCE OF TEMPERATURE ON SURVIVAL, PHENOTYPE AND ANTYPHEN PROPERTIES OF *ESCHERICHIA COLI* O157 STRAINS ISOLATED FROM WATER AND CLINICAL MATERIAL

Małgorzata Michalska-Szymaszek

Wojewódzka Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna w Rzeszowie
Oddział Laboratoryjny w Tarnobrzegu

Słowa kluczowe: przeżywalność, temperatura, właściwości fenotypowe i genotypowe, *E. coli* O157
Key words: survival, temperature, phenotype and genotype properties, *E. coli* O157

STRESZCZENIE

W badaniach określono przeżywalność szczepów *E. coli* O157 (*SF*-fermentujących sorbitol i *NSF* – nie fermentujących sorbitolu) w sterylnych próbkach wody powierzchniowej. Próbki wody były dodatkowo zakażone innymi bakteriami stanowiącymi mikroflorę towarzyszącą. Próbki wody były badane w temperaturze 5°C i 25°C w stabilnych warunkach laboratoryjnych i w warunkach środowiskowych. Wyniki badań wykazały zmiany właściwości fenotypowych i antygenowych badanych szczepów. Zmiany te utrudniają identyfikację i izolację *E. coli* O157 z wód powierzchniowych zawierających mieszaną mikroflorę towarzyszącą. Szczepy *E. coli* O157 obecne w wodzie stanowią zagrożenie dla człowieka kąpiącego się w tych wodach. Ryzyko dla zdrowia wynika z obecności czynników wirulencji w komórkach tych bakterii, które po pewnym czasie przebywania w wodzie są jednak częściowo traczone.

ABSTRACT

In this research I evaluated *E. coli* O157 strains' (*SF*-sorbitolfermenting and *NSF* – non sorbitolfermenting) ability to survive in samples of surface waters. These samples were additionally contaminated with other strains, used as background microflora. These water samples were stored in the temperature 5°C i 25°C in laboratory and environmental conditions. The results of the research show changes of phenotype and antigen properties of *E. coli* O157 strains during research. These changes make it difficult to isolate *E. coli* O157 strains from natural water with numerous background microflora. These strains in surface water are threat for humans, who swim such waters in the summer. The threat results from toxic virulent factors staying for a short period of time in bacterial cells, which are lost in water.

WSTĘP

W ostatnich latach z powodu zmiany trybu życia ludzi w krajach uprzemysłowionych, infekcje spowodowane przez *E. coli* O157 są przyczyną chorób często ze śmiertelnym przebiegiem. Porządek życia, międzynarodowa turystyka, wysoko rozwinięte rolnictwo, zmieniające się technologie przygotowywania środków spożywczych, przyzwyczajenia żywieniowe („fast-food”) mają wpływ na tworzenie niszy nowego

czynnika chorobowego. Najbardziej toksyczny i zagrażający życiu człowieka jest serotyp *E. coli* O157:H7. Szczep izolowano podczas licznych epidemii w Stanach Zjednoczonych [15]. Od czasu rozpoznania patogenu (tj. roku 1982) odnotowano ponad 30 epidemii w USA, epidemie spowodowane były głównie konsumpcją żywności skażonej tym szczepem bakteryjnym.

Dane statystyczne pokazują, iż zachorowania pojawiają się głównie w okresie ciepłych miesięcy. W tym bowiem czasie zwierzęta stanowiące główny

Adres do korespondencji: Małgorzata Michalska-Szymaszek, Wojewódzka Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna w Rzeszowie, Oddział Laboratoryjny w Tarnobrzegu, Laboratorium Diagnostyki Medycznej, 39-400 Tarnobrzeg, ul.1-go Maja 5, tel. 015 82 34 410 wew. 134, fax 015 8234452, e-mail: gogo29@wp.pl

rezerwuar zarazka tj: bydło i owce, wykazują wysoki stopień wydzielania bakterii *E. coli* O157 [6, 9, 10, 13].

Częstość izolacji *E. coli* O157 od zwierząt stanowiących rezerwuar bakterii, czy od ludzi albo z próbek żywnościowych jest niewielki. Z badań przeprowadzonych przez Moses i wsp.[24] wynika, że z kału osób chorych, z odchodów bydła, z wody, z żywności (łącznie liczba próbek 440) wyizolowano 4% szczepów zidentyfikowanych jako *E. coli* O157. Były to szczepy w 72% nie fermentujące sorbitolu (NSF), a 16,7% było non-mobile (nie ruchliwe) [24]. Dodatkowo cytowani autorzy wykryli 27,8% sorbitolo fermentujących (SF) szczepów *E. coli* O157, co sugeruje, że wśród *E. coli* O157 są szczepy posiadające zdolność fermentacji sorbitolu.

W Europie Środkowej, w takich krajach jak Niemcy, Czechy, Finlandia odnotowano epidemie, których czynnikiem epidemicznym jest nietypowy szczep serogrupy *E. coli* O157, a mianowicie szczep fermentujący sorbitol (SF) [2, 4, 12, 20].

Szczep SF *E. coli* O157:H został po raz pierwszy rozpoznany w roku 1988 podczas wybuchu epidemii HUS (zespół hemolityczno-mocznicowy) w Bawarii, w Niemczech [19].

W ostatnich latach frekwencja izolacji szczepów sorbitolo (+) zwiększyła się zwłaszcza w Europie Środkowej. Izolacja szczepów SF *E. coli* O157 od osób z biegunką, z HUS sugeruje zdolność tych nietypowych szczepów do wirulencji (zjadliwości) [2, 5, 19, 20, 26].

E. coli O157 z wody była po raz pierwszy wyizolowana w roku 1986. Latem 1991 roku pojawiły się zachorowania wywołane przez *E. coli* O157 u dzieci kąpiących się w jeziorze zanieczyszczonym fekaliami [14]. Dawka infekcyjna w zakażeniach *E. coli* O157 określana jest jako bardzo niska. Dowodem są epidemie pojawiające się na przykład po kąpeli w wodzie basenowej (zbiornik o dużej objętości) zawierającej ten czynnik chorobotwórczy. Po kąpeli w jeziorach skażonych *E. coli* O157 38% osób spośród wszystkich pływających miało biegunki wodniste i krwiste [1].

Do osób (z grupy ryzyka) najbardziej narażonych na zachorowanie zalicza się: dzieci poniżej 10 roku życia, ludzi starszych (>60 lat), kobiety ciężarne, osoby z osłabioną odpornością, osoby pracujące w obszarach rolniczych kontaktujące się ze zwierzętami i osoby pracujące w masarniach.

Patogenność szczepów *E. coli* O157 związana jest z występowaniem kilku czynników wirulencji: do których należy m.in. intimina – białko zewnątrz błonowe, kodowane przez chromosomalny gen *eae*. Gen ten znajduje się w chromosomalnym locus LEE, który dodatkowo zawiera geny dla systemu wydzielania typu III oraz dla białek sekrecyjnych – Esp (EspA, EspB, EspD) i receptora Tir (receptora translokowanej intiminy) [10, 21]. Dodatkowo na wirulencję szczepów wpływają

produkty genów: *hlyA* dla hemolizyny oraz *stx*₁ i *stx*₂ dla werotoksyn [7, 18, 25, 27].

Od czasu pojawienia się epidemii, której czynnikiem epidemicznym był szczep *E. coli* O157 poświęcono tym patogenom więcej uwagi [2, 15].

Badaniom poddano próbki środków spożywczych, próbki kału od osób chorych, odchody bydła, koni i psów. Próbki pochodziły z różnych regionów. Zauważono podobieństwa i różnice między szczepami pochodzącymi z różnego rodzaju materiału i z różnych regionów.

Charakterystyka szczepów pozwoliła wyodrębnić trzy grupy szczepów w obrębie serogrupy *E. coli* O157:

1. Grupa pierwsza obejmuje szczepy VT(+), sorbitolo(-), β-glukuronidazo (-),
2. Grupa druga obejmuje VT(+), sorbitolo(+) lub (-), β-glukuronidazo (+),
3. Grupa trzecia obejmuje VT(-), sorbitolo(+) lub (-), β-glukuronidazo (+) grupa ta wykazała niski stopień pokrewieństwa

Przedmiotem niniejszej pracy jest grupa trzecia, do której można zaliczyć szczepy *E. coli* O157 wyizolowane z wody: *E. coli* O157: D3 i Sw4, S2, S3, S4, S5 [23]: sorbitolo(+), β-glukuronidazo (+), nie wytwarzające toksyn. Analiza metodą PCR szczepów D3, Sw4, S2, S3, S4, S5 potwierdziła brak genu dla Shiga – toksyny *stx*, brak genu dla hemolizyny *hly* i obecność genu *eae* dla intiminy – białka odpowiedzialnego z adhezję bakterii do komórek śluzówki jelita.

Szczepy *E. coli* O157 D3, *E. coli* O157 Sw4, *E. coli* O157 S2, *E. coli* O157 S3, *E. coli* O157 S4, *E. coli* O157 S5 zostały wyizolowane z wód powierzchniowych w okresie letnim (kiedy temperatura powietrza wynosiła około 20°C) [23].

Celem badań było:

1. zbadanie wpływu temperatur 5°C i 25°C na przeżywalność szczepów: *E. coli* O157 D3, *E. coli* O157 Sw4, *E. coli* O157 S2, *E. coli* O157 S3, *E. coli* O157 S4, *E. coli* O157 S5 i na ich właściwości fenotypowe i genotypowe w próbkach wody powierzchniowej skażonej dodatkowo szczepami *Enterobacter cloacae* i *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*;
2. porównanie przeżywalności szczepów *E. coli* O157 w próbkach wody powierzchniowej w warunkach naturalnych zmiennych temperatur i w warunkach laboratoryjnych w stałej temperaturze 5°C i 25°C.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiły próbki wody powierzchniowej o pH=7,8 i przewodności elektrycznej 1034 μS/cm i o pH= 8,0 i przewodności elektrycznej = 585 μS/cm (podane wartości pH i przewodności odnoszą się do wody po autoklawowaniu).

Szczepy bakteryjne: Wyizolowano z wody 6 szczepów o podobnych właściwościach fenotypowych i antygenowych.

Szczepy kontrolne: *E. coli* O157- kliniczny (werotoksyczny), pochodzący od osoby chorej z objawami biegunki: sorbitolo (-), β -glukuronidazo (-), *eae*+, *hlyA*(+), *stx*₁(+), *stx*₂(+); *E. coli* ATCC 25922

Szczepy symulujące udział mikroflory towarzyszącej: *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*

Podłoża: SMAC (Mac Conkey z sorbitolem) i SMAC+CT (Mac Conkey z sorbitolem, cefiximem i telurynem potasu)

Lateks *Escherichia coli* O157 firmy BIOMED, filtry membranowe o średnicy porów 0,45 μ m.

Próbki wody (pobranej z jeziora i wyjałowionej w autoklawie) w ilości 250 ml zakażono szczepami: *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii* (stanowiącymi florę towarzyszącą). W tym celu z 24 godzinnej hodowli bulionowej każdego ze szczepów pobrano 10 μ l i dodano do próbki wody (uzyskując liczbę bakterii 10⁴/1ml wody). Tak przygotowane próbki wody zawierały mieszaną hodowlę ww. szczepów i były następnie zakażone szczepami badanymi: *E. coli* O157 D3 (próbka 1), *E. coli* O157 Sw4 (próbka 2), *E. coli* O157 S2 (próbka 3), *E. coli* O157 S3 (próbka 4), *E. coli* O157 S4 (próbka 5), *E. coli* O157 S5 (próbka 6), *E. coli* O157 kliniczny (próbka 7).

Każdy ze szczepów *E. coli* O157 był dodany do oddzielnej zakażonej uprzednio próbki wody. W tym celu z 24 godzinnej hodowli bulionowej każdego szczepu *E. coli* O157 pobrano 10 μ l *inokulum* i dodano do 250ml próbek wody. Szczepy S2, S3, S4, S5 zostały wyizolowane w okresie letnim z jeziora na pastwisku, podobnie jak szczep Sw4 [23]. Każda próbka zawierająca szczepy wchodzące w skład grupy coli (i stanowiące florę towarzyszącą w tym badaniu) i *E. coli* O157 były przetrzymywane w warunkach laboratoryjnych w temperaturze 5°C i 25°C.

Zdolność do wzrostu i cechy charakterystyczne kolonii określono na podstawie liczby kolonii wyrastających z posiewu powierzchniowego określonej objętości wody (0,1ml; 10 μ l; 1 μ l) pobieranego w kolejnym okresie czasu na podłoża stałe wybiórcze:

- dla próbek wody zawierających szczepy *E. coli* O157 wyizolowane z wody tj: D3, Sw4, S2, S3, S4, S5 było to podłożo SMAC (MC z sorbitolem) - inkubacja w czasie 24h w temperaturze 44°C (ta temperatura w opisywanym doświadczeniu działała jako czynnik wybiórczy przy izolacji z wody szczepów SF *E. coli* O157)
- dla próbek wody ze szczepem *E. coli* O157 klinicznym było używane podłożo SMAC +CT (MC z sorbitolem, cefiximem i tellurynem potasu) - inkubacja w temperaturze 37°C w czasie 24h.

Badania trwały do momentu kiedy z próbki wody nie udało się wyizolować poszukiwanych bakterii *E. coli* O157 przy użyciu ww. podłóż i metodyki.

Próbki wody (pobrane z jeziora i wyjałowione w autoklawie) w ilości 200ml zakażano szczepami *E. coli* O157 (klinicznym, D3, Sw4, S2, S3, S4, S5) i *E. coli* ATCC, dodając każdy szczep do oddzielnej butelki. W tym celu z 24 godzinnej hodowli bulionowej każdego ze szczepów pobrano 10 μ l i dodano do 200 ml próbki wody (uzyskując liczbę bakterii 10⁴/1ml wody dla każdego szczepu). Każdym szczepem zakażano przygotowane próbki wody w czterech seriach. Jedną serię próbek wody przetrzymywano w laboratorium w temperaturze 5°C (reprezentatywną dla okresu jesienno-zimowego), drugą serię w temperaturze 25°C (charakterystyczną dla okresu wiosenno-letniego), trzecią serię na zewnątrz budynku w warunkach środowiska zewnętrznego w okresie zimowym i czwartą serię na zewnątrz budynku w warunkach środowiska zewnętrznego w okresie letnim.

Warunki polowe określają naturalny stan temperatury w ciągu doby. Utrzymanie stałej temperatury w tych warunkach jest niemożliwe, ale takie właśnie różnice dobowe obserwujemy w środowisku naturalnym.

Badanie w warunkach polowych zostało przeprowadzone w dwóch cyklach: od maja do grudnia, kiedy temperatury utrzymywały się na poziomie od +10°C do +30°C. i w miesiącach styczeń – kwiecień, kiedy temperatury wahały się od -10°C do +10°C.

Badania miały charakter jakościowy. Zdolność do wzrostu i cechy charakterystyczne kolonii określono na podstawie kolonii wyrastających z posiewu powierzchniowego określonej objętości wody (0,5ml; 0,1ml; 10 μ l; 1 μ l) na podłożo stałe wybiórcze Endo lub/i SMAC (MC + sorbitol) a w przypadku braku możliwości wyizolowania bakterii z objętości mniejszej lub równej 0,5ml wykorzystywano posiew metodą filtracji membranowej z użyciem filtrów o średnicy porów 0,45 μ m i podłoża Endo-Les.

WYNIKI

Wpływ temperatury 5°C i 25°C na przeżywalność szczepów *E. coli* O157 w próbkach wody powierzchniowej zakażonej szczepami stanowiącymi mikroflorę towarzyszącą zestawiono w tabeli 1 i tabeli 2.

Na szczególną uwagę zasługuje szczep kliniczny *E. coli* O157, który po miesiącu obecności w wodzie w obecności flory towarzyszącej i w temp. 5°C i 25°C zyskuje zdolność fermentacji sorbitolu, chociaż dodatkowo niektóre kolonie pozostają nadal typowe tj: nie fermentujące sorbitolu. Cechą powstałych koloni sorbitolo(+), jest zmieniony profil genetyczny.

Tabela 1. Przeżywalność w wodzie w temperaturze 5°C i właściwości fenotypowe szczepów *E. coli* O157
The survival in water in the temperature 5°C and phenotype properties of *E. coli* O157 strains

Szczep	Czas przeżycia w próbkach wody	
	Charakterystyczne cechy fenotypowe kolonii	
<i>E. coli</i> O157 D3	8 miesięcy;	Kolonie: sorbitolo (+) posiadające antygen O157(+)
<i>E. coli</i> O157: Sw4, S2, S3, S4, S5	8 miesięcy;	Kolonie: sorbitolo(+), z antygenem O157(+) i (-)
<i>E. coli</i> O157 kliniczny	6 miesięcy; w 4 miesiącu liczba jtk<1/1ml próbki wody;	Kolonie: w 4 tygodniu oprócz kolonii sorbitolo(-) z antygenem O157(+) i już (-), wykrywano kolonie sorbitolo (+) z antygenem O157. W miarę upływu czasu liczba kolonii sorbitolo(-) tj. typowych dla szczepu wyjściowego <i>E. coli</i> O157 zmniejszała się a stosunkowo więcej wykrywano kolonii sorbitolo (+) (w 1ml próbki wody) pozbawionych antygeny O157. W 6 miesiącu izolowano tylko kolonie sorbitolo (+) bez antygeny O157.

Tabela 2. Przeżywalność w wodzie w temperaturze 25°C i właściwości fenotypowe szczepów *E. coli* O157
The survival in water in the temperature 25°C and phenotype properties of *E. coli* O157 strains

Szczep	Czas przeżycia w próbkach wody	
	Charakterystyczne cechy fenotypowe kolonii	
<i>E. coli</i> O157 D3	4 miesiące; W 3 miesiącu liczba jtk<1/1ml	Kolonie: sorbitolo (+) i z antygenem O157(+)
<i>E. coli</i> O157: Sw4, S2, S3, S4, S5	4 miesiące;	Kolonie: W 4 tygodniu wykrywalne są kolonie sorbitolo(+) z antygenem O157 i bez antygeny O157, W 4 miesiącu występowały tylko kolonie sorbitolo (+) bez antygeny O157 (-)
<i>E. coli</i> O157 kliniczny	7 miesięcy; w 4 miesiącu liczba jtk<1/1ml próbki wody;	Kolonie: W 4 tygodniu wykrywano (podobnie jak w 5°C) kolonie sorbitolo(-) z antygenem O157(+) i również bez antygeny O157 (-). W miarę upływu czasu liczba kolonii sorbitolo(-) <i>E. coli</i> O157 zmniejszała się a stosunkowo więcej pojawiało się kolonii sorbitolo(+). W 13 tygodniu (3 miesiąc) pojawiły się kolonie tylko sorbitolo(+), a część z nich utraciła już antygen O157 (-). W 7 miesiącu wykrywano tylko kolonie sorbitolo(+), bez antygeny O157.

Analiza metodą PCR wykazała, że werotoksyczny szczep kliniczny *E. coli* O157 w wodzie w temperaturze 5°C i 25°C traci plazmidowe cechy wirulencji (geny *stx*₁ i *stx*₂ oraz gen *hlyA*). Utrata cech wirulencji dotyczy kolonii, które zyskały zdolność fermentacji sorbitolu (a pochodziły od sorbitolo (-) kolonii) i posiadały albo nie posiadały antygen powierzchniowy O157. Utrata w wodzie genów odpowiedzialnych za wirulencję tłumaczyć może izolację z wody szczepów *E. coli* O157 tylko sorbitolo-fermentujących pozbawionych genów wirulencji [23].

Wpływ temperatur w warunkach naturalnych środowiska zewnętrznego i w stabilnych warunkach laboratoryjnych przedstawia tabela 3.

Przeżywalność *E. coli* ATCC i szczepów *E. coli* O157 w warunkach środowiskowych jest mniejsza niż w stabilnych warunkach laboratoryjnych. Oddziaływanie światła i dobowe zmiany temperatury skracają żywotność badanych mikroorganizmów.

Badanie (w temp. ~5°C) w warunkach środowiskowych zostało zakończone kiedy temperatura w środowisku zewnętrznym wynosiła -10°C. Po tym czasie nie udało się wyizolować żadnego badanego szczepu a spadek temperatury nastąpił w 5 tygodniu badania. W warunkach laboratoryjnych (dla temperatury 5°C) przeżywalność utrzymywała się przez dłuższy okres czasu 3-7 miesięcy.

W stabilnych warunkach laboratoryjnych w temp. 25°C badane szczepy przeżywały przez okres 3-7 mie-

Tabela 3. Przeżywalność w wodzie i właściwości fenotypowe szczepów *E. coli* O157 i *E. coli* ATCC
The survival in water and phenotype properties of *E. coli* O157 strains and *E. coli* ATCC

Nazwa szczepu	Zmienna temperatura zimowa	Stała temperatura 5°C	Zmienna temperatura letnia	Stała temperatura 25°C
	warunki środowiskowe	warunki laboratoryjne	warunki środowiskowe	warunki laboratoryjne
	Przeżywalność w czasie		Przeżywalność w czasie	
<i>E. coli</i> ATCC –	1 miesiąc	4 miesiące	1 miesiąc	4 miesiące
<i>E. coli</i> O157 – szczep kliniczny	1 miesiąc	3 miesiące	3 tygodnie	3 miesiące w 5 tygodniu utrata antygeny O157
<i>E. coli</i> O157: Sw4, S2, S3, S4, S5	1 miesiąc	7 miesięcy	5 tygodni i utrata antygeny O 157	6 miesięcy w 5 tygodniu utrata antygeny O157
<i>E. coli</i> O157D3	1 miesiąc	7 miesięcy	5 tygodni i utrata antygeny O 157	7 miesięcy

sięcy. W temp. 25°C w warunkach środowiskowych dłuższą przeżywalność wykazały szczepy *E. coli* O157 wyizolowane z wody tj. Sw4, S2, S3, S4, S5 i D3, przy czym traciły one antygen somatyczny (z wyjątkiem szczepu *E. coli* O157 D3), na podstawie którego można je identyfikować – ma to duże znaczenie diagnostyczne. Utrata antygeny przy dłuższym przebywaniu w wodzie (w temperaturze 5°C i 25°C) uniemożliwia (w warunkach naturalnych) wyizolowanie *E. coli* O157 z wód powierzchniowych zawierających mieszaną mikroflorę.

Szczep kliniczny *E. coli* O157 wyizolowany (doświadczalnie) z próbki wody powierzchniowej w warunkach środowiskowych i w temperaturze 25°C (wyizolowany w 3 tygodniu badania), wykazał zmieniony profil genetyczny: posiadał tylko gen *eae*, natomiast utracił plazmidowe geny wirulencji: *stx*₁, *stx*₂ oraz *hlyA*, natomiast fenotypowo zyskał zdolność fermentacji sorbitolu. Natomiast profil genetyczny i fenotyp sorbitolu zbadanego w tym czasie szczepu klinicznego *E. coli* O157 z warunków laboratoryjnych był jeszcze niezmienny.

DYSKUSJA

Bakterie *E. coli* O157 zasiedlają przewód pokarmowy zwierząt stałocieplnych, a wraz z kałem wydalane są do środowiska zewnętrznego, skąd mogą kontaminować wodę powierzchniową jak również podziemną.

Woda to jedna z dróg zakażenia się człowieka pałeczkami *E. coli* O157. Infekcje *E. coli* O157 przenoszone drogą wodną pojawiają się sporadycznie. Pomimo tego są niebezpieczne dla zdrowia a nawet życia człowieka. Kwasotolerancja i niska dawka infekcyjna czyni je silnymi patogenami.

Wyniki badania próbek wód przetrzymywanych w temperaturze 5°C i 25°C wykazały, że szczepy *E. coli* O157 przeżywają w wodzie przez pewien okres czasu. W temperaturze 5°C tempo rozwoju jest spowolnione, procesy metaboliczne ulegają w dużym stopniu zwolnieniu a nawet zahamowaniu, przez co następuje mniejsze zużycie substancji odżywczych. Adaptacja wzrostu bakterii do chłodnych temperatur obejmuje modyfikacje membrany utrzymując jej płynność i strukturalną integralność z makromolekułami: białkami i rybosomami oraz produkcję białek „szoku zimnego”. Takie zaadaptowanie się bakterii do rozwoju w niskiej temperaturze warunkuje być może długie przeżywanie w stabilnych warunkach laboratoryjnych w porównaniu do warunków naturalnych.

W warunkach naturalnych z uwagi na obecność konkurencyjnej flory towarzyszącej i wielu czynników o działaniu antibakteryjnym (toksyny, światło) czas przeżywania może być znacznie krótszy aniżeli wykazany doświadczalnie (tab. 3).

Przeżywalność w warunkach doświadczalnych zależy w dużym stopniu od wielkości inokulum użytego do kontaminacji próbek wody, od objętości wody użytej w eksperymentach i od przewodności elektrycznej tej wody, jak również od obecności związków o działaniu hamującym wzrost i rozwój bakterii. Im wyższa przewodność elektryczna, objętość wody użytej w doświadczeniu tym dłuższa przeżywalność bakterii *E. coli* O157 w wodzie w warunkach doświadczalnych [22, 29].

Temperatura 25°C umożliwia rozwój badanych szczepów w pierwszych trzech dobach i warunkuje przeżywanie aż do momentu wyczerpania zasobów pokarmowych zawartych w ograniczonej objętości wody użytej w eksperymentach. W miarę upływu czasu zmniejsza się ilość substancji odżywczych przez co następuje obumieranie znacznej części populacji bakteryjnej.

W warunkach środowiskowych przeżywalność w każdym z badanych przypadków (temperatura 5°C i 25°C) była krótsza aniżeli w stabilnych warunkach laboratoryjnych (w ciemności). Regularne zmiany temperaturowe i cykl dobowy (dzień-noc) w warunkach środowiskowych skracają okres przeżywalności badanych bakterii w wodzie.

Światło wpływa negatywnie na bakterie *E. coli* i *E. coli* O157 w wodzie. Istnieje kilka sugestii na negatywny wpływ światła na mikroorganizmy w wodzie [3].

Wyizolowanie z naturalnych wód szczepów SF-sorbitolofermentujących *E. coli* O157: D3, Sw4, S2, S3, S4, S5 [23], posiadających wyłącznie chromosomalne geny *eae*, ich długie przeżywanie w wodzie w warunkach doświadczalnych (tab. 1, 2 i 3) dowodzą, że obecność *E. coli* O157 w wodzie może stanowić zagrożenie dla zdrowia osób kąpiących się w takiej wodzie.

Produktem genu *eae* jest białko – intimina ważny czynnik wirulencji. Intimina odpowiedzialna jest za przyłączanie bakterii do komórek śluzówki jelita i tworzenie uszkodzeń A/E. W badaniu uszkodzeń A/E stwierdzono, iż pojawiają się one w tkankach zawierających >10⁶ jtk bakterii EHEC *eae*⁺ [10, 21]. Dane z mutantem w genie *eae* oznaczają, że gen ten a ściśle mówiąc jego produkt jest wymagany dla kolonizacji śluzówki jelita i wywołania biegunek.

Fakt wyizolowania od osób z biegunką i z HUS szczepów posiadających tylko gen *eae* kodujący γ -intiminę, świadczy o zagrożeniu jakie mogą stanowić dla człowieka bakterie serogrupy O157, a posiadające tylko gen *eae* [26]. Obecność genów *stx* dla Shiga – toksyn (szczep kliniczny *E. coli* O157) wspomaga toksyczność szczepów *E. coli* O157, które mają zdolność fermentacji sorbitolu lub jej nie posiadają [16].

Długie przebywanie w wodzie (około 1 miesiąca, głodzenie) może powodować utratę antygeny somatycznego O157, utratę czynników wirulencji: geny *stx* i *hly* (tab. 1, 2 i 3). Wang i Doyle wykazali zmiany w bu-

dowie białek zewnętrznej błony w komórkach *E. coli* O157:H7 przeżywającej w wodzie. Szczepy wg Wang i Doyle utraciły swój antygen ale zachowały zdolność wytwarzania toksyn [29].

Utrata antygeny dla szczepów *E. coli* O157 jest ważna z punktu widzenia diagnostycznego i fakt ten mógłby tłumaczyć znikomy procent izolacji szczepów *E. coli* O157 z wody [23].

Wyizolowane z wody szczepy *E. coli* O157 D3, Sw4, S2, S3, S4, S5 i szczep kliniczny *E. coli* O157 należy uznać za zagrożenie dla człowieka kąpiącego się w wodach powierzchniowych w okresie letnim, bez względu na fenotyp sorbitolu danego szczepu. Obecność bowiem tylko chromosomalnego genu *eae* czyni je patogenami człowieka, a z powodu utraty antygeny O157 w pewnym momencie nie wykrywalnymi metodami identyfikacji opartej o antygen somatyczny O157.

WNIOSKI

1. Szczepy *E. coli* O157 mają zdolność przeżywania w środowisku wodnym w temperaturach 5°C i 25°C.
2. Okres przeżywalności szczepów *E. coli* O157 jest krótszy w zmiennych warunkach środowiska zewnętrznego w porównaniu do stabilnych warunków laboratoryjnych.
3. Właściwości fenotypowe i genotypowe *E. coli* O157 ulegają zmianie: utrata antygeny O157 oraz zyskanie zdolności do fermentacji sorbitolu (dotyczy szczepów pierwotnie NSF), utrata genów wirulencji: *hlyA*, *stx₁* i *stx₂*.

Podziękowanie

Autorka dziękuje Pani doc dr. hab. *Elżbiecie Trafny* z Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii w Warszawie za wykonanie analizy genotypowej omawianych szczepów *E. coli* O157.

PIŚMIENNICTWO

1. Ackman D., Marks S., Mack P., Caldwell M., Root T., Birkhead G.: Swimming-associated haemorrhagic colitis due to *Escherichia coli* O157:H7 infection: evidence of prolonged contamination of a fresh water lake. *Epidemiol. Infect.* 1997, 119, 1-8.
2. Ammon A., Petersen L.R., Karch H.: A large Outbreak of Hemolytic Uremic Syndrome Caused by an Unusual Sorbitol-Fermenting Strain of *Escherichia coli* O157:H-. *J. Infect. Dis.* 1999, 179, 1274-1277.
3. Barcina I., Gonzalez J.M., Iriberry J., and Egea L.: Effect of Visible Light on Progressive Dormancy of *Escherichia coli* Cells during the Survival Process in Natural Fresh Water. *Appl. Environ. Microbiol.* 1989, 55, 246-251.
4. Bielaszewska M., Schmidt H., Karmali M., Khakhria R., Janda J., Karch H.: Isolation and Characterization of Sorbitol – Fermenting Shiga Toxin (Verocytotoxin) – Producing *Escherichia coli* O157:H- Strains in the Czech Republic. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36, 2135-2137.
5. Bielaszewska M., Schmidt H., Liesegang A., Prager R., Rabsch W., Tschape H., Cizek A., Janda J., Karch H.: Cattle Can Be a Reservoir of Sorbitol-Fermenting Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157:H- Strains and a Source of Human Diseases. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38, 3470-3473.
6. Blanco M., Schumacher S., Tasara T., Zweifel C., Blanco J., and Stephan R.: Serotypes, intimin variants and other virulence factors of *eae* positive *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle in Switzerland. Identification of a new intimin variant gene. *BMC Microbiol.* 2005, 5, 23.
7. Bokete T., Whittam T., Richard A., Carla R., Cliff M., Moseley S., Fritsche T.: Genetic and Phenotypic Analysis of *Escherichia coli* with Enteropathogenic Characteristics Isolated from Seattle Children. *J. Infect. Dis.* 1997, 175, 1382-1390.
8. Carlucci A., Scarpino P., Pramer D.: Evaluation of Factors Affecting Survival of *Escherichia coli* in Sea Water. *Appl. Microbiol.* 1961, 9(5), 400-404.
9. Chapman P., Siddons C., Cerdan M., Harkin M.: A 1-year study of *Escherichia coli* O157 in cattle, sheep, pigs and poultry. *Epidemiol. Infect.* 1997, 119, 245-250.
10. Dean-Nystrom E., Bosworth B., Moon H., and O'Brien A.: *Escherichia coli* O157:H7 Requires Intimin for Enteropathogenicity in Calves. *Infect. Immun.* 1998, 66, 4560-4563.
11. Draughon A., Golden D., Oliver S.: Evaluation and Use of FDA/BAM and Rapid Methods for On-Farm Survey (o *Salmonella*, *Campylobacter*, *E. coli* O157:H7 and *Yersinia enterocolitica*). U.S. Food and Drug Administration FDA Grant FD-U-001603-01.
12. Eklund M., Bielaszewska M., Nakari U., Karch H., Siitonen A.: Molecular and phenotypic profiling of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H- human isolates from Finland. *Clin. Microbiol. Infect.* 2006, 12, 634-641.
13. Elliott S., Yu J., Kaper J.: The cloned locus of enterocyte effacement from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is unable to confer the attaching and effacing phenotype upon *E. coli* K-12. *Infect. Immun.* 1999, 67, 4260-4263.
14. Feldman K., Mohle-Boetani J., Ward J., Furst K., Abbott S., Ferrero D., Olsen A., Werner B.: A cluster of *Escherichia coli* O157: nonmotile infections associated with recreational exposure to lake water. *Public Health Reports/* 2002, 117, 380-385.
15. Feng P.: *Escherichia coli* Serotype O157:H7: Novel Vehicles of Infection and Emergence of Phenotypic Variants. Food and Drug Administration, Washington, USA 1995, 1.
16. Friedrich A., Zhang W., Bielaszewska M., Mellmann A., Kock R., Fruth A., Tschape H., Karch H.: Prevalence, virulence profiles and clinical significance of Shiga toxin-negative variants of enterohemorrhagic *Escheri-*

- chia coli* O157 infection in humans. Clin. Infect. Dis. 2007, 45, 39-45.
17. James P., Kaper J.: Diarrheagic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 1998, 11, 142-201.
 18. Karch H., Bohm H., Schmidt H., Gunzer F., Stojanka A., Heesemann J.: Clonal Structur and Pathogenicity of Shiga-Like Toxin-Producing, Sorbitol – Fermenting *Escherichia coli* O157:H-. J. Clin. Microbiol. 1993, 31, 1200-1205.
 19. Karch H., Bielaszewska M.: Sorbitol-Fermenting Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157:H- Strains: Epidemiology, Phenotypic and Molecular Characteristics, and Microbiological Diagnosis. J. Clin. Microbiol. 2001, 39, 2043-2049.
 20. Karch, H., Bockemuhl J., Hans I.: Erkrankungen durch enterohamorrhagische *Escherichia coli* (EHEC). Deutsches Aerzteblatt 2000, 36, A-2314, B-2004, C-1862.
 21. Kobayashi H., Shimada J., Nakazawa M., Morozumi T., Pohjanvirta T., Sinikka P., Yamamoto K.: Prevalence and Characteristics of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* from Healthy Cattle in Japan. Appl. Environ. Microbiol. 2001, 67, 484-489.
 22. McGee P., Bolton D., Sheridan J., Earley B., Kelly G., Leonard N.: Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in farm water: its role as a vector in the transmission of the organism within herds. J. Appl. Microbiol. 2002, 93, 706.
 23. Michalska-Szymaszek M.: Występowanie *Escherichia coli* O157 w wodach powierzchniowych i podziemnych. Roczn. PZH 2007, 58, 489-598.
 24. Moses A., Egbu G., Ameh J.: Phenotypic and Genotypic Characteristics of *E. coli* O157 and Non O157 Serogroups Isolated from Human, Animals, Dairy Products and Water in Borno and Adamawa States, Nigeria J. Med. Med. Science. 2006, 1, 96-103.
 25. Oswald E., Schmidt H., Morabito S., Karch H., Marches O., Caprioli A.: Typing of Intimin Genes in Human and Animal Enterohemorrhagic and Enteropathogenic *Escherichia coli* : Characterization of a New Intimin Variant. Infect. Immun. 2000, 68, 64-71.
 26. Schmidt H., Scheef J., Huppertz H., Frosch M., Karch H.: *Escherichia coli* O157:H7 and O157:H- Strains That Do Not Produce Shiga Toxin: Phenotypic and Genetic Characterization of Isolates Associated with Diarrhea and Hemolytic-Uremic Syndrome. J. Clin. Microbiol. 1999, 37, 3491-3496.
 27. Tzipori S, Gunzer F., Donnenberg M., Kaper J., Donohue R.: The role of the *eaeA* gene in diarrhea and neurological complications in a genotobiotic piglet model of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection. Infect. Immun. 1995, 63, 3621-3627.
 28. Yatsuyanagi J., Saito S. Ito I.: A case of Hemolytic Uremic Syndrome Associated with Shiga Toxin 2- Producing *Escherichia coli* O121 Infection Caused by Drinking Water Contaminated with Bovine. Jpn. J. Infect. Dis. 2002, 55, 174 - 176.
 29. Yukiko H., Michiko M., Susumu K.: Loss of O157 Antigenicity of Verotoxin-Producing *Escherichia coli* O157:H7 Surviving under Starvation Conditions. Appl. Environ. Microbiol. 2000, 66, 5540 - 5543.

Otrzymano: 10.08.2009

Zaakceptowano do druku: 15.01.2010

