

STRESZCZENIE

Fenotypowa i molekularna charakterystyka szczepów *Escherichia coli* O157 izolowanych z wód powierzchniowych

Escherichia coli O157 jest serotypem *E. coli* należącym do grupy biegunkowych, enterokrwotocznych pałeczek jelitowych (enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC). Bakterie EHEC *E. coli* O157 są egzogennym składnikiem flory jelitowej człowieka i mogą być wydalane wraz z kałem do 30 dni. Ponieważ infekcje często mają charakter bezobjawowy, sprzyja to rozprzestrzenianiu bakterii i powstawaniu różnych genotypów w wyniku poziomego przekazywania genów (horizontal gene transfer, HGT). Największą i udokumentowaną rolę w nosicielstwie *E. coli* O157 odgrywają duże i małe przeżuwacze. Mimo niewielkiej liczebności w przewodzie pokarmowym i krótkiego okresu nosicielstwa i siewstwa (do 30 dni u bydła, owiec i kóz) obecność *E. coli* O157 w odchodach stanowi ryzyko dla zdrowia ludzi ze względu na możliwość przeniesienia na produkty spożywcze i zakażenie wody oraz długi okres utrzymywania się tych bakterii w środowisku (od kilku tygodni do kilkunastu miesięcy).

Do najważniejszych czynników patogenności należą tych bakterii należą:

1. Toksyna Stx - Shiga toxin lub Shiga-like toxin (verotoxin), wytwarzana w dwu podstawowych odmianach: Stx1 i Stx2, kodowana przez geny *stx*, zlokalizowane w genomach fagów lambdoidalnych zintegrowanych z genomem bakteryjnym profagów. Toksyny hamują biosyntezę białek w komórkach posiadających receptor globotriaosylceramid (Gb3). Są bezpośrednio związane z wystąpieniem objawów krwotocznego zapalenia okrężnicy (hemorrhagic colitis, HC) i zespołu hemolityczno-mocznicowego (hemolytic uremic syndrome, HUS).
2. Adhezyny odpowiedzialne za przyleganie bakterii i wywoływanie zmian histopatologicznych typu A-E (Attaching-Effacing, przyleganie i ścieranie) oraz systemy ich transportu zlokalizowane w locus LEE (locus of enterocyte effacement, złuszczenie komórek nabłonka jelitowego) położonym w obrębie chromosomalnej wyspy patogenności A-E.
3. Hemolizyny: hemolizyna α odpowiedzialna za hemolizę krwinek czerwonych - gen *hlyA* zlokalizowany chromosomalnie lub plazmidowo oraz enterohemolizyna - gen *ehx* zlokalizowany na plazmidzie wirulencji pO157.

Niska dawka infekcyjna określana dla *E. coli* O157 na mniej niż 50 komórek bakteryjnych przyczynia się do zwiększonego ryzyka zakażeń przenoszonych między ludźmi lub ze zwierząt na człowieka oraz epidemii wodnych. Stąd też ważne znaczenie dla zdrowia ludzi ma występowanie *E. coli* O157 w wodzie. W zależności od cech osobniczych pacjenta pałeczki *E. coli* O157 mogą wywoływać biegunki wodniste, krwawe z ciężkim przebiegiem i komplikacjami w postaci HUS. HUS jest zdefiniowany jako niewydolność nerek i towarzyszące jej objawy: trombocytopenia i anemia hemolityczna, małopłytkowa plamica zakrzepowa TTP (thrombotic thrombocytopenic purpura, TTP) oraz zaburzenia neurologiczne, jako następstwo TTP. Przeciętnie 10% infekcji może kończyć się śmiercią.

Cel pracy: Celem pracy jest wyjaśnienie czy korzystanie z wód powierzchniowych zanieczyszczonych werotoksycznymi szczepami *E. coli* O157 stwarza zagrożenie dla życia i zdrowia ludzi

Wymaga to określenia częstości występowania szczepów *E. coli* O157 w wodach powierzchniowych oraz charakterystyki wybranych cech fenotypowych i genotypowych warunkujących patogenność tych szczepów. Ponadto w ramach prowadzonych badań oceniono wpływ środowiska wodnego w różnych warunkach temperaturowych na wzrost, obecność antygeny somatycznego O157, występowanie czynników wirulencji oraz zdolność fermentacji sorbitolu. Wyniki tych badań mogą przyczynić się do udoskonalenia metod badania próbek wody ze środowiska w kierunku identyfikacji szczepów *E. coli* serotypu O157.

Metodyka pracy:

Pobieranie próbek wody do badań przeprowadzono wg PN-EN ISO 19458:2007 – pobieranie próbek do analiz mikrobiologicznych. Zagęszczanie próbek wody: technika filtracji membranowej i hodowla w wybiórczo-różnicujących podłożach. Charakterystyka fenotypowa w oparciu o jakościowe metody hodowlane, biochemiczne i serologiczne. Charakterystyka genotypowa w oparciu o analizę PCR dla sekwencji charakterystycznych dla genów: *rfbE* dla antygeny O157, *eaeA*, *hlyA*, *stx1*, *stx2* warunkujących patogenność wyizolowanych szczepów oraz analiza profili elektroforetycznych (Tris/Tricine SDS-PAGE) preparatów lipopolisacharydowych (LPS) wyizolowanych z badanych szczepów oraz reakcji z surowicą anti-O157. Ponadto określono zdolność do tworzenia biofilmu na powierzchniach abiotycznych szczepów *E. coli* O157 różniących się profilami LPS.

Materiał do badań:

Próbki wody powierzchniowej pobrane z miejsc przeznaczonych do kąpieli lub tzw. „dzikich” kąpielisk wykorzystywanych przez ludzi okresie letnim. Szczepy bakterii *E. coli* O157 wyizolowane z naturalnych wód powierzchniowych i ich pochodne i szczep werotoksyczny *E. coli* O157 wyizolowany z materiału klinicznego oraz jego pochodne.

Wyniki i omówienie:

Przebadano 150 próbek wody powierzchniowej, skąd wyizolowano 6 szczepów *E. coli* serotyp O157 fermentujących sorbitol, wytwarzających β -glukuronidazę. Szczepy określone biochemicznie i serologicznie jako *E. coli* O157 poddano analizie PCR, na podstawie której w szczepach pochodzących z wody wykazano obecność chromosomalnego genu *eae* dla intyminy, będącej istotnym czynnikiem wirulencji.

Wyniki badania wpływu temperatury na wzrost wybranych szczepów *E. coli* O157 wyizolowanych z wody oraz szczepu klinicznego werotoksycznego *E. coli* O157 niefermentującego sorbitolu wykazały, że szczepy *E. coli* O157 przeżywają dłużej w wodzie o niskiej temperaturze tj. $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, w porównaniu z wodą o temperaturze $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ i zmieniają niektóre cechy fenotypowe i genotypowe. Badanie wpływu temperatury na zdolność fermentacji sorbitolu, będącą jednym z markerów diagnostycznych wykazały, że jest ona niezależna od temperatury. Natomiast badania próbek wody w warunkach laboratorium wykazały różne tempo wzrostu szczepów *E. coli* O157 fermentujących sorbitol i nie fermentujących sorbitolu.

Rozdziały elektroforetyczne preparatów LPS wyizolowanych ze szczepów pochodzących z wody i z materiału klinicznego oraz ich pochodnych uzyskanych w wyniku inkubacji w wodzie środowiskowej wykazały, że w około połowie szczepów dochodzi do utraty lub zmiany ciężaru cząsteczkowego LPS odpowiadającej skróconej formie LPS I (S) lub LPS szorstkiemu LPS II (R). Brak antygeny O157 w większości szczepów był skorelowany z brakiem produktu PCR genu *rfbE*_{O157}. Nie zaobserwowano korelacji między glikoformą S lub R LPS a zdolnością adhezji do powierzchni abiotycznych (polistyren).

Wyniki sugerują, że szczep werotoksyczny po dostaniu się do wody przeżywa w środowisku wodnym długi czas, stanowiąc zagrożenie dla człowieka kąpiącego się w tej wodzie. Obserwacje dotyczące werotoksycznego szczepu klinicznego mogą przyczynić się do wyjaśnienia przyczyny izolowania z wód powierzchniowych tylko szczepów fermentujących

sorbitol posiadających gen *eae*, przy braku pozostałych genów warunkujących wirulencję szczepów *E. coli* O157 i ważnych z diagnostycznego punktu widzenia.

Wnioski:

- 1. Wykazano zdolność bakterii *E. coli* należących do serotypu O157 do przeżywania przez wiele miesięcy w naturalnych wodach powierzchniowych z zachowaniem przez pewien czas wirulencji.
- 2. Duży wpływ na tę przeżywalność ma temperatura, im niższa tym dłużej bakterie pozostają zdolne do podziałów. W trakcie badań laboratoryjnych w szczepach przechowywanych w próbkach wody dochodzi do zmian w genomie, które najczęściej polegają na utracie zdolności do produkcji hemolizyny α , toksyn Shiga i genu kodującego syntazę D-perozaminy, cukru wchodzącego w skład antygeny O, czym można wytłumaczyć brak reakcji szczepów z surowicami anti-O157. Natomiast w żadnym z pochodnych szczepów nie stwierdzono utraty genu strukturalnego *eaeA* intyminy. Dalsze badania mają na celu wyjaśnienie, jak takie zmiany wpływają na wirulencję szczepów.

Podsumowanie:

E. coli O157 jest patogenem przenoszonym przez wodę, ważnym z uwagi na wywoływanie poważnych zachorowań w tym krwawych biegunek, perforacji i krwawienia z okrężnicy oraz groźnego dla życia zespołu hemolityczno-mocznicowego w wielu przypadkach kończącego się śmiercią. Ponadto niska dawka zakaźna bakterii przyczynia się do zwiększonego ryzyka zakażeń szczepami *E. coli* O157 przenoszonych przez wodę.