

MAŁGORZATA MICHALSKA-SZYMASZEK

## WYSTĘPOWANIE *ESCHERICHIA COLI* O 157 W WODACH POWIERZCHNIOWYCH I PODZIEMNYCH

### THE PRESENCE OF *E. COLI* O 157 IN THE SURFACE AND UNDERGROUND WATERS

Laboratorium Higieny Komunalnej  
Wojewódzka Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna w Rzeszowie  
Dział Laboratoryjny w Tarnobrzegu  
39-400 Tarnobrzeg, ul. 1-go Maja 5

*Wykrywano obecność pałeczek E. coli O 157 w próbkach wody powierzchniowej i podziemnej pobranych w sezonie letnim. Przeprowadzone badania wykazały sporadyczne występowanie E. coli O 157.*

**Słowa kluczowe:** *Escherichia coli* O 157, próbki wody, wykrywanie  
**Key words:** *Escherichia coli* O 157, samples of water, detection

#### WSTĘP

*Escherichia coli* O157 jest jednym z enterokrwotocznych odmian *E. coli* ruchliwych bądź nieruchliwych pałeczek gramujemnych należących do rodziny Enterobacteriaceae. Enterokrwotoczne szczepy *E. coli* (EHEC) zostały po raz pierwszy wykryte w roku 1982 w USA. Były one przyczyną licznych krwawych biegunek spowodowanych zjedzeniem hamburgerów z niedogotowanym mięsem wołowym [1, 8]. Potwierdzonym w laboratorium czynnikiem zakaźnym był wówczas serotyp O157:H7, wytwarzający toksynę, podobną w budowie i działaniu do toksyny wytwarzanej przez *Shigella dysenteriae* 1 [1], szczepy te zaliczane są do podgrupy STEC – szczepów *E. coli* wytwarzających toksynę Shiga. Takie szczepy są przyczyną biegunek jelitowych o różnym stopniu nasilenia, a również przyczyną występowania u niektórych chorych zespołu hemolityczno-uremicznego (HUS) o ciężkim przebiegu często śmiertelnym. Rezerwuarem pałeczek *E. coli* O 157 jest bydło, zwierzęta dzikie i domowe oraz ptactwo wodne wydalające z kałem ten szczep bakteryjny [4].

Droga zakażenia *E. coli* O157 odbywa się poprzez [6, 8]:

- bezpośredni kontakt ze zwierzętami nosicielami
- spożywanie żywności i wody do picia skażonej odchodami
- kąpiel w wodach skażonych odchodami zwierząt lub ludzi nosicieli
- kontakt z osobą zakażoną nie zachowującą podstawowych zasad higieny osobistej.

Jak dotąd w Polsce nie było doniesień o występowaniu *E. coli* O 157 w wodzie. Nie odnotowano też zachorowań pojawiających się po spożyciu wody zanieczyszczonej tymi bakteriami.

Celem podjętych badań była próba wykrycia obecności bakterii *E. coli* O157 w wodach powierzchniowych tzn. w jeziorach, rzekach, kąpieliskach oraz w wodach podziemnych np. w studniach przydomowych, w celu oceny stopnia zagrożenia dla zdrowia ludzi kontaktujących się z wodą.

## MATERIAŁ I METODY

W sezonie od czerwca do października 2006 roku przeprowadzono badania 76 próbek wody na terenie powiatu tarnobrzesckiego, stalowowolskiego, staszowskiego i sandomierskiego: 8 próbek wody pochodziło z kąpielisk, 38 próbek z jezior przy pastwiskach, 26 próbek z rzek i 4 próbki stanowiła woda ze studni przydomowych usytuowanych w pobliżu budynków, w których przebywało bydło.

Badanie próbek wody w kierunku wykrywania pałeczek *E. coli* O157 przeprowadzono metodą filtracji membranowej wg metodyki własnej opartej na normie PN-EN ISO 16654:2002 (Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania *Escherichia coli* O 157). Badania te miały charakter jakościowy.

1. W pierwszym etapie przy użyciu aparatu filtracyjnego sączono 500 ml wody przez filtr membranowy o średniej wielkości porów 0,45  $\mu\text{m}$ .
2. Po przesączeniu filtr membranowy przenoszono do płynnego podłoża wybiórczo-namnażającego mTSB (bulion tryptonowo-sojowy) z nowobiocyną wg pkt.5.1.1 i 5.1.2 normy PN-EN ISO 16654:2002 i inkubowano w temperaturze 41,5°C przez 18-24 godzin.
3. Po wymaganym czasie inkubacji posiewano powierzchniowo (metodą sektorowo-redukcyjną) oczko ezy danego inokulum na podłoże wybiórcze CT-SMAC tj. *Mac Conkey* z cefiximem, telurynem potasu i sorbitolem (pkt.5.2 ww. normy) oraz na podłoże fluorogenne MUG. Inkubacja posianych podłoży prowadzono w temperaturze 36 $\pm$ 2 °C przez 18–24 godzin.
4. Kolonie podejrzane o przynależność do *E.coli* O 157 były potwierdzane biochemicznie oraz przy użyciu testu lateksowego.

## WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Przeprowadzone badania wykazały, że wykrywalność pałeczek *E. coli* O157 w próbkach wody na badanym terenie, w okresie ciepłych miesięcy tzn. od czerwca do października 2006 roku była niska i wyniosła 2,6%.

Liczbę przebadanych próbek wody w poszczególnych miesiącach ogółem i liczbę próbek z wynikiem dodatnim tzn. tych, z których wyhodowano *E. coli* O 157 przedstawiono w tabeli I.

Tabela I. Wyniki badania próbek wody  
Table I. The results of water samples testing

Miesiąc	Liczba próbek badanych	Liczba próbek w których wyhodowano <i>E.coli</i> O 157
Czerwiec	8	0
Lipiec	15	0
Sierpień	20	<b>2</b>
Wrzesień	21	0
Październik	12	0
Razem	<b>76</b>	<b>2,6%</b>

Wyhodowane dwa szczepy pochodziły z naturalnych zbiorników wodnych, z których jeden znajdował się na pastwisku (miano coli wynosiło 0,02), natomiast drugi w lasku i był zasiedlony przez dzikie ptactwo wodne ( miano coli wynosiło 0,03).

Próbki z wynikiem dodatnim były pobrane w sierpniu, gdy temperatura otoczenia wynosiła 25°C, a dzień przed poborem padał intensywny deszcz. Deszcz prawdopodobnie spłukał odchody zwierząt bytujących w pobliżu zbiorników, co zwiększyło szansę wyhodowania poszukiwanych mikroorganizmów. Wyhodowane szczepy były sorbitolododatnie. Jak wynika z piśmiennictwa [1,12] większość wykrywalnych szczepów *E. coli* O157 nie ma zdolności do fermentacji sorbitolu, co uważano za ważną cechę odróżniającą tę serogrupę od niepatogennych bakterii *E. coli* obficie występujących w wodach powierzchniowych. Jednakże na terenie południowych Niemiec, w Bawarii wystąpiły w roku 2002 liczne zachorowania z objawami HUS z których izolowano nieruchliwe szczepy *E. coli* O 157 fermentujące sorbitol. Wykazano, że 50 izolowanych w Niemczech szczepów *E. coli* O 157 posiada zdolność do fermentacji sorbitolu [2]. Stawia to pod znakiem zapytania przydatność podłoża MAC z sorbitolem do izolacji szczepów O 157 w krajach środkowo europejskich.

Odczyn pH dodatnich próbek wody mieścił się w przedziale od 6,9 - 7,2. Bakterie *E. coli* O157 z uwagi na przeżywalność w przewodzie pokarmowym przeżuwaczy cechują się przypuszczalnie dużą opornością na kwaśne środowisko (pH soku żołądkowego przeżuwaczy może mieć odczyn kwaśny) [5]. Potwierdzeniem tej cechy było wyhodowanie jednego z dwóch szczepów z próbki wody (oznaczonej kodem Sw4) zakwaszonej do wartości pH=3,87 (tabela II). Drugi szczep natomiast został wyizolowany z wody o pH=7,2. Zakwaszenie próbki wody mogłoby zwiększyć szansę na wykrycie *E. coli* O157, lecz ta prawidłowość nie potwierdza się w każdym przypadku. Właściwości biochemiczne szczepów potwierdzonych jako *E. coli* O 157 przedstawia tabela II.

Szczep zakodowany jako Sw4 został wyizolowany z wody pochodzącej z naturalnego zbiornika wodnego na pastwisku dla bydła, zakwaszonej 1-molowym kwasem solnym do wartości pH=3,8, natomiast z tej samej próbki wody o pH wyjściowym równym 6,9 nie udało się wyizolować poszukiwanego szczepu. Szczep D3 pochodzi z wody o pH 7,2. Próbką ta była również zakwaszana do wartości pH =3,8, lecz nie wyizolowano w tym przypadku ponownie *E. coli* O 157. Jako szczep kontrolny został użyty szczep *E. coli* O157- sorbitoloujemny, wyizolowany z kału osoby chorej (z biegunką).

Woda jest środowiskiem bardzo różnorodnym pod względem mikrobiologicznym, biologicznym i chemicznym. Warunki środowiskowe wpływają na różnorodność właściwości biochemicznych szczepów *E. coli* i *E. coli* O 157, pochodzących z różnych środowisk. Niska wykrywalność *E. coli* O157 w próbkach wody może wynikać z wielu przyczyn. Nie każde zwierzę zaliczane do grupy nosicieli posiada szczep *E. coli* O157 [4, 9]. Wydalanie z kałem tych bakterii jest sezonowe, prawdopodobnie największe podczas lata [10]. Wysokie temperatury otoczenia oraz susza powodują, że wydalone z odchodami zwierząt bakterie nie dostają się do wód [13]. Mała wybiórczość metody badawczej i dość obficie występująca flora towarzysząca sprawia, że wyselekcjonowanie tego szczepu jest trudne [1], także z powodu nie przydatności powszechnie stosowanego podłoża z sorbitolem do izolacji odmian sorbitolododatnich *E. coli* O157. Dodatek antybiotyków do pożywienia dla bydła i innych zwierząt zmienia ich florę jelitową w tym także eliminuje *E. coli* O 157 [3].

Wykrycie w sezonie letnim dwóch szczepów *E. coli* O157 w próbkach wody jest potwierdzeniem niskiej wykrywalności tej grupy mikroorganizmów. Próbki wody z omawianych

Tabela II. Właściwości biochemiczne szczepów *E.coli* O157 wyizolowanych z próbek wody i szczepu kontrolnego *E.coli* O 157 wyizolowanego od osoby z biegunkąTable II. Biochemical specificity of *E.coli* O 157 isolated from water samples and control strain *E.coli* O 157 isolated from diarrhoea patients

Kod	Indol	mocznik	kligler			lizyna	laktoza 10%	MR	VP	Simmons	KCN	arginina	ornityna	Christensen	laktoza	maltoza	sorbitol	glukoza	fruktoza	sacharoza	ruch
			glukoza	gaz	H <sub>2</sub> S																
Sw 4	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D3	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+/+
Szczep kontrolny <i>E.coli</i> O157	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-

Kod	inozytol	mannotol	arabinoza	rafinoza	ksyloza	ramnoza	adonitol	malonian sodu	Aktywność β-glukuronidazy	hemoliza	Test API
Sw 4	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	<i>E.coli</i> 5144572
D3	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	<i>E.coli</i> 1144572
Szczep kontrolny <i>E.coli</i> O157	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	

(+) oznacza typowe reakcje biochemiczne na danym podłożu ; (-) oznacza brak typowych reakcji biochemicznych na danym podłożu

naturalnych zbiorników wodnych zostały ponownie (dwukrotnie) przebadane. W żadnym jednak powtórnym badaniu nie udało się ponownie wyizolować poszukiwanych mikroorganizmów. Nasuwa się więc pytanie jakie stanowią niebezpieczeństwo dla zdrowia i życia człowieka?

*E. coli* O157 jest florą mniejszościową w przewodzie pokarmowym a tym samym w odchodach zwierząt nosicieli [13]. Odchody zwierząt zawierające *E. coli* O157 mogą zanieczyszczać wodę powierzchniową i wody podziemne poprzez deszcze i roztopy śniegu, a następnie zakażać ludzi kontaktujących się z taką wodą. Chorobotwórczość dla człowieka związana jest z wytwarzaniem przez te bakterie toksyny tzw. shigatoksyny (verotoksyny-ważną rolę odgrywa tu szczep *E.coli* O157:H7) [3]. Nie każdy szczep *E. coli* O157 jest jednak chorobotwórczy dla ludzi, z uwagi na brak wytwarzania toksyny. Wypicie wody zawierającej toksyczne szczepy *E. coli* O157 powoduje biegunki początkowo wodniste a następnie pojawiają się w kale ślady krwi. Czas wylegania choroby od 1 do 3 dni (a nawet 8 dni)[8] a czas trwania biegunek około 10 dni. Po upływie tego czasu biegunka ustępuje. Infekcja może jednak powodować komplikacje scharakteryzowane jako HUS (*Haemolytic Uraemic Syndrome*) – ostra niewydolność nerek, anemia hemolityczna i trombocytopenia (zaburzenia

krzepliwości krwi). U większości pacjentów, u których pojawiło się HUS, choroba prowadzi do śmierci. Na wystąpienie HUS najbardziej narażone są osoby starsze, dzieci <14 roku życia [8], osoby z osłabioną odpornością (chore na raka, AIDS). Ryzyko zagrożenia zdrowia a nawet życia ludzi korzystających z wód zanieczyszczonych pałeczkami *E. coli* O 157 jest duże [7]. Niebezpieczeństwo jakie niesie ze sobą obecność tej bakterii w wodzie skłania naukowców do szczegółowych badań tych mikroorganizmów, ich właściwości biochemicznych, przetrwalności w wodzie oraz do opracowania sposobów jak takim infekcjom zapobiegać.

### WNIOSKI

Przeprowadzone badania próbek wody wykazały niską wykrywalność pałeczek *E. coli* O 157 wynoszącą 2,6 %. Niniejsze badania nad szczepem *E. coli* O157 będą kontynuowane.

M. Michalska-Szymaszek

#### WYSTĘPOWANIE *ESCHERICHIA COLI* O 157 W WODACH POWIERZCHNIOWYCH I PODZIEMNYCH

##### Streszczenie

*E. coli* O 157 jest bakterią gram ujemną należącą do enterokrwotocznych pałeczek jelitowych *E. coli* (EHEC). Bakterie te stanowią fizjologiczną florę jelitową bydła, ale wykryto je także w odchodach innych zwierząt. Bakterie te wydalane z odchodami zwierząt dostają się do gleby i wraz z deszczem i roztopami śniegu splukiwane są do wód powierzchniowych i wód podziemnych gruntowych. Zagrożenie dla człowieka stanowią te szczepy *E. coli* O 157, które wytwarzają toksynę- zwaną Shigatoksyną. Celem niniejszej pracy była próba wykrycia obecności pałeczek *E. coli* O 157 w naturalnym środowisku wodnym i wstępne określenie ich właściwości biochemicznych. Materiał do badań stanowił próbki wody powierzchniowej i podziemnej pobrane w okresie ciepłych miesięcy. Badania próbek wody przeprowadzone w sezonie letnim wykazały sporadyczne występowanie *E. coli* O 157 w naturalnym środowisku wodnym.

M. Michalska-Szymaszek

#### THE PRESENCE OF *E. COLI* O157 IN THE SURFACE AND UNDERGROUND WATERS

##### Summary

*Escherichia coli* O 157 is the G(-) bacteria, and belongs to the enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC). *E. coli* O 157 is a bacteria that is a common inhabitant of the ruminants, particularly cattle. These bacteria are expelled with animal excretions and can contaminate the soil. They are transferred by rain and melting snow into surface and underground water. The strain *E. coli* O 157 is dangerous for human, because of toxins, known as Shiga. In this study *E. coli* O 157 in the samples of surface and underground water was determined. It was shown that *E. coli* O 157 appears in natural waters very rare.

## PIŚMIENNICTWO

1. *Agaoglu S., Yavuz M.T., Berktaş M., Guducuoglu H.*: Detection of *E. coli* O 157:H7 in Retail Ground Beef, Raw Ground Beef Patties and Raw Meat Balls Sold in Van. *Eastern Journal of Medicine* 2000, 5 (2): 73-75
2. *Alpers K., Weber D., Frank C. I.*: Large outbreak of Haemolytic uraemic syndrome associated with sorbitol fermenting Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O 157 H- in southern Germany, October to December 2002. *Proceedings of the 5<sup>th</sup> World Congress Foodborne Infections and intoxications.* BFR 2004, 381-382
3. *Callaway T.R. et al.*: What are we doing about *E.coli* O 157:H7 in cattle? *J.Anim.Sci.*2004, 82 (E Suppl):E93-E99
4. *Cornick N.A., Booher S.L., Casey T.A., Moon H.W.*: Persistent Colonization of Sheep by *E. coli* O 157H:7 and Other *E. coli* Pathotypes. *Applied and Environmental Microbiology* 2000, Vol.66, No 11, 4926-4934
5. *Ewy Z.*: Zarys fizjologii zwierząt. 1989, 321
6. *LeJeune J.T., Besser T. E., Hancock D.D.*: Cattle Water Troughs as Reservoirs of *Escherichia coli* O 157. *Appl Environ Microbiol.*2001 July; 67(7): 3053-3057.
7. *Karen R.*: Unusual *E. coli* Outbreak in Southwest Washington Has Been Traced to Contaminated Lake water. *EpiTrends* :1999, Vol.4 No. 9, 1-2
8. *Karch, Helge; Bockemuhl, Jochen; Huppertz, Hans-Iko*: Erkrankungen durch enterohaemorrhagische *E.coli* (EHEC). *Dt Arztebl* 2000; 97: A 2314-2318 [Heft 36].
9. *Kiefer C.A., Golden D.A., Draughon F.A., Mathew A.G., and Oliver S.P.*: Evaluation of FDA/BAM and rapid methods for enumeration and detection of *Escherichia coli* O157:H7 from farm animal environments. 2000. *Proceedings, Annual Meeting of the International Association for Food Protection* (Poster P117), Atlanta, GA, 2000.August 6-9
10. *Mehmet Elmali, Zeynep Ulukanli, Hilmi Yaman, Mehmet Tuzcu, Kenan Genctav and Perihan Cavli*: A Seven Month Survey for the Detection of *E. coli* O 157:H7 from Ground Beef Samples in the Markets of Turkey. *Pakistan Journal of Nutrition* 2005, 4(3) 158-161.
11. *Scott McEwen at the University of Guelph.*: U of G Researchers Testing *E. coli* O 157 Vaccine for Cattle. *News Release*, 2002
12. *Sherman,P., Soni R., Petric M., Karmali M.*: Surface properties of the Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* serotype O157:H7. *Infect. Immun.* 1987, 55, 1824-1830
13. *Stanfield G., Gale P., Carrington E.*: Scoping study on *E. coli* O 157 in water. *Water Research Centre.* Environment Group 1997

Otrzymano: 23.01.2007 r.