

Zoonotiske *E. coli* i norske kjøttvarer



Veterinærinstituttet
Norwegian Veterinary Institute



Zoonotiske *E. coli* i norske kjøttvarer

Innhold

Sammendrag	3
Summary	3
Bakgrunn	4
Materiale og metoder	5
Resultater og vurderinger	7
Referanser	10
Annex 1	11

Forfattere / Authors

Gro S. Johannessen, Camilla Sekse, Marianne Økland, Anne Margrete Urdahl, Mona Torp

Oppdragsgiver / Commissioned by

Mattilsynet / Norwegian Food Safety Authority

ISSN 1894-5678



© Veterinærinstituttet 2019 / © Norwegian Veterinary Institute 2019

Design omslag/Design Cover: Reine Linjer
Foto forside / Photo front page: Colourbox

Sammendrag

Zoonotiske *E. coli* inkluderer Shiga toksin-produserende *E. coli* (STEC). Storfe regnes som det viktigste reservoaret for zoonotiske STEC, og også som hovedkilde for sykdomstilfeller hos mennesker. Det er derfor viktig å ha kunnskap om forekomsten av STEC både i storfe og i produkter av storfekjøtt, slik som kvernet kjøtt og kjøttdeig. Det gjennomføres ikke årlig overvåkning av zoonotiske *E. coli* i storfepopulasjonen eller i produkter av storfekjøtt. Resultatene fra en kartlegging av zoonotiske *E. coli* i storfe utført i 2014-2017 viste at forekomst av STEC av serogruppene O26, O91, O103, O111, O121, O145 og O157 var lav i norske melkekubesetninger. Mattilsynet initierte derfor kartlegging av STEC i norske kjøttvarer med innsamling av prøvemateriale i 2017 med påfølgende analyser i 2018.

Det ble samlet inn til sammen 308 prøver av kvernet kjøtt og kjøttdeig av storfe. Oppformerte prøver ble undersøkt for tilstedeværelse av de genetiske markørene *stx*₁, *stx*₂ og *eae*. Prøvene som var positive for *stx* og *eae* gener ble videre undersøkt for genetiske markører for serogruppene O26, O91, O103, O121, O145 og O157. Det ble utført isolering fra prøver som var positive for virulensmarkørene og en eller flere av O-gruppene. Stammer identifisert som STEC ble videre karakterisert ved helgenomsekvensering.

Resultatene tyder på at forekomsten av STEC av serogruppene O91, O103, O111, O121, O145 og O157 er lav, men at de kan forekomme. I tillegg ble det isolert atypiske enteropatogene *E. coli* (aEPEC) og *E. coli* uten virulensfaktorer som tilhørte de undersøkte serogruppene. Dette må imidlertid anses som tilfeldige funn siden STEC har vært fokus i denne studien.

Resultatene tyder på en god situasjon i Norge med lav forekomst av STEC som kan gi alvorlig sykdom hos mennesker. Det er lenge siden de forrige studiene ble utført på norske kjøttvarer, og da disse i stor grad kun fokuserte på *E. coli* O157:H7, gir denne kartleggingen viktig, oppdatert kunnskap til nytte for både næring, myndigheter og kunnskapsinstitusjoner. Det er derfor viktig å gjennomføre slike kartlegginger jevnlig for å generere oppdaterte norske data.

Summary

Zoonotic *E. coli* includes Shiga toxin producing *E. coli* (STEC). Cattle are considered the most important reservoir for zoonotic STEC, and also the main source for human infection. Thus, it is important to have knowledge on the occurrence of STEC in cattle, and products such as beef and minced meat. The results from a survey of zoonotic *E. coli* in cattle, which was carried out in 2014-2017, indicated a low occurrence of STEC of serogroups O26, O91, O103, O111, O121, O145 and O157 in Norwegian dairy herds. The Norwegian Food Safety Authority commissioned a survey of STEC in Norwegian meat products. The samples were collected in 2017 with subsequent analyses in 2018.

A total of 308 samples of minced meat were collected. Enriched samples were screened for the presence of the genetic markers *stx*₁, *stx*₂ and *eae*. Samples positive for *stx* and *eae* were further screened for the genetic markers for the serogroups O26, O91, O103, O121, O145 and O157. After screening, isolation was carried out from the samples that were positive for virulence markers and one or more of the serogroups. Isolates identified as STEC were further characterized using whole genome sequencing.

The results indicates that the occurrence of STEC of the serogroups O91, O103, O111, O121, O145 and O157, is low, but such bacteria may occur. Atypical enteropathogenic *E. coli* (aEPEC) and *E. coli* without virulence factors belonging to the serogroups in question were also isolated. However these findings must be considered as random findings as STEC was the focus of this survey.

The results indicate a good situation in Norway with low occurrence of STEC that may cause serious illness in humans. The former surveys on STEC in Norwegian meat products were carried out several years ago and were mainly focused on STEC O157:H7. The present survey provides important, updated knowledge for the industry, authorities and knowledge institutions. However, it is imperative to carry out similar surveys regularly to generate updated Norwegian data.

Bakgrunn

Det er ulike *Escherichia coli* som kan gi sykdom hos mennesker, hvorav Shigatoksin-produserende *E. coli* (STEC) kan forårsake alvorlig sykdom (1). Dette gjelder særlig hos barn, i form av blodig diaré med mulighet for påfølgende nyresvikt (HUS) og eventuelt død. En annen viktig gruppe *E. coli*, med mulig zoonotisk potensiale og som er beslektet med STEC, er atypiske enteropatogene *E. coli* (aEPEC).

Definisjoner og forkortelser	
STEC	Shigatoksin-produserende <i>Escherichia coli</i> ; <i>E. coli</i> som er bærere av Shigatoksin-gener (<i>stx</i>)
VTEC	verotoxin-produserende <i>E. coli</i> , er det samme som STEC
EHEC	enterohemoragisk <i>E. coli</i> , har både <i>stx</i> - og <i>eae</i> -gener og kan gi alvorlig sykdom hos menneske (blodig diaré og hemolytisk uremisk syndrom)
aEPEC	atypiske enteropatogene <i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> som har intimingen (<i>eae</i>), men ikke <i>stx</i> -gener, kan gi diaré hos menneske
EAEC	enteroaggregative <i>E. coli</i> ; <i>E. coli</i> som har <i>aggR</i> (og <i>aaiC</i>) og kan gi diaré hos menneske
HUS	hemolytisk uremisk syndrom, en form for nyresvikt
<i>stx</i>	gen som koder for Shigatoksin. Har tilsvarende undergrupper som toksinet det koder for, <i>stx</i> ₁ og <i>stx</i> ₂ , samt undergrupper av disse igjen
<i>eae</i>	gen som koder for tilheftingsegenskap (intimin)
<i>ehxA</i>	gen som koder for enterohemolysin
O-grupper	serogruppering ved hjelp av O-antigener (LPS - lipopolysakkarider) feks. O157, O26, O103
H-typer	serotyping ved hjelp av H-antigener (flagellære antigener) feks. H7, H11, H2
Zoonotiske <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> som kan overføres/smitte mellom dyr og mennesker

I de senere årene har det vært økning i antall rapporterte tilfeller av STEC hos mennesker i Norge. I 2018 ble det rapportert 494 tilfeller (www.msis.no). STEC O157, O26, O145 og O103 er de vanligst rapporterte STEC serogruppene fra sykdomstilfeller hos mennesker i Norge, men også andre serogrupper, bl.a. O91, O146 og O113 er rapportert som årsak til sykdom (2).

STEC er bærer av Shigatoksin-gener (*stx*), som er regnet som den viktigste virulensfaktoren. Shigatoksiner deles i to hovedgrupper; Stx1 og Stx2, som videre er inndelt i subtyper (3). Noen Stx subtyper er mer assosiert med alvorlige sykdom hos mennesker enn andre. Blant annet er tilstedeværelse av genet *stx*_{2a} oftere assosiert med HUS enn andre subtyper (4). Sykdomsfremkallende STEC inneholder flere virulensfaktorer, og særlig *eae* (som koder for tilhefting til epitelceller i tarmen) er viktig. aEPEC har som STEC, tilheftingsegenskapen intimin som er kodet av *eae*, og deler også mange andre virulensfaktorer med STEC. Imidlertid er aEPEC ikke bærere av *stx*.

Storfe regnes som det viktigste reservoaret for zoonotiske STEC, og også som hovedkilden for sykdomstilfeller hos mennesker. Det er derfor viktig å ha kunnskap om forekomsten av STEC både i storfe og i produkter av storfekjøtt, slik som kvernet kjøtt og kjøttdeig. Det utføres ikke årlig overvåkning av zoonotiske *E. coli* i storfepopulasjonen eller i produkter av storfekjøtt. Høsten 2014 ble det samlet inn prøver til en kartlegging av forekomsten av potensielt zoonotiske *E. coli* hos storfe i Norge med påfølgende analyser. Resultatene fra denne kartlegging viste at forekomsten av STEC av serogruppene O26, O91, O103, O121, O145 og O157 var lav i norske melkekubesetninger (5). Med bakgrunn i dette bestilte Mattilsynet i 2016 en kartlegging av zoonotiske *E. coli* (STEC) i norske kjøttvarer. Innsamling av prøvematerialet skulle foregå i 2017 med påfølgende analyser i 2018 etter nærmere avtale med Mattilsynet.

Materiale og metoder

Utvalg og prøveinnsendelse

Alle prøver ble tatt hos detaljist av Mattilsynet i 2017 i henhold til oppsatt uttaksplan. Uttaksplanen var basert på kriterier som sikret tilfeldig utvalg av prøver fra hele landet gjennom et helt år (6). Prøvene skulle bestå av kvernet kjøtt, kjøttdeig eller karbonadedeig av storfekjøtt. Prøvene ble sendt inn med kjøling til laboratoriet. Ved ankomst til laboratoriet ble prøvene oppbevart i kjøleskap i maks 3 dager fram til analysestart.

Bakteriologiske undersøkelser

Undersøkelse for genetiske markører i oppformert materiale

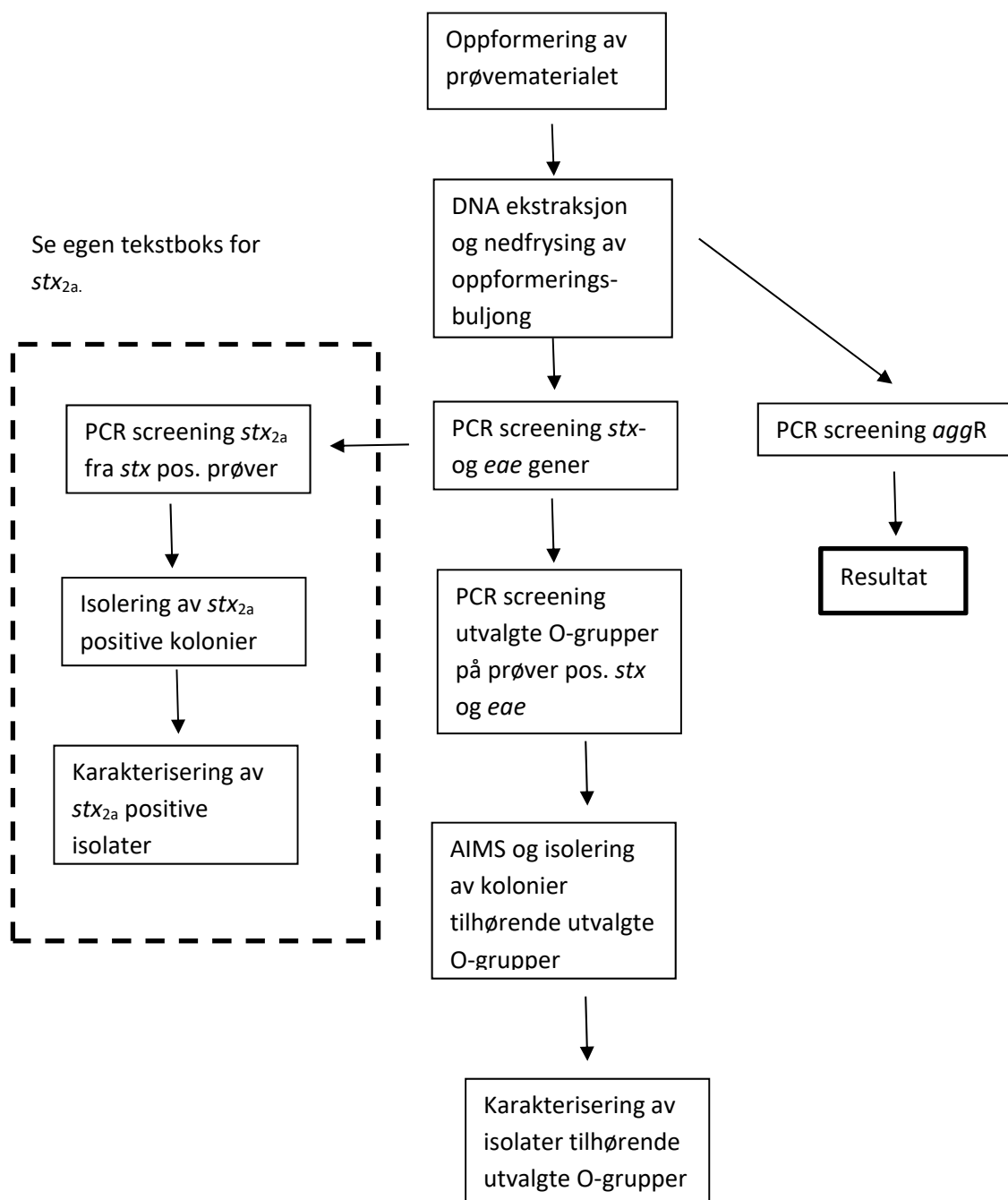
Prøvene ble analysert som beskrevet i ISO TS 13136:2012, med enkelte presiseringer. Fra hver prøve ble 25 g kvernet storfekjøtt blandet med 225 ml bufret peptonvann (BPV-ISO), homogenisert og inkubert ved 37 °C i ca. 18 timer. Figur 1 viser trinnene i videre analyse.

Etter oppformering ble DNA ekstrahert fra oppformeringsbuljongen ved bruk av DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Tyskland) i henhold til produsentens anvisninger. I tillegg ble det frosset ned fire rør med oppformeringsbuljong og 85 % glyserol (3,3 ml buljong + 1,7 ml glyserol), ved -80 °C for videre isolering av bakterier. Prøvene ble primært analysert for tilstedeværelse av *stx*₁, *stx*₂ og *eae* ved hjelp av real-time PCR som beskrevet i ISO TS 13136:2012. Primere og prober benyttet i kartleggingen er angitt i Annex 1.

Etter de første analysene for *stx*₁, *stx*₂ og *eae*, ble prøver som var positive for *stx*₁ og/eller *stx*₂ og *eae* undersøkt videre ved hjelp av real-time PCR for tilstedeværelse av O-gruppene O26, O103, O121, O145 og O157. Prøvene som var positive for *stx*-gener ble også undersøkt for serogruppe O91. Alle prøvene ble undersøkt for *aggR* (markør for enteroaggregative *E. coli* (EAEC)). I tillegg ble prøvene som var positive for *stx*₂, undersøkt for tilstedeværelse av subtype *stx*_{2a} (se egen tekstboks). Tabell 1 gir oversikt over hvilke gener de oppformerte prøvene ble undersøkt for.

Tabell 1. Oversikt over hvilke gener de oppformerte prøvene er undersøkt for med PCR i kartleggingen av patogene *E. coli* i norske kjøttvarer i 2017.

Undersøkt gen	Forklaring
<i>stx</i> ₁	Shigatoksin 1, alle <i>stx</i> ₁ varianter
<i>stx</i> ₂	Shigatoksin 2, alle <i>stx</i> ₂ varianter bortsett fra <i>stx</i> _{2f}
<i>eae</i>	Intimin, tilheftningsgen assosiert med EPEC og patogene STEC
<i>wzxO26</i>	Gen assosiert med serogruppe O26
<i>wzyO91</i>	Gen assosiert med serogruppe O91
<i>wzxO103</i>	Gen assosiert med serogruppe O103
<i>wzxO121</i>	Gen assosiert med serogruppe O121
<i>wzyO145</i>	Gen assosiert med serogruppe O145
<i>rfbE0157</i>	Gen assosiert med serogruppe O157
<i>aggR</i>	Virulensgen assosiert med EAEC og bla. STEC O104:H4 (spireutbrudd)



Figur 1. Oversikt over utførte analyser i kartleggingen av patogene *E. coli* i norske kjøttvarer i 2017.

Isolering av bakterier

På bakgrunn av resultatene fra de innledende analysene for genetiske markører, ble det gått videre med isolering av STEC tilhørende de aktuelle O-gruppene. Prøver positive for *stx*-, *eae*- og serogruppe O26, O103, O121, O145 eller O157, samt prøver positive for *stx*-gener og serogruppe O91, ble valgt ut for videre isolering.

Prøvene ble tint raskt i vannbad ved 50 °C til all is var borte (ca. 2 min) (7)). Deretter stod rørene ca. 1 time i romtemperatur før 1 ml tint materiale ble overført til 9 ml fersk BPV-ISO og inkubert ved 37 °C i 2-3 timer. Videre ble automatisk immunomagnetisk separasjon (AIMS) benyttet for å oppkonsentrere målbakterier (av en bestemt O-gruppe) og fjerne noe av bakgrunsmikrobiota.

Etter AIMS ble prøvene sådd ut på Chrom agar O157 (CHROMagar, Paris, Frankrike) og sorbitol MacConkey agar (SMAC; OXOID, ThermoFisher Scientific, MA, USA). Prøver som ble undersøkt for O26 ble sådd på MacConkey agar med rhamnose (RMAC; BD Difco™, NJ, USA) i stedet for SMAC.

Etter inkubering (37 °C i 18-24 timer) ble skålene undersøkt for typiske og mistenkelige kolonier, og 30 kolonier fra hver prøve ble agglutinert med O antiserum. Alle koloniene som agglutinerte ble testet for *stx*₁, *stx*₂, *eae* og aktuell O-gruppe. Inntil tre isolater av potensielle STEC og aEPEC, samt ett isolat fra hver prøve som kun var positiv for aktuell O-gruppe, ble rendyrket og tatt vare på for videre identifisering og karakterisering.

Alle isolatene som ble tatt vare på ble verifisert som *E. coli* i MALDI Biotyper (MALDI-TOF, Bruker, Bremen, Tyskland).

Exact binominal test ble benyttet for å kalkulere 95 % konfidensintervall, og ble utført i R versjon 3.5.2 (The R Foundation for Statistical Computing Platform; 2018-12-20).

Helgenomsekvensering og analyse

Et utvalg av isolater ble karakterisert ved helgenomsekvensering. DNA fra hvert isolat ble ekstrahert med QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Tyskland). DNA ble sendt til sekvensering til Eurofins Genomics og sekvensdataene ble kvalitetssjekket og videre analysert i Bifrost, en internt tilpasset pipeline for analyse av bakterieisolater. I tillegg ble dataene analysert i web-baserte verktøy fra Center for Genomic Epidemiology (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/>) for karakterisering av serotype, virulensgener, MLST og eventuelle resistensgener.

Resultater og vurderinger

Det ble samlet inn 308 prøver av norske kjøttvarer av storfe (kvernet kjøtt, kjøttdeig og karbonadedeig) i perioden fra februar og ut november 2017.

Undersøkelse for genetiske markører

Tabell 2 viser oversikt over resultatene for genetiske markører. Resultatene benyttes som en indikator på om det kan være bakterier som inneholder de ulike markørene tilstede i prøvematerialet.

Tabell 2. Resultater fra screening for genetiske markører fra prøver av norske kjøttdeigprøver i 2017.

Genetisk markør	Antall prøver undersøkt	Antall positive prøver	% positive prøver	95% konfidensintervall
<i>stx</i> ₁	308	27	8,7	5,8 - 12,5
<i>stx</i> ₂	308	70	22,7	18,2 - 27,8
<i>eae</i>	308	64	20,1	16,4 - 25,7
<i>aggR</i>	308	0	0	0 - 1,1
O26	33	7	21,2	9,0 - 38,9
O103	33	10	30,3	15,6 - 48,7
O145	33	2	6,1	0,7 - 20,2
O157	33	3	9,1	1,9 - 24,3
O91	73	17	23,0	14,2 - 34,6
O121	33	7	21,2	9,0 - 38,9

Forekomst av *stx*_{2a}-positive *E. coli* i norske kjøttvarer

Innledning

Shigatoksinene (Stx) er den viktigste virulensfaktoren hos STEC for utvikling av sykdom og hemolytisk uremisk syndrom (HUS) hos mennesker. Genene som koder for Stx (*stx*) sitter på bakteriofager som er integrert i bakteriekromosomet. Flere subtyper av både *stx*₁ og *stx*₂ eksisterer, og noen subtyper er mer assosiert med sykdom enn andre. Subtype *stx*_{2a} er den som er oftest assosiert med alvorlig sykdom slik som blodig diare og HUS (4, 14). Kunnskap om forekomst av *stx*_{2a}-positive *E. coli* finnes vanligvis først når subtyping av *stx* genet i bakterier har blitt utført. Standard metodikk for undersøkelse av prøver direkte for genetiske markører har vært på *stx*₁ og *stx*₂ generelt, og ikke så detaljert som *stx* subtyper. Forekomsten av subtype *stx*_{2a}, samt hvilke *E. coli* serotyper som er bærere av disse, i de forskjellige reservoarer er derfor ukjent.

I forbindelse med kartlegging av forekomst av patogene *E. coli* i norske kjøttvarer i Norge i 2017 ble også forekomsten av *stx*_{2a}-positive *E. coli* undersøkt i det samme materialet.

Materiale og metoder

Det samme prøvematerialet fra 308 prøver av kvernet kjøtt og kjøttdeig av storfe som ble benyttet i kartleggingen av patogene *E. coli* i norske kjøttvarer i 2017, ble benyttet i denne studien. DNA fra de oppformeringsbuljongene som var positive for *stx*₂ i primærscreeningen ble undersøkt spesifikt for *stx*_{2a} ved hjelp av real-time PCR. Fra *stx*_{2a}-positive prøver ble det forsøkt isolert *stx*_{2a}-positive *E. coli*. Siden *stx*_{2a} resultatene sees uavhengig av serogruppe, ble de positive prøvene fortynt og 100 µl fra passende fortyninger (10⁻³ og 10⁻⁴) ble sådd ut på tre forskjellige agarmedier; CHROMagar™ O157 (CHROMagar, Paris, Frankrike) og Sorbitol MacConkey agar (SMAC; OXOID, ThermoFisher Scientific, MA, USA). Etter inkubering ved 37 °C overnatt, ble 50 kolonier med karakteristisk *E. coli* morfologi valgt ut for rendyrking og real-time PCR for *stx*_{2a}-genet. Kolonier som var positive for *stx*_{2a} ble videre karakteriser med bl.a. helgenomsekvensering. DNA fra hvert isolat ble ekstrahert med QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Tyskland) og sendt til sekvensering ved Eurofins Genomics. Sekvensdataene ble kvalitetssjekket og videre analysert i Bifrost, en internt tilpasset pipeline for analyse av bakterieisolater. I tillegg ble dataene analysert med web-baserte verktøy som SerotypeFinder 1.1 og VirulenceFinder 2.0, ResFinder 3.2 og Multi locus sequence typing (MLST) *E. coli*#1 fra Center for Genomic Epidemiology (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/>).

Resultater

Til sammen 70 prøver var positive for *stx*₂ i den innledende undersøkelsen, og disse prøvene ble inkludert i videre undersøkelser for *stx*_{2a}. Ved bruk av real-time PCR ble *stx*_{2a}-genet påvist i ni av de 70 prøvene (12,7%). Fra to av de ni prøvene ble det isolert *E. coli* med *stx*_{2a}, tilsvarende <1% forekomst av *E. coli* med *stx*_{2a} i norske kjøttvarer. Det ble valgt ut fire isolater til videre karakterisering (to isolater fra hver positive prøve), og ett isolat fra hver positive prøve ble sendt til helgenomsekvensering. Resultatet fra helgenomsekvenseringen er vist i tabellen under.

Tabell 1. Resultater fra helgenomsekvensering av to *stx*_{2a} positive *E. coli* isolert fra to prøver av norske kjøttvarer.

Isolat	Serotype	<i>stx</i> -gener	Andre virulensgener	MLST
212-15	O22:H8	<i>stx</i> _{1a} , <i>stx</i> _{2a}	<i>ehxA</i> , <i>espP</i> , <i>subA</i>	ST-446
576-23	O153/O178:H19	<i>stx</i> _{1a} , <i>stx</i> _{2a}	<i>ehxA</i> , <i>espP</i>	ST-443

Begge isolatene som ble karakterisert hadde både *stx*_{1a} og *stx*_{2a} genene og flere andre gener som koder for potensielle virulensfaktorer. Imidlertid hadde ingen av isolatene *eae*-genet som er det vanligste tilheftningsgenet, og serogruppene de tilhører er ikke vanlig rapportert som årsak til sykdom. De *stx*_{2a} positive *E. coli*-ene kan likevel ikke avskrives som potensielt sykdomsframkallende, og betydningen av disse er uklar.

Referanser

- Persson S, Olsen KE, Ethelberg S, Scheutz F. Subtyping method for *Escherichia coli* shiga toxin (verocytotoxin) 2 variants and correlations to clinical manifestations. *J Clin Microbiol.* 2007;45(6):2020-4.
- Naseer U, Loberli I, Hindrum M, Bruvik T, Brandal L. Virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and the risk of developing haemolytic uraemic syndrome in Norway, 1992-2013. *Eur J Clin Microbiol.* 2017;36(9):1613-20.

Som tabell 2 viser var det variasjon i tilstedeværelse av de genetiske markørene i prøvene. Det ble påvist *stx*-gener (*stx*₁ og/eller *stx*₂) i til sammen 73 av prøvene. I alt 33 prøver var positive for både *stx*- og *eae*-gener, og disse ble dermed undersøkt videre for forekomst av de utvalgte O-gruppe spesifikke genene. Det er ingen automatisk sammenheng mellom de påviste markørene da de i den samme prøven kan være tilstede i forskjellige bakterier eller som fritt DNA/bakteriofager. Positive *stx* resultater kan derfor ha flere bakenforliggende årsaker; 1) tilstedeværelse av STEC, 2) rester av genetisk materiale, eller 3) frie *stx* bakteriofager. Siden PCR påviser genetisk materiale generelt i prøvene og ikke nødvendigvis i bakteriene, er det nødvendig å undersøke om de genetiske markørene er tilstede i levende *E. coli* for å kunne si noe om forekomst av potensielt sykdomsframkallende *E. coli*.

Ingen av prøvene var positive for *aggR*, markør for EAEC. EAEC ansees i utgangspunktet å være tilpasset mennesker, og det er forholdsvis lite kunnskap om EAEC i dyr og mat. I følge EFSA er det ikke noe bevis for at dyr er et reservoar for EAEC (8). Resultatene fra denne undersøkelsen støtter dette.

Forekomst

Det ble gått videre til isolering fra til sammen 27 prøver (PCR positive for *stx*, *eae* og en eller flere av markørene for O26, O103, O121, O145 og O157, eller *stx* og O91). Uavhengig av serogruppe ble det isolert STEC fra to av 308 prøver (<1%, 95% KI: 0,1- 2,3 %). Disse to prøvene inneholdt henholdsvis STEC O26 (*stx*₁ og *eae* positiv) og STEC O91 (*stx*₂ positiv).

Tabell 3. Resultater fra karakterisering av STEC isolater fra norske kjøttvarer.

O-gruppe	Serotype	Virulensprofil	MLST profil	Andre virulensgener
O26	O26:H11	<i>stx</i> _{1a} , <i>eae</i> , <i>ehxA</i>	ST-21	<i>cif</i> , <i>esp</i> -gener, <i>nle</i> -gener
O91	O91:H21	<i>stx</i> _{2b}	ST-442	-

I tillegg til funnene av STEC, ble det isolert aEPEC tilhørende serogruppene O26 og O145 fra tre prøver som i utgangspunktet også var positive for *stx* på screening. Ved isolering ble kun aEPEC av de respektive serogruppene identifisert og ingen STEC. I noen av prøvene som gikk videre til isolering ble det også isolert *E. coli* tilhørende de undersøkte serogruppene, men uten tilstedeværelse av *stx*- og *eae*-gener. I noen av prøvene var det også flere enn en serogruppe til stede, men ingen av disse var STEC.

Vurdering

I denne kartleggingen ble det isolert STEC av serogruppene O26 og O91 i to av til sammen 308 prøver (<1%) (Tabell 3). Det ble ikke isolert STEC av serogruppene O103, O121, O145 og O157 fra noen av prøvene. STEC O26 isolatet var av serotype O26:H11, inneholdt *stx*_{1a}, *eae*, *ehxA*, samt flere andre virulensassosierte gener (bl.a. *cif*, *esp*- og *nle*-gener), og er å regne som patogent for mennesker. Det andre STEC isolatet var av serotype O91:H21, inneholdt *stx*_{2b}, men hadde få andre virulensassosierte gener. Subtype *stx*_{2b} er ikke assosiert med alvorlig sykdom, og det anses derfor som mindre sannsynlig at STEC O91:H21 med subtype *stx*_{2b} vil kunne gi alvorlig sykdom hos mennesker. Det ble valgt å ikke analysere for serogruppe O111 i dette prosjektet da det er svært lav forekomst i norske storfe og den heller ikke er blant de vanligst forekommende ved human sykdom (2, 5). Tidligere studier på kjøttdeig i Norge har konsentrert seg om påvisning av STEC O157 og har funnet svært lave forekomster av STEC O157. Det samme gjelder forekomst av STEC O157 på storfeslakt, der et nasjonalt overvåkningsprogram fra 1998 til 2004 viste en forekomst på 0,06%.

Tall fra EFSA (9) viste at i 2017 rapporterte åtte medlemsstater inn resultater fra testing av rundt 760 prøver av kvernet kjøtt med ni positive STEC resultater. Til sammen fire av disse var STEC O157. I USA har USDA FSIS et «Microbiological Testing Program for *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) der kvernet kjøtt testes for O157:H7 og råvarer til kvernet kjøtt testes for O157:H7 og non-O157 STEC. I 2018 ble det påvist en lav forekomst (0,04% positive prøver for O157:H7) i produksjonsbedriftene som ble testet og ingen av prøvene fra butikker var positive. I råvarer til kvernet

kjøtt var det en forekomst på 0,14% positive for STEC (10). I en kartleggingsstudie fra Irland i 2011 ble det påvist STEC i 2,5% av de undersøkte prøvene av rått kvernet kjøtt og rå hamburgere, mens det ble påvist STEC O157 i 0,2% av prøvene (11). Andre studier fra andre land har imidlertid vist høyere forekomst (12, 13). Siden mange av de tidligere undersøkelsene som er utført har fokusert på *E. coli* O157:H7 og det er stor variasjon i studiedesign og metodikk brukt, er det vanskelig å sammenlikne resultater og studier direkte.

Funnene av aEPEC i den foreliggende studien må regnes som tilfeldige funn siden det har vært fokus på STEC her. Kartleggingen i storfe viste en viss forekomst av aEPEC O26, men resultatene kan ikke sammenliknes på grunn av forskjeller i design av studiet.

Resultatene fra denne kartleggingen viser at forekomsten av STEC av serogruppene O26, O91, O103, O121, O145 og O157 i norske kjøttvarer er lav, men at de kan forekomme. Siden det er lenge siden de forrige studiene ble utført på norske kjøttvarer og disse i stor grad kun fokuserte på *E. coli* O157:H7, gir kartleggingen viktig kunnskap til nytte for både næring, myndigheter og kunnskapsinstitusjoner. Det er derfor viktig å gjennomføre slike kartlegginger med jevne mellomrom for å generere oppdaterte norske data.

Referanser

1. FAO/WHO. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and food: attribution, characterization, and monitoring. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations World Health Organization; 2018. Report No.: 31.
2. Lyngstad TM KM, Valcarcel SB, Lange H, Nygård K, Jore S, Kapperud G, MacDonald E, Brandal LT, Feruglio SL, Grøneng GM, Blystad H, Vold L. . Årsrapport 2018 Overvåking av sykdommer som smitter fra mat, vann og dyr, inkludert vektorbårne sykdommer. . Oslo: Folkehelseinstituttet; 2019.
3. Scheutz F, Teel LD, Beutin L, Pierard D, Buvens G, Karch H, et al. Multicenter Evaluation of a Sequence-Based Protocol for Subtyping Shiga Toxins and Standardizing Stx Nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012;50(9):2951-63.
4. Naseer U, Lobersli I, Hindrum M, Bruvik T, Brandal L. Virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and the risk of developing haemolytic uraemic syndrome in Norway, 1992-2013. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2017;36(9):1613-20.
5. Johannessen G, Sekse C, Hopp P, Urdahl AM. Zoonotiske *E. coli* hos storfe. Oslo: Veterinærinstituttet; 2018. Report No.: 15 - 2018.
6. European Food Safety Authority (EFSA). Technical specifications on randomised sampling for harmonised monitoring of antimicrobial resistance in zoonotic and commensal bacteria. *EFSA Journal*. 2014;12(5):33.
7. Ternent HE, Innocent GT, Filshie LM, Taylor DJ, Steele WB, McEwen SA, et al. Frozen storage of *Escherichia coli* O157 in buffered peptone water and its detection on bovine carcasses. *J Food Prot*. 2004;67(1):40-5.
8. EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards). Scientific opinion on public health risks associated with Enterococci *Escherichia coli* (EAEC) as a food-borne pathogen. *EFSA Journal*. 2015;13(12):87.
9. EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal*. 2018;16 (12):262 pp.
10. <https://www.fsis.usda.gov/wps/portal/efsa/topics/data-collection-and-reports/microbiology/ec/e-coli-o157h7-year-to-date/ecoli-o157-raw-beef-testing-data-ytd>. (03.07.2019)
11. Food Safety Authority of Ireland. Microbiological safety of raw minced beef and beef burgers on retail sale in Ireland (11NS1). Food Safety Authority of Ireland; 2013.
12. Toro M, Rivera D, Jimenez MF, Diaz L, Navarrete P, Reyes-Jara A. Isolation and characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from retail ground beef in Santiago, Chile. *Food Microbiol*. 2018;75:55-60.
13. Brusa V, Aliverti V, Aliverti F, Ortega EE, de la Torre JH, Linares LH, et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef retail markets from Argentina. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012;2:171.
14. Persson S, Olsen KE, Ethelberg S, Scheutz F. Subtyping method for *Escherichia coli* shiga toxin (verocytotoxin) 2 variants and correlations to clinical manifestations. *J Clin Microbiol*. 2007;45(6):2020-4.

Annex 1

Primere og prober

Primere og prober benyttet i kartleggingen av patogene *E. coli* i norske kjøttvarer i 2017 er listet i tabellen under.

Gen	Primere/prober	Sekvens (5' - 3')	Referanser*
<i>stx</i> ₁	<i>stx</i> -F <i>stx</i> -R	TTT GTY ACT GTS ACA GCW GAA GCY TTA CG CCC CAG TTC ARW GTR AGR TCM ACR TC	ISO/TS 13136:2012
<i>stx</i> ₂	<i>stx</i> ₁ -P <i>stx</i> ₂ -P	FAM-CTG GAT GAT CTC AGT GGG CGT TCT TAT GTA A-BHQ1 HEX-TCG TCA GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC-BHQ1	Perelle <i>et al</i> 2004
<i>eae</i>	<i>eae</i> -F <i>eae</i> -R <i>eae</i> -P	CAT TGA TCA GGA TTT TTC TGG TGA A CTC ATG CGG AAA TAG CCG TTA FAM-ATA GTC TCG CCA GTA TTC GCC ACC AAT ACC-TAMRA	ISO/TS 13136:2012 Nielsen <i>et al.</i> 2003
<i>wzy</i> O145	O145wzy2-F O145wzy2-R O145wzy-P	ATA TTG GGC TGC CAC TGA TGG GAT TAT GGC GTA CAA TGC ACC GCA AAC FAM-AGC AGT GGT TCG CGC ACA GCA TGG T-BHQ1	Fratamico <i>et al.</i> 2009
<i>rfbE</i> O157	rfbE0157-F rfbE0157-R rfbE0157-P	TTT CAC ACT TAT TGG ATG GTC TCA A CGA TGA GTT TAT CTG CAA GGT GAT FAM-AGG ACC GCA GAG GAA AGA GAG GAA TTA AGG-TAMRA	
<i>wbdI</i> O111	wbdI0111-F wbdI0111-R wbdI0111-P	CGA GGC AAC ACA TTA TAT AGT GCT TT TTT TTG AAT AGT TAT GAA CAC CTT GTT TAG C FAM-TTG AAT CTC CCA GAT GAT CAA CAT CGT GAA-TAMRA	ISO/TS 13136:2012
<i>wzx</i> O26	wzx026-F wzx026-R wzx026-P	CGC GAC GGC AGA GAA AAT T AGC AGG CTT TTA TAT TCT CCA ACT TT FAM-CCC CGT TAA ATC AAT ACT ATT TCA CGA GGT TGA-TAMRA	
<i>wzx</i> O103	wzx0103-F wzx0103-R wzx0103-P	CAA GGT GAT TAC GAA AAT GCA TGT GAA AAA AGC ACC CCC GTA CTT AT FAM-CAT AGC CTG TTG TTT TAT-MGB	
<i>wzy</i> O91	wzyO91 -F wzyO91-R wzyO91-P	CGA TTT TCT GGA ATG CTT GAT G CAA TAC ATA GTT TGA TTT GTG TTT AAA GTT TAA T FAM- CCT GGG TTG TTA GGA ACA ATT TCA GCA CTT C-BHQ1	Perelle <i>et al</i> 2004
<i>wzx</i> O121	wzxO121-F wzxO121-R wzxO121-P	TGGTCTCTTAGACTTAGGGC TTAGCAATTTTCTGTAGTCCAGC FAM- TCC AAC AAT TGG TCG TGA AAC AGC TCG-BHQ1	Bugarel <i>et al.</i> 2010
<i>aggR</i>	aggR-F aggR-R aggR-P	GAATCGTCAGCATCAGCTACA CCTAAAGGATGCCTGATGA FAM-CGGACAACGCAAGCATCTA-BHQ1	EURL Method 05 Rev 1. 2013

* International Organization for Standardization. 2012. Microbiology of food and animal feed - Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens - Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups. ISO/TS 13136:2012, 1st ed. Geneva, Switzerland.

Perelle S, Dilasser F, Grout J, Fach P. 2004. Detection by 5'-nuclease PCR of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26, O55, O91, O103, O111, O113, O145 and O157:H7, associated with the world's most frequent clinical cases. Mol Cell Probes 18:185-192.

Nielsen EM, Andersen MT. 2003. Detection and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* by automated 5' nuclease PCR assay. J Clin Microbiol 41:2884-2893.

Fratamico PM, DebRoy C, Miyamoto T, Liu Y. 2009. PCR detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O145 in food by targeting genes in the *E. coli* O145 O-antigen gene cluster and the shiga toxin 1 and shiga toxin 2 genes. Foodborne Pathog Dis 6:605-611.

Bugarel M, Beutin L, Martin A, Gill A, Fach P. 2010. Micro-array for the identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) seropathotypes associated with hemorrhagic colitis and haemolytic uremic syndrome in humans. Int J Food Microbiol 142:318-329.

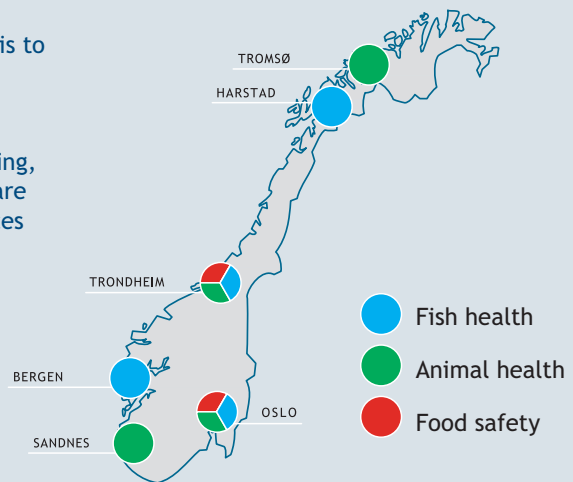
*Scientifically ambitious, forward-looking and cooperatively oriented
– for integrated health*

The Norwegian Veterinary Institute is a national research institute that operates in the fields of animal and fish health, food safety and feed hygiene; its primary task is to provide the authorities with independently generated knowledge.

Emergency preparedness, diagnostic services, monitoring, reference functions, consulting, and risk assessments are all important areas of activity. Our products and services include research results and reports, analyses and diagnoses, studies and advice.

The Norwegian Veterinary Institute's central laboratory and administration lie in Oslo, and we operate regional laboratories in Sandnes, Bergen, Trondheim, Harstad and Tromsø.

The Norwegian Veterinary Institute collaborates with a large number of national and international institutions.



Fish health



Animal health



Food safety



Oslo
postmottak@vetinst.no

Trondheim
vit@vetinst.no

Sandnes
vis@vetinst.no

Bergen
post.vib@vetinst.no

Harstad
vih@vetinst.no

Tromsø
vitr@vetinst.no

www.vetinst.no



Veterinærinstituttet
Norwegian Veterinary Institute