

2016-06-09

Catarina Flink

Förekomst av shigatoxinproducerande *Escherichia coli* (STEC) i svenskt nötkött

Sammanfattning

Nötkött är en vanlig smittkälla till STEC. Livsmedelsverket har tidigare utfört en kartläggning av förekomsten av STEC i importerat och infört nötkött (Egervärn och Flink, 2014). För att bättre kunna värdera risken med konsumtion av nötkött som finns på den svenska marknaden behövs även kunskap om förekomsten av STEC i svenskt nötkött. Insamling av prov av helt svenskt nötkött utfördes till största delen under 2015 av Statens Veterinärmedicinska Anstalt. Analyser utfördes sedan av Livsmedelsverket under våren 2016. Totalt analyserades 300 prov och STEC påvisades i sex (2 procent) av dessa. Det är väsentligt lägre än förekomsten av STEC i importerat och infört helt nötkött (11 procent). Karaktäriseringen av bakterierna visade att inget av STEC isolaten hade den kombination av gener som är kopplad till ökad risk för allvarlig sjukdom (*stx2* och *eae*).

Inledning

Infektion med shigatoxinproducerande *E. coli* (STEC) utgör ett betydande hälsoproblem eftersom det kan orsaka allvarlig sjukdom hos människa och framför allt kan små barn drabbas. De vanligaste symtomen är diarréer som kan bli blodiga men hos cirka fem procent av patienterna utvecklas den allvarliga följsjukdomen hemolytiskt uremiskt syndrom (HUS) som ofta kräver intensivvårdsbehandling och dialys. Idag är STEC, tillsammans med salmonella, det smittämne som orsakat flest utbrott i världen med nötkött som smittkälla (Greig et al. 2009). Under 2011 utförde Livsmedelsverket en kartläggning av STEC i importerat och infört nötkött till Sverige (Egervärn och Flink, 2014) där STEC påvisades i mer än vart tionde prov. Aktuella resultat om förekomst av STEC i svenskt nötkött är bristfälliga och tidigare undersökningar har fokuserat på STEC tillhörande serogruppen O157. Livsmedelsverket har därför med hjälp av Statens Veterinärmedicinska Anstalt (SVA) undersökt förekomsten av STEC i svenskt nötkött. Syftet med kartläggningen var att öka kunskapsunderlaget för framtida riskvärderingar och riskhanteringsåtgärder samt att jämföra förekomsten av STEC i importerat och infört nötkött med svenskt nötkött.

STEC

Vissa stammar av *Escherichia coli* producerar shigatoxin och kallas därför shigatoxinproducerande *E. coli* (STEC). STEC kallas också VTEC, och när den har isolerats från människa kallas den EHEC (Enterohaemoragisk *E. coli*). Det finns två undergrupper av shigatoxin, Stx1 som kodas av genen *stx1* och Stx2 som kodas av *stx2*. Minst ett av shigatoxinerna är nödvändigt för att sjukdomssymtom ska uppkomma vid infektion med STEC men även andra virulensfaktorer bidrar. Toxinet Stx2 är mer frekvent förknippad med allvarlig sjukdom hos människa än Stx1 (Mathusa et al. 2010; Efsa 2013). En annan bidragande virulensgen är *eae*, som kodar för proteinet intimin och som är viktigt för att STEC ska kunna fästa vid tarmepitelet. Vissa kombinationer av virulensgener hos STEC såsom *stx2* och *eae* bedöms utgöra högre risk att orsaka allvarligare sjukdom (Caprioli et al. 2004; Andersson et al. 2011; Efsa 2013). Infektionsdosen, det minsta antalet bakterier som krävs för att orsaka sjukdom, är låg (mindre än 100 bakterier) och tillväxt av STEC-bakterier i livsmedel är således inte nödvändigt för att orsaka sjukdom.

Utförande

Prov från svenskt nötkött (bitar och strimlat färskt nötkött, ej malet kött) samlades in av Statens Veterinärmedicinska Anstalt (SVA) som en del i ett större projekt om förekomst av ESBL-bildande tarmbakterier på svenskt nötkött. Insamling av prov (289 st) gjordes under 2015 och provtagningen gjordes hos grossister, på stormarknader och i mindre butiker. Ett fåtal prover togs också av Livsmedelsverkets egen personal på stormarknader och i mindre butiker under 2016 (21 st).

För en mer detaljerad beskrivning av utförande och analysprocedur se bilaga 1.

Resultat

Sammanlagt analyserades 300 prover av svenskt nötkött och av dessa var sju (2 procent) anrikningsbuljonger positiva vid PCR-analys av generna *stx1* och/eller *stx2*. I ett av de sju positiva anrikningsbuljongerna påvisades även genen *eae*. Av de sju positiva proven isolerades STEC-bakterier från sex (2 procent) prov. Av de 6 isolaten innehöll fyra enbart *stx2*-genen och resterande två isolat innehöll generna för både *stx1* och *stx2*. Genen *eae* tillsammans med *stx*-gen/er hittades inte i något av STEC isolaten. De sex STEC-bakterier som isolerats från svenskt nötkött tillhörde fem olika serotyper där endast serotypen O171:H2 förekom i mer än ett prov (Tabell 1).

Tabell 1. Sammanställning av isolerade STEC-bakterier i svenskt nötkött.

Livsmedel	Serotyp	Subtyp <i>stx</i>	<i>eae</i>
Högre	O171:H2	<i>stx2c</i> , <i>stx2d</i>	-
Grytbitar	O171:H2	<i>stx2c</i>	-
Ryggbiff	O22:H16	<i>stx2b</i> , <i>stx2c</i> , <i>stx2d</i>	-
Strimlat oxkött	O116:H48	<i>stx2a</i> , <i>stx2d</i>	-
Nötbog	O185:H28	<i>stx1a</i> , <i>stx2a</i>	-
Rostas	O91:H14	<i>stx1a</i> , <i>stx2b</i>	-

Diskussion

Kunskap om förekomst av sjukdomsframkallande mikroorganismer i livsmedel behövs för att kunna värdera risken att bli sjuk av maten vi äter. Behovet av data gällande STEC på kött och grönsaker har lyfts i utlåtanden från bland annat FAO/WHO (2011) och Efsa (2011) och var en av de identifierade kunskapsluckorna i den nationella strategin för STEC som svenska myndigheter tog fram 2014 (Socialstyrelsen, 2014).

STEC påvisades i två procent av sammanlagt 300 prov av hela bitar svenskt nötkött. Förekomsten var lägre än vad som tidigare rapporterats i en kartläggning av importerat och infört nötkött där den totala andelen prov med fynd av STEC var 13 procent (både helt och malet kött) och för prov av helt kött 11 procent (Egervärn och Flink, 2014). Undersökningen av nötkött från andra länder omfattade även malet kött, där andelen prov med fynd av STEC var ännu högre (20 procent). Motsvarande data saknas för malet kött av svenskt ursprung. Malet kött har kopplats ihop med fler sjukdomsutbrott jämfört med helt kött (Rangel et al. 2005; Hussein 2007). Risken att insjukna i infektion med STEC är dessutom sannolikt större vid konsumtion av malet kött än helt kött, eftersom de bakterier som finns på ytan blandas in i köttfärsen vid malningen (Lindblad 2013).

Vid senaste zoonosrapporteringen inom EU där 27 medlemsländer rapporterade in förekomsten av STEC i livsmedel för respektive medlemsland var förekomsten för STEC 1,3 procent (Efsa/ECDC 2014). Resultaten är dock inte jämförbara, eftersom prov i denna undersökning har tagits i olika led av livsmedelskedjan. Dessutom har inte alla medlemsländer analyserat för alla serogrupper, vilket gjordes i nuvarande undersökning. Förekomsten var också lägre än i den baslinjestudie som Livsmedelsverket utförde mellan 2006 och 2007 där STEC förekom på fem procent av slaktkropparna från svenska nötkreatur (opublicerade data från Lindblad 2008). Resultaten är dock inte jämförbara, eftersom provtagningen vid de olika undersökningarna är helt olika (25 g i denna studie och svabbprov av 400 cm² av slaktkroppen i baslinjestudien).

Inget av isolaten av STEC i denna undersökning uppfyllde kriterierna för ökad risk för allvarlig sjukdom från Efsa, det vill säga förekomst av virulensgenerna *stx2* och *eae* eller *aaiC/aggR* (EFSA, 2013).

Tre av serotyperna (O91:H14, O171:H2, O22:16) som hittades i studien har även hittats hos sjuka människor (Tozzoli and Scheutz, 2014). Dock hittades ingen av de vanligaste förekommande serogrupperna hos patienter i Sverige (O157, O26, O103, O121).

Referenser

- Egervärn, M., Flink, C., 2014. Kartläggning av shigatoxinproducerande E. coli (STEC) på nötkött och bladgrönsaker. Livsmedelsverket Rapport 22.
- EFSA, European Food Safety Authority, (2011). "Scientific Report of EFSA – Urgent advice on the public health risk of Shiga-toxin producing Escherichia coli in fresh vegetables." EFSA Journal 9(6):2274.
- EFSA, 2013. Scientific opinion on VTEC-seropathotype and scientific criteria regarding pathogenicity assessment. EFSA Journal. 11, 3138.
- EFSA/ECDC, European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (2014). "The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012." EFSA Journal 12(2):3547.
- FAO/WHO (2011). Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. "Enterohaemorrhagic Escherichia coli in raw beef and beef products: approaches for the provision of scientific advice: meeting report." Microbiol Risk Assessment Series No. 18/2011.
- Greig, J. D. och A. Ravel (2009). "Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution." Int J Food Microbiol 130:77-87.
- Hussein, H.S. (2007). "Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing Escherichia coli in beef cattle and their products." Anim Sci 85(13 Suppl):E63-72.
- Lindblad, M. (2008). "Mikroprofil Nötkreatur - Kartläggning av mikroorganismer på slaktkroppar." Livsmedelsverkets rapport nr 1/2008.
- Lindblad M. (2013). "Risker förenade med konsumtion av råbiff och rå eller understekt nötfärs." Livsmedelsverket. Augusti-13.
- Mathusa, E. C., Chen, Y., Enache, E., Hontz, L., 2010. Non-O157 shiga toxin-producing Escherichia coli in foods. Journal of Food Protection. 73, 1721-1736.
- Rangel, J.M., P.H. Sparling et al. (2005). "Epidemiology of Escherichia coli O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002." Emerg Infect Dis 11(4):603-9.
- Socialstyrelsen, 2014. Infektion med EHEC/VTEC - ett nationellt strategidokument.
- Tozzoli, R. and Scheutz, F., 2014. Diarrhoeagenic Escherichia coli Infections in Humans. Patogenic Escherichia coli – Molecular and Cellular Microbiology:1-19.

Utförande

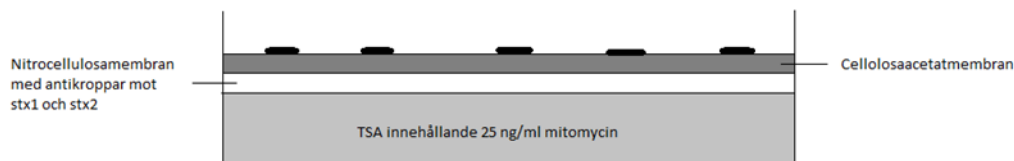
Insamling av 289 prov av svenskt nötkött genomfördes som en del i ett större projekt om förekomst av ESBL-bildande tarmbakterier på svenskt kött som utfördes av SVA. Anrikning av 25 g prov utfördes av SVA och anrikningsbuljongen frystes in i -70°C för senare analys för STEC av Livsmedelsverket. Insamling av 21 prov av svenskt nötkött utfördes av personal från Livsmedelsverket och analysen för STEC utfördes inom 24 timmar efter provtagning.

Detektion av STEC med realtids-PCR

Detektion av STEC i anrikningsbuljong utfördes enligt Livsmedelsverkets metod, SLV-m243.2, som baseras på en teknisk specifikation från ISO, ISO/TS 13136:2012. Totalt 25 g av provet blandades med 225 ml Buffrat Peptonvatten (BPV) med homogenisator och anrikades vid 37°C i 18 till 24 timmar. Extraktion av genomiskt DNA utfördes genom att ta 200 µl från anrikningsbuljongen till ett automatiserat system, BioRobot EZ1 och EZ1 DNA Tissue Kit (Qiagen). Eluering gjordes i 100 µl elueringsbuffert. Detektion av generna för shigatoxinerna, *stx1* och *stx2*, utfördes med realtids-PCR. Vid detektion av en eller båda *stx*-gener utfördes ytterligare en analys med realtids-PCR för detektion av genen *eae* (ISO/TS, 13136:2012).

Isolering av STEC med immunoblot

Vid detektion av en eller båda *stx*-gener gjordes försök till isolering av STEC med immunoblot enligt Livsmedelsverkets metod, SLV-m242.1. Analysmetoden innebär att Stx-toxiner som producerats av bakterier fångas upp och detekteras med antikroppar, och utfördes enligt Atalla och Johnson (2000). Analys med immunoblot utfördes på infrysad anrikningsbuljong. Ett nitrocellulosamembran (82 mm; 0,2 µm), som behandlats med kanin-anti Stx1 och anti Stx2-antikroppar, lades på Trypton Soja Agar (TSA)-plattor innehållande 25 ng/ml mitomycin. Över nitrocellulosamembranet lades ett cellulosaacetatmembran (82 mm; 0,45 µm). Anrikningsbuljongen späddes och spreds på cellulosaacetatmembranet (Figur 1). Plattorna inkuberades vid 37°C i 18-24 timmar.



Figur 1. Schematisk bild på hur de olika membranerna placerades på odlingsplattan.

Efter inkuberingen avlägsnades nitrocellulosamembranet och behandlades först med en blandning av monoklonala antikroppar mot Stx1, Stx2a/c, Stx2e och Stx2d-varianter följt av en sekundär antikropp kopplad till enzymkonjugatet Alkaline Phosphatas-konjugerad Affinipure kanin-antimus-IgG. Därefter behandlades nitrocellulosamembranet med framkallningsvätskan BCIP/NBT för att få fram lila prickar på membranet, vilket indikerar shigatoxinproducerande kolonier på motsvarande plats på cellulosaacetatmembranet. Misstänkt positiva kolonier från cellulosaacetatmembranet renströks och verifierades som STEC med realtids-PCR för gener mot *stx* som beskrivits ovan.

Typning av STEC

De isolerade STEC-bakterierna har skickats till Folkhälsomyndigheten för serotypning och subtypning av shigatoxingenen genom helgenomsekvensering enligt Folkhälsomyndighetens protokoll.

Referenser

- Atalla, H. N., R. Johnson et al. (2000). "Use of shiga toxin (Stx)- enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot for detection and isolation of Stx-producing *Escherichia coli* from naturally contaminated beef." J Food Protect 63 (9):1167-1172.
- ISO/TS 13136:2012. "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 *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups."