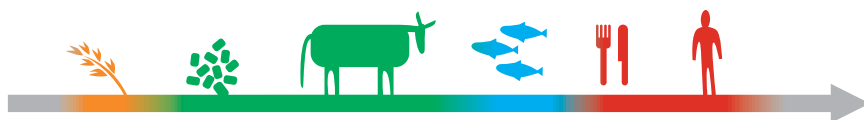


Zoonotiske *E. coli* hos storfe



Zoonotiske *E. coli* hos storfe

Innhold

Sammendrag	2
Summary	2
Bakgrunn	3
Definisjoner og forkortelser	3
Materiale og metoder	4
Utvalg av besetninger	4
Prøvetaking	4
Bakteriologisk analyse	4
Screening for genetiske markører i oppformert materiale	4
Isolering av bakterier	5
Karakterisering av isolater	5
Helgenomsekvensering og analyse	6
Statistiske analyser	6
Resultater og vurderinger	6
Oversikt over innsamlet materiale	6
Screening for genetiske markører	7
Forekomst av <i>stx_{2a}</i> -positive <i>E. coli</i> hos storfe	8
Forekomst	9
<i>E. coli</i> O26	9
<i>E. coli</i> O103	10
<i>E. coli</i> O145	10
<i>E. coli</i> O157	11
<i>E. coli</i> O111	11
<i>E. coli</i> O91	11
<i>E. coli</i> O121	12
Diskusjon	12
Referanser	13
Annex 1	15

Forfattere

Gro Johannessen, Camilla Sekse, Petter Hopp,
Anne Margrete Urdahl

Oppdragsgiver



ISSN 1890-3290

© Veterinærinstituttet 2018

Design omslag: Reine Linjer

Foto forside: Colourbox

Sammendrag

Dyr er bærere av noen *Escherichia coli* (*E. coli*) som kan gi sykdom hos mennesker (zoonotiske *E. coli*). Av disse kan Shigatoksin-produserende *E. coli* (STEC) forårsake alvorlig sykdom, og da særlig hos barn. Drøvtyggere er regnet som det viktigste reservoaret for STEC. En annen viktig gruppe *E. coli*, med mulig zoonotisk potensiale og som er beslektet med STEC, er atypiske enteropatogene *E. coli* (aEPEC). Det har vært mangel på nyere norske data vedrørende forekomst hos storfe av *E. coli* patogene for mennesker. Med bakgrunn i dette bestilte Mattilsynet en kartlegging av forekomst av potensielt patogene *E. coli* hos storfe i Norge. Innsamling av prøvemateriale foregikk høsten 2014 med påfølgende analyser de neste årene.

Det ble samlet inn avføringsprøver fra 179 melkekubesetninger. Oppformerte prøver ble screenet for tilstedeværelse av genetiske markører for serogruppene O26, O91, O103, O111, O121, O145 og O157. Det ble utført isolering og videre karakterisering av bakterier tilhørende de aktuelle O-gruppene. Et utvalg av isolater ble karakterisert ved helgenomsekvensering.

Resultatene fra denne kartleggingen viser at forekomsten av STEC av serogruppene O26, O91, O103, O121, O145 og O157 er lav i norske melkekubesetninger. Videre viser resultatene at det er en større forekomst av aEPEC, og da særlig aEPEC O26, som ble påvist i ca. 15 % av besetningene. For aEPEC O26 ble det også påvist en geografisk forskjell med høyest forekomst i region Vest og lavest i region Midt/Nord.

Kartleggingen gir viktig kunnskap til nytte for både næring, myndigheter og kunnskaps-institusjoner. Selv om resultatene viser en god situasjon i Norge med lav forekomst av zoonotiske *E. coli* som kan gi alvorlig sykdom hos mennesker, er det viktig å gjennomføre kartlegginger med jevne mellomrom for slik å generere oppdaterte norske data som grunnlag for næring, myndigheter og kunnskapsinstitusjoner.

Summary

Some *Escherichia coli* (*E. coli*) from animals may give rise to infections in humans (zoonotic *E. coli*). Of these, Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) may cause severe disease, especially in children. Ruminants are the most important reservoir for STEC. Another important group of *E. coli*, with possible zoonotic potential and also related to STEC, is atypical enteropathogenic *E. coli* (aEPEC). In Norway, there has been a lack of recent data with respect to occurrence of *E. coli* pathogenic to humans, in cattle. Thus, the Norwegian Food Safety Authority commissioned a survey of potentially pathogenic *E. coli* in cattle in Norway. The collection of samples was carried out in 2014 with subsequent analyses the following years.

Pooled fecal samples from 179 dairy herds were collected. Enriched samples were screened for the presence of genetic markers for the serogroups O26, O91, O103, O111, O121, O145 and O157, which are well known STEC serogroups associated with infection in humans. After screening, isolation and further characterization of the isolates of serogroups in question were performed. A selection of isolates was further characterized by whole genome sequencing.

The results from this survey show that the occurrence of STEC of the serogroups O26, O91, O103, O121, O145 and O157 is low in Norwegian dairy herds. Furthermore, the results indicate that there is a larger occurrence of aEPEC, in particular aEPEC O26 which was isolated from approximately 15% of the herds. A geographical difference in occurrence of aEPEC O26 was shown, with highest occurrence in region West and lowest in region Mid/North.

This survey provides important knowledge for the benefit of both industry, the authorities and knowledge institutions. Although the results show a good situation in Norway with low occurrence of STEC that may cause serious illness in humans, it is of importance to carry out similar surveys on a regular basis to follow the situation and generate updated Norwegian data.

Bakgrunn

Noen *Escherichia coli* (*E. coli*) som finnes hos dyr kan gi sykdom hos mennesker (zoonotiske *E. coli*). Av disse kan Shigatoksin-produserende *E. coli* (STEC) forårsake alvorlig sykdom, og da særlig hos barn, i form av blodig diaré med 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).

I 2013 var det en økning i antall tilfeller av sykdom forårsaket av STEC hos mennesker i Norge. Det har også de siste årene vært en økning i antall rapporterte tilfeller og i 2017 ble det rapportert 405 tilfeller hos mennesker i Norge (www.msis.no). STEC O157, O103, O26 og O145 er de vanligst rapporterte serotypene fra sykdomstilfeller hos mennesker i Norge (4, 5). Det er også rapportert sykdomstilfeller fra mange andre serogrupper, bl.a. O91, O121 og O111.

STEC er bærer av Shigatoksin-gener (*stx*), som er regnet som den viktigste virulensfaktoren. Shigatoksiner kan deles inn i to hovedgrupper; Stx1 og Stx2, som videre er inndelt i subtyper (6). 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 (2). Sykdomsfremkallende STEC inneholder flere virulensfaktorer, og særlig *eae* (som koder for en tilhefting til epitelceller i tarmen) er viktig. aEPEC har som STEC tilheftingsegenskapen kodet av *eae*, og deler også mange andre virulensfaktorer med STEC. Imidlertid er aEPEC ikke bærere av *stx*.

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 intimingenen (<i>eae</i>), men ikke <i>stx</i> -gener
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>stx₁</i> og <i>stx₂</i> , 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

Drøvtyggere er regnet som det viktigste reservoaret for zoonotiske STEC, mens det er mindre kunnskap om dyr som reservoar for zoonotiske aEPEC. Det utføres ikke årlig overvåking av zoonotiske *E. coli* i den norske husdyrpopulasjonen. Forrige kartlegging ble utført på sau i 2006-07. Kartleggingen den gang førte til gode data på forekomsten av STEC og aEPEC av serogruppene O26, O111, O103, O145 og O157 hos sau (7, 8). For storfe, som er regnet som det viktigste reservoaret for zoonotiske STEC, og også hovedkilden for sykdomstilfeller hos mennesker, er det ikke utført tilsvarende og like omfattende kartlegginger. Studiene som er utført på storfe i Norge, er flere år gamle, fokuserte i hovedsak på *E. coli* O157 og var den gang utført med mindre sensitive metoder enn det som er tilgjengelig i dag (9-11). Med bakgrunn i dette bestilte Mattilsynet i 2014 en kartlegging av forekomst av potensielt zoonotiske *E. coli* hos storfe i Norge. Innsamling av prøvemateriale skulle foregå høsten 2014 med påfølgende analyser de neste årene etter nærmere avtale med Mattilsynet.

Materiale og metoder

Utvalg av besetninger

Kartleggingen var basert på tilfeldig utvalg av 200 melkekubesetninger med mer enn 50 kyr. Data om besetningsstørrelse ble hentet fra registeret for produksjonstilskudd. Prøvetaking skulle utføres i perioden august - oktober 2014.

Prøvetaking

Innsamling av prøvemateriale foregikk i besetningene. Fra hver besetning ble det samlet inn fersk avføring fra ti punkter (ca. 1 spiseskje fra hvert punkt), fordelt i besetningen slik at alle aldersgrupper ble prøvetatt. Avføring fra de ti punktene ble samlet i et beger og sendt med kjøling til laboratoriet. Ved ankomst til laboratoriet ble samleprøven analysert med en gang eller frosset ved -80 °C fram til analyse.

Bakteriologisk analyser

Screening for genetiske markører i oppformert materiale

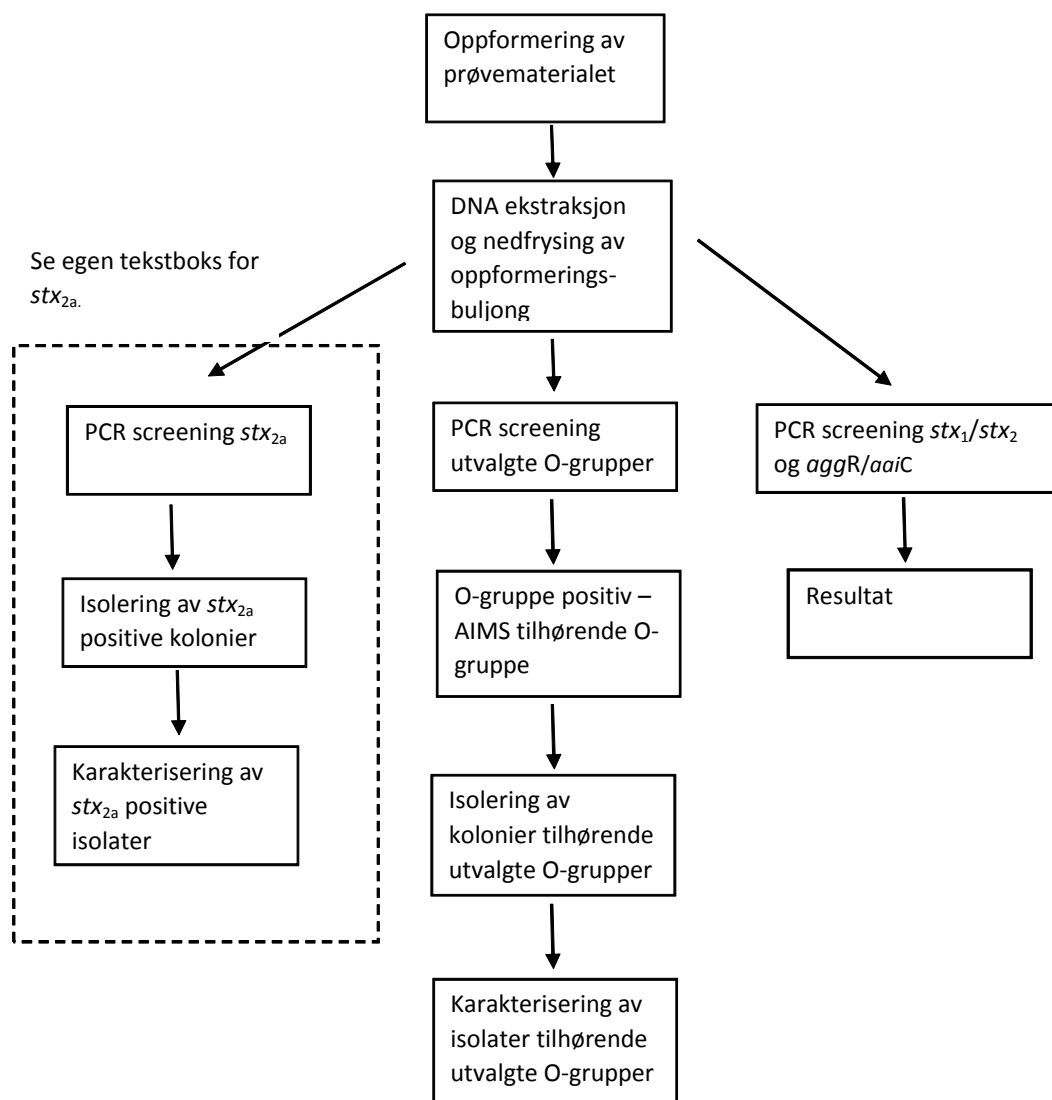
Prøvene ble analysert som beskrevet i ISO TS 13136:2012, men med enkelte endringer på rekkefølgen av analyse-stegene. Fra hver besetning ble 25 g avføring blandet med 225 ml bufret peptonvann (BPV-ISO), homogenisert og inkubert ved 37 °C i ca. 18 timer. Figur 1 viser trinnene i videre analyse.

DNA ble ekstrahert fra oppformeringsbuljongen med QIAamp DNA Stool mini kit (Qiagen, Hilden, Tyskland) i henhold til produsentens anvisninger. Prøvene ble screenet for O-gruppene O26, O103, O111, O145 og O157 ved hjelp av real-time PCR som beskrevet i ISO TS 13136, med unntak for O145 der primere og probe beskrevet av Fratamico *et al.* (12) ble benyttet. Alle primere og prober benyttet i kartleggingen er beskrevet i Annex 1. På bakgrunn av PCR resultatene ble det frosset ned 1-6 rør med oppformeringsbuljong og 85 % glyserol ved -80 °C for videre isolering av bakterier (ett rør per prøve uansett resultat, og ett rør per positivt PCR resultat).

I tillegg til primærscreening av materialet for utvalgte O-grupper, ble prøvene undersøkt for forekomst av O-gruppene O91 og O121, *stx*₁ og *stx*₂-genene, subtype *stx*_{2a}-genet (se egen tekstboks), samt genene *aggR* og *aaiC* (markører for enteroaggregative *E. coli* (EAEC), men som også er påvist i STEC-isolater som f.eks. i STEC O104:H4 som var årsak til det store «spire-utbruddet» i Europa for noen år siden.). Tabell 1 viser en oversikt over hvilke gener de oppformerte prøvene ble undersøkt for.

Tabell 1. Oversikt over hvilke gener de oppformerte prøvene er screenet for med PCR i kartleggingen av zoonotiske *E. coli* hos norske melkekubesetninger i 2014.

Undersøkt gen	Forklaring
<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>wbdO111</i>	Gen assosiert med serogruppe O111
<i>wzxO121</i>	Gen assosiert med serogruppe O121
<i>wzyO145</i>	Gen assosiert med serogruppe O145
<i>rfbEO157</i>	Gen assosiert med serogruppe O157
<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>aggR</i>	Virulensgen assosiert med EAEC og bla. STEC O104:H4 (spireutbrudd)
<i>aaiC</i>	Virulensgen assosiert med EAEC og bla. STEC O104:H4 (spireutbrudd)



Figur 1. Oversikt over utførte analyser i en kartlegging av zoonotiske *E. coli* hos norske melkekubesetninger i 2014.

Isolering av bakterier

På bakgrunn av resultatene fra primærscreeningen ble det gått videre med isolering av bakterier tilhørende de aktuelle O-gruppene. Prøvene ble tint raskt i vannbad ved 50 °C til all is var borte (ca. 1 min) (13)). 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 bakgrunnsfloraen. 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; opptil 30 kolonier fra hver prøve ble agglutinert med O antiserum, og inntil fem positive isolater (isolater som viste typisk agglutinasjon) ble rendyrket og tatt vare på for videre identifisering og karakterisering.

Karakterisering av isolater

Inntil fem isolater per serogruppe per besetning ble verifisert som *E. coli* i MALDI Biotyper (MALDI-TOF, Bruker, Bremen, Tyskland). Ett til to isolater per O-gruppe per besetning ble videre verifisert for respektiv O-gruppe, samt karakterisert for patogene egenskaper (*stx*₁, *stx*₂ og *eae*) vha. real-time PCR som

beskrevet over. De samme isolatene av serogruppe O26, O103, O157 og O145 ble også undersøkt med pulsfelt gelelektroforese (PFGE) (PulseNet PFGE protokoll for *E. coli* O157:H7, STEC med fler. <https://www.cdc.gov/pulsenet/pdf/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf>).

Helgenomsekvensering og analyse

Totalt 96 isolater ble karakterisert med helgenomsekvensering. For *E. coli* O145 ble ett isolat per positive besetning valgt ut til sekvensering, totalt fire, for *E. coli* O157 ble totalt 16 isolater sekvensert fra ulike besetninger, for *E. coli* O26 ble 41 isolater sekvensert fra 37 besetninger og for *E. coli* O103 ble det sekvensert 26 isolater fra ulike besetninger. I tillegg ble åtte *E. coli* O91 fra ulike besetninger og ett *E. coli* O121 isolat sekvensert. DNA fra hvert isolat ble ekstrahert med kit; enten QIAamp DNA Mini kit, DNeasy Blood and Tissue kit eller QIASymphony DSP DNA Mini kit (alle fra Qiagen).

DNA ble sendt til sekvensering til Norwegian Sequencing Centre, en nasjonal teknologiplattform ved Universitet i Oslo (med støtte fra ulike finansieringsprogrammer ved Norges forskningsråd og helse Sør-Øst). Dataene ble analysert med web-baserte verktøy som SerotypeFinder, VirulenceFinder, ResFinder og Multi locus sequence typing (MLST) *E. coli*#1 fra Center for Genomic Epidemiology (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/>).

Statistiske analyser

Univariat analyse ble utført for å se på assosiasjoner mellom geografi og forekomst av de forskjellige genetiske markører og potensielt patogene *E. coli* (STEC og aEPEC av forskjellige O-grupper). For å undersøke geografiske forskjeller ble prøvene kategorisert tilhørende regioner som vist i tabell 2. Den statistiske analysen ble utført i STATA versjon 12.0 ved å benytte Fisher's exact test (STataCorp LP, Texas, USA). Antall positive besetninger er angitt i prosent med 95 % konfidensintervall basert på binominal fordeling og er utregnet vha. R versjon 3.3.0 for Windows (R Development Core Team, 2016).

Resultater og vurderinger

Oversikt over innsamlet materiale

Til sammen ble det innsendt samleprøver fra 179 melkekubesetninger (>50 kyr) i perioden august - desember 2014. De prøvetatte besetningene fordelte seg på de ulike regioner (Sør/Øst, Vest og Midt/Nord) som vist i tabell 2.

Tabell 2. Antall besetninger planlagt prøvetatt og prøvetatte besetninger per region i en kartlegging av zoonotiske *E. coli* hos norske melkekubesetninger i 2014.

Region	Fylker	Antall planlagt prøvetatt	Antall prøvetatte besetninger
Sør/Øst	Østfold, Akershus, Oslo, Hedmark, Oppland, Buskerud, Vestfold, Telemark, Aust-Agder, Vest-Agder	54	49
Vest	Rogaland, Hordaland, Sogn og Fjordane, Møre og Romsdal	94	92
Midt/Nord	Sør-Trøndelag, Nord-Trøndelag, Nordland, Troms, Finnmark	50	38
Totalt		198	179

Screening for genetiske markører

Tabell 3 viser oversikt over resultatene fra screeningen for genetiske markører. Screeningens anses som innledende analyser. Videre isolering av bakterier er nødvendig som forklart under. Imidlertid kan resultatene benyttes som en indikator på om det kan være bakterier som inneholder de ulike markørene til stede i prøvematerialet.

Tabell 3. Resultater av innledende screening for genetiske markører for hhv. forekomst av forskjellige O-grupper og virulensgener i en kartlegging av zoonotiske *E. coli* hos norske melkekubesetninger i 2014. Videre isolering av bakterier er nødvendig å vurdere eventuell patogenitet.

Genetisk markør	Antall positive besetninger	% positive besetninger	95 % konfidensintervall
O26	70	39,1	31,9 - 46,7
O103	83	46,4	38,9 - 54,0
O111	3	1,7	0,3 - 4,8
O145	4	2,2	0,6 - 5,6
O157	30	16,8	11,6 - 23,1
O91	43	24,0	18,0 - 31,0
O121	67	37,4	30,3 - 45,0
<i>stx</i> ₁	142	79,3	73,0 - 85,0
<i>stx</i> ₂	168	93,9	89,3 - 96,9
<i>aggR</i>	0	0	0 - 2,0
<i>aaiC</i>	0	0	0 - 2,0

Som tabellen viser er det svært vanlig å påvise flere av de genetiske markørene slik som enkelte O-grupper og *stx*-gener i avføring fra storfe. Til sammen 100 besetninger var positive for begge *stx*-genene, mens det var bare syv besetninger som var negative for *stx*-gener. Det trenger imidlertid ikke å være sammenheng mellom de påviste markørene, da de kan være tilstede i forskjellige bakterier eller fritt i prøvematerialet. Positive *stx* resultater kan 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 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 patogene *E. coli*.

Ingen besetninger var positive for *aggR* og *aaiC*, markørene for EAEC. EAEC anses i utgangspunktet å være tilpasset mennesker (14), men det er liten kunnskap om EAEC hos dyr. I følge EFSA er det ikke noe bevis for at dyr er et reservoar for EAEC (14). Resultatene fra denne kartleggingen støtter oppunder dette da *aggR* og *aaiC* ikke ble påvist i noen av prøvene som ble undersøkt.

Det var geografiske forskjeller i forekomst av både *stx*₁ ($p=0,007$) og *stx*₂ ($p=0,003$) med en lavere forekomst i Sør/Øst enn i Vest og Midt/Nord (Tabell 4). Tilsvarende var det forskjell i forekomst av O121 ($p=0,001$) med lavest forekomst i Sør/Øst. For de andre genetiske markørene ble det ikke påvist signifikante forskjeller i geografisk fordeling.

Tabell 4. Forekomst av de genetiske markørene *stx*₁, *stx*₂ og O121 hos storfebesetninger i forskjellige geografiske områder i innledende screening i kartleggingen av zoonotiske *E. coli* hos norske melkekubesetninger i 2014.

Genetisk markør	Forekomst i geografisk område (95 % konfidensintervall)		
	Sør/Øst	Vest	Midt/Nord
<i>stx</i> ₁	63,3 % (48,3 - 76,6)	84,8 % (75,8 - 91,4)	86,8 % (71,9 - 95,6)
<i>stx</i> ₂	83,7 % (70,3 - 92,7)	96,7 % (90,8 - 99,3)	100 % (90,7 - 100)
O121	16,3 % (7,3 - 29,7)	43,5 % (33,2 - 54,2)	50 % (33,4 - 66,6)

Forekomst av *stx*_{2a}-positive *E. coli* hos storfe

Innledning

Shigatoksiner (Stx) er STEC's hoved virulensfaktor 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. Det er flere subtyper av både *stx*₁ og *stx*₂, 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 diaré og HUS (1, 2).

Kunnskap om forekomst av *stx*_{2a}-positive *E. coli* finnes vanligvis først når subtypering av *stx* genet i bakterier har blitt utført. Standard metodikk for screening 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 zoonotiske *E. coli* hos storfe i Norge i 2014, ble det også undersøkt for forekomst av *stx*_{2a}-positive *E. coli*.

Materialer og metoder

Det samme prøvematerialet fra 179 besetninger som ble benyttet i kartleggingen av zoonotiske *E. coli* hos norske melkekubesetninger i 2014, ble benyttet. DNA fra oppformeringsbuljongene ble screenet spesifikt for *stx*_{2a} ved hjelp av real-time PCR og det ble gått videre til isolering fra *stx*_{2a}-positive prøver. Siden *stx*_{2a} resultatene sees uavhengig av serogruppe, ble de positive prøvene fortynnet og 100 µl fra passende fortyngninger (10⁻³ og 10⁻⁴) ble sådd ut på tre forskjellige agarmedier; CHROMagar™ O157 (CHROMagar, Paris, Frankrike), Sorbitol MacConkey agar (SMAC; OXOID, ThermoFisher Scientific, MA, USA) og MacConkey agar (BD Difco™, NJ, USA). Etter inkubering ved 37 °C overnatt, ble 50 kolonier med typisk eller mistenkelig *E. coli* morfologi valgt ut for rendyrking og videre karakterisering. Et utvalg av isolater ble karakterisert med helgenomsekvensering. DNA fra hvert isolat ble ekstrahert med QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Tyskland) og sendt til sekvensering til Norwegian Sequencing Centre. Dataene ble analysert med web-baserte verktøy som SerotypeFinder, VirulenceFinder, ResFinder og Multi locus sequence typing (MLST) *E. coli*#1 fra Center for Genomic Epidemiology (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/>).

Univariat analyse ble utført for å se på assosiasjoner mellom geografi og forekomst av den genetiske markøren *stx*_{2a}. Den statistiske analysen ble utført i STATA versjon 12.0 ved å benytte Fisher's exact test (STataCorp LP, Texas, USA). Antall positive besetninger er angitt i prosent med 95 % konfidensintervall basert på binominal fordeling og er utregnet vha. R versjon 3.3.0 for Windows (R Development Core Team, 2016).

Resultater

Til sammen 30 besetninger (16,8 %, 95 % KI: 11,6 - 23,1 %) var positive for tilstedeværelse av *stx*_{2a} ved screeningen. Det var geografiske forskjeller i forekomst av *stx*_{2a} med 8,2 % i region Sør/Øst, 15,2 % i region Vest og 31,6 % i region Midt/Nord (p=0,018).

Fra 15 av disse 30 besetningene ble det isolert *E. coli* med *stx*_{2a}, tilsvarende en 8,4 % (95 % KI: 4,8 - 13,4) forekomst av *E. coli* med *stx*_{2a} i norske melkekubesetninger. Det ble valgt ut 25 isolater til videre karakterisering. Resultatet er vist i Tabell 1.

Tabell 1. Karakteristikk av *stx*_{2a}-positive *E. coli* basert på fylogruppe, serotype, MLST og de viktigste virulensgenene.

Fylogruppe	Serotype	MLST	Virulens gener	Antall besetninger	Antall isolater
A	O165:H25	ST-119	<i>stx</i> _{2c} [*] , <i>eae</i> , <i>ehxA</i>	1	2
	O50/O2:H27	ST-10	<i>stx</i> _{2a} , <i>ehxA</i> (7/9)	6	9
	O101/O162:H33	ST-330	<i>stx</i> _{2a} , <i>eae</i> , <i>ehxA</i>	1	2
B1	O26:H11	ST-21	<i>stx</i> _{2a} , <i>eae</i> , <i>ehxA</i>	1	2
	O113:H21	ST-223	<i>stx</i> _{2a} , <i>ehxA</i>	1	2
	O168:H8	ST-718	<i>stx</i> _{2a} , <i>stx</i> _{1a} (1/3)	2	3
	O84:H2	ST-306	<i>stx</i> _{2a} , <i>stx</i> _{1a} , <i>eae</i> , <i>ehxA</i>	2	3
	ONT:H28	ST-156	<i>stx</i> _{2a} , <i>ehxA</i>	1	1
	ONT:H29	ST-515	<i>stx</i> _{2a}	1	1
Totalt				16**	25

*To isolater var *stx*_{2a}-positive ved real-time PCR, mens WGS analyser viser at isolatene er *stx*_{2c} og ikke *stx*_{2a}

**En besetning med to ulike *stx*_{2a}-positive *E. coli*

De vanligste sykdomsfremkallende STECene, som STEC O26, O103, O145, O121, er i fylogruppe B1 og flere av disse er assosiert med HUS, mens fylogruppe A ofte er assosiert med mindre alvorlig sykdom (3). Mange av de *stx*_{2a}-positive *E. coli* ene har flere virulensgener, blant annet tilheftingsgenet *eae*, og kan derfor ikke avskrives som potensielt sykdomsfremkallende for mennesker. Betydningen av disse funnene er ellers uklart og bør undersøkes videre.

Referanser

- Persson S, Olsen KE, Ethelberg S, Scheutz F. 2007. Subtyping method for *Escherichia coli* shiga toxin (verocytotoxin) 2 variants and correlations to clinical manifestations. *J Clin Microbiol* 45:2020-2024.
- Naseer U, Loberls I, Hindrum M, Bruvik T, Brandal L. 2017. Virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and the risk of developing haemolytic uremic syndrome in Norway, 1992-2013. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 36:1613-1620.
- Haugum K, Johansen J, Gabrielsen C, Brandal LT, Bergh K, Ussery DW, Drablos F, Afset JE. 2014. Comparative genomics to delineate pathogenic potential in non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) from patients with and without haemolytic uremic syndrome (HUS) in Norway. *PLoS One* 9:e111788.

Forekomst

Uavhengig av serotype, ble det isolert STEC fra 15,6 % (95 % KI: 10,7 - 21,8 %) av besetningene som ble undersøkt. I tillegg ble det isolert aEPEC fra 26,3 % (95 % KI: 20,0 - 33,3 %) av besetningene, igjen uavhengig av serotype. Tabell 5 viser en oversikt over funn av antall besetninger med STEC og aEPEC av de forskjellige serotyper, samt deres virulensprofil.

Tabell 5. Forekomst av STEC og aEPEC tilhørende serogruppene O26, O103, O145, O157, O91 og O121 i en kartlegging av zoonotiske *E. coli* hos norske melkekubesetninger i 2014.

O-gruppe	Patogruppe/Serotype	% positive	Virulensprofil	MLST profil	Antall besetninger
O26	STEC O26:H11	5,6	<i>stx</i> _{1a} , <i>eae</i> , <i>ehxA</i>	ST-21, ST-29	7
			<i>stx</i> _{1a} , <i>eae</i>	ST-21	1
			<i>stx</i> _{2a} , <i>eae</i> , <i>ehxA</i>	ST-21, ST-29	2
	aEPEC O26:H11/NT	15,1	<i>eae</i>	ST-29, ST-396	13
			<i>eae</i> , <i>ehxA</i>	ST-21, ST-29, ST-395, ST-1573	15
O103	STEC O103:H2	1,7	<i>stx</i> _{1a} , <i>eae</i> , <i>ehxA</i>	ST-17	3
	aEPEC O103:H2	6,7	<i>eae</i> , <i>ehxA</i>	ST-17, ST-376, ST-7262	12
	STEC O103:H25	0,6	<i>stx</i> _{2a} , <i>eae</i> , <i>ehxA</i>	ST-343	1
	aEPEC O103:H25	0,6	<i>eae</i> , <i>ehxA</i>	ST-343	1
O145	STEC O145:H4	0,6	<i>stx</i> _{1a} , <i>eae</i> , <i>ehxA</i>	ST-137	1
	aEPEC O145:H4/NT	1,1	<i>eae</i> , <i>ehxA</i>	ST-32	2
		0,6	<i>eae</i>	ST-137	1
O157	STEC O157:H7	2,2	<i>stx</i> _{1a} , <i>eae</i> , <i>ehxA</i>	ST-11	1
			<i>stx</i> _{1a} , <i>stx</i> _{2c} , <i>eae</i> , <i>ehxA</i>	ST-11	2
			<i>stx</i> _{2c} , <i>eae</i> , <i>ehxA</i>	ST-11	1
	aEPEC O157:H7	1,7	<i>eae</i>	ST-11	2
			<i>eae</i> , <i>ehxA</i>	ST-11	1
O91	STEC O91:H10	0,6	<i>stx</i> _{2d}	ST-641	1
	STEC O91:H21	3,9	<i>stx</i> _{2b}	ST-442	6
			<i>stx</i> _{1a} , <i>stx</i> _{2d} , <i>ehxA</i>	ST-442	1
O121	STEC O121:H19	0,6	<i>stx</i> _{2a} , <i>eae</i> , <i>ehxA</i>	ST-655	1

Fra en besetning ble det påvist både STEC O26 og et *stx*_{2a} positivt isolat med serotype O2:H7 (se separat tekstboks om *stx*_{2a}). En besetning hadde STEC O121, aEPEC O26 og aEPEC O103, mens det fra syv besetninger ble isolert både STEC og aEPEC med ulike serotyper.

I tillegg til hva som er vist i Tabell 5, ble det isolert *E. coli* uten *stx*- og *eae*-gener tilhørende de nevnte serogruppene (unntatt O145) fra mange av besetningene. Dette viser at disse O-gruppene er vanlig forekommende *E. coli* hos storfe.

E. coli O26

STEC O26 ble isolert fra ti besetninger (5,6 %, 95 % KI: 2,7 - 10,0 %) der åtte besetninger hadde *stx*₁-positive isolater og de resterende to besetningene hadde *stx*₂-positive isolater. Alle de *stx*₁-positive isolatene var av subtype *stx*_{1a}, mens isolatene fra de *stx*₂-positive besetningene hadde subtype *stx*_{2a}. I tillegg var alle STEC isolatene av serotype O26:H11 og hadde mange virulensassosierte gener (bl.a. *ehxA*, *cif*, *astA* og ulike *esp*-gener). Det var ingen forskjell i funn av STEC O26 i forhold til region. STEC O26 isolatene er å regne som patogene for mennesker (15).

Det ble påvist aEPEC O26 fra totalt 27 besetninger (15,1 %, 95 % KI: 10,2 - 21,2 %). Fra en besetning ble det påvist både STEC O26 og aEPEC O26. I tillegg ble det påvist *E. coli* O26 uten *eae* og *stx* fra en besetning. Det var en geografisk forskjell i forekomst av aEPEC O26 ($p=0,036$) med høyest forekomst i region Vest med 21,7 %, etterfulgt av region Sør/Øst med 10,2 % og lavest i Midt/Nord med 5,2 %. Funn av STEC og aEPEC O26 hos storfe er også rapportert fra andre land (16-19), men studiene er vanskelig å sammenlikne da det er benyttet ulike tilnærminger og metoder i de ulike studiene.

I denne kartleggingen var forekomsten av aEPEC O26 høyere enn forekomsten av STEC O26. Dette er også sett i andre studier (18). Alle aEPEC O26 isolatene i kartleggingen var av serotype O26:H11, med unntak av ett isolat som var O26:HNT. I tillegg til *eae* hadde de også mange andre virulensassosierte gener (bl.a. *ehxA*, *cif*, *astA* og ulike *esp*-gener). aEPEC O26 er assosiert med diaré hos småbarn, men det er uklart om alle aEPEC O26 fra dyr kan gi sykdom hos mennesker. Det er også uklart hvor beslektet aEPEC og STEC O26:H11 fra storfe er, og om alle aEPEC O26 kan være forløpere til STEC O26. Resultater fra kartleggingen viser at de stort sett deler de samme virulensassosierte gener (bl.a. *ehxA*, *cif*, *astA* og ulike *esp*-gener) og har samme MLST profiler, men ingen aEPEC og STEC O26 hadde identiske PFGE profiler. Slektskapet mellom aEPEC og STEC O26 blir undersøkt videre i pågående forskningsprosjekter.

E. coli O103

I alt fire besetninger (2,2 %, 95 % KI: 0,6 - 5,6 %) hadde STEC O103; tre besetninger hadde *stx*₁- og en besetning hadde *stx*₂-positive isolater. De *stx*₁-positive isolatene var av serotype O103:H2 og hadde alle subtype *stx*_{1a} (1,7 %, 95 % KI: 0,3 - 4,8 %), mens isolatet som var *stx*₂ positivt var *E. coli* O103:H25 med subtype *stx*_{2a} (0,6 %, 95 % KI: 0,01 - 3,1 %). Alle STEC O103 isolatene hadde i tillegg mange virulensassosierte gener (bl.a. *ehxA*, *esp*-gener, *nleA*, *nleB*). STEC O103 isolatene er å regne som patogener for mennesker (15).

Det ble i tillegg isolert aEPEC O103 fra 13 besetninger (9,5 %, 95 % KI: 5,6 - 14,8 %). Alle aEPEC O103 isolatene hadde mange virulensassosierte gener i tillegg til *eae* (bl.a. *ehxA*, *esp*-gener, en del har *nleA*, *nleB*). Ett isolat var av serotype O103:H25 (0,6 %, 95 % KI: 0,01 - 3,1 %), mens de resterende var av O103:H2 (8,9 %, 95 % KI: 5,2 - 14,9 %).

I tillegg ble det isolert *E. coli* O103 uten virulensgenene *eae* og *stx* fra til sammen 29 besetninger (16,2 %, 11,1 - 22,4 %), noe som er noe færre enn det som ble påvist i kartleggingen av zoonotiske *E. coli* hos sau i 2006 og 2007 (20). Noen av disse isolatene ble også sekvensert, og har få virulensassosierte gener sammenliknet med aEPEC og STEC, ingen typiske virulensgener assosiert med alvorlig sykdom og ikke de samme som beskrevet over for STEC og aEPEC. De *stx*- og *eae*-negative isolatene har flere ulike H-typer; H2, H14, H16, H21, og tilsvarende H-typer ble også isolert i kartleggingen på sau (20).

Funn av STEC O103 og aEPEC O103 fra storfe er også beskrevet av andre, men studiene er vanskelig å sammenlikne da det er benyttet ulike tilnærminger og metoder i de ulike studiene (16-18, 21). Som for O26, ble det for O103 isolert flere aEPEC O103 enn STEC O103. Det var ingen forskjell i funn av STEC eller aEPEC O103 i forhold til region.

Det er første gang STEC O103:H25 er isolert fra storfe i Norge. Denne serotypen er imidlertid et vanlig funn hos sau, men da som aEPEC, altså uten *stx* (20). STEC O103:H25 med *stx*_{2a} var årsak til utbruddet på mennesker i Norge i 2006 (22, 23). Videre studier vil bli gjort for å undersøke funnet hos storfe nærmere.

E. coli O145

Fra en besetning ble det isolert STEC O145 med *stx* subtype *stx*_{1a} (0,6 %, 95 % KI: 0,01 - 3,1 %). Det ble også isolert aEPEC O145 fra tre besetninger (1,7 %, 95 % KI: 0,3 - 4,8 %). aEPEC og STEC O145 isolatene hadde i tillegg mange andre virulensassosierte gener (bl. a. *ehxA*, *cif*, *astA* og ulike *esp*-gener). STEC O145 isolatet var av serotype O145:H4, det samme som to av tre aEPEC O145. Det siste aEPEC isolatet var det ikke mulig å identifisere med H-typing. Imidlertid har isolatet samme MLST-profil som de andre aEPEC O145 isolatene, noe som kan tyde på at også dette isolatet er av serotype O145:H4.

Det er relativt vanlig kun å karakterisere isolater til serogruppe (O-gruppe) og ikke nødvendigvis med H-type, inkludert for STEC O145. STEC O145:H4 anses dermed som patogen for mennesker på bakgrunn av at det er en STEC O145 (15), selv om serotypen O145:H4 i seg selv ikke er spesielt godt omtalt i litteraturen.

Sammenliknet med kartleggingen på sau fra 2007 (8) der et utvalg på 149 av besetningene ble undersøkt for O145, ble det isolert betydelig mindre aEPEC O145 fra storfe (1,7 %) enn fra sau (ca. 29 %). Internasjonalt er både STEC O145 og aEPEC O145 beskrevet isolert fra storfe, men med en nokså lav forekomst. Det var ingen forskjell i funn av STEC eller aEPEC O145 i forhold til region i denne kartleggingen.

E. coli O157

STEC O157 ble isolert fra fire besetninger (2,2 %, 95 % KI: 0,6 - 5,6 %) der en besetning hadde *stx*₁-positive isolater (*stx*_{1a}), to besetninger hadde *stx*₂-positive isolater (*stx*_{2c}), mens den siste besetningen hadde isolater som var positiv for både *stx*₁ og *stx*₂ (*stx*_{1a} og *stx*_{2c}). Fra tre besetninger ble det påvist aEPEC O157 (1,7 %, 95 % KI: 0,3 - 4,8 %). Alle isolatene var av serotype O157:H7, og både aEPEC O157:H7 og STEC O157:H7 hadde også mange andre virulensassosierte gener (bl.a. *ehxA*, *astA*, *esp*-gener, *nleA*, *nleB*). Det ble ikke påvist noen sorbitolfermenterende *E. coli* O157 (SF O157). Det var ingen forskjell i funn av STEC eller aEPEC O157 i forhold til region. STEC O157:H7 isolatene regnes som patogener for mennesker (15).

I tillegg var det 11 besetninger hvor det ble isolert *E. coli* O157 uten virulensgenene *eae* og *stx* (6,1 %, 95 % KI: 3,1 - 10,7 %). Ni av disse isolatene ble sekvensert, og alle disse hadde en annen H-type; H10, H12, H42, H43, samt få eller ingen andre virulensassosierte gener.

Det er vanskelig å sammenlikne forekomsten av STEC (og aEPEC) O157:H7 med tidligere studier på storfe i Norge da det er benyttet ulike metoder og tilnærminger (9-11). Det samme gjelder for kartleggingen av zoonotiske *E. coli* hos sau. Internasjonalt er STEC O157:H7 den STEC O-gruppen som er best beskrevet, og store geografiske variasjoner i forekomst er rapportert. Tilsvarende omfattende data finnes ikke for aEPEC O157. I en fransk studie (18) ble det isolert både STEC O157 og aEPEC O157 fra storfe. Tilsvarende hva som ble observert i vår kartlegging, ble det påvist flere STEC O157 enn aEPEC O157.

E. coli O111

Det ble ikke isolert *E. coli* O111 fra noen av besetningene der prøvene var positive for O111 i den innledende screeningen (95 % KI: 0 - 2,0 %). Heller ikke i kartleggingen av *E. coli* hos sau i 2006-07 ble det påvist *E. coli* O111(8). Dette tilsier at forekomsten av *E. coli* O111 hos norske drøvtyggere (sau og storfe) er svært lav. Tilsvarende resultater er rapportert fra andre europeiske land (16-18).

E. coli O91

STEC O91 ble isolert fra åtte av besetningene (4,4 %, 95 % KI: 1,9 - 8,6 %). Isolater fra syv av besetningene tilhørte serotype O91:H21, hvorav seks hadde *stx* subtype *stx*_{2b} og ett hadde både *stx*_{1a} og *stx*_{2d}. Isolatet fra den siste besetningen var av serotype O91:H10 og hadde subtype *stx*_{2d}. Isolatene med subtype *stx*_{2b} og *stx*_{2d} hadde bare noen få virulensassosierte gener i tillegg, mens isolatet som var positivt for både *stx*_{1a} og *stx*_{2d} hadde flere virulensassosierte gener (bl. a. *ehxA*, *cdtB*). Ingen av STEC O91 isolatene hadde *eae*-genet, noe som er kjent fra andre undersøkelser av STEC O91 (24, 25). Det ble i tillegg påvist *E. coli* O91 uten *stx* og *eae* fra til sammen ni besetninger (5,0 %, 95 % KI: 2,3 - 9,3 %). Fra en av disse besetningene ble det også isolert STEC O91. Det var ingen forskjell i funn av STEC O91 i forhold til region. Det er lite kunnskap om forekomsten av STEC O91 hos storfe, men den er beskrevet isolert fra storfe tidligere (26, 27), samt fra storfekjøtt (25).

STEC O91 er vist å kunne gi sykdom hos mennesker i Norge, men H-type og *Stx* subtype er ikke alltid kjent (3, 28). STEC O91:H21 med *stx* subtypene *stx*_{1a} og *stx*_{2d} kan regnes som patogen for mennesker selv om de ikke har *eae* (24, 29). Det samme gjelder STEC O91:H10 med subtype *stx*_{2d} (24, 25). Subtype *stx*_{2d} er assosiert med alvorlig sykdom uavhengig av serotype, mens *stx*_{2b} er imidlertid ikke assosiert med alvorlig sykdom hos mennesker. Det anses derfor mindre sannsynlig at STEC O91:H21 med subtype *stx*_{2b} vil kunne gi alvorlig sykdom.

E. coli O121

Det ble isolert STEC O121 fra en besetning (0,6 %, 95 % KI: 0,01 - 3,1 %). Isolatet hadde subtype *stx*_{2a} og *eae*, var av serotype O121:H19. Det hadde i tillegg mange andre virulensassosierte gener (bl.a. *astA*, *ehxA*, *esp*-gener, *nleA*, *nleB*) og er å regne som patogent for mennesker (30, 31). STEC O121 er vist å gi alvorlig sykdom, inkludert HUS også i Norge (28, 32). Enkelte studier i ulike land har rapportert lite eller ingen funn av STEC O121 i storfe (19, 33, 34), men det er generelt lite kunnskap om forekomsten av STEC O121 hos storfe.

Det ble i tillegg påvist *E. coli* O121 uten virulensgener fra 36 besetninger (20,1 %, 95 % KI: 14,5 - 26,7 %) noe som viser at dette er en vanlig *E. coli* serotype hos storfe.

Diskusjon

I denne kartleggingen ble det isolert STEC av serogruppene O26, O91, O103, O121, O145 og O157 fra mindre enn 1 % (O121) til drøyt 5 % (STEC O26) av melkekubesetningene. Det ble ikke isolert STEC O111 fra noen av besetningene. Tidligere studier på storfe i Norge har konsentrert seg om påvisning av STEC O157 og har funnet en forekomst <1 %. I denne studien ble det isolert STEC O157:H7 fra 2,2 % av besetningene. Det kan ikke ut i fra dette sies at det har vært en økning i forekomst, da det kan forklares med endringer i metodikk til mer sensitive metoder, samt forskjeller i design av studiene. I 2006 og 2007 ble det gjennomført en tilsvarende kartlegging av *E. coli* i norske saubesetninger der forekomsten av STEC av serogruppene O26, O103, O145 og O157 for alle var under 1 %. Det ble ikke heller ikke den gang isolert STEC O111. Resultatene fra kartleggingen på storfe tyder på en noe høyere forekomst av STEC av de analyserte serogruppene hos storfe enn hos sau, men det er brukt til dels ulik studiedesign og metoder i disse to kartleggingene og en sammenlikning må derfor gjøres med forbehold.

Siden det har vært sykdomstilfeller av STEC O91 og O121 i Norge, ble undersøkelser for disse serotypene inkludert i kartleggingen. Det ble isolert STEC O91 og STEC O121 fra henholdsvis 4,5 % og 0,6 % av besetningene. Det er første gang det undersøkes for disse serotypene hos drøvtyggere i Norge.

Internasjonalt er det gjort relativt mange undersøkelser av forekomst av STEC hos storfe, men det er svært vanskelig å sammenlikne resultater fra disse direkte med kartleggingen som er utført her i Norge. Hovedårsaken til dette er at det er stor variasjon i design av studiene og benyttet metodikk. For Europa, ble det i Zoonoserapporten for 2015 rapportert en forekomst av STEC i 6,8 % av prøvene fra dyr som ble analysert totalt, mens 8,3 % av prøvene av storfe var positive for STEC (35). Det var imidlertid kun syv medlemsstater som rapporterte data for STEC. I Sverige og Finland ble det påvist STEC O157 i henholdsvis 2,2 % og 2,9 % av prøvene, noe som tilsvarer funnene i denne kartleggingen. STEC O157 var den hyppigst rapporterte STEC serogruppen fra alle landene, men det ble også rapportert funn av STEC O103 og STEC O121 fra noen land. Imidlertid er det fortsatt slik at mange land kun undersøker for STEC O157.

Kartleggingen viser at det er vanlig å finne aEPEC (*stx*-negative og *eae*-positive *E. coli*) av serogruppene O26, O103, O145 og O157 hos storfe, og da spesielt aEPEC O26 som ble påvist i ca. 15 % av de prøvetatte besetningene. Betydningen av et slikt reservoar hos dyr med tanke på sykdom hos mennesker er uklar. Det finnes muligheter for at aEPEC O26, eller aEPEC av andre serotyper, har evne til å plukke opp *stx*-bakteriofager, og slik utvikle seg til STEC (*stx*- og *eae*-positive *E. coli*). Det er imidlertid flere faktorer som må inntreffe samtidig for at dette skal kunne skje. Bakterien må treffe på en *stx*-bakteriofag som er infektiv for denne bakterien og forholdene må ligge til rette for at en transduksjon (DNA overføring via bakteriofager) skal kunne inntreffe. Söderlund *et al.* (21) sammenliknet STEC og aEPEC O103:H2 fra storfe og konkluderte med at aEPEC O103:H2 tilhørte en annen subgruppe enn STEC O103:H2, og at det antagelig ikke er vanlig at disse aEPEC tar opp eller mister *stx*-bakteriofager. Laboratorieforsøk viste imidlertid at optak av *stx*-bakteriofager kan forekomme.

Resultatene fra denne kartleggingen viser at forekomsten av STEC av serogruppene O26, O91, O103, O121, O145 og O157 er lav i norske melkekubesetninger. Videre viser resultatene at det er en større forekomst av aEPEC, og da særlig aEPEC O26, som ble påvist i ca. 15 % av besetningene. For aEPEC O26 ble det også påvist en geografisk forskjell med høyest forekomst i region Vest og lavest i region Midt/Nord.

Kartleggingen gir viktig kunnskap til nytte for både næring, myndigheter og kunnskaps-institusjoner. Selv om resultatene viser en god situasjon i Norge med lav forekomst av zoonotiske *E. coli* som kan gi alvorlig sykdom hos mennesker, er det viktig å gjennomføre kartlegginger med jevne mellomrom for slik å generere oppdaterte norske data som grunnlag for næring, myndigheter og kunnskapsinstitusjoner.

Referanser

1. Persson S, Olsen KE, Ethelberg S, Scheutz F. 2007. Subtyping method for *Escherichia coli* shiga toxin (verocytotoxin) 2 variants and correlations to clinical manifestations. *J Clin Microbiol* 45:2020-2024.
2. Naseer U, Loberli I, Hindrum M, Bruvik T, Brandal L. 2017. 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* 36:1613-1620.
3. Haugum K, Johansen J, Gabrielsen C, Brandal LT, Bergh K, Ussery DW, Drablos F, Afset JE. 2014. Comparative genomics to delineate pathogenic potential in non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) from patients with and without haemolytic uraemic syndrome (HUS) in Norway. *PLoS One* 9:e111788.
4. Krosness MM, Lyngstad TM, Lange H, Nygård K, Jore S, Kapperud G, MacDonald E, Brandal LT, Feruglio SL, Grøneng GM, Vold L. 2018. «[Årsrapport 2017 Overvåkning av sykdommer som smitter fra mat, vann og dyr, inkludert vektorbårne sykdommer]». [2017 Annual Surveillance Report for Zoonotic, Food, Water and Vector-borne Infectious Diseases]. Rapport 2017. Oslo: Folkehelseinstituttet.
5. Ocampo JMF, Lange H, Jore S, Guzman BRH, Kapperud G, Blystad H, Nygård K, Grøneng GM, Vold L. 2017. "[Årsrapport 2016 Overvåkning av sykdommer som smitter fra mat, vann og dyr, inkludert vektorbårne sykdommer]". [2016 Annual Surveillance Report for Zoonotic, Food, Water and Vectorborne Infectious Diseases] Rapport 2016. Oslo: Folkehelseinstituttet.
6. Scheutz F, Teel LD, Beutin L, Pierard D, Buvens G, Karch H, Mellmann A, Caprioli A, Tozzoli R, Morabito S, Strockbine NA, Melton-Celsa AR, Sanchez M, Persson S, O'Brien AD. 2012. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *J Clin Microbiol* 50:2951-2963.
7. Urdahl AM, Bruheim T, Cudjoe K, Hofshagen M, Hopp P, Johannessen GS, Sunde M. 2009. Kartlegging av *E. coli* hos sau - sluttrapport. Veterinærinstituttet, Oslo.
8. Urdahl AM, Pedersen R, Johannessen GS, Cudjoe K, Hopp P, Sekse C. 2011. Sluttrapport: *E. coli* O111 og O145 hos sau. Veterinærinstituttet, Oslo.
9. LeJeune JT, Hancock D, Wasteson Y, Skjerve E, Urdahl AM. 2006. Comparison of *E. coli* O157 and Shiga toxin-encoding genes (*stx*) prevalence between Ohio, USA and Norwegian dairy cattle. *Int J Food Microbiol* 109:19-24.
10. Vold L, Klungseth Johansen B, Kruse H, Skjerve E, Wasteson Y. 1998. Occurrence of shigatoxinogenic *Escherichia coli* O157 in Norwegian cattle herds. *Epidemiol Infect* 120:21-28.
11. Johnsen G, Wasteson Y, Heir E, Berget OI, Herikstad H. 2001. *Escherichia coli* O157:H7 in faeces from cattle, sheep and pigs in the southwest part of Norway during 1998 and 1999. *International Journal of Food Microbiology* 65:193-200.
12. 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* 6:605-11.
13. Ternent HE, Innocent GT, Filshie LM, Taylor DJ, Steele WB, McEwen SA, Reilly WJ, Gunn GJ, Reid SW, Mellor DJ. 2004. Frozen storage of *Escherichia coli* O157 in buffered peptone water and its detection on bovine carcasses. *J Food Prot* 67:40-5.
14. Hazards) EBPEPoB. 2015. Scientific opinion on public health risks associated with Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) as a food-borne pathogen. European Food Safety Authority,
15. (BIOHAZ) EPoBH. 2013. Scientific Opinion on VTEC-seropathotype and scientific criteria regarding pathogenicity assessment. European Food Safety Authority,
16. Pearce MC, Evans J, McKendrick IJ, Smith AW, Knight HI, Mellor DJ, Woolhouse ME, Gunn GJ, Low JC. 2006. Prevalence and virulence factors of *Escherichia coli* serogroups O26, O103, O111, and O145 shed by cattle in Scotland. *Appl Environ Microbiol* 72:653-659.
17. Thomas KM, McCann MS, Collery MM, Logan A, Whyte P, McDowell DA, Duffy G. 2012. Tracking verocytotoxinogenic *Escherichia coli* O157, O26, O111, O103 and O145 in Irish cattle. *Int J Food Microbiol* 153:288-96.
18. Bibbal D, Loukiadis E, Kerouredan M, Ferre F, Dilasser F, Peytavin de Garam C, Cartier P, Oswald E, Gay E, Auvray F, Brugere H. 2015. Prevalence of carriage of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8, and O145:H28 among slaughtered adult cattle in France. *Appl Environ Microbiol* 81:1397-1405.

19. Mellor GE, Fegan N, Duffy LL, Mc MK, Jordan D, Barlow RS. 2016. National Survey of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Serotypes O26, O45, O103, O111, O121, O145, and O157 in Australian Beef Cattle Feces. *J Food Prot* 79:1868-1874.
20. Sekse C, Sunde M, Hopp P, Bruheim T, Cudjoe KS, Kvitle B, Urdahl AM. 2013. Occurrence of potentially human-pathogenic *Escherichia coli* O103 in Norwegian sheep. *Appl Environ Microbiol* 79:7502-7509.
21. Soderlund R, Hurel J, Jinnerot T, Sekse C, Aspan A, Eriksson E, Bongcam-Rudloff E. 2016. Genomic comparison of *Escherichia coli* serotype O103:H2 isolates with and without verotoxin genes: implications for risk assessment of strains commonly found in ruminant reservoirs. *Infect Ecol Epidemiol* 6:30246.
22. Sekse C, O'sullivan K, Granum PE, Rorvik LM, Wasteson Y, Jorgensen HJ. 2009. An outbreak of *Escherichia coli* O103:H25 isolated from patients suffering from hemolytic uremic syndrome. *Int J Food Microbiol* 133:259-264.
23. Schimmer B, Nygard K, Eriksen HM, Lassen J, Lindstedt BA, Brandal LT, Kapperud G, Aavitsland P. 2008. Outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Norway caused by stx2-positive *Escherichia coli* O103:H25 traced to cured mutton sausages. *BMC Infect Dis* 8:41.
24. Mellmann A, Fruth A, Friedrich AW, Wieler LH, Harmsen D, Werber D, Middendorf B, Bielaszewska M, Karch H. 2009. Phylogeny and disease association of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O91. *Emerg Infect Dis* 15:1474-7.
25. Feng PCH, Delannoy S, Lacher DW, Bosilevac JM, Fach P, Beutin L. 2017. Shiga Toxin-Producing Serogroup O91 *Escherichia coli* Strains Isolated from Food and Environmental Samples. *Appl Environ Microbiol* 83.
26. Galli L, Miliwebsky E, Irino K, Leotta G, Rivas M. 2010. Virulence profile comparison between LEE-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains isolated from cattle and humans. *Vet Microbiol* 143:307-13.
27. Mekata H, Iguchi A, Kawano K, Kirino Y, Kobayashi I, Misawa N. 2014. Identification of O serotypes, genotypes, and virulotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates, including non-O157 from beef cattle in Japan. *J Food Prot* 77:1269-74.
28. Brandal LT, Wester AL, Lange H, Løbersli I, Lindstedt B-A, Vold L, Kapperud G. 2015. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Norway, 1992-2012: characterization of isolates and identification of risk factors for haemolytic uremic syndrome. *BMC Infectious Diseases* 15:324.
29. Bielaszewska M, Stoewe F, Fruth A, Zhang W, Prager R, Brockmeyer J, Mellmann A, Karch H, Friedrich AW. 2009. Shiga toxin, cytolethal distending toxin, and hemolysin repertoires in clinical *Escherichia coli* O91 isolates. *J Clin Microbiol* 47:2061-6.
30. McCarthy TA, Barrett NL, Hadler JL, Salisbury B, Howard RT, Dingman DW, Brinkman CD, Bibb WF, Cartter ML. 2001. Hemolytic-Uremic Syndrome and *Escherichia coli* O121 at a Lake in Connecticut, 1999. *Pediatrics* 108:E59.
31. Robertson J, Lin J, Levett PN, Nadon C, Nash J, Berry C. 2018. Complete Genome Sequence of an *Escherichia coli* O121:H19 Strain from an Outbreak in Canada Associated with Flour. *Genome Announc* 6.
32. Gabrielsen C, Drablos F, Afset JE. 2015. Genome Sequences of 11 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains. *Genome Announc* 3.
33. Cull CA, Renter DG, Dewsbury DM, Noll LW, Shridhar PB, Ives SE, Nagaraja TG, Cernicchiaro N. 2017. Feedlot- and Pen-Level Prevalence of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Feces of Commercial Feedlot Cattle in Two Major U.S. Cattle Feeding Areas. *Foodborne Pathog Dis* 14:309-317.
34. Schneider LG, Stromberg ZR, Lewis GL, Moxley RA, Smith DR. 2018. Cross-sectional study to estimate the prevalence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* on hides of market beef cows at harvest. *Zoonoses Public Health* doi:10.1111/zph.12468.
35. EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). 2016. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal* 2016;14(12):4634, 231 pp. doi:10.2903/j.efsa.2016.4634.

Annex 1

Primere og prober

Tabell 1. Primere og prober som er benyttet i kartleggingen av zoonotiske *E. coli* hos norske melkekubesetninger i 2014 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	<i>rfbE</i> 0157-F <i>rfbE</i> 0157-R <i>rfbE</i> 0157-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>	<i>aggR</i> -F <i>aggR</i> -R <i>aggR</i> -P	GAATCGTCAGCATCAGCTACA CCTAAAGGATGCCCTGATGA FAM-CGGACAACCTGCAAGCATCTA-BHQ1	EURL Method 05 Rev 1. 2013
<i>aaiC</i>	<i>aaiC</i> -F <i>aaiC</i> -R <i>aaiC</i> -P	CATTTACGCTTTTTCAGGAAT CCTGATTTAGTTGATTCCTACG HEX-CACATACAAGACCTTCTGGAGAA-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.

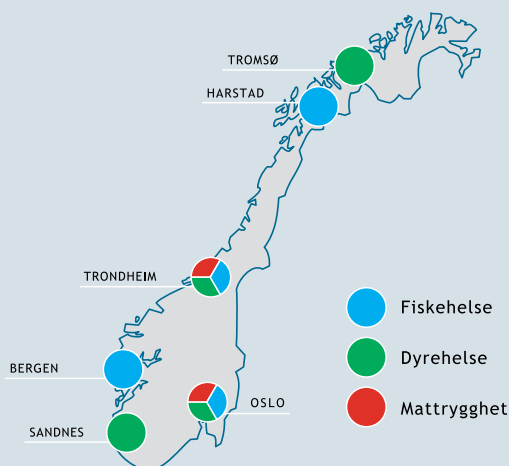
Bugarel M, Beutin L, Martin A, Gill A, Fach P. 2010. Micro-array for the identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) seropathotypes associated with hemorrhagic colitis and haemolytic uremic syndrome in humans. *Int J Food Microbiol* 142:318-329.

Faglig ambisjos, fremtidsrettet og samspillende - for én helse!

Veterinærinstituttet er et nasjonalt forskningsinstitutt innen dyrehelse, fiskehelse, mattrygghet og fôrhygiene med uavhengig kunnskapsutvikling til myndighetene som primæroppgave.

Beredskap, diagnostikk, overvåking, referansefunksjoner, rådgivning og risikovurderinger er de viktigste virksomhetsområdene. Produkter og tjenester er resultater og rapporter fra forskning, analyser og diagnostikk, og utredninger og råd innen virksomhetsområdene. Veterinærinstituttet samarbeider med en rekke institusjoner i inn- og utland.

Veterinærinstituttet har hovedlaboratorium og administrasjon i Oslo, og regionale laboratorier i Sandnes, Bergen, Trondheim, Harstad og Tromsø.



Fiskehelse



Dyrehelse



Mattrygghet



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