



Patogene *Yersinia enterocolitica* i svineprodukter



RAPPORT 30/2021

Patogene *Yersinia enterocolitica* i svineprodukter

Forfattere

Gro S. Johannessen, Veterinærinstituttet og
Cathrine Signe Svindland, Mattilsynet

Forslag til sitering

Johannessen, Gro S, Svindland, Cathrine Signe. Patogene *Yersinia enterocolitica* i svineprodukter. Surveillance program report. Veterinærinstituttet 2021. © Norwegian Veterinary Institute, copy permitted with citation

Kvalitetssikret av

Merete Hofshagen, avdelingsdirektør dyrehelse, dyrevelferd og mattrygghet, Veterinærinstituttet

Publisert

2021 on www.vetinst.no
ISSN 1890-3290 (electronic edition)
© Norwegian Veterinary Institute 2021

Oppdragsgiver



Kolofon

Design omslag: Reine Linjer
Foto forside: Colourbox
www.vetinst.no

Innhold

Sammendrag	3
Summary	3
Bakgrunn	4
Materiale og metoder	5
Utvalg og prøveinnsendelse	5
Bakteriologiske undersøkelser	5
Resultater og vurderinger	7
Undersøkelse for <i>ail</i> -genet	7
Forekomst	7
Vurdering.....	7
Referanser	9

Sammendrag

Yersinia enterocolitica er en bakterie der noen varianter er i stand til å forårsake sykdom hos mennesker. Svin antas å være hovedreservoaret for sykdomsfremkallende (patogene) *Y. enterocolitica*, og svinekjøtt regnes for å være en viktig smittekilde. I en tidligere kartlegging utført på oppdrag fra Statens Næringsmiddeltilsyn i 1997-98, ble det isolert *Y. enterocolitica* serogruppe O:3 fra 2 prosent av prøver tatt ut på slakteri. Det var behov for oppdatert kunnskap om forekomsten av patogene *Y. enterocolitica* i svinekjøttprodukter, og Mattilsynet initierte en kartlegging av dette med innsamling av prøvemateriale i 2019.

Det ble analysert til sammen 152 prøver av kvernet svinekjøtt og svinekjøttdeig hentet i butikk. Oppformerte prøver ble undersøkt for tilstedeværelse av den genetiske markøren *ail* som finnes i patogene *Y. enterocolitica*. Det ble gjort forsøk på isolering av patogene *Y. enterocolitica* fra prøver som var positive for *ail*-genet. Typiske kolonier fra skålene ble identifisert ved fenotypiske og molekylære metoder, som MALDI-TOF, PCR for tilstedeværelse av *ail*-genet, pyrazinamidase (PYZ) test og serotyping med antisera for serogruppene O:3, O:8 og O:9.

Resultatene tyder på at forekomsten av patogene *Y. enterocolitica* i norske svinekjøttprodukter er lav, men at de kan forekomme. Det er lenge siden den forrige studien fant sted, og undersøkelsene her gir derfor oppdatert kunnskap til nytte for både næring, myndigheter og kunnskapsinstitusjoner.

Summary

Yersinia enterocolitica is a bacterial species where some variants are able to cause disease in humans. Swine are assumed to be the main reservoir for pathogenic *Y. enterocolitica*, and pork meat is an important source. In a previous survey carried out on behalf of Statens Næringsmiddeltilsyn in 1997-98, *Y. enterocolitica* serogroup O:3 was isolated from 2 % of the samples collected at abattoirs. Updated knowledge on the occurrence of pathogenic *Y. enterocolitica* in pork products was needed, and Mattilsynet initiated a survey with sample collection throughout 2019.

In total, 152 samples of minced pork collected from supermarkets, were analysed. Enriched samples were screened for the presence of the genetic marker *ail* which is present in pathogenic *Y. enterocolitica*. After screening, isolation was attempted from the samples that were positive for the *ail* gene. Typical colonies were identified using, phenotypical and molecular methods, ie. MALDI-TOF, PCR for the *ail* gene, pyrazinamidase (PYZ) test and serotyping using antisera for O:3, O:8 and O:9.

The results indicate that the occurrence of pathogenic *Y. enterocolitica* in Norwegian pork products is low, but such bacteria may occur. The previous study took place in 1997-98 and this survey gives updated knowledge for the industry, authorities and knowledge institutions.

Bakgrunn

Yersinia enterocolitica er en bakterie der noen varianter er i stand til å forårsake sykdom hos mennesker [1]. I Norge har det siden 2010 vært mellom 50 og 100 tilfeller i året, med unntak av 2014 da det var et enkeltutbrudd med 133 tilfeller [2]. I 2020 ble det meldt inn 82 tilfeller til Meldingssystemet for Smittsomme Sykdommer (MSIS) [3]. Siden 2010 er det beskrevet flere utbrudd med yersiniose i Norge [4]. I de senere årene har man sett flere utbrudd som er knyttet til salat/bladgrønnsaker, mens det er registrert tre utbrudd fra sylte [4]. Yersiniose var den fjerde hyppigst rapporterte zoonosen i EU i 2018, og i perioden 2005 - 2018 var svinekjøtt og -produkter og «annen mat» det som oftest ble rapportert i forbindelse med matbårne yersiniose-utbrudd i EU [5].

Patogene *Y. enterocolitica* er bærere av flere gener som koder for virulensfaktorer, som f.eks. *ail* (kromosomalt) og *yadA* (plasmidbårent). En ofte brukt tilnærming for å påvise patogene *Y. enterocolitica* er å benytte en kombinasjon av dyrkings- og PCR-metodikk. Oppformert prøvemateriale screenes for tilstedeværelse av en eller flere genetiske markører, som virulensfaktorer. Hvis prøvene er positive etter screeningen, går man videre for å forsøke å isolere og karakterisere den aktuelle bakterien fra de PCR positive prøvene. *Y. enterocolitica* er en svært heterogen gruppe bakterier, og serotyping vha. O-antigener, biotyping vha. biokjemisk karakterisering samt DNA baserte teknikker benyttes til å gruppere *Y. enterocolitica*. Mange av de variantene som kan gi sykdom hos mennesker hører hjemme i noen få serogruppe - biotypekombinasjoner og særlig serogruppene O:3 og O:9 er vanlige [1]. I Norge har det vært utbrudd knyttet til begge disse serogruppene [4].

Svin regnes for å være hovedreservoaret for patogene *Y. enterocolitica*, og svinekjøtt og svinekjøttprodukter ansees å være de vanligste smittekilene i Norge. *Y. enterocolitica* er kuldetilpasset og kan vokse ved kjøleskapstemperatur og lavere [1]. I en kartlegging som ble utført på oppdrag fra Statens Næringsmiddeltilsyn i 1997-98, ble det påvist genetisk markør for patogene *Y. enterocolitica* ved PCR i 17 prosent av 300 prøver av rå svinekjøttprodukter tatt ut på slakteri, mens det med dyrkningsmetode ble isolert *Y. enterocolitica* serogruppe O:3 fra 2 prosent av prøvene [6]. Det var behov for oppdatert kunnskap om forekomst av patogene *Y. enterocolitica* i norske svinekjøttprodukter, og Mattilsynet initierte en kartlegging av dette med innsamling av prøvemateriale i 2019.

Materiale og metoder

Utvalg og prøveinnsendelse

Alle prøver ble tatt hos detaljist av Mattilsynet i 2019 i henhold til en uttaksplan som var basert på kriterier som sikret tilfeldig utvalg av prøver fra hele landet gjennom et helt år [7]. Prøvene skulle bestå av kvernet kjøtt og kjøttdeig fra svin av norsk opprinnelse. Prøvene ble sendt inn med kjøling til laboratoriet. Ved ankomst til laboratoriet ble prøvene oppbevart i kjøleskap i maks 3 dager fram til analysestart. Analyse av prøvene ble startet innenfor holdbarhetsdato.

Bakteriologiske undersøkelser

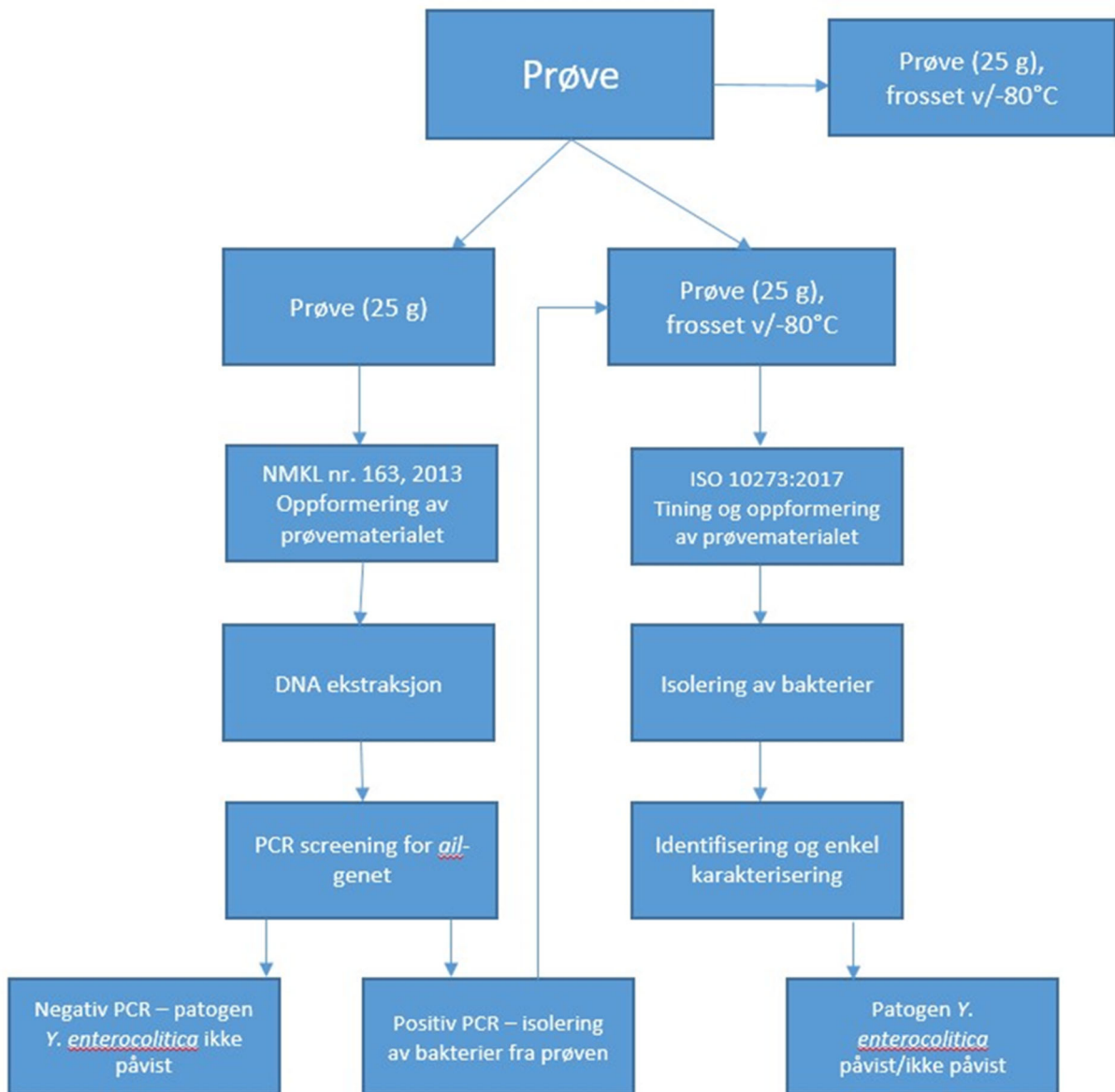
Undersøkelse for genetiske markører i oppformert materiale

Prøvene ble analysert som beskrevet i NMKL 163, 2. utg, 2013 [8] med enkelte presiseringer. Fra hver prøve ble det tatt ut en laboratorieprøve på ca. 100 g. Fra denne laboratorieprøven ble det veid inn 3 x 25 g hvorav 2 x 25 g ble frosset ved -80°C , mens de resterende 25 g prøve ble blandet med 225 ml pepton-sorbitol-gallesalt-buljong (PSB), homogenisert og inkubert ved $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ i 21 ± 3 timer. Se flytskjema i figur 1 for oversikt over analysene.

Etter oppformering ble DNA ekstrahert fra oppformeringsbuljongen ved bruk av DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Tyskland) i henhold til produsentens anvisninger. Prøvene ble analysert for tilstedeværelse av *ail* ved hjelp av real-time PCR som beskrevet i NMKL 163 [8] i to runder; en etter at ca. halvparten av prøvene var samlet inn og den andre etter at de resterende prøvene var samlet inn.

Isolering av bakterier

Etter at alle prøvene var analysert for tilstedeværelse av *ail*-genet, ble det på bakgrunn av resultatene fra den innledende analysen gjort forsøk på isolering av *Y. enterocolitica*. Alle prøvene som var positive for *ail* ble valgt ut for videre analyse. En av de to prøvene som ble lagret ved -80°C ble tint raskt i romtemperatur før den ble analysert som beskrevet i NS-EN ISO 10273:2017 [9] med noen endringer. Kort beskrevet ble prøven (25 g) blandet med 225 ml PSB og homogenisert, og 10 ml av PSB-homogenatet ble overført til 90 ml ITC-buljong (Irgasan Ticarcillin og kaliumklorat-buljong). Begge buljongene ble inkubert ved $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ i 44 ± 4 timer. Etter oppformering ble 0,5 ml av de respektive buljongene behandlet med KOH i 20 sekunder før de ble sådd ut på CIN agar (Cefsulodin Irgasan Novobiocin agar) og inkubert ved $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ i 24 ± 2 timer. Etter inkubering ble inntil 30 typiske og mistenkelige kolonier plukket og rendyrket. Fem og fem kolonier ble slått sammen i pooler og disse poolene ble testet for *ail*-genet med real-time PCR som beskrevet over. Kolonier fra *ail*-positive pooler ble deretter identifisert og karakterisert med MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight Mass Spectrometry, Bruker Daltronics GmbH, Tyskland), real-time PCR for *ail*-genet, pyrazinamidase (PYZ) test og serogruppering med antisera (Anti-*Y. enterocolitica* O3, Anti-*Y. enterocolitica* O8, Anti-*Y. enterocolitica* O9, Sifin Diagnostics GmbH, Tyskland).



Figur 1: Flytskjema over utførte analyser av kvernet svinekjøtt eller svinekjøttdeig

Resultater og vurderinger

I perioden fra slutten av februar til midt i november 2019 ble det samlet inn 168 prøver av kvernet svinekjøtt og svinekjøttdeig hvorav 152 prøver ble analysert for patogene *Y. enterocolitica*. De resterende 16 prøvene ble ikke analysert da de enten var av feil prøvemateriale eller ble mottatt etter utgått holdbarhetsdato.

Undersøkelse for *ail*-genet

Real-time PCR for *ail*-genet viste at det var tilstede i 26 (17,1 prosent) av de undersøkte prøvene. Resultatene brukes som en indikator på om det kan være bakterier som inneholder det aktuelle genet tilstede i prøvene. Siden PCR påviser genetisk materiale generelt i prøvene og ikke nødvendigvis i bakteriene, er det nødvendig å undersøke om *ail*-genet er tilstede i levende bakterier for å kunne si noe om forekomst av potensielt patogene *Y. enterocolitica*. Som nevnt tidligere er det kun noen varianter av *Y. enterocolitica* som kan forårsake sykdom hos mennesker og det er derfor ikke tilstrekkelig å bare påvise *Y. enterocolitica*. Positive *ail* resultater kan ha flere årsaker; tilstedeværelse av patogene *Y. enterocolitica* eller rester av genetisk materiale.

Forekomst

Det ble utført forsøk på isolering fra til sammen 26 prøver (positive for *ail*-genet). Det ble isolert patogene *Y. enterocolitica* fra ni av disse, noe som utgjør 5,9 prosent av alle prøver (152) (Tabell 1). I hovedsak var isolatene av serogruppe O:3 (åtte av ni prøver), mens isolatet fra den siste prøven var verken O:3, O:8 eller O:9. Det er ikke uvanlig at man ikke greier å isolere patogene *Y. enterocolitica* fra prøver som er positive for den genetiske markøren, i dette tilfellet *ail*-genet. En av grunnene til dette er at det kan være overvekst av andre bakterier på skålene som maskerer patogene *Y. enterocolitica* eller det kan være tilstede genetisk materiale fra døde bakterier.

Vurdering

I denne kartleggingen ble det isolert patogene *Y. enterocolitica* fra ni av til sammen 152 prøver (5,9 prosent) av kvernet svinekjøtt eller svinekjøttdeig. I et prosjekt gjennomført på oppdrag av Statens Næringsmiddeltilsyn i 1997-98, ble det påvist genetisk markør for patogene *Y. enterocolitica* ved PCR i 17 prosent av 300 prøver av rå svinekjøttprodukter tatt ut på slakteriet, mens det med dyrkningsmetode ble isolert *Y. enterocolitica* serogruppe O:3 fra 2 prosent av prøvene [6]. Resultatene fra disse to undersøkelsene kan ikke sammenliknes direkte siden det er undersøkt ulikt prøvemateriale og benyttet forskjellige metoder.

I en nylig avsluttet 5-årig studie fra Tyskland ble patogene *Y. enterocolitica* isolert fra 11,5 prosent av prøvene fra krydret svinekjøttdeig [10]. Tidligere studier fra Europa viser at patogene *Y. enterocolitica* kan isoleres fra svinekjøttdeig i mellom 1-6 prosent av prøvene [11-15]. Det er vanskelig å sammenlikne resultatene direkte da det er benyttet forskjellige tilnærminger og benyttet ulike metoder.

Tabell 1: Oversikt over ail-positive prøver og videre isolering fra de ail-positive prøvene. Totalt 26 prøver var positive for ail og patogene *Y. enterocolitica* ble isolert fra ni av disse prøvene, hvorav åtte var av serogruppe O:3.

ID-nummer	Real-time PCR screening av prøver	Real-time PCR pooler	Etter isolering			
			Enkeltkolonier			
			Maldi-TOF	PYZ-test ¹	<i>ail</i> -gen	Serogruppe
2019-22-71	+	+	<i>Y. enterocolitica</i>	-	+	O:3
2019-22-97	+	+	<i>Y. enterocolitica</i>	-	+	O:3
2019-22-113	+	-				
2019-22-114	+	-				
2019-22-176	+	+	<i>Y. enterocolitica</i>	-	+	O:3
2019-22-245	+	-				
2019-22-360	+	-				
2019-22-399	+	+	<i>Y. enterocolitica</i>	-	+	O:3
2019-22-415	+	+	<i>Y. enterocolitica</i>	-	+	. ²
2019-22-438	+	-				
2019-22-439	+	-				
2019-22-490	+	-				
2019-22-514	+	-				
2019-22-558	+	+	<i>Y. enterocolitica</i>	-	+	O:3
2019-22-600	+	+	<i>Y. enterocolitica</i>	-	+	O:3
2019-22-626	+	-				
2019-22-663	+	+	<i>Y. enterocolitica</i>	-	+	O:3
2019-22-680	+	-				
2019-22-692	+	-				
2019-22-695	+	-				
2019-22-736	+	-				
2019-22-907	+	+	<i>Y. enterocolitica</i>	-	+	O:3
2019-22-1115	+	-				
2019-22-1201	+	-				
2019-22-1272	+	-				
2019-22-1275	+	-				

¹ Patogene *Y. enterocolitica* er negative på pyrazinamidase (PYZ) test.

² Tilhørte ingen av serogruppene O:3, O:8 eller O:9.

Resultatene fra denne kartleggingen tyder på at det er en lav forekomst av patogene *Y. enterocolitica* i norske svinekjøttprodukter, men at det kan forekomme. Det må bemerkes at det er analysert et relativt lavt antall prøver. Siden det er lenge siden den forrige studien utført på norske svinekjøttprodukter, gir kartleggingen likevel kunnskap til nytte for både næring, myndigheter og kunnskapsinstitusjoner. Det er viktig å gjennomføre slike kartlegginger med jevne mellomrom for å generere oppdaterte norske data for å kunne ha oversikt over status og følge med på trender.

Referanser

1. Kapperud, G., *Yersinia enterocolitica*, in *Matforgiftning*, P.E. Granum, Editor. 2017, Cappelen Damm AS: Oslo.
2. Lyngstad TM, A.E., Brandal LT, Eide HN, Feruglio SL, Grøneng GM, Johansen TB, Jore S, Lange H, Lund H, MacDonald E, Naseer U, Nygård K, Vold L., "Årsrapport 2019 Overvåkning av sykdommer som smitter fra mat, vann og dyr, inkludert vektorbårne sykdommer" 2020, Folkehelseinstituttet: Oslo.
3. Meldingssystem for smittsomme sykdommer. MSIS - Statistikk. [26.01.2021]; Available from: <http://www.msis.no/>.
4. Folkehelseinstituttet. Utbrudd av yersiniose i Norge. 2020 [26.01.2021]; Available from: <https://www.fhi.no/sv/utbrudd/oversikt-over-storre-utbrudd/utbrudd-av-yersiniose-i-norge/>.
5. EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control) The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 2019. 17(12):5926, 276 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5926>.
6. Johannessen, G.S., G. Kapperud, and H. Kruse, Occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in Norwegian pork products determined by a PCR method and a traditional culturing method. *International Journal of Food microbiology*, 2000. 54(1-2): p. 75-80.
7. 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): p. 3686.
8. Nordic Committee on Food Analysis, NMKL. Pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* - real-time PCR methods for the detection in food, feed and environmental samples. NMKL nr 163, 2. utg., 2013. Bergen, Norway.
9. International Organization for Standardization, ISO. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica*. 10273:2017. Geneva, Switzerland.
10. Ferl, M., D. Maede, and P.G. Braun, Combined molecular biological and microbiological detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in spiced ground pork, meat for production of ground pork and raw sausages. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 2020. 15(1): p. 27-35.
11. Fredriksson-Ahomaa, M., S. Hielm, and H. Korkeala, High prevalence of yadA-positive *Yersinia enterocolitica* in pig tongues and minced meat at the retail level in Finland. *J Food Prot*, 1999. 62(2): p. 123-7.
12. Lambertz, S.T., et al., Evaluation of a combined culture and PCR method (NMKL-163A) for detection of presumptive pathogenic *Yersinia enterocolitica* in pork products. *J Food Prot*, 2007. 70(2): p. 335-40.
13. Bonardi, S., et al., Detection, semiquantitative enumeration, and antimicrobial susceptibility of *Yersinia enterocolitica* in pork and chicken meats in Italy. *J Food Prot*, 2010. 73(10): p. 1785-92.
14. Van Damme, I., et al., Evaluation of the ISO 10273:2003 method for the isolation of human pathogenic *Yersinia enterocolitica* from pig carcasses and minced meat. *Food Microbiol*, 2013. 36(2): p. 170-5.
15. Messelhäuser, U., et al., Qualitative and quantitative detection of human pathogenic *Yersinia enterocolitica* in different food matrices at retail level in Bavaria. *Foodborne Pathog Dis*, 2011. 8(1): p. 39-44.

Frisk fisk



Sunne dyr



Trygg mat



Faglig ambisiøs, fremtidsrettet og samspillende - for én helse!



Veterinærinstituttet
Norwegian Veterinary Institute

Oslo

Trondheim

Sandnes

Bergen

Harstad

Tromsø

postmottak@vetinst.no
www.vetinst.no