

Forekomsten av *E.coli* O157 ("hamburgerbakterien") hos storfe i Telemark og i kjøttdeig fra Trøndelag

Undersøkt med automatisk immunomagnetisk separasjon
ELISA teknikk (AIMS-ELISA)

**Olav Rosef, Jon Djupvik dy, Marte Bratsvedal,
Helle Vold og Mona Yri**

**Avdeling for allmenne fag
Institutt for natur- helse- og miljøvern fag, Bø**

HiT skrift nr 1/2003

ISBN 82-7206-201-1 (trykt)
ISBN 82-7206-203-8 (online)
ISSN 1501-8539 (trykt)
ISSN 1503-3767 (online)

Høgskolen i Telemark
Postboks 203
3901 Porsgrunn
Telefon 35 57 50 00
Telefaks 35 57 50 01
<http://www.hit.no/>

Trykk: Kopisenteret. HiT-Bø

© Forfatterne/Høgskolen i Telemark

Det må ikke kopieres fra rapporten i strid med åndsverkloven og fotografiloven, eller i strid med avtaler om kopiering inngått med KOPINOR, interesseorganisasjon for rettighetshavere til åndsverk

Nøkkelord: E.coli O157, storfe, kjøttdeig, påvisning, AIMS-ELISA, VIP EHEC

English summary

Summary

The prevalence of *E.coli* O157 in feces from cattle in Telemark and minced meat from Trøndelag.

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) have been focused on during the last decade as important enteric pathogens due to their potential to induce serious illnesses in humans.

The predominant pathogenic serotype O157:H7. EHEC has a very low infectious dose and can infect humans via contaminated foods, water or via the faecal-oral route from other humans or animals.

In the district of Eastern Telemark, Norway, 109 animals from 21 herds were studied for the occurrence of *E. coli* O157 and 410 samples of faeces were analysed from January through August 2001. Meat-producing herds, milk-producing herds and one mixed herd were investigated. One strain of *E. coli* O157 was isolated by the use of Automated Immuno Magnetic Separation-Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (AIMS - ELISA) technique. This strain was isolated in January and was a sorbitolpositive, non-toxin producing, *eae*- and *hly*-negative *E. coli* O157. The isolate originated from a three-year-old milk-producing cow. A total of 243 samples of minced meat were collected from March to October 2001 in Trøndelag and analysed. *E. coli* O157 was not detected. Petrifilm as described in NMKL 147 was used in parallel to test the hygienic condition of the minced meat. None of the samples showed high values of coliform bacteria (<5000/g).

Two methods for detecting EHEC, VIP EHEC and AIMS – ELISA, were tested by the use of inoculated samples. Nineteen faeces samples were spiked with approximately 130 cfu *E. coli* O157:H7 Δ *stx*₂::*cat* and incubated at 37 °C for 24 hours. VIP EHEC detected the bacteria in samples while AIMS - ELISA detected the bacteria in 7 (37%). Corresponding

figures for minced meat inoculated with approximately 490 cfu were 18 of 19 samples (95%) with VIP EHEC and 10 out of 19 (53%) with AIMS-ELISA.

Sammendrag

AIMS-ELISA (Automated Immunomagnetic Separation-Enzyme Linked Immunosorbent Assay) (Dynals BeadRetriver) ble anvendt for å isolere *Escherichia coli* O157 i storfe fra østre del av Telemark og i kjøttdeigsprøver fra Trøndelagsområdet. Det ble undersøkt 410 fecesprøver som representerte 109 dyr fra 21 besetninger hvor det ble tatt prøver fra fire til fem dyr i hver besetning med seks ukers mellomrom fra januar til august 2001.

En stamme av *E. coli* O157 ble isolert fra faeces. Denne var sorbitolpositiv, ikke-toksinproduserende, *eae*- og *hly*-negativ og ble påvist fra en tre år gammel melkeku i januar.

I perioden mars til oktober 2001 ble 243 kjøttdeigprøver undersøkt. Det ble ikke påvist *E. coli* O157. Petrifilm som beskrevet i NMKL nr 147 ble brukt parallelt for å påvise forekomsten av koliforme bakterier og *E. coli* som uttrykk for den hygieniske standarden. Antall koliforme bakterier var under grenseverdiene fastsatt av SNTs (Statens næringsmiddeltilsyn) i mikrobiologiske retningslinjer, mens tre av prøvene hadde for høye verdier *E.coli*.

To ulike metoder for påvisning av *E. coli* O157:H7, VIP EHEC og AIMS-ELISA er sammenlignet. 19 kjøttdeigprøver ble inokulert med ca. 490 cfu. *E. coli* O157:H7 Δ *stx*₂::*cat* og inkubert ved 37 °C i 24 timer. VIP EHEC detekterte bakterien i 18 prøvene (95 %), mens AIMS-ELISA *E. coli* O157 detekterte den i 10 (53%).

Videre ble 19 fecesprøver inokulert med ca 130 cfu *E. coli* O157:H7 Δ *stx*₂::*cat* og inkubert ved 37 °C i 24 timer. VIP EHEC detekterte bakterien i alle 19 prøver (100%), mens AIMS - ELISA *E. coli* O157 detekterte den i syv (37%).

Innledning

Escherichia coli (*E. coli*) O157:H7 er med sin lave infektive dose og sitt sykdomsbilde en av de mest alvorlige næringsmiddelbårne sykdommene. *E. coli* O157:H7 ble først i 1982 kjent som en matbåren human patogen, da den ble assosiert med to utbrudd med blodig diaré. Utbruddene fant sted i Oregon og Michigan i USA, og var forbundet med konsum av dårlig stekte hamburgere fra en fast-food kjede (Riley *et al.*, 1983). Bakterien er derfor blitt kalt "hamburgerbakterien".

E. coli opptrer i forskjellige former som varierer fra ufarlige tarmbakterier til svært patogene bakterier som kan forårsake alvorlig sykdom og død hos menneske (Vold, 2000, Griffin, 1995). Bakteriene i den siste kategorien kalles enterohemorragiske *E. coli*, (EHEC), og kjennetegnes ved at de gir blodig diaré hos menneske (Doyle *et al.*, 1997). EHEC har evnen til både å feste seg og kolonisere tarmepitelet i tykktarmen hos menneske, og de kan produsere flere forskjellige cytotoksiner. Det er to såkalte verotoksiner (VT), VT1 og VT2, som kan føre til hemolytisk uremisk syndrom (HUS) eller trombotisk trombocytopenisk purpura (TTP), eventuelt med døden som følge, særlig hos små barn under 5 år, og hos eldre (Booth *et al.*, 1999, Griffin og Tauxe, 1991).

Sykdom forårsaket av *E. coli* O157:H7 er et økende problem i en rekke land, og det er også her i landet iverksatt overvåkningsprogrammer for bakterien selv om den foreløpig ikke er noe stort problem. Norge er med i et europeisk kartleggings- og overvåkingsprogram (A European study on animal, food and biomedical aspects of verotoxigenic *E. coli* including serotype O157:H7, an emerging pathogen (CT98-3935)) (Matnyttig, 1999).

I Norge har vi til nå vært spart for store sykdomsutbrudd forårsaket av denne bakterien mens det i våre naboland Sverige og Finland har vært flere utbrudd. Sverige har en årsinsidens på ca. det tidobbelte av det som meldes til Meldingssystem for smittsomme sykdommer (MSIS) (Hasseltvedt *et al.*, 2001). Det ble i år 2000 meldt syv tilfeller av

(EHEC) til MSIS, hvorav to var non-O157. I 2001 ble det meldt 15 tilfeller av EHEC infeksjoner, hvorav seks skyldtes *E. coli* O157. 11 av de 15 tilfellene skyldtes innenlandssmitte, mot fire av syv i år 2000 (Hasseltvedt *et al.*, 2001). Det reelle antall personer som er syke er sannsynligvis langt høyere enn ti ganger det antall som registreres i MSIS (Folkehelseinstituttet, rapport, 1998). Det er flere forhold som gjør at det er vanskelig å bestemme det reelle antall personer som er syke. På langt nær alle pasienter med akutt gastroenteritt oppsøker lege (anslagsvis under 10%), legene tar ikke alltid prøve til mikrobiologisk undersøkelse (antagelig i under 10% av tilfellene) og laboratoriene klarer ikke alltid å påvise de sykdomsfremkallende mikroorganismene (bare i ca. 10-15% av prøvene).

Storfe regnes i dag som bærer av *E. coli* O157:H7 (Rasmussen og Casey, 2001), og den første rapporterte isoleringen var fra en kalv i Argentina i 1977 (Ørskov *et al.*, 1987).

Bakterien finnes også i andre dyrearter som hjortedyr (Rice *et al.*, 1995; Chapman og Ackroyd, 1997), geit (Synge *et al.*, 1993; Shukla *et al.*, 1995), orangutang (Beutin *et al.*, 1996), og ville fulger (Wallace *et al.*, 1997). *E. coli* O157 har også blitt isolert fra forskjellige dyr og i gårdsmiljø (Vold, 2000).

De vanligste smitteveiene for mennesker er ved inntak av forurenset drikkevann eller mat (Doyle *et al.*, 1997), men smitte kan også skje via badevann (Paunio *et al.*, 1999), kontakt med dyr eller fra person til person (Parry og Palmer, 2000). Kartlegginger i Skottland i 1996, av VTEC O157 (verotoksinproduserende *E. coli*) i forskjellige dyr viser en variasjon i forekomst fra 0,28 til 9,5%. Undersøkelser utført i England og Wales i 1998 av feces fra storfe viste en forekomst på 0,83% med høyest forekomst i yngre kyr. I en studie i Skottland ble det påvist at 0,4% av kalvene som var yngre enn to måneder skilte ut *E. coli* O157 i feces. I ungdirene, som var i en alder fra to måneder til to år, var forekomsten på

0,12%, mens de ikke ble påvist hos voksne dyr. En lignende studie fra USA viste en forekomst på 0,2% hos de voksne og 0,65% hos de avvente kalvene (Synge, 1999).

I Sverige og Danmark er forekomsten av *E. coli* O157 i storfe på rundt 1% (Ivar Vågsholm, pers. med.), og en undersøkelse gjennomført i Finland i 1997 viser en forekomst i storfe på 1,31% (Lahti *et al.*, 2001).

Undersøkelser i Norge har vist en svært lav forekomst av *E. coli* O157 i feces fra storfe. I 1995 ble bakterien påvist i seks av 1970 avføringsprøver (0,3%) fra melkefe-besetninger (Vold *et al.*, 1998). I 1998 og 1999 ble avføringsprøver fra henholdsvis 2617 og 2497 melkekyr undersøkt ved veterinærinstituttene i Harstad og Trondheim. *E. coli* O157 ble påvist i en samleprøve fra tre dyr i 1998, mens den i 1999 ikke ble påvist. (Bruheim og Fredriksen, 2000). En studie fra 1996 på importert kjøttfe viser vesentlig høyere forekomst. Bakterien ble påvist i 19 av 504 avføringsprøver (3,8%) (Vold *et al.*, 2001). I 2000 ble forøvrig 1435 kjøttfe undersøkt uten at *E. coli* O157 ble påvist (Bruheim og Fredriksen, 2000).

Hensikten med denne undersøkelsen er å gi en oversikt over forekomst av *E. coli* O157 hos storfe i østre del av Telemark. Videre er hensikten å gi en oversikt over forekomsten av *E. coli* O157:H7 i kjøttdeig fra et utvalgt område hvor analysetidspunktene var spredt over tid for å påvise eventuelle sesongvariasjoner.

Vi ville og bruke en ny automatisert ELISA - metode basert på immunomagnetisk separasjon med paramagnetiske kuler for oppkonsentrasjon og detektering.

For å kunne vurdere en eventuell sammenheng mellom forekomst av *E. coli* O157:H7 og hygieniske forhold i kjøttdeig, ble kjøttdeigen undersøkt for koliforme bakterier og *E. coli*. Videre er påvisningsmetodene AIMS-ELISA og VIP EHEC sammenlignet for å finne eventuelle forskjeller i deteksjonen.

Material og metode

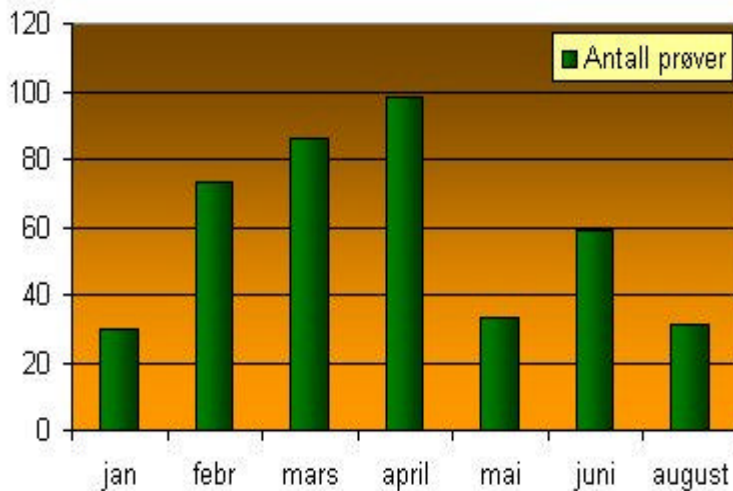
Besetningene som er undersøkt ble tilfeldig valgt ut i kommunene Bø, Nome, Seljord, Notodden, Sauherad, Kviteseid og Hjartdal. Disse ble valgt fordi det var mulig å gjennomføre innsamling og analysering av fecesprøvene samme dag og derved unngå nedfrysing av prøvene. I alt ble 21 besetninger undersøkt. Fra hver av disse ble det valgt ut fem dyr som ble fulgt fra januar til august 2001. Utvalget ble gjort ved at de fem første dyrene som gjorde ifra seg under første prøvetaking, ble fulgt gjennom hele undersøkelsesperioden. Avføringsprøver ble tatt av de utvalgte dyrene fire til fem ganger med seks ukers mellomrom. Til sammen ble 410 avføringsprøver fra 109 dyr undersøkt. Prøvene ble oppbevart i kjølebag under transport og i kjøleskap til analysene startet innen 24 timer etter uttak.

Antall besetninger og kyr som var med i undersøkelsen.

Besetning	Antall besetninger	Antall kyr	Antall importerte kyr	Antall kyr	Antall kviger	Antall okser
Kjøttbesetninger	4	21	0	14	5	2
Melkebesetninger	16	83	0	74	9	0
Blandingsbesetninger	1	5	0	5	0	0

Fordelingen av antall fecesprøver i analyseperioden er vist under.

Antall prøver fordelt etter måned



Kjøttdeigen som ble undersøkt kom fra Trøndelagsområdet. I en periode på syv mnd. ble det en gang i uka tilsendt prøver fra SPIS nedskjæringsbedrift, avdeling Gjøvik. I denne perioden ble det hver gang tatt ut 10 pakker á 400 gram med kjøttdeig. Prøvene ble vilkårlig plukket ut av personer i produksjonen slik at lotnummer og tid for pakking varierte. Det ble totalt undersøkt 243 prøver. Analysene ble gjennomført samme dag som de ble mottatt.

AIMS – ELISA med Dynal Beadretriever™ ble benyttet for å isolere *E. coli* O157. De 60 første prøvene fra feces ble oppformert med 225 ml modifisert tryptosesoyabuljong med novobiocin, mTSB + n, (Prod.: Merck, forh.: VWR international, best.nr 1.09205.) med 25 g storfefeces og inkubert ved $42 \pm 1^\circ\text{C}$ i 24 ± 2 timer. De resterende 350 prøvene ble oppformert ved at 225 ml bufret peptonvann (Prod.: Merck, forh.: VWR international, best.nr. 1.07228.) og 25 g storfefeces ble inkubert ved $37 \pm 1^\circ\text{C}$ i 24 ± 2 timer.

Analysene av kjøttdeig fulgte sistnevnte prosedyre med 25 g kjøttdeig til 225 ml bufret peptonvann stomackert i 30 sekunder og inkubert ved $37 \pm 1^\circ\text{C}$ i 24 ± 2 timer.

Etter oppformering ble *E. coli* O157 fanget opp ved hjelp av AIMS - ELISA

(Beadretriever™, Appendix 4; User Protocols, January 2001).

Før hver prøveanalyse ble Dynal Beadretriever™ desinfisert med et papir dynket i 70% etanol.

I sensitivitetstesten ble det brukt tint kjøttdeig fra nedskjæringsbedriften og tint storfececes fra gårder i østre del av Telemark som ikke inneholdt *E. coli* O157. Prøvene ble sådd ut som beskrevet i Dynals protokoll, og Beadretriever instrumentet gjennomførte automatisk AIMS- ELISA i løpet av 69 minutter.

Absorbansen på 100 µl løsning fra ELISA brønn 5 ble målt ved 405 nm. Dersom A405 > 0,45 er prøven presumptivt positiv og det ble dyrket på kromagar (Prod.: CHROMagar microbiology, forh.: Dynal a/s, best.nr. EE220) og sorbitol MacConkey - agar med cefixime og kaliumtelluritt, (CT - SMAC) (SMAC - agar: prod.: Merck, forh.: VWR international, best.nr. 1.09207. med CT supplement: prod.: Merck, forh.: VWR international, best.nr. 1.09202.0001). 100 µl av de oppslemmede paramagnetiske kulene ble overført til agarplatene. Prøven ble strøket ut med bomullssvaber (swab-streak-technique). Referansestammen (*E. coli* O157:H7 Δ stx₂::cat) ble dyrket parallelt for å kontrollere at agarene fungerer og som en referanse på sorbitolnegative kolonier.

Presumptive *E. coli* O157 ble testet for agglutinasjon med anti-O157 paramagnetiske kuler og med anti-O157-serum, OK O157 (Prod.: Statens Serum Institut, forh.: Statens Serum Institut, best.nr.: 15525). Både sorbitolpositive og sorbitolnegative kolonier ble testet.

Isolatene ble og testet for auto-agglutinerings i fysiologisk saltvann (9 g NaCl/l). For å kontrollere at prøven ikke var forurenset av referansestammen, ble mistenkelige isolater dyrket på Müeller Hinton agar, tilsatt 30 µg kloramfenikol per ml. agar, fordi referansestammen er kloramfenikolresistent.

Petrifilm for *E. coli* og koliforme bakterie er et kommersielt tilgjengelig dyrkningsmedium som er klar til bruk. 25 gram kjøtt og 225 ml bufret peptonvann ble overført til stomacherpose og homogenisert i 30 sek. Filmen avleses første gang etter 24 ± 2 timer. *E. coli* bakterier danner blå kolonier med og uten gass og avleses etter 48 timer. (NMKL 147.1993).

Metoden VIP EHEC (Prod.: Biocontrol) er en immunologisk deteksjonsmetode som kan påvise *E. coli* O157 direkte etter ti minutter, og AIMS-ELISA *E. coli* O157 (Prod: Dynal) ble sammenlignet for påvisning av *E. coli* O157. Dette ble gjort med bruk av referansestammen *E. coli* O157:H7 $\Delta stx_2::cat$ og inokulert i feces- og kjøttdeigprøver. Gjentatte tester ble gjort for å finne passe bakteriemengde til inokulering. På bakgrunn av disse testene ble det bestemt å bruke ulike inokuleringsmengder 490 cfu i kjøttdeig og 130 cfu i feces.

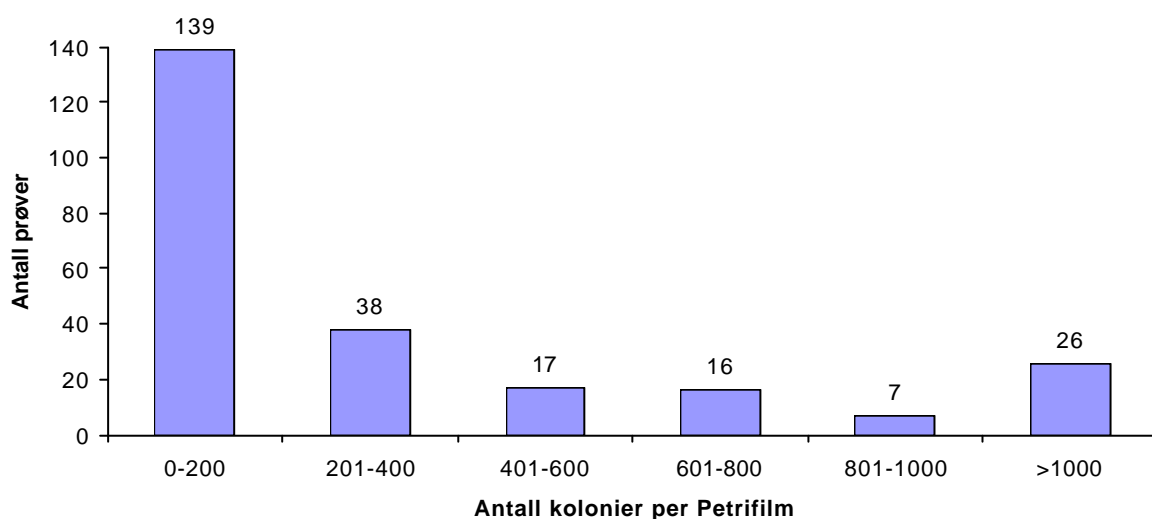
Det ble det overført ca 490 cfu til 19 kjøttdeigprøver à 25g med 225 ml bufret peptonvann og 19 kjøttdeigprøver med 225 ml mTSB + n. Det ble brukt to ulike oppformeringsmedium da metodene hadde forskjellige krav til medium. For test på VIP EHEC ble det oppformert i mTSB + n, mens en for AIMS-ELISA brukte bufret peptonvann. Negative kontroller ble brukt. Prøvene ble stomachert og inkubert ved $37 \pm 1^\circ\text{C}$ i 24 ± 2 timer med uttesting av de ulike påvisningsmetodene. Samme prosedyre med 130 cfu fra feces ble utført.

Resultater

Av de 410 fecesprøvene som ble analysert, ble det isolert en stamme av *E. coli* O157 i perioden fra januar til august 2001 (0,25%). Stammen som ble isolert i januar fra en melkeku født i 1998 er verifisert å være en sorbitolpositiv, ikke-toksinproduserende, *eae*- og *hly*-negativ *E. coli* O157 (Yngvild Wasteson, pers. med.).

Det ble ikke påvist *E. coli* O157 i de 243 kjøttdeigprøvene.

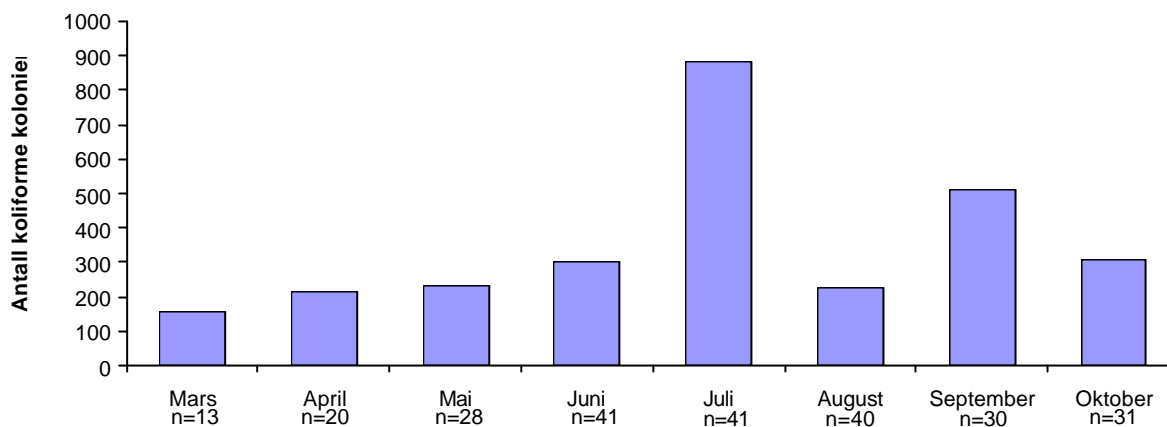
Fordelingen av koliforme bakterier på Petrifilm er vist i Figur 1 mens fordelingen av koliforme bakterier i undersøkelsesperioden er vist i Figur 2.



Figur 1. Koliforme bakterier dyrket på Petrifilm.

Resultatene av sammenligningen mellom AIMS-ELISA og VIP-EHEC er vist i Tabell 1.

VIP-EHEC var den mest sensitive påvisningsmetoden.



Figur 2. Fordeling av koliforme bakterier i undersøkelsesperioden.

Tabell 1.

Sammenligning av påvisningsmetoder for *E. coli* O157 med inokulerte prøver.

<i>Metode</i>	<i>Kjøttdeig</i>		<i>Feces</i>	
	Positiv	Negativ	Positiv	Negativ
VIP EHEC	18	1	19	0
AIMS-ELISA	10	9	7	12

Positiv = *E. coli* O157 påvist. Negativ = *E. coli* O157 ikke påvist.

Diskusjon

E. coli O157 ble isolert fra en av 410 fecesprøver (0,25%) fra storfe. Dette er i samsvar med andre norske undersøkelser (Bruheim og Fredriksen, 2000; Vold *et al.*, 1998) som indikerer at forekomsten av *E. coli* O157 i storfe i Norge er lav. Det er imidlertid vanskelig å sammenligne resultatene fra forskjellige prevalensstudier på grunn av forskjellige metodevalg og utvalget av storfe studiene bygger på. En av grunnene til at forekomsten av *E. coli* O157 i Norge er såpass lav kan være at norske gårder generelt sett er små og spredd ut over et stort geografisk område med til dels store avstander mellom dem. Et annet forhold er den restriktive praksis en tidligere har hatt ved import av levende dyr og animalske produkter. En undersøkelse gjort på kjøttfe på slutten av 90-tallet viste at forekomsten av *E. coli* O157 var høyere hos importerte enn hos ikke-importerte dyr (Vold, 2000). Etter at EØS-avtalen var inngått ble importreglene endret slik at det ble lettere å importere levende dyr. Om dette kan ha økt smittepresset på storfe i Norge er usikkert, men ikke usannsynlig.

E. coli O157 ble isolert en gang i feces fra en melkeku i januar 2001. I prøver tatt av samme ku og av fire andre kyr i samme besetning i mars, april og juni ble bakterien ikke påvist. Dette kan i likhet med andre undersøkelser (Hancock *et al.*, 1997; Hinton *et al.*, 1985) tyde på at *E. coli* O157 enten ikke klarer å overleve over lengre tid eller at bakterien går inn i lengre hvilefaser (viable but not culturable) i storfetarmen. Disse undersøkelsene viser at *E. coli* O157 blir utskilt uregelmessig og bare i korte perioder fra storfetarmen (Hancock *et al.*, 1997; Hinton *et al.*, 1985).

I besetningen hvor *E. coli* O157 ble isolert, står dyrene på bås og sjansen for fekal-oral smitte er trolig mindre enn ved løsdrift. Dette kan og være en av grunnene til at bakterien ikke ble isolert flere ganger fra andre dyr. Hvordan den ene kua ble infisert med *E. coli* O157 er det vanskelig å gi noen forklaring på. Fekal utskilling av EHEC fra kyr øker om

sommeren. Årsakene til denne sesongrelaterte variasjonen er ikke kjent, men det er blitt foreslått at klimatiske faktorer spiller en rolle (Vold, 2000). Undersøkelser gjort i USA viser at det er flere tilfeller av human EHEC-infeksjon i sommermånedene enn ellers i året (Doyle *et al.*, 1997). Andre undersøkelser viser derimot at sorbitolpositiv *E. coli* O157:H- blir isolert hyppigst i vinterhalvåret (Karch og Kohler, 1999). Stammen av *E. coli* O157 som ble isolert i foreliggende undersøkelse var sorbitolpositiv, ble isolert i januar, men manglet *eae*- (attaching and effacing genes) og *hly*- (hemolysin) gener i tillegg til gener for toksinproduksjon. Det finnes imidlertid sorbitolpositive varianter som er humanpatogene (Karch og Bielaszewska, 2001). I foreliggende undersøkelse ble det tatt færre fecesprøver om sommeren enn om vinteren og våren fordi det var vanskelig å ta prøver av dyrene i beitesesongen. Noen få bønder hadde dyrene sine tilgjengelig deler av, eller hele sommeren. Disse dyrene ble det tatt prøver av i motsetning til de som gikk på beite hvor kyrne var utenfor bondens tilgjengelighet. Dette gjorde det vanskelig å avdekke eventuelle sesongvariasjoner.

Statens næringsmiddeltilsyn iverksatte i 1998 et overvåkningsprogram for bakterien blant annet pga. opphør av grensekontrollen. Ett av målene var å få informasjon om smittepotensialet for storfeprodukter. Det er til nå undersøkt over 10 000 prøver av storfe og ca. 2500 prøver av småfe. Det ble påvist *E. coli* O157:H7 i henholdsvis 3 (0,03%) storfe og 2 sau (0,05%). Forekomsten er lav, noe våre undersøkelser også viser, men overvåkningsprogrammet fortsetter som følge av alvorlighetsgraden ved smitte (SNT nytt, 08.09.2002).

Det ble det ikke påvist *E. coli* O157 i de 243 kjøttdeigprøvene som ble analysert.

Deteksjonsmetoden som er brukt for påvisning er AIMS-ELISA med bruk av Dynals BeadRetrieverTM. Metoden er ikke en offisiell metode og var under utvikling da undersøkelsen pågikk. En av grunnene til at AIMS-ELISA ble valgt, var at metoden

minsker kontamineringsrisikoen ved at testen foregår automatisk i en lukket maskin. I tillegg var hurtighet for påvisning av betydning. I tilfelle kontaminering med bakterien vil det være viktig å få hurtig svar på prøvene, slik at nødvendige tiltak kan settes i gang for å hindre videre spredning. AIMS-ELISA krever oppformering i 24 timer og maskinen bruker bare 69 min på deteksjonsprogrammet AIMS-ELISA som påviser presumptive *E. coli* O157 ett døgn raskere enn metoden beskrevet i NMKL 164. En annen fordel med AIMS-ELISA er at den kan isolere *E. coli* O157 stammer uavhengig av om stammen er sorbitolpositiv eller sorbitolnegativ. Dermed er man ikke avhengig av subjektive vurderinger av kolonifarge og morfologi på agarplatene, og man kan isolere stammer som avviker fra det normale biokjemiske mønsteret. Dersom man benytter NMKL-metoden og velger en agar som skiller mellom sorbitolpositive og sorbitolnegative, i tillegg til den selektive agaren CT-SMAC, vil man forkaste de sorbitolpositive *E. coli* O157 (Vold og Djupvik, 2002). Noen Shiga toksin produserende *E. coli* (STEC) er sensitive for tellurite og/eller fermenterer sorbitol, og det anbefales derfor å bruke en kromogen agar i tillegg (De Boer og Heuvelink, 2000).

Da AIMS-ELISA metoden ikke er kommersielt tilgjengelig og var under utvikling da undersøkelsene pågikk ble det gjort et bytte av oppformeringsbuljong ved analyse av feces. De 60 første prøvene ble oppformert i mTSB + n, mens de resterende 350 prøvene ble oppformert i bufret peptonvann etter leverandørens anbefaling (Dynal a/s). Den sorbitolpositive *E. coli* O157 som ble detektert i denne undersøkelsen ble isolert fra en prøve oppformert i mTSB + n. Valg av oppformeringsmedium kan være av betydning mht. deteksjon. Det er nødvendig med sensitive metoder siden bakterien ofte bare forekommer i lave konsentrasjoner. *E. coli* O157:H7 er EHEC-serotypen som er enklest å isolere fra pasienter, siden de fleste påvisningsmetodene for EHEC er rettet mot denne bakterien. Shigatoksinproduksjon er en essensiell patogenitetsfaktor hos alle EHEC. Nyere

påvisningsmetodikk tar derfor utgangspunkt i påvisning av Shigatoksin/Shigatoksingener slik at non-O157 EHEC kan detekteres på lik linje med O157. Det er registrert infeksjoner av non-O157 EHEC. Av de 63 tilfellene meldt til MSIS fra 1992-2001 var fire EHEC O26, tre O145, en O128, en O130, en O103 og en O113 (Hasseltvedt *et al.*, 1999; Lassen og Hasseltvedt, 2000, Vold og Nygård, 2002). Forbedring av deteksjonsmetoder for non-O157 EHEC vil trolig føre til en økning av isolater av denne typen. Dette bekreftes gjennom registrerte EHEC-tilfeller hvor det har vært en økning i påvisning av non-O157 de siste årene (Hasseltvedt *et al.*, 2001). Andre toksin-produserende serotyper kan også gi tilsvarende sykdom, men det er *E. coli* O157:H7 som vi per i dag har gode analysemetoder for i næringsmidler og feces (Vold, 2000). Kommersielt tilgjengelige analysemetoder for andre serogrupper; O26, O111, O103 og O145, har nylig blitt lanserte, men er enda ikke godt utprøvde.

Vi sammenlignet to påvisningsmetoder; AIMS-ELISA og VIP EHEC. Det var i forkant utført et pilotstudium for å finne en nedre bakteriegrense som ga muligheter til å skille metodene. Den inokulerte bakteriemengde var 490 cfu i kjøttdeig og 130 cfu i feces. Referansestammen *E. coli* O157:H7 Δ *stx*₂::*cat* ble brukt til å inokulere prøvene. VIP EHEC påviste *E. coli* i 18 (95 %) kjøttdeigprøver og i 19 (100 %) fecesprøver. AIMS-ELISA ga henholdsvis 10 (53 %) og 7 (37 %) påvisning (Tabell 1). Forskjellen mellom metodene tyder på at VIP EHEC er en mer sensitiv metode enn AIMS-ELISA. En annen grunn til forskjellene kan være bruk av ulike oppformeringsmedier. VIP EHEC krever m-TSB + n, mens det til AIMS-ELISA ble brukt BPW. Det er usikkert hva som er årsaken til denne ulikheten, men fettinnholdet i kjøttdeig kan være av betydning. Dersom det er slik at fett minsker kulenes magnetiske evne og sjansen for binding til bakterier, vil ikke samme bakteriefortynning i kjøttdeig og storfe feces gi like resultater. Ved høy bakteriefortynning vil trolig ikke de få bakteriene som er tilstede i kjøttdeig detekteres. Man vil da finne færre

bakterier i kjøttdeig enn i storfefeces ved samme fortykning. En undersøkelse har vist at deteksjon av O103 (STEC) i sau er lettere med AIMS-ELISA enn med AIMS. AIMS detekterte *E. coli* O103 i 36,5% av prøvene og AIMS-ELISA detekterte bakterien i 52,1% av prøvene (Urdahl *et al.*, 2002). Det finnes påvisningsmetoder som er mer sensitive enn hurtigmetodene, men disse er dyrere og krever mer spesialutstyr (Chapman *et al.*, 2001). Slakteprosessen er viktig når det gjelder hygiene og kontaminering av kjøttet da *E. coli* O157 har sitt reservoar i storfetarmen. Fjerning av innvoller er derfor en kritisk fase i slakteprosessen, da det er viktig å fjerne disse uten å kontaminere kjøttet med tarminnhold. Det kan forventes økt kontamineringsrisiko ved dårlig hygiene og slakteprosedyrer. En kan derfor anta at dårlige hygieniske forhold vil øke sannsynligheten for å påvise *E. coli* O157 i kjøttprodukter. Det ble derfor utført hygienisk kontroll av kjøttdeigen med bruk av Petrifilm. Ingen av de 243 prøvene oversteg de mikrobiologiske grenseverdiene for koliforme bakterier, og bare 3 prøver hadde for høye *E. coli*-verdier (SNT, Mikrobiologiske retningslinjer, 2002). Juli måned skilte seg klart ut med et gjennomsnitt på 881 koliforme bakterier per gram mens mars måned hadde det laveste gjennomsnittet med 155 kolonier (Fig 2.). Uhygieniske forhold ved slakteri og nedskjæringsbedrift ville trolig resultert i større antall koliforme- og *E. coli* bakterier. Tallene indikerer derfor at de hygieniske forholdene er tilfredsstillende og risiko for kontaminering med *E. coli* O157 er liten.

Referanser

Beutin L, G Knollmannschanbacher, W Rietschel, Seeger H.

Animal reservoirs of *Escherichia coli* O157:H7. 1996, Vet. Rec. 139:70-71.

Booth IR, Thomson-Carter F, Carter P, Jordan S, Park S, Malcolm L, Glover J.

Acid Tolerance of *Escherichia coli* – the Sting inn the Tail?

in **Stewart CS and Flint HJ.** *Escherichia coli* O157 in Farm Animals.

1999, CABI Publishing UK: 27-38. ISBN 0 85199 332 X.

Bruheim T, Fredriksen B.

Overvåkings- og kontrollprogrammet for enterohemoragisk *Escherichia coli* (EHEC) i Norge 2000. Veterinærinstituttet, Oslo.

Chapman PA, Ackroyd HJ.

Farmed deer as a potential source of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157. 1997, Vet. Rec. 141:314-315.

Chapman PA, M Ellin, Ashton R.

A comparison of immunomagnetic separation and culture, Reveal and VIP for the detection of *E. coli* O157 in enrichment cultures of naturally-cotaminated raw beef, lamb and mixed meat products. 2001, Lett. Appl. Microbiol. 32(3):171-175.

De Boer E, Heuvelink AE.

Methods for the detection and isolation of Shiga toxinproducing *Escherichia coli*. 2000, Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol. 29:133S-143S.

Doyle MP, Zhao T, Meng J, Zhao S.

Food Microbiology - Fundamentals and Frontiers.

1997, American Society for Microbiology: 171-187.

ISBN 1-55581-117-5.

Folkehelseinstituttet, rapport 1998.

Miljø og helse- en forskningsbasert kunnskapsbase. Rapport fra folkehelse.
09.01.1998. Sykdomsfremkallende mikroorganismer i næringsmidler. B.6.11:157-163. ISBN: 82-7364-127-9.

Griffin PM.

Escherichia coli O157:H7 and other enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. In: Infections of gastrointestinal tract. Blaser MJ, JI Smith, HB Ravdin, HB Greenberg and RL Guerrant (eds). 1995, Raven Press, New York, pp. 121-145.

Griffin PM, RV Tauxe

The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157 : H7, other enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, and the associated haemolytic uraemic syndrome. 1991, *Epidem. Rev.* 13:60-98.

Hancock DD, Besser TE, Rice DH, Herriott DE, Tarr PI.

A longitudinal study of *Escherichia coli* O157 in fourteen cattle herds.
1997, *Epidemiol. Infect.* 118:193-195.

Hasseltvedt V, Lassen J, Kapperud G, Kuusi M.

EHEC-infeksjoner i Norge 1998- 30.9.99.
1999, MSIS-rapport, ukenr. 43.

Hasseltvedt V, Lassen J, Kapperud G, Stavnes T-L.

Sykdom forårsaket av enterohemoragisk *E. coli* (EHEC) i Norge 2000.
2001, MSIS-rapport, ukenr.7.

Hinton M, Linton AH, Hedges AJ.

The ecology of *Escherichia coli* in calves reared as dairy-cow replacements.
1985, *J. Appl. Bacteriol.* 58:131-138.

Karch H, Bielaszewska M.

Sorbitol-fermenting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H(-) strains: epidemiology, phenotypic and molecular characteristics, and microbiological diagnosis. Review. 2001, J. Clin. Microbiol. 39(6):2043-2049.

Karch H, Kohler B.

New knowledge of the molecular biology of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157. 1999, Gesundheitswesen. 61(1):46-51.

Lahti E, Keskimäki M, Rantala L, Hyvönen P, Siitonen A, Honkanen-Buzalski T.

Occurrence of *Escherichia coli* O157 in Finnish cattle.
2001, Vet. Microbiol. 79(3):239-251.

Lassen J, Hasseltvedt V.

Norske tilfeller av EHEC-sykdom og hemolytisk uremisk syndrom (HUS).
2000, MSIS-rapport, ukenr. 31.

Matnyttig. Nr. 6. 1999.

<http://www.matforsk.no/web/wpubl.nsf/4a149612062882bcc125666e00409df6/d0b85bb08ff4bb0cc125679e0040369d?OpenDocument>

NMKL nr. 164, 1999, Nordisk Metodikkomité For Næringsmidler.

Escherichia coli O157. Påvisning i levnedsmidler og foder.
National Veterinary Institute, PO Box 8156 Dep.,
N-0033 OSLO.

Parry SM, Palmer SR.

The public health significance of VTEC O157.
2000, Symposium series (Society for Applied Microbiology). (29):1S-9S.

Paunio M, Pebody R, Keskimäki M, Kokki M, Ruutu P, Oinonen S, Vuotari V, Siitonen A, Lahti E, Leinikki P.

Swimming-associated outbreak of *Escherichia coli* O157:H7.
1999, Epidemiol. Infection. 122(1):1-5.

Rasmussen MA, Casey TA.

Environmental and food safety aspects of *Escherichia coli* O157:H7 infections in cattle. 2001, *Critical Reviews in Microbiology*. 27(2):57-73.

Rice DH, DD Hancock, Besser TE.

Verotoxigenic *E. coli* O157 colonisation of wild deer and range cattle. 1995, *Vet. Rec.* 137:524.

Riley LW, RS Remis, SD Helgerson, HB McGee, JG Wells, BR Davis, RJ Hebert, ES Olcott, LM Johnson, NT Hargrett, PA Blake, Cohen ML.

Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. 1983, *N. Engl. J. Med.* 308:681-685.

Shukla R, R Slack, A George, T Cheasty, B Rowe, Scutter J.

Escherichia coli O157 infection associated with a farm visitor centre. 1995, *Commun. Dis. Rep. Review* 5: R86-R90

SNT nytt 08.09. 2002.

<http://www.snt.no/nytt/ferskvare/notis.html/652.html>

Funn av ” hamburgerbakterien ” i Møre og Romsdal, 08.09.2002.

SNT. Mikrobiologiske retningslinjer. Tabellar. 2002.

<http://www.snt.no/dokumentasjon/veiledere/mikro/tab3.pdf>

Synge, BA.

Animal studies in Scotland in **Stewart CS and Flint HJ.**

Escherichia coli O157 in Farm Animals. 1999, CABI Publishing UK: 27-38.

ISBN 0 85199 332 X.

Synge BA, GF Hopkings, WJ Reilly, Sharp JCM.

Possible link between cattle and *Escherichia coli* O157 infection in a human. 1993, *Vet. Rec.* 133:507.

Urdal AM, K Cudjoe, E Wahl, E Heir, Wasteson Y.

Isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O103 from sheep using automated immunomagnetic separation (AIMS) and AIMS-ELISA: sheep as the source of a clinical *E. coli* O103 case? 2002, Lett. Appl. Microbiol. 35:218-222.

Vold H, Djupvik J.

Escherichia coli O157 som næringsmiddelbåren patogen
-undersøkelse av forekomsten av *E. coli* O157 hos storfe i østre del av Telemark.
2002, Hovedfagsoppgave, Høgskolen i Telemark.

Vold L.

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Norway. Epidemiology
in cattle. Thesis for the degree of *Doctor Medicinae Veterinariae*.
2000, ISBN 82-7725-066-5.

Vold L, Klungseth Johansen B, Kruse H, Skjerve E, Wasteson Y.

Occurrence of shigatoxinogenic *Escherichia coli* O157 in Norwegian cattle herds.
1998, Epidemiol Infect. 120(1):21-28.

Vold L, Nygård K.

EHEC-infeksjoner i Norge 2001. 2002, MSIS-rapport nr 23.

Vold L, Sandberg M, Jarp J, Wasteson Y.

Occurrence and characterization of *Escherichia coli* O157 isolated from cattle in
Norway. 2001, Vet. Res. Comm. 25(1):13-26.

Wallace JS, T Cheasty, Jones K.

Isolation of verocytotoxin producing *Escherichia coli* O157 from wild birds. 1997,
J. Appl. Microbiol. 82:399-404.

Øskov F, I Ørskov, Villar JA.

Cattle as reservoir of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. 1987, Lancet.
ii: 276.