



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

**Masteroppgave 2018 30 stp**

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM)  
Helge Holo

# **Forekomst av Shigatoksinproduserende *Escherichia coli* i norske kjøttvarer, med hovedvekt på *stx*<sub>2a</sub>-genet**

Occurrence of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* in Norwegian meat products, with emphasis on the *stx*<sub>2a</sub>-gene

**Andrea Martine Johansen**

Matvitenskap – Matvaretrygghet, kvalitet og hygiene  
Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap



## Forord

Denne oppgaven var et avsluttende prosjekt i mastergradsstudiet i matvitenskap ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU). Masteroppgaven min ble skrevet ved Veterinærinstituttet i Oslo, ved seksjon for mattrygghet og nye helsetrusler, som en del av et kartleggingsprosjekt på oppdrag fra Mattilsynet.

Jeg vil gjerne takke min veileder ved NMBU, Helge Holo. Jeg vil også rette en spesielt stor takk til mine veiledere ved Veterinærinstituttet, Gro Johannessen og Camilla Sekse, for ubetinget veiledning, tålmodighet og støtte, og ikke minst for at dere har hatt troen på meg hele veien. Deres entusiasme og kunnskap har vært til stor inspirasjon. Dere er fantastiske, og jeg kunne ikke vært mer heldig.

Jeg vil også gi en stor takk til laboratorieingeniørene ved seksjon for mikrobiologi, Marianne Økland, Tone Mathisen Fagereng og Bjørg Kvitle, som alltid har tatt seg tid til å hjelpe meg. Jeg er takknemlig for alt dere har lært meg.

Ole Johan, Kingsley og Håkon; dere har vært mine støttespillere her ved Veterinærinstituttet. Tusen takk for faglige diskusjoner, og ikke minst oppmuntring og hyggelige lunsjtunder.

Jeg vil også takke familie og venner for tålmodighet og støtte gjennom denne tiden.

De siste seks månedene ved Veterinærinstituttet har vært utrolig lærerike og givende. Jeg er glad for at jeg har fått muligheten til å skrive min masteroppgave her hos dere, og for at jeg har fått møte så mange inspirerende mennesker.

Oslo, 11. juli 2018

Andrea Martine Johansen

## Sammendrag

Shigatoksinproduserende *Escherichia coli* (STEC), også kalt Verotoksinproduserende *E. coli* (VTEC) har tilstedeværelse av gener som koder for Shigatoksin (*stx*). Noen STEC har i tillegg det intimin-kodende genet *eae*, og denne kombinasjonen av virulensgener gjør at de kan forårsake alvorlig sykdom som hemorragisk kolitt og hemolytisk uremisk syndrom (HUS) hos mennesker. Ikke alle STEC er humanpatogene, men spesielt Shigatoksin med subtype *stx*<sub>2a</sub> er ofte assosiert med de mest alvorlige sykdomstilfellene. STEC har sitt naturlige reservoar i storfetarm, og smitte til mennesker skjer hovedsakelig ved konsum av fekalt kontaminerte næringsmidler eller kontakt med dyr.

I denne studien skulle forekomsten av patogene STEC, med hovedvekt på *stx*<sub>2a</sub>-genet, undersøkes i norsk storfekjøttdeig. På forhånd hadde 308 kjøttdeigprøver blitt screenet for *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub> og *eae*, samt de O-gruppe assosierte genene for O26, O103, O145 og O157. I denne masteroppgaven ble 71 *stx*<sub>2</sub>-positive prøver inkludert og screenet med PCR for subtype *stx*<sub>2a</sub>. Det ble gjort forsøk på å isolere *stx*<sub>2a</sub>-positive *E. coli* fra PCR-positive prøver, som videre ble karakterisert for å undersøke hvilke virulensgener isolatene bærer. Det ble også gjort forsøk på å isolere *E. coli* som var positive for *stx*- og *eae*-gener, og negative for undersøkte O-grupper i screeningen.

Resultatene i denne studien viste at ni av de 71 prøvene var positive for *stx*<sub>2a</sub>-genet. Ved påfølgende forsøk på isolering, ble *stx*<sub>2a</sub>-positive *E. coli* isolert fra to av ni prøver. Fire *stx*<sub>2a</sub>-positive STEC-isolater fra to ulike kjøttdeigprøver ble karakterisert, og resultatene fra O-gruppe typingen viste at ingen av de vanligste serogruppene assosiert med sykdom hos menneske ble påvist.

Virulenskarakteriseringen viste at de *stx*<sub>2a</sub>-positive STEC isolatene også var *stx*<sub>1a</sub>-positive og *stx*<sub>1c</sub>-, *stx*<sub>1d</sub>- og *eae*-negative. Resultatene fra helgenomsekvenseringen bekreftet for øvrig at dette var tilfellet for de to undersøkte isolatene (en fra hver prøve), i tillegg til at isolatene hadde gener for ulike virulensfaktorer. Helgenomsekvensering avslørte også at isolatene var av serotype O22:H8 og O153/O178:H19.

Resultatene fra denne studien indikerer at forekomsten av *stx*<sub>2a</sub>-positive *E. coli* i norsk kjøttdeig er lav. Det finnes ikke, så vidt vi vet, lignende studier på forekomsten av *stx*<sub>2a</sub> i kjøttdeig eller næringsmidler generelt, slik at sammenlignbare data ikke er tilgjengelig. STEC-isolatene var *stx*<sub>2a</sub> og *stx*<sub>1a</sub> positive, noe som antyder at isolatene kan være humanpatogene. Allikevel ble ingen av de vanligste serogruppene assosiert med sykdom, og heller ikke det intimin-kodende genet *eae* påvist. Isolatene hadde derimot gener for andre potensielle virulensmekanismer. Basert på isolatenes virulensprofil kan man ikke utelukke sannsynligheten for at de kan forårsake sykdom hos mennesker.

## Summary

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC), also known as Verotoxin-producing *E. coli* (VTEC), harbor genes encoding Shiga toxins (*stx*). Some STEC also harbor the intimin-coding gene *eae*, and this combination of virulence genes is highly associated with severe disease in humans, such as hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome (HUS). Not all STEC are pathogenic to humans, but especially Shiga toxin subtype *stx*<sub>2a</sub> is associated with the most severe cases of human infection. STEC has its main reservoir in cattle, and fecal contamination of food products and contact with animals are the main vehicle of transmission.

In this study, the occurrence of pathogenic STEC, with main focus on the *stx*<sub>2a</sub>-gene, was examined in Norwegian minced meat. Previously, 308 minced meat samples were screened for the presence of *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub> and *eae*, as well as the O-serogroup associated genes for O26, O103, O145 and O157. In this thesis, 71 *stx*<sub>2</sub>-positive samples were included and screened by PCR for subtype *stx*<sub>2a</sub>. It was attempted to isolate *stx*<sub>2a</sub>-positive *E. coli* from PCR-positive samples. Further on, *stx*<sub>2a</sub>-positive isolates were characterized to investigate which virulence genes the isolates carry. In addition, *E. coli* positive for *stx*- and *eae*-genes, and negative for the tested O-groups, were attempted isolated.

The results in this study indicated that nine out of 71 of the minced meat samples were positive for the *stx*<sub>2a</sub>-gene. *stx*<sub>2a</sub>-positive STEC were isolated from two out of nine samples. Four *stx*<sub>2a</sub>-positive STEC, from two different minced meat samples, were further characterized, and the typing of O-groups showed that none of the common serogroups involved in human disease were identified. Moreover, determination of virulence genes revealed that the *stx*<sub>2a</sub>-positive STEC isolates were *stx*<sub>1a</sub>-positive and *stx*<sub>1c</sub>-, *stx*<sub>1d</sub>- and *eae*-negative. The whole genome sequencing confirmed the presence of virulence genes for the two examined isolates (one from each samples). In addition, the isolates possessed several other genes encoding different virulence factors. The whole genome sequencing also estimated that the isolates had serotypes O22:H8 and O153/O178:H19.

The results from the present study indicate that the occurrence of *stx*<sub>2a</sub>-positive *E. coli* in Norwegian minced meat is low. To the best of our knowledge, it has not been published similar studies on the prevalence of *stx*<sub>2a</sub> in minced meat or food products, and no comparable data is available. The STEC-isolates were *stx*<sub>2a</sub> and *stx*<sub>1a</sub> positive, indicating that they might be pathogenic to humans. Despite this, none of the most common serogroups associated with human disease, nor the intimin-coding gene *eae* were detected. On the other hand, the isolates did possess genes encoding other virulence mechanisms. Thus, based on the virulence profile, one cannot rule out the possibility that the isolates may cause infection in humans.



## Innholdsfortegnelse

<b>Forord</b> .....	<b>I</b>
<b>Sammendrag</b> .....	<b>II</b>
<b>Summary</b> .....	<b>III</b>
<b>1. Introduksjon</b> .....	<b>1</b>
1.1 <i>Escherichia coli</i> .....	1
1.2 Shigatoksinproduserende <i>E.coli</i> (STEC).....	2
1.3 STEC virulensfaktorer .....	2
1.3.1 Shigatoksin.....	3
1.3.2 Intimin.....	4
1.4 STEC reservoar, overføring og sykdom .....	4
1.5 Forekomst av STEC-infeksjon hos mennesker .....	5
1.6 Matbårne utbrudd forårsaket av STEC .....	6
1.7 STEC – forekomst i dyr og mat.....	7
1.8 Påvisning av STEC .....	10
1.9 Formålet med oppgaven .....	12
<b>2. Materialer og metoder</b> .....	<b>13</b>
2.1 Materialer.....	13
2.1.1 Referanse/kontrollstammer .....	14
2.2 Metoder.....	15
2.2.1 Polymerase chain reaction – PCR.....	16
2.2.2 DNA ekstraksjon.....	18
2.2.3 Screening av kjøttdeigprøver for tilstedeværelse av <i>stx</i> <sub>2a</sub> med real-time PCR .....	19
2.2.4 Isolering av <i>stx</i> <sub>2a</sub> -positive <i>E. coli</i> fra PCR-positive kjøttdeigprøver.....	19
2.2.5 Isolering av <i>stx</i> - og <i>eae</i> -positive <i>E.coli</i> fra PCR-positive kjøttdeigprøver .....	20
2.2.6 Identifisering av <i>E. coli</i> med MALDI-TOF .....	21
2.2.7 Karakterisering av <i>stx</i> <sub>2a</sub> -positive isolater .....	21
<b>3. Resultater</b> .....	<b>25</b>
3.1 Screening av DNA ekstrahert fra kjøttdeigprøver for påvisning av <i>stx</i> <sub>2a</sub> .....	25

3.2 Isolering av <i>stx</i> <sub>2a</sub> -positive <i>E. coli</i> .....	25
3.3 Isolering av <i>stx</i> - og <i>eae</i> -positive <i>E. coli</i> .....	26
3.4 Karakterisering av <i>stx</i> <sub>2a</sub> -positive <i>E. coli</i> .....	27
3.4.1 O-gruppe typing .....	27
3.4.2 Virulens karakterisering .....	27
3.5 Oppsummering: Karakterisering av fire <i>stx</i> <sub>2a</sub> -positive <i>E.coli</i> .....	27
3.6 Helgenomsekvensering.....	28
<b>4. Diskusjon.....</b>	<b>30</b>
4.1 Screening av kjøttdeigprøver for tilstedeværelse av <i>stx</i> <sub>2a</sub> -genet.....	30
4.2 Isolering .....	31
4.3 Identifisering av <i>E. coli</i> .....	32
4.4 Karakterisering av <i>stx</i> <sub>2a</sub> -positive STEC .....	33
4.5 Konklusjon og videre arbeid.....	35
<b>5. Litteraturliste.....</b>	<b>36</b>
<b>6. Vedlegg .....</b>	<b>43</b>
6.1 Vedlegg 1.....	43
6.2 Vedlegg 2.....	43
6.3 Vedlegg 3.....	44
6.4 Vedlegg 4.....	45
6.5 Vedlegg 5.....	46



# 1. Introduksjon

## 1.1 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* (*E. coli*) tilhører familien *Enterobacteriaceae*, og er en Gram-negativ, ikke sporedannende, fakultativ anaerob stavbakterie. I tillegg er bakterien mobil ved hjelp av flageller. *E. coli* er en del av normalfloraen til alle varmblodige dyr og mennesker. De fleste stammene er apatogene, og benyttes hyppig som indikatorbakterie for fekal forurensning. Noen varianter har imidlertid egenskaper (virulensgener) som gjør at de kan forårsake sykdom hos mennesker (Tenaillon et al., 2010).

*E. coli* er en mangfoldig art med stor grad av fenotypisk og genotypisk diversitet. Bakterienes genom inneholder mellom 4200 og 5500 gener, hvorav under 2000 av disse genene er konservert hos alle *E. coli*-stammer og regnes som *E. coli* sitt kjernegenom («the core genome»). Den resterende delen av genomet varierer mellom stammer (Scheutz, 2014).

*E. coli* sitt plastiske genom gjør at den kan være alt fra en normalt forekommende tarmbakterie til en alvorlig patogen. Siden apatogene- og patogene *E. coli* vil kunne være tilstede samtidig, er det essensielt å kunne differensiere mellom disse. En av flere typingsmetoder for *E. coli* serotyping baserer seg på fenotypiske O- (lipopolysakkarid, LPS), H- (flagell) og K- (kapsel) antigener. O- og H-antigener definerer serogruppe (kun O-antigener) og serotype (O- og H-antigener) (Kaper et al., 2004). Så mange som 173 O-antigener, 56 H-antigener og 80 K-antigener er blitt beskrevet for *E. coli*-serotyper (Tenaillon et al., 2010). I dag benyttes også flere molekylærbiologiske typingsmetoder for å sammenligne og skille *E. coli*-stammer, for eksempel ved påvisning av ulike virulensgener.

Basert på fenotypiske egenskaper, kliniske symptomer og spesifikke virulensfaktorer, er patogene *E. coli* kategorisert inn i patotyper. *E. coli* patotyper involvert i ekstraintestinale infeksjoner kalles «Extra intestinal pathogenic *E. coli*», ExPEC, og omfatter urinveisinfeksjoner og sepsis/meningitt. Patotyper involvert i intestinale infeksjoner (intestinale patotyper) er assosiert med diaré og består av seks definerte kategorier: enteropatogene *E. coli* (EPEC), Shigatoksinproduserende *E. coli* (STEC) også kalt Verotoksinproduserende *E. coli* (inkluderer enterohemorragisk *E. coli*, (EHEC)), enterotoksinproduserende *E. coli* (ETEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enteroaggregative *E.*

*coli* (EAEC) og diffus adherente *E. coli* (DAEC) (Croxen & Finlay, 2009; Kaper et al., 2004; Scheutz, 2014). Patotypen det er fokusert på i denne masteroppgaven er STEC.

## 1.2 Shigatoksinproduserende *E.coli* (STEC)

Shigatoksinproduserende *E. coli* (STEC), synonymt med Verotoksinproduserende *E. coli* (VTEC) er blant de mest virulente *E. coli*-stammene (Tozzoli & Scheutz, 2014). STEC har tilstedeværelse av gener som koder for Shigatoksin (*stx*). Noen STEC har i tillegg gener for adhesjon, og denne kombinasjonen av virulensgener gjør at de kan forårsake alvorlig sykdom som hemorragisk kolitt og hemolytisk uremisk syndrom (HUS) hos mennesker (Kaper et al., 2004; Paton & Paton, 1998). STEC brukes som et generelt begrep på *E. coli*-stammer som inneholder *stx*-gener, mens enterohemorragisk *E. coli* (EHEC) ofte brukes om humanpatogene varianter av STEC som også inneholder «locus of enterocyte effacement» (LEE) og dermed evnen til adhesjon (Kaper et al., 2004).

Fler enn 472 STEC-serotyper er blitt beskrevet, men kun et fåtall av disse har blitt assosiert med sykdom hos menneske. STEC O157:H7 er den vanligste serotypen, men det har vist seg at mange non-O157:H7-stammer også er av signifikant betydning med tanke på sykdom. De vanligste non-O157:H7 serogruppene assosiert med sykdom hos menneske er O26, O103, O111, og O145 (Scheutz, 2014). Humanpatogene STEC er for øvrig ikke begrenset til disse serogruppene.

## 1.3 STEC virulensfaktorer

STEC har flere gener som er viktig for virulens, men det varierer hvilke gener som er tilstede i de ulike stammene. Den aller viktigste virulensfaktoren er evnen til å produsere Shigatoksin (Stx), som finnes i alle STEC. For de fleste humanpatogene STEC er i tillegg bakteriens evne til adhesjon («attaching and effacing») med blant annet *eae*-genet som koder for proteinet intimin viktig.

*E. coli*-stammer som inneholder både *stx*-kodende gener og det intimin-kodende genet *eae* er oftest assosiert med de mest alvorlige sykdomstilfellene forårsaket av STEC (Paton & Paton, 1998). Kombinasjonen av gener for toksinproduksjon og evne til kolonisering er nødvendig for å gjøre *E. coli* patogen, mens kun *stx*-gener ikke er tilstrekkelig (Kaper et al., 2004).

### 1.3.1 Shigatoksin

*stx*-genene sitter i bakteriofager som er inkorporert i bakteriegenomet. *stx*-genene uttrykkes når bakteriofagen går fra lysogen til lytisk syklus, og toksinet frigis når bakteriecellen lyserer. Frigjort Shigatoksin vil virke på vertscellen, mens frigjorte bakteriofager med *stx*-gener kan spres og potensielt infisere nye *E. coli* (genetisk overføring ved transduksjon).

*stx*-genene koder for flere toksiner, der *stx*<sub>1</sub> og *stx*<sub>2</sub> er de to hovedtypene. STEC kan produsere *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub> eller begge varianter, men *E. coli*-stammer som koder for *stx*<sub>2</sub> er assosiert med mer alvorlig sykdomsforløp og komplikasjon med HUS enn de som bærer gener for *stx*<sub>1</sub> (Melton-Celsa, 2014; Paton & Paton, 1998; Scheutz et al., 2012b). *stx*<sub>1</sub> inkluderer tre subtyper; *stx*<sub>1a</sub>, *stx*<sub>1c</sub> og *stx*<sub>1d</sub>, mens *stx*<sub>2</sub> består av syv subtyper; *stx*<sub>2a</sub>, *stx*<sub>2b</sub>, *stx*<sub>2c</sub>, *stx*<sub>2d</sub>, *stx*<sub>2e</sub>, *stx*<sub>2f</sub> og *stx*<sub>2g</sub>. De ulike subtypene er forbundet med ulike sykdom og alvorlighetsgrad. *stx*<sub>1a</sub>, *stx*<sub>2a</sub>, *stx*<sub>2c</sub> og *stx*<sub>2d</sub> er assosiert med infeksjonen hos menneske. Andre subtyper er derimot i hovedsak forbundet med STEC-infeksjon hos dyr, og spesielt *stx*<sub>2e</sub> er vist å forårsake ødemsykdom hos gris. *stx*<sub>2f</sub>-genet er opprinnelig isolert i STEC fra duer (Melton-Celsa, 2014; Scheutz et al., 2012b). Spesielt STEC-stammer med gener som koder for *stx*<sub>2a</sub> er assosiert med utvikling av HUS (Boerlin et al., 1999; Friedrich et al., 2002; Jenkins et al., 2003; Melton-Celsa, 2014; Persson et al., 2007).

Shigatoksinet er en avgjørende faktor for utvikling av sykdom og HUS. Stx produseres i tykktarmen, og går derifra med blodstrømmen til nyrene, der det inhiberer proteinsyntesen og skader endotelcellene i nyrene. Skaden kan føre til HUS som igjen kan medføre permanent nyresvikt. Stx kan også gi lokal skade i tykktarmen, som resulterer i blodig diaré, hemorrhagisk kolitt og nekrose (Kaper et al., 2004).

Pasienter med hemorrhagisk kolitt må ikke behandles med antibiotika, da det er vist at dette er assosiert med økt risiko for utvikling av HUS (Croxen et al., 2013).

Dødeligheten hos barn med HUS er 3-5 %, og ca. 10 % av barn < 10 år som har gjennomgått STEC-assosiert HUS utvikler kronisk nyresvikt (Fraser et al., 2016). HUS er vanligste årsak til akutt nyresvikt hos barn (Fraser et al., 2016).

### 1.3.2 Intimin

En del humanpatogene STEC kan også inneholde LEE (Locus of enterocyte effacement), en patogenitetsøy i genomet som blant annet inneholder genene som koder for intimin (*eae*) og type III sekresjonssystem (Franzin & Sircili, 2015).

*eae*-genet koder for proteinet intimin. Intimin er viktig for at bakteriene skal kunne feste seg i tarmen hos mennesker og er regnet som hovedårsaken til selve diareen (Kaper et al., 2004; Mora et al., 2007).

Ved hjelp av bakteriens type III sekresjonssystem (T3SS) kan det dannes forbindelse («nål») mellom bakterie og tarmepitel. Gjennom denne «nålen» kan bakterien overføre sin egen spesifikke reseptor (Translocated intimin receptor, Tir) til overflaten av epitelcellene. Kontakten mellom bakterie og vertscelle initierer cellulære responser i epitelcellene, og det dannes en pidestall-lignende struktur som omslutter bakterien. Denne strukturen medfører tett kontakt mellom bakterie og epitelcelle. De fleste genene som koder for denne typen adhesjonsmekanismen er lokalisert på LEE på bakteriekromosomet (L'Abée-Lund & Wasteson, 2015; Stevens & Frankel, 2014).

Tilstedeværelse av LEE i STEC gir disse en fordel med hensyn på kolonisering til tarmepitelcellene, og *eae*-positive STEC er ofte involvert ved alvorlig sykdom. Det finnes for øvrig LEE-negative STEC, som har vært årsak til sporadiske tilfeller og utbrudd av hemorragisk kolitt og HUS (Mora et al., 2007; Scheutz, 2014). Dette viser at det finnes andre potensielle mekanismer for adheranse, men betydningen av disse virulensfaktorene er ikke like etablert som intimin (Kaper et al., 2004).

### 1.4 STEC reservoar, overføring og sykdom

Patogene STEC har sitt naturlige reservoar i tarmen til drøvtyggere, og bakterien blir ofte isolert fra storfe. Dyrene er vanligvis friske smittebærere (Madic et al., 2009; Sperandio & Nguyen, 2012). STEC er en zoonotisk overførbart bakterie, og smitte til mennesker skjer hovedsakelig ved konsum av mat og vann kontaminert med avføring fra dyr som er bærere av STEC. Direkte kontakt med dyr og smittede mennesker har også vist seg å være en viktig overføringsvei for STEC (Croxen et al., 2013; Hunt, 2010).

Spesielt kjøttdeig som ikke har blitt godt nok varmebehandlet og upasteurisert melk- og meieriprodukter er assosiert med sykdomstilfeller med STEC. Også fekal kontaminering av spesielt matvarer som spises rå (eks. salat, spirer, spinat) har vært ansvarlig for flere tilfeller av matbåren sykdom (Croxen et al., 2013; Hunt, 2010). STEC er resistente i miljøet, og kan overleve lav pH, lave temperaturer, forholdsvis høy saltkonsentrasjon og lav vannaktivitet. De er derimot ikke spesielt varmeresistente, og overlever ikke pasteurisering eller koking (L'Abée-Lund & Wasteson, 2015).

Infeksjon med STEC kan forårsake et bredt spekter av symptomer, som varierer fra mild diaré til hemorragisk kolitt (blodig diaré), i tillegg til risiko for utvikling av hemolytisk uremisk syndrom (HUS) (Auvray et al., 2009; Madic et al., 2009). STEC-infeksjon har i motsetning til de andre patogene *E. coli* lav infektiv dose, som er estimert til å være < 100 bakterier (Kaper et al., 2004). Alvorlighetsgrad av sykdom kan variere mellom blant annet ulike serotyper, *stx*-subtype og tilstedeværelse av andre virulensfaktorer. Inkubasjonstiden er vanligvis på 3-4 dager, og symptomer inkluderer vanligvis diaré, som kan utvikle seg til blodig diaré, etterfulgt av feber, magekramper og oppkast (Croxen et al., 2013).

## 1.5 Forekomst av STEC-infeksjon hos mennesker

Den globale forekomsten av STEC-infeksjon er ukjent, men basert på data innhentet fra 21 land fordelt mellom 10 av 14 subregioner av verdens helseorganisasjon (World Health Organization, WHO), er det estimert at STEC forårsaker 2 801 000 tilfeller akutt sykdom, 3890 HUS-tilfeller og 230 dødsfall årlig (Majowicz et al., 2014).

I USA ble det i følge Centers for Disease Control and Prevention (CDC) rapportert totalt 465 laboratorie-bekreftede tilfeller av STEC O157 og 807 laboratorie-bekreftede tilfeller STEC non-157 i 2015 (CDC, 2015).

I 2016 ble det i følge European Food Safety Authority (EFSA) og European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) bekreftet 6378 tilfeller med STEC-infeksjon i Europa (EFSA & ECDC, 2017). I Norge har STEC-infeksjon vært meldingspliktig siden 1995, og det ble i følge meldingssystem for smittsomme sykdommer (MSIS) meldt 239 tilfeller av infeksjon med STEC i 2016. I år 2013, 2014 og 2015 var derimot antall meldte tilfeller henholdsvis 103, 151 og 221. Til forskjell fra de fleste andre zoonoser har antall sykdomstilfeller forårsaket av STEC generelt vært stigende de siste 10-15 årene. Over

halvparten av disse er smittet i Norge. Årsaken til økningen kan delvis forklares med økt oppmerksomhet og prøvetaking etter flere tidligere STEC-utbrudd, samt nye metoder for diagnostikk, men utviklingen er allikevel bekymringsverdig på grunn av bakteriens potensiale til å gi svært alvorlig sykdom og følgetilstander (Folkehelseinstituttet, 2017; Veterinærinstituttet, 2017). I følge MSIS-statistikk er det hittil i år rapportert 182 sykdomstilfeller forårsaket av STEC (<http://www.msis.no/>).

## 1.6 Matbårne utbrudd forårsaket av STEC

STEC har vært årsak til mange matbårne utbrudd, spesielt i den industrialiserte delen av verden. Mange av sykdomstilfellene forårsaket av STEC er sporadiske, og smittekilden blir aldri identifisert (Madic et al., 2009). Bakterien ble oppdaget som årsak til sykdom hos menneske første gang i USA på 1980-tallet, da STEC O157:H7 forårsaket en rekke utbrudd i forbindelse med understekte hamburgere. Senere har flere matvarer blitt forbundet med sykdom, som blant annet pølser, upasteurisert melk og ost, salat og spirer (Kaper et al., 2004; O'Brien et al., 1993).

Sykdom og utbrudd med STEC var lenge kun forbundet med serotype O157:H7, men det ble etter hvert klart at STEC som gir infeksjon hos menneske omfatter langt flere serotyper. De vanligste non-O157:H7 serogruppene som har vært årsak til alvorlig sykdom og utbrudd er O26, O91, O103, O111, O121 og O145 (Haugum et al., 2014; Perelle et al., 2004; Silva et al., 2017).

Det er rapportert utbrudd av STEC over store deler av verden, og de største utbruddene er beskrevet fra USA, Japan, Canada og Tyskland; det største utbruddet i USA i 1993 kunne spores tilbake til kjøttdeig forurenset med *E. coli* O157:H7. Hamburgere stekt uten høy nok kjernetemperatur var årsaken til at flere hundre mennesker ble syke, tre barn døde og flere fikk permanent nyreskade. I Japan i 1996 var reddiker forurenset med *E. coli* O157:H7 årsaken til at 8000 skolebarn ble syke, hvorav 12 døde. Canada hadde i 2000 et utbrudd med *E. coli* O157:H7 som skyldes drikkevann forurenset med feces fra beitedyr (Kaper et al., 2004; O'Brien et al., 1993; Silva et al., 2017).

I 2011 var *E. coli* O104:H4 årsaken til et internasjonalt utbrudd, men som hovedsakelig rammet Tyskland. Det skulle vise seg at dette var en uvanlig stamme (EAEC O104:H4) som ved genetisk overføring hadde fått *stx*-bakteriofager integrert i sitt genom, og dermed evnen

til å produsere Shigatoksin. Utbruddet førte til over to tusen tilfeller med gastroenteritt, totalt 46 dødsfall og 782 tilfeller med HUS. Epidemiologiske analyser identifiserte sporer som den mest sannsynlige kilden til infeksjon, men dette ble ikke bekreftet av laboratorieanalyser (Buchholz et al., 2011; Navarro-Garcia, 2014).

I 1999 hadde Norge sitt første matbårne utbrudd forårsaket av STEC. Norskprodusert salat kontaminert med *E. coli* O157:H7 ble identifisert som årsaken til fire tilfeller av STEC-infeksjon (Folkehelseinstituttet, 2018). I 2006 hadde Norge et nasjonalt utbrudd med en sjelden STEC-variant; *stx*<sub>2</sub>-positiv *E. coli* O103:H25. Flere enn halvparten av pasientene utviklet HUS, noe som indikerte at denne varianten var spesielt virulent. I alt 17 sykdomstilfeller ble registrert og ti barn utviklet HUS, hvorav ett barn døde. Smittekilden ble sporet tilbake til morrpølse (Schimmer et al., 2008; Sekse et al., 2009). I 2009 hadde Norge igjen et nasjonalt utbrudd som skyldes sorbitolfermenterende *E. coli* O157, der 13 barn ble syke, ni utviklet HUS og én person døde. Smittekilden forble ukjent (Fraser et al., 2016).

## 1.7 STEC – forekomst i dyr og mat

Zoonoser er infeksjonssykdommer som kan smitte fra dyr til mennesker (eller omvendt), og smitte kan blant annet skje indirekte gjennom kontaminerte matvarer (Veterinærinstituttet, 2017). Som nevnt har STEC sitt naturlige reservoar hos drøvtyggere, særlig i storfetarm, og omtrent 75 % av alle STEC-utbrudd er relatert til inntak av kontaminert storfeprodukter (Sperandio & Nguyen, 2012). Gjennom slakteprosessen kan dyr som er bærere av STEC kontaminere egen og andre slakteskrotter, og på den måten komme inn i næringsmiddelkjeden. Gode slakterutiner og prosessering av slakt er derfor viktig for å redusere sjansen for fekal kontaminering og dermed forhindre at STEC kommer inn i produktet (Croxen et al., 2013; Hussein & Bollinger, 2005). Fare for kontaminering gjelder først og fremst deig- og farseprodukter, inkludert produkter som ikke varmebehandles. Ved konsum av helt kjøtt, som for eksempel biffstykker, vil vanlig varmebehandling/overflatebehandling drepe STEC som eventuelt befinner seg på overflaten av kjøttstykket. I deigprodukter vil derimot bakterien kunne være tilnærmet jevnt fordelt i hele produktet og ved varmebehandling uten høy nok kjernetemperatur vil STEC kunne overleve (L'Abée-Lund & Wasteson, 2015).

Det har vært gjennomført flere kartlegginger og undersøkelser med hensyn på forekomsten av STEC i storfe. I 1995 ble 1970 avføringsprøver fra 197 norske storfebesetninger undersøkt for

*E. coli* O157. Resultatene viste at seks dyr (0,3 %) fra to besetninger (1 %) var positive for O157, og isolatene hadde gener for *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub> og *eae* (Vold et al., 1998). Fra januar 1998 til desember 1999 ble 1541 storfe og 665 sau fra henholdsvis 848 og 605 norske besetninger undersøkt for *E. coli* O157:H7. Tre prøver (0,19 %) fra ulike storfebesetninger var positive for *E. coli* O157:H7, hvorav alle tre isolater hadde gener for *stx*<sub>2</sub> og *eae*, mens ett isolat også var bærer av *stx*<sub>1</sub>-genet. Resultatene viste også at ingen av de 665 prøvene fra sau var positive for *E. coli* O157:H7 (Johnsen et al., 2001). I 2002 ble 50 norske storfebesetninger undersøkt for forekomst av *E. coli* O157 og *stx*-kodende gener, og resultatene fra studien viste at O157 ikke ble isolert fra noen av de 680 undersøkte kyrene, mens *stx*-genet ble påvist i 61 % av prøvene og hos alle de 50 besetningene (LeJeune et al., 2006). I 2014 ble forekomsten av de fem vanligste STEC serogruppene undersøkt i norsk storfe. Resultatene viste at STEC ble påvist i 10,6 % av besetningene, med O26 som den vanligste serogruppen. Forekomsten av STEC O26 var på 5,6 %, mens O103 og O157 var begge på 2,2 %. Forekomsten av STEC O111 og O145 var svært lav, og var på henholdsvis 0 og 0,6 % (Sekse et al., 2015).

Etter STEC O103:H25-utbruddet i 2006 startet et toårig kartleggingsprosjekt, der Veterinærinstituttet på oppdrag fra Mattilsynet skulle undersøke forekomsten av STEC O26, O103, O111, O145 og O157 i norske sauebesetninger. Til sammen 585 besetninger ble undersøkt, og resultatene viste at forekomst av STEC O103:H2 og O157 var på henholdsvis 0,7 % og 0,9 %. I tillegg ble det påvist *eae*-positive, men *stx*-negative *E. coli* O103:H2 og O103:H25 i henholdsvis 3,1 og 5,8 % av besetningene. STEC O26:H11 ble påvist i 0,8 % av besetningene, og *eae*-positive, *stx*-negative *E. coli* O26:H11 i 15,9 % av besetningene. STEC O111 og O145 ble ikke påvist i noen av besetningene, men det ble påvist *eae*-positive, *stx*-negative *E. coli* O145 hos 28,9 % (Urdahl et al., 2009).

Norge importerer hvert år kjøtt fra land utenfor EU/EØS, men kunnskapen om forekomsten av patogene *E. coli* fra disse landene er varierende. I perioden 2011-2012 gjennomførte derfor Veterinærinstituttet på oppdrag fra Mattilsynet en kartlegging av STEC O26, O103, O111, O145 og O157 fra importert kjøtt. Resultatene viste at STEC O26, O111, O145 og O157 ikke ble påvist i noen av de 177 og 13 forsendelsene med henholdsvis storfekjøtt og sauekjøtt. Det ble derimot isolert *eae*-positive *E. coli* O26 (samtlige var *stx*-negative) i prøver fra fem av de totalt 177 forsendelser (2,8 %) med storfekjøtt; tre fra Swaziland, én fra Brasil og én fra Uruguay. Fra de 13 partiene med sauekjøtt ble det også isolert én *stx*<sub>1</sub>-positiv og *eae*-positiv *E. coli* O103 fra en av prøvene fra Uruguay. Det skal nevnes at antallet prøvetatte partier med



sauekjøtt var for lavt til å kunne si noe om den reelle forekomsten i importert sauekjøtt fra disse landene (Johannessen et al., 2012).

I 2015/2016 ble det gjort en prøveinnsamling i Sverige, der forekomsten av STEC i svensk storfekjøtt skulle undersøkes. Resultatene viste at av de totalt 300 prøvene som ble analysert, ble STEC påvist i seks (2 %) av prøvene. Ved karakterisering av isolatene fant man at fire isolater inneholdt *stx*<sub>2</sub>-genet og to isolater inneholdt både *stx*<sub>1</sub>- og *stx*<sub>2</sub>-genet. For øvrig hadde ingen av de seks STEC-isolatene tilstedeværelse av *eae*-genet (Livsmedelsverket, 2016).

I årene mellom 1995-2003 ble forekomsten av STEC O157:H7 og non-O157 i spansk kjøttdeig undersøkt. Prøveinnsamling foregikk i Lugo, Spania. Tilsammen 785 kjøttdeigprøver ble samlet inn fra 30 ulike dagligvarebutikker. STEC ble påvist i 95 (12 %) av kjøttdeigprøvene; STEC O157:H7 ble isolert fra åtte prøver (1 %), og non-157 STEC ble isolert fra 90 prøver (11 %). 96 isolater ble videre karakterisert, hvorav 29 % og 51 % hadde gener for henholdsvis *stx*<sub>1</sub> og *stx*<sub>2</sub>, og 20 % hadde både *stx*<sub>1</sub>- og *stx*<sub>2</sub>-gener. Virulensgenet *eae* ble påvist i 26 % av isolatene (Mora et al., 2007).

I en studie fra Frankrike i 2006 ble 164 kjøttdeigprøver screenet for tilstedeværelse av *stx*-gener med PCR, og videre ble *stx*-positive prøver analysert for O26, O103, O111, O145 og O157. Resultatene viste at 27 kjøttdeigprøver (16 %) var positive for *stx*-genet. Ni av disse var også positive for minst én av de fem serogruppene forbundet med alvorlig sykdom hos menneske (Auvray et al., 2007). I en annen studie fra Frankrike ble 300 kjøttdeigprøver screenet for tilstedeværelse av *stx* og de fem vanligste STEC serogruppene forbundet med alvorlig sykdom. Resultatene vist at 45 prøver var *stx*-positive (15 %). Forekomsten av *E. coli* O26, O103, O111, O145 og O157 i kjøttdeig var på 2,6 % (Perelle et al., 2007).

Det gjennomføres ingen rutinemessig overvåkning av STEC i norske næringsmidler, men i perioden 1996-2004 ble flere tusen ulike matvarer undersøkt for STEC O157. Resultatene fra ulike overvåkningsprogrammer og prosjekter viste at kun åtte norske storfeslakt og to norske saueslakt var positive (L'Abée-Lund & Wasteson, 2015; Veterinærinstituttet, 2015).

## 1.8 Påvisning av STEC

Som nevnt innledningsvis er *E. coli* en mangfoldig art, og det er essensielt å kunne differensiere mellom patogene- og apatogene stammer ved påvisning av bakterien. STEC overføres hovedsakelig til mennesker ved konsum av kontaminerte matvarer, og via fekal kontaminering og krysskontaminering kan forurensning med STEC omfatte et bredt spekter av næringsmidler. Behovet for raske og sensitive laboratoriemetoder er derfor vesentlig for å kunne påvise bakterien fra ulike matriksprøver (Fratamico et al., 2009; Verhaegen et al., 2016).

STEC O157:H7 er den vanligste serotypen forbundet med sykdom, men non-O157:H7 STEC-serotyper har i økende grad blitt rapportert som en viktig årsak til alvorlig sykdom og utbrudd (Haugum et al., 2014; Verhaegen et al., 2016). Etter det første utbruddet med *E. coli* O157:H7 ble det utviklet standardmetoder for påvisning av denne serotypen (blant annet nordisk metodikkomité for næringsmidler, NMKL, nr.164: *E. coli* O157 - påvisning i næringsmidler og fôr). Isolering av STEC O157 ble tradisjonelt gjort ved immunomagnetisk separasjon (IMS), en teknikk som baserer seg på at *E. coli* O157:H7 separeres fra matriks (etter oppformering av prøven) ved hjelp av magnetiske kuler dekket med spesifikke antistoffer rettet mot O157-antigenet (EFSA, 2013; L'Abée-Lund & Wasteson, 2015). Prinsippet med metoden er å redusere bakgrunnsflora (Paton & Paton, 1998; Verhaegen et al., 2016). Videre dyrkes kule-bakteriekomplekset på blant annet MacConkey agar med sorbitol (SMAC), som er et selektivt medium for ikke-sorbitolfermenterende O157:H7, etterfulgt av agglutineringsreaksjon med anti-O157 antiserum. Denne serotypen skiller seg biokjemisk fra andre STEC ved at den mangler evnen til å fermentere sorbitol, og kan derfor lett gjenkjennes ved at de danner fargeløse/klare kolonier på slikt medium. Dette er en pålitelig metode for å isolere og identifisere *E. coli* O157:H7, men sorbitolfermenterende O157:H- og andre STEC-serotyper vil derimot ikke kunne skilles fra andre *E. coli* da disse fermenterer sorbitol og danner rosa kolonier på SMAC-agar (Croxen et al., 2013; Haugum et al., 2014). Også andre selektive medium som baserer seg på kjente biokjemiske egenskaper for O157:H7 benyttes, som for eksempel cefixim telluritt sorbitol-MacConkey (CT-SMAC) agar (cefixim og telluritt inhiberer andre *E. coli*) og CHROMagar O157 (*E. coli* O157:H7 er  $\beta$ -glukuronidase-negativ). Det finnes også kommersielt tilgjengelige magnetiske kuler rettet mot de vanligste O-antigenene assosiert med sykdom hos menneske, og IMS kan derfor benyttes ved isolering av enkelte non-O157 STEC, med etterfølgende utsåing/dyrking og verifisering (EFSA, 2013).

Etter hvert som non-O157:H7 og O157:H- (sorbitolfermenterende) *E. coli* i økende grad har vært årsak til sykdom hos menneske, har det blitt nødvendig å endre metodene for påvisning. Metodene er nå i større grad basert på påvisning av *stx*-gener, heller enn identifisering av serogrupper. Molekylærbiologiske metoder har blitt utviklet for påvisning av STEC, og i 2012 ble en ny internasjonal standard gitt ut (ISO/TS13136:2012(E)). Denne metoden baserer seg på påvisning av *stx* og *eae*-virulensgener, og i tillegg bestemmelse av serogruppe-assosierte gener O26, O103, O111, O145 og O157 ved bruk av real-time PCR (Verhaegen et al., 2016).

Metoden krever først oppformering av matriksprøver (feces eller matvarer) og ekstraksjon av DNA, før prøvene screenes for tilstedeværelse av *stx*- og *eae*-gener med real-time PCR. Ved påvisning av *stx* og *eae* blir det videre utført serogruppe-spesifikk PCR. Påfølgende isolering av STEC-stammer er imidlertid nødvendig for å bekrefte at positivt PCR-signal er fremkalt av gener som er tilstede i levende bakterieceller (bekrefte at virulensgenene er tilstede i de isolerte koloniene) (ISO/TS13136:2012(E)). Isoleringen er dyrkingsbasert, og denne prosessen er både tid- og arbeidskrevende. I tillegg kan blant annet valg av oppfomeringsmedium og isoleringsmedium som favoriserer vekst av STEC være avgjørende for resultatet (Verhaegen et al., 2016). Etter isolering følger identifisering og eventuell karakterisering av bakterieisolater.

Påvisning av STEC gjøres hovedsakelig med disse standardiserte fenotypiske og genotypiske laboriemetodene, og for å kunne skille isolater er det stort sett nødvendig å kombinere flere av disse, noe som er både kostbart og arbeidskrevende (Joensen et al., 2014). Som et alternativ til dette benyttes i økende grad DNA-sekvenseringsmetoder, der rekkefølgen (sekvensen) til nukleotidbasene i DNA bestemmes. Ved helgenomsekvensering (Whole genome sequencing, WGS) sekvenseres hele genomet, noe som krever at DNA først deles opp i flere fragmenter som sekvenseres hver for seg, før sekvensene settes sammen igjen til en konsensus. Denne tilnærmingen har vist seg å være et nyttig og verdifullt verktøy for karakterisering av STEC og andre patogene bakterier (Joensen et al., 2014).

## 1.9 Formålet med oppgaven

STEC har sitt naturlige reservoar i tarmen til drøvtyggere, og bakterien blir ofte isolert fra storfe. Smitte til menneske kan blant annet skje ved konsum av fekalt kontaminerte næringsmidler, og spesielt stammer med gener for *stx*<sub>2a</sub> er assosiert med de mest alvorlige sykdomstilfellene. Så vidt vi vet er heller ikke *stx*<sub>2a</sub>-positive STEC undersøkt i næringsmidler tidligere. Med bakgrunn i dette skulle forekomst av STEC, med hovedvekt på *stx*<sub>2a</sub>-genet, undersøkes i norsk storfekjøttdeig.

I det innledende kartleggingsprogrammet hadde 308 kjøttdeigprøver blitt screenet for *stx*-gener, og 71 *stx*<sub>2</sub>-positive prøver ble inkludert i denne masteroppgaven. Også screeningprøver positive for *stx*- og *eae*-gener, og som i tillegg var O-gruppe negative ble inkludert. Formålet med denne masteroppgaven var:

- i. Undersøke for forekomst av *stx*<sub>2a</sub>-genet i norsk storfekjøttdeig
- ii. Forsøke å isolere *stx*<sub>2a</sub>-positive STEC fra PCR-positive kjøttdeigprøver
- iii. Identifisere og karakterisere *stx*<sub>2a</sub>-positive STEC-isolater
- iv. Forsøke å isolere *E. coli* positive for *stx* og *eae*, og negative for undersøkte O-grupper, fra tilsvarende PCR-positive kjøttdeigprøver.

## 2. Materialer og metoder

### 2.1 Materialer

På oppdrag fra Mattilsynet skulle patogene STEC kartlegges i norske kjøttvarer. I 2017 samlet Mattilsynet inn 308 kjøttdeig- og karbonadedeigprøver av storfe fra et representativt utvalg av dagligvarebutikker over hele Norge. DNA ble ekstrahert fra samtlige prøver kjøttdeig- og karbonadedeig (omtales i denne oppgaven som «kjøttdeig»), og hadde på forhånd blitt screenet for virulensgenene *stx* og *eae* og følgende O-grupper: O26, O103, O145 og O157.

Prøveopparbeidingen som hadde blitt utført på forhånd var som følger; 25 g kjøttdeig ble veid opp direkte i en stomacherpose. Deretter ble 225 ml bufret pepton vann (BPV, Medieproduksjon, Veterinærinstituttet) tilsatt, før prøvene ble homogenisert og satt til oppformering ved  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  i 18-24 timer. Etter oppformering ble 1 ml av kulturen brukt til å ekstrahere DNA. Dette ble gjort i henhold til leverandørens instruksjoner (DNeasy® Blood & Tissue Kit, Qiagen, Hilden, Germany). DNA-konsentrasjonen ble målt på NanoDrop og deretter brukt som templat for screening med real-time PCR for tilstedeværelse av *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub> og *eae*. Prøver positive for *stx* og *eae* ble testet for serogruppe-assosierte gener (O26, O103, O145 og O157). Prøver med påvist O-gruppe har blitt fulgt opp videre i kartleggingsprogrammet.

Ferdig ekstrahert DNA ble oppbevart ved  $-18\text{ °C}$  for videre analyser. En andel av den oppformerte buljongen ble blandet og frosset ned med 85 % konsentrert glyserol. I 10 ml Kryorør utgjorde dette en sluttkonsentrasjon på 15 % glyserol. Rørene ble lagret ved  $-80\text{ °C}$ , og senere brukt til isolering av bakterier.

Dette er det ferdige materiale jeg startet å jobbe med i min masteroppgave, men for å få forståelse for hele prosessen ble prøveopparbeidelsen gjort «fiktivt».

### 2.1.1 Referanse/kontrollstammer

Det ble benyttet positive og negative kontroller i samtlige av laboratorieforsøkene.

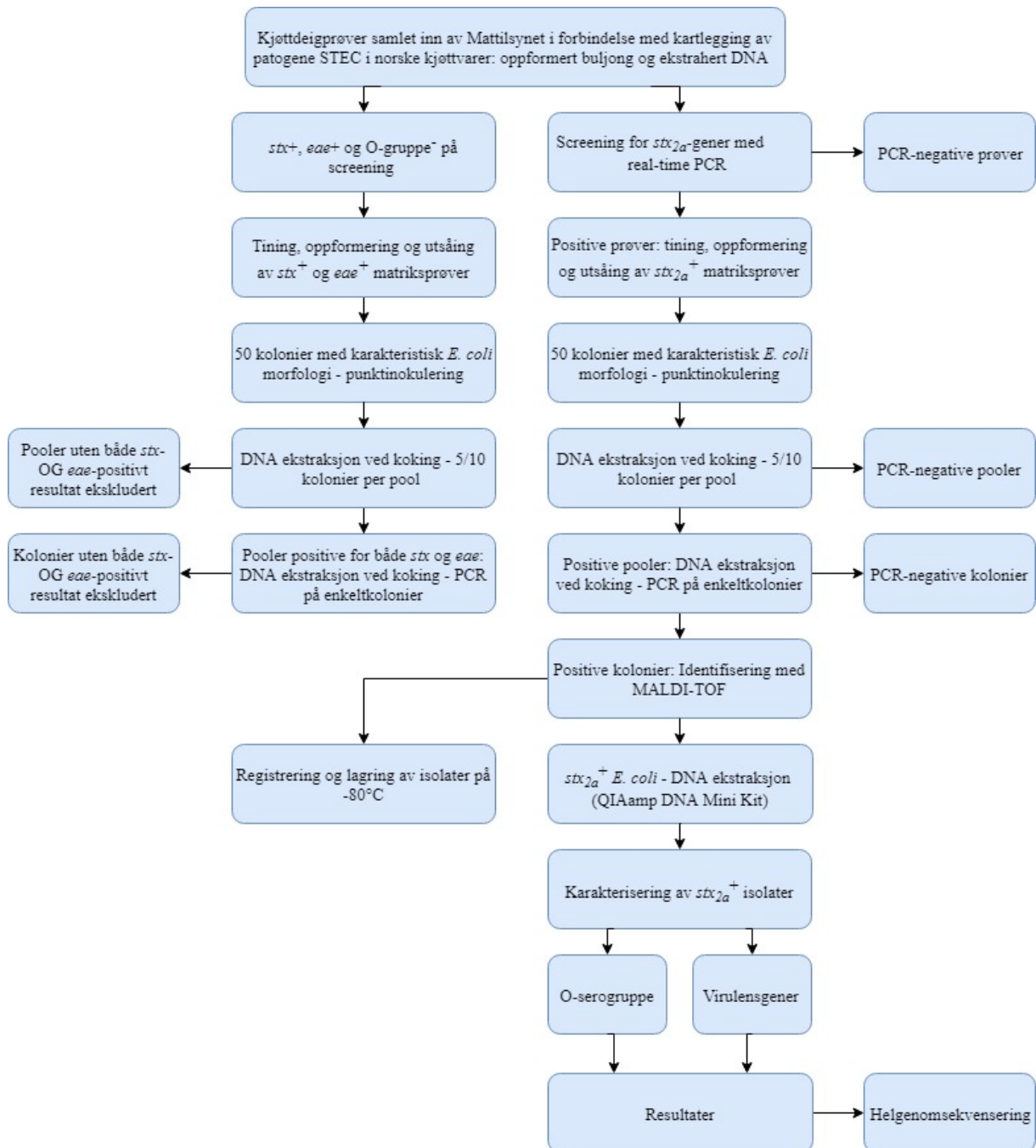
Kontrollstammene bærer de genene/hører til i den serogruppen som man ønsket å påvise, og er oppgitt i tabell 1. De negative kontrollene bestod av milliQ vann uten templat.

**Tabell 1.** Kontrollstammer benyttet i laboratorieforsøkene

Målgen/ serogruppe	Kontrollstamme	Serotype	Metode	Referanse	
<i>stx</i> <sub>2a</sub>	EDL933, D2653/ VI 60299	O157:H7	Real-time PCR	(Scheutz et al., 2012a)	
<i>stx</i> <sub>1</sub> , <i>stx</i> <sub>2</sub> , <i>eae</i>	EDL933, D2653/ VI 51048	O157:H7			
<b>O145</b>	A08/VI 51046	O145:H28		Serologisk	European Union Reference Laboratory VTEC (EU-RL-VTEC)
<b>O26</b>	G08/VI 51052	O26:H11			
<b>O111</b>	C08/VI 51048	O111:H-			
<b>O157</b>	D08/VI 51049	O157:H7			
<b>O103</b>	E08/VI 51050	O103			
<b>O91</b>	F08/VI 51051	O91:H14	(Scheutz et al., 2012a)		
<b>O121</b>	B08/VI 51047	O121:H19			
<b>O113</b>	CRL-464	O113			
<b>O128</b>	T4/97 (D3546)	O128:H2			
<b>O146</b>	EC_Norway_NVI_257	O146:H21			
<b>O104</b>	H519	O104: K-H12	European Union Reference Laboratory VTEC (EU-RL-VTEC)		
<b>O55</b>	Su 3912-41	O55:H-			
<b>O45</b>	EU-RL-VTEC-EF-129	O45			
<i>stx</i> <sub>1a</sub>	EDL933, D2653	O157:H7	Konvensjonell PCR	(Scheutz et al., 2012a)	
<i>stx</i> <sub>1c</sub>	DG131/3, D3602	O174:H8			
<i>stx</i> <sub>1d</sub>	MHI813, D3522	O8:H19			

## 2.2 Metoder

En oversikt over de ulike trinnene i laboratorieforsøkene er vist i figur 1, og de forskjellige metodene som har blitt benyttet er beskrevet under.



**Figur 1.** Flytskjema over de ulike trinnene i laboratorieforsøkene.

### 2.2.1 Polymerase chain reaction – PCR

Polymerase chain reaction (PCR) er en veletablert laboratorieteknikk for amplifisering av spesifikke DNA-fragmenter. Hensikten med PCR er å lage nok kopier av det området på DNA som man ønsker å undersøke (målgenet). Real-time PCR reaksjonen inneholder blant annet primere, en fluoriserende probe, en termostabil *Taq* DNA polymerase, nukleotider og templat DNA. PCR-reaksjonen starter med at temperaturen økes slik at templatet denaturerer og separeres til enkelttrådet DNA. I neste steg senkes temperaturen slik at primerne kan binde til sin komplementære sekvens på DNA. Reaksjonstemperaturen øker deretter noe og polymerasen forlenger primerne og syntetiserer med det en ny DNA-tråd.

I real-time PCR kan PCR-produktet kvantifiseres ved hjelp av prober merket med et fluoriserende fargestoff. Proben binder spesifikt til det området på DNA som skal amplifiseres. Når DNA syntetiseres degraderes proben og det fluoriserende fargestoffet frigis. Akkumulering av fluorescenssignal over en viss terskelverdi gir et mål, en Ct-verdi, på hvor mye templat det er i prøven. Ved hjelp av antall syklene kjørt kan opprinnelig mengde templat beregnes. I denne masteroppgaven har real-time PCR kun blitt benyttet som en kvalitativ indikator på tilstedeværelse eller fravær av mål-DNA.

#### 2.2.1.1 Real time-PCR

DNA ekstrahert ved enten koking eller kit (beskrevet i henholdsvis punkt 2.2.2.1 og 2.2.2.2) ble brukt som templat for PCR-reaksjonen. Ferdig mastermix og DNA-templat ble tilsatt i sine respektive brønner. Prøvene ble kjørt på enten Stratagene Mx3005P qPCR Systems (Agilent Technologies, Germany) eller CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad Laboratories, USA) og resultater ble avlest i henholdsvis MxPro- og CFX Manager 3.1-programvare.

#### 2.2.1.2 Primere og prober for real-time PCR

Primere og prober benyttet for deteksjon av virulensgener og O-antigener med real-time PCR er vist i tabell 3. I tabellen er primere og prober oppgitt som henholdsvis forward primer, revers primer og probe.



**Tabell 2.** Real-time PCR-program

Målgen/serogruppe	Real-time PCR-program	Tid (sekunder)	Temperatur (°C)
<i>stx</i> <sub>2a</sub>	Pre-PCR: aktivering av polymerase og denaturering av templat	180	95
	PCR 35/40 sykler		
	Trinn 1: Denaturering	3	95
	Trinn 2: Annealing og DNA-syntese	30	60
<i>stx</i> <sub>1</sub> / <i>stx</i> <sub>2</sub> duplex, <i>eae</i> , IAC, O157, O111, O26, O103, O145	Pre-PCR: dekontaminering	120	50
	Pre-PCR: aktivering av polymerase og denaturering av templat	600	95
	PCR 45 sykler		
	Trinn 1: Denaturering	15	95
	Trinn 2: Annealing og DNA-syntese	60	60

**Tabell 3.** Primere og prober benyttet for amplifisering av virulens- og O-antigener med real-time PCR

Målgen (serogruppe)	Primer/probe	Sekvens (5'-3')*	Amplikon størrelse (bp)	Referanse
<i>stx</i> <sub>2a</sub>	<i>VT2a</i> -QfLNA1	GGCGG+TTTT+ATT+TGCATTA+G**	113	Tomas Jinnerot, Statens veterinærmedicinska anstalt (SVA), Perskomm.
	<i>VT2a</i> -QfLNA2	CG+TC+AAC+CTT+CACTGT+A**		
	<i>VT2a</i> -Qp	HEX-CRCAATCCGCCGCCATTGCATTAACAGAA-BHQ1		
<i>stx</i> <sub>1</sub>	<i>stx1</i> -forw	TTT GTY ACT GTS ACA GCW GAA GCY TTA CG	131	ISO/TS 13136:2012 (E) Annex E
	<i>stx1</i> -rev	CCC CAG TTC ARW GTR AGR TCM ACR TC		
	<i>stx1</i> -probe	5'-FAM-CTG GAT GAT CTC AGT GGG CGT TCT TAT GTA A-BHQ1-3'		
<i>stx</i> <sub>2</sub>	<i>stx2</i> -forw	TTT GTY ACT GTS ACA GCW GAA GCY TTA CG	128	ISO/TS 13136:2012 (E) Annex E
	<i>stx2</i> -rev	CCC CAG TTC ARW GTR AGR TCM ACR TC		
	<i>stx2</i> -probe	HEX-TCG TCA GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC-BHQ1		
<i>eae</i>	<i>eae</i> -forw	CAT TGA TCA GGA TTT TTC TGG TGA TA	102	ISO/TS 13136:2012 (E) Annex E
	<i>eae</i> -rev	CTC ATG CGG AAA TAG CCG TTA		
	<i>eae</i> -probe	FAM-ATA GTC TCG CCA GTA TTC GCC ACC AAT ACC-TAMRA		
<i>rfbE</i> (O157)	<i>rfbE</i> (O157) forw	TTT CAC ACT TAT TGG ATG GTC TCA A	88	ISO/TS 13136:2012 (E) Annex E
	<i>rfbE</i> (O157) rev	CGA TGA GTT TAT CTG CAA GGT GAT		
	<i>rfbE</i> (O157) probe	FAM-AGG ACC GCA GAG GAA AGA GAG GAA TTA AGG-TAMRA		

<b>wbdl (O111)</b>	wbdl-O111-F	CGA GGC AAC ACA TTA TAT AGT GCT TT	146	ISO/TS 13136:2012 (E) Annex E
	wbdl-O111-R	TTT TTG AAT AGT TAT GAA CAT CTT GTT TAG C		
	wbdl-O111-probe	FAM-TTG AAT CTC CCA GAT GAT CAA CAT CGT GAA-TAMRA		
<b>wzx (O26)</b>	wzx-O26- forw	CGC GAC GGC AGA GAA AAT T	135	ISO/TS 13136:2012 (E) Annex E
	wzx-O26-rev	AGC AGG CTT TTA TAT TCT CCA ACT TT		
	wzx-O26- probe	FAM-CCC CGT TAA ATC AAT ACT ATT TCA CGA GGT TGA-TAMRA		
<b>wzy (O145)</b>	O145wzy2-F	ATA TTG GGC TGC CAC TGA TGG GAT	310	(Fratamico et al., 2009)
	O145wzy2-R	TAT GGC GTA CAA TGC ACC GCA AAC		
	O145wzy-P	FAM-AGC AGT GGT TCG CGC ACA GCA TGG T-BHQ1		
<b>wzx (O103)</b>	wzx-O103-F	CAA GGT GAT TAC GAA AAT GCA TGT-3'	99	ISO/TS 13136:2012 (E) Annex E
	wzx-O103-R	GAA AAA AGC ACC CCC GTA CTT AT		
	wzx-O103-probe	FAM-CAT AGC CTG TTG TTT TAT-MGB		

\* I sekvensen er Y (C, T), S er (C, G), W er (A, T), R er (A, G) og M er (A, C).

\*\* LNA teknologi

En intern amplifikasjonskontroll (IAC) er tilsatt for påvisning av *eae*, og benyttes for å kunne oppdage falsk-negative resultater som blant annet kan skyldes PCR-inhibitorer, og for å kontrollere at DNAet fungerer som det skal i PCR-reaksjonen. Reagenser til IACen kommer i et kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific), og består av primere og probe (10x Exogenous Internal Positive Control (Exo IPC) Mix), IAC mål-DNA (Exo IPC DNA) og en blokkløsning (10x Exo IPC Block).

## 2.2.2 DNA ekstraksjon

### 2.2.2.1 DNA ekstraksjon ved koking

DNA ekstraksjon ved koking ble utført ved at en podeøse kolonimateriale ble suspendert i et 1,5 ml rør bestående av 100 µl milliQ vann. Rørene ble plassert på en varmeblokk (Techne, Staffordshire, England) og kokt ved 100 °C i 10 min, før sentrifugering (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) ved 10 000 rpm i ytterligere 10 min. Ved denne ekstraksjonsmetoden lyserer cellen slik at DNAet slipper ut og legger seg i supernatanten ved sentrifugering. DNAet ble benyttet som templat for real-time PCR.

### 2.2.2.2 DNA ekstraksjon med QIAamp DNA Mini Kit

DNA fra *stx*<sub>2a</sub>-positive isolater ble ekstrahert ved QIAamp DNA Mini Kit® (Qiagen, Hilden, Germany), en metode som resulterer i et renere og mer stabilt DNA. DNA ekstraksjonen ble utført i henhold til Qiagens protokoll for bakterier «DNA Purification from Tissues». I punkt 11 i prosedyren ble det benyttet 100 µl 10mM (0,01 M) Tris som elueringsbuffer i stedet for Buffer AE.

Etter DNA-ekstraksjon ble NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) benyttet til å måle DNA-konsentrasjon- og renhet.

DNA-ekstraktet ble lagret ved -18 °C, og senere brukt som templat for real-time PCR og konvensjonell PCR, samt til innsendelse for helgenomsekvensering (punkt 2.2.7.3).

### 2.2.3 Screening av kjøttdeigprøver for tilstedeværelse av *stx*<sub>2a</sub> med real-time PCR

På forhånd hadde DNA ekstrahert fra kjøttdeigprøver blitt brukt som templat for screening med real-time PCR for tilstedeværelse av *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub> og *eae*. Prøver med påvist *stx*<sub>2</sub>-gen ble videre screenet for subtype *stx*<sub>2a</sub>. En reaksjonsblanding (totalt volum 20 µl) bestående av 10 µl Brilliant III Ultra-Fast QPCR Master Mix, 0,66 µl 10 µM forward primer (Exiqon, Vedbaek, Denmark), 0,66 µl 10 µM revers primer (Exiqon, Vedbaek, Denmark), 0,2 µl 10 µM probe (Exiqon, Vedbaek, Denmark), 3,48 µl milliQ vann og 5 µl DNA templat ble brukt for hver reaksjon.

En oversikt over primere og prober er vist i tabell 3. Prøvene ble amplifisert med real-time PCR (Stratagene Mx3005P) som beskrevet i tabell 2, og analysert i MxPro-programvaren.

### 2.2.4 Isolering av *stx*<sub>2a</sub>-positive *E. coli* fra PCR-positive kjøttdeigprøver

Det ble gjort forsøk på å isolere bakterier fra prøver med *stx*<sub>2a</sub>-positivt PCR-resultat. Oppformert buljong lagret på -80 °C ble tint i vannbad ved 50 °C til prøvene akkurat var tint (ca. 1 minutt). For å oppnå best mulig vekst ble prøvene resuscitert ved inkubering i romtemperatur i 1 time, før 1 ml ble overført til 9 ml BPV-ISO (Bufret pepton vann, Medieproduksjon, Veterinærinstituttet) og inkubert ved 37 °C ± 1 °C i 2-3 timer (Ternent et al., 2004). Den ferdige kulturen ble blandet med en Vortexer (Scientific Industries, USA) før

det ble lagd en fortynningsrekke fra  $10^0$  til  $10^{-3}$  (1 ml kultur til 9 ml BPV-ISO). Deretter ble 10  $\mu$ l fra  $10^{-2}$  og  $10^{-3}$  fortynninger sådd ut på CHROMagar™ O157 (Medieproduksjon, Veterinærinstituttet) og SMACagar (Sorbitol Mac Conkey agar) (Medieproduksjon, Veterinærinstituttet) skåler med en podeøse. Skålene ble inkubert ved  $37\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$  i 18-24 timer.

Videre ble ISO/TS 13136:2012, Annex F – isolering av STEC stammer, fulgt med noen modifikasjoner; 50 enkeltkolonier med karakteristisk *E.coli* morfologi ble plukket, punktinokulert på en blodagarskål (Medieproduksjon, Veterinærinstituttet) og poollet i 1,5 ml Eppendorfrør med 100  $\mu$ l milliQ vann (5 eller 10 kolonier per pool). Den punktinokulerte blodagarskålen ble inkubert over natten ved  $37\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ . DNA fra poolene ble ekstrahert ved koking (som beskrevet i punkt 2.2.3.1) og brukt som templat for påvisning av *stx*<sub>2a</sub>-gener med real-time PCR (PCR-programmet er vist i tabell 2). Dersom en pool var positiv ble DNA fra enkeltkoloniene testet for tilstedeværelse av *stx*<sub>2a</sub> på samme måte som beskrevet over. Gjeldende koloni ble også sådd ut på blodagar. Pooler der det ikke var mulig å påvise *stx*<sub>2a</sub>-genet ble rapportert som PCR-negative (ingen Ct-verdi).

Identifisering av isolater ble gjort med MALDI-TOF som beskrevet i punkt 2.2.6, før *stx*<sub>2a</sub>-positive isolater ble slemmet opp i frysebuljong (Kryorør bestående av HIB med 15 % glyserol, Medieproduksjon, Veterinærinstituttet) og lagret på  $-80^\circ\text{C}$  for senere bruk.

### **2.2.5 Isolering av *stx*- og *eae*-positive *E.coli* fra PCR-positive kjøttdeigprøver**

Det ble gjort forsøk på å isolere *E. coli* som var positive for *stx*- og *eae*-gener, og som var O-gruppe negative på screeningen. Dette ble gjort på samme måte som prosedyren for de *stx*<sub>2a</sub>-positive matriksprøvene (punkt 2.2.4). Dersom en pool var positiv for både *stx* og *eae* ble DNA fra enkeltkolonier testet, og ved tilstedeværelse av begge gener i én/samme koloni (*stx*<sub>1</sub>/*stx*<sub>2</sub> og *eae*) var prøven å regne som positiv. Ved påvisning av *stx*-virulensgener ble det brukt en *stx*<sub>1</sub>/*stx*<sub>2</sub>-duplex PCR. Ved amplifisering av *eae* ble det inkorporert en intern amplifikasjonskontroll, IAC (TaqMan®, Applied Biosystems), som beskrevet i punkt 2.2.1.2.

PCR-programmet er vist i tabell 2. Primere og prober, samt mastermikssammensetning er å finne i henholdsvis tabell 3 og 4. De prøvene der det var mulig å isolere *E. coli* med *stx*- eller *eae*-genet ble slemmet opp i frysebuljong (Kryorør bestående av HIB med 15 % glyserol, Medieproduksjon, Veterinærinstituttet) og lagret på  $-80^\circ\text{C}$ .

### 2.2.6 Identifisering av *E. coli* med MALDI-TOF

Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) er en etablert metode for identifisering av mikroorganismer. Isolater ble identifisert med MALDI-TOF ved at ferske kolonier sådd ut på blodagar og inkubert ved 37 °C over natt. En enkeltkoloni ble plukket med en tannpirker og overført til en stålplate. Det ble tilsatt 1 µl 70 % maursyre før platen ble satt til å tørke. Så ble 1 µl MALDI-TOF matrix (Bruker, Bremen, Germany) tilsatt til det tørre kolonimateriale, og når stålplaten var tørr ble den plassert i MALDI-TOF instrumentet (MALDI Biotyper Microflex, Bruker). MALDI Biotyper programvaren (Bruker, Bremen, Germany) sammenligner prøven opp mot en database, og angir med logaritmen til et tall mellom 0 og 1000, hvilken slekt og art bakterien mest sannsynlig tilhører. En treffverdi («score value»)  $\geq 2$  vurderes som pålitelig.

### 2.2.7 Karakterisering av *stx*<sub>2a</sub>-positive isolater

*stx*<sub>2a</sub>-positive isolater ble karakterisert ved hjelp av både fenotypiske metoder (serotyping) og genotypiske/molekylære metoder (konvensjonell- og real-time PCR).

#### 2.2.7.1 O-gruppe typing

Bestemmelse av de fem vanligste serogruppene; O157, O111, O26, O103 og O145, ble gjort med real-time PCR. For kontrollstammer, se tabell 1. PCR-program og primere/prober som ble benyttet er oppgitt i henholdsvis tabell 2 og 3. Sammensetning av mastermix for hver av de fem O-gruppene er beskrevet i tabell 4.

Bestemmelse av O-antigenene O45, O55, O91, O104, O113, O121, O128 og O146 ble utført serologisk. Metoden baserer seg på prinsippet om at reaksjon mellom antigen og antistoff agglutinerer, dvs. klumping av antistoffer og antigener; når kokt bakteriekultur blandes sammen med antiserum spesifikt for bakteriens overflateantigener bindes cellene sammen via antigen-antistoffbindinger. Disse kan sees som agglutinasjoner.

Heart infusion buljong (HIB) ble inokulert med kolonimateriale og inkubert ved 37 °C  $\pm$  1 °C. Etter 18-24 timer ble HIB-buljongen kokt, avkjølt til romtemperatur og tilsatt til brønner på en mikrotiterplate sammen med respektivt antiserum. Platen ble dekt med tape og inkubert ved

50 °C ± 1 °C, og etter 18-24 timer ble resultatene lest av. Agglutineringssees som et jevnt dekke i hele brønnen, og tolkes som positiv reaksjon, mens en velavgrenset «knapp» i bunnen av brønnen tyder på negativ reaksjon.

**Tabell 4.** Sammensetning av mastermikser for amplifisering av virulensgener *stx*<sub>1</sub>/*stx*<sub>2</sub> og *eae*, og O-antigener; O157, O111, O26, O103 og O145 med real-time PCR

Komponent (µl)	<i>stx</i> <sub>1</sub> / <i>stx</i> <sub>2</sub> *	<i>eae</i> **	O157	O111	O26	O103	O145
Brilliant III Ultra-Fast QPCR Master Mix	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
Forward primer (50 µM)	0,5	0,3	0,25	0,5	0,25	0,25	0,3
Revers primer (50 µM)	0,5	0,3	0,25	0,5	0,25	0,25	0,3
Probe (5 µM)	1,0*	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
milliQ vann	4,5	2,9	6	5,5	6	6	5,9
DNA templat	5	5	5	5	5	5	5
Totalt volum	25	22	25	25	25	25	25

\* For *stx*-typing benyttes en *stx*<sub>1</sub>/*stx*<sub>2</sub> primer-duplex. Det tilsettes 1 µl probe FAM og 1 µl probe HEX for henholdsvis *stx*<sub>1</sub> og *stx*<sub>2</sub>.

\*\* Her er det inkorporert en intern amplifikasjonskontroll (IAC) bestående av 2,5 µl 10x Exo IPC Mix og 0,5 µl Exo IPC DNA per reaksjon som tilsettes mastermiksen, og det totale volumet ender på 25 µl. Det benyttes i tillegg en ekstra brønn for block der 5 µl 10x Exo IPC Block tilsettes i stedet for DNA templat.

### 2.2.7.2 Virulens karakterisering

Ved bruk av real-time PCR skulle *stx*<sub>2a</sub>-positive isolater testes for tilstedeværelse av *stx*<sub>1</sub>- og *eae*-virulensgener. Mastermikserkomposisjonen er beskrevet i tabell 4. For referansestammer se tabell 1, for PCR-program se tabell 2 og for primere og prober se tabell 3.

Isolatene der *stx*<sub>1</sub> ble påvist ble videre subtypet. Subtyping av *stx*<sub>1a</sub>, *stx*<sub>1c</sub> og *stx*<sub>1d</sub> ble utført med konvensjonell PCR etterfulgt av gelelektroforese.

PCR-reaksjonen ble utført i en 25 µl reaksjonsblanding bestående av: 12 µl Mastermix (HotStart, Qiagen), 1 µl av hver av de fire primerne for *vtx1c* og *vtx1d* (5 µM), 2 µl av hver av de to primerne for *vtx1a* (5 µM), 3 µl milliQ vann og 2 µl DNA-templat. Samtlige primere

kan brukes i en PCR-triplex for subtyping av *stx*<sub>1</sub>, og en oversikt over disse er vist i tabell 5. PCR ble kjørt under forholdene som vist i tabell 6 (BIO-RAD T100™ Thermal Cycler).

PCR-produktene ble visualisert med gelelektroforese. 10 µl PCR-produkt ble blandet med 2,5 µl gelloading buffer (6 x DNA Gel Loading Dye, Thermo Fisher Scientific) og separert på 1,5 % agarosegel (lagd i TBE-buffer) og farget med 10 µl Gelred (Thermo Fisher Scientific). Gelen ble kjørt på 80 V og 400 mA i 90 minutter. GeneRuler™ 50 bp DNA ladder (Thermo Fisher Scientific) ble brukt som størrelsesmarkør. Gelen ble fotografert med BIO-RAD Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS+ Imaging System (Bio-Rad Laboratories).

For ytterligere detaljer om metoden henvises det til (Scheutz et al., 2012a).

**Tabell 5.** Primere benyttet til *stx*<sub>1</sub>-subtyping

Subtype	Primer*	Sekvens (5'-3')	Amplikon størrelse (bp)	Referanse
<i>stx</i> <sub>1a</sub>	<i>vtx1a</i> -F1	CCTTTCCAGGTACAACAGCGTT	478	(Scheutz et al., 2012a)
	<i>vtx1a</i> -R2	GGAAACTCATCAGATGCCATTCTGG		
<i>stx</i> <sub>1c</sub>	<i>vtx1c</i> -F1	CCTTTCCTGGTACAACACTGCGGTT	252	
	<i>vtx1c</i> -R1	CAAGTGTTGTACGAAATCCCCTCTGA		
<i>stx</i> <sub>1d</sub>	<i>vtx1d</i> -F1	CAGTTAATGCGATTGCTAAGGAGTTTAC C	203	
	<i>vtx1d</i> -R1	CTCTTCCTCTGGTTCTAACCCCATGATA		

\* I tabellen er *vtx* = *stx*

**Tabell 6.** PCR-program for subtyping av *stx*<sub>1</sub>

Målgjen	Konvensjonell PCR-program	Tid (sekunder)	Temperatur (°C)	
<b>Multiplex</b> <i>stx</i> <sub>1a</sub> , <i>stx</i> <sub>1c</sub> , <i>stx</i> <sub>1d</sub>	Trinn 1: Taq aktivering	900	95	
	PCR 35 sykler	Trinn 2	50	94
		Trinn 3	40	62
		Trinn 4	60	72
	Trinn 5	180	72	
	Trinn 6: Lagring av PCR -produkt før kjøring på agarosegel	∞	4	

### **2.2.7.3 Helgenomsekvensering**

Som beskrevet i punkt 2.2.2.2 ble DNA ekstrahert ved QIAamp DNA Mini Kit® (Qiagen, Hilden, Germany) og DNA-kvalitet ble målt med NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA). DNA fra to isolater (se tabell 9) ble sendt til GATC Biotech for helgenomsekvensering.

### **2.2.7.4 Analyse av helgenomsekvenser**

Rådata mottatt fra GATC Biotech ble kvalitetskontrollert i programmet FastQC og deretter ble sekvensene trimmet for å fjerne adaptersekvenser i Trimmomatic (Bolger et al., 2014). De trimmede sekvensene ble deretter assemblert til contigs i Spades (Bankevich et al., 2012). Preprosesseringen av dataene var ikke en del av oppgaven, og derfor utført av andre. Web-basert verktøy fra Center for Genomic Epidemiology (CGE) har blitt benyttet for å analysere dataene, tilgjengelig på <http://www.genomicepidemiology.org/>. Assemblert sekvens fra Spades ble benyttet. Serotype og virulensgener ble identifisert henholdsvis ved hjelp av serveren SerotypeFinder 1.1 (Joensen et al., 2015) og VirulenceFinder 1.5 (Joensen et al., 2014).



### 3. Resultater

#### 3.1 Screening av DNA ekstrahert fra kjøttdeigprøver for påvisning av *stx*<sub>2a</sub>

Tidligere screening av de 308 kjøttdeigprøvene viste at *stx*<sub>2</sub>-genet ble påvist i 71 (23 %) av prøvene. Disse 71 *stx*<sub>2</sub>-positive prøvene ble videre screenet for *stx*<sub>2a</sub>. Resultatene viste at *stx*<sub>2a</sub>-genet var tilstede i ni av de 71 (12,7 %) prøvene (Ct-verdier 31,55-42,11).

Vedlegg 1 viser en oversikt over resultatene fra real-time PCR. På screeningen er Ct-verdier kun oppgitt for *stx*<sub>2a</sub>.

#### 3.2 Isolering av *stx*<sub>2a</sub>-positive *E. coli*

Screening med real-time PCR viste at *stx*<sub>2a</sub>-genet var tilstede i totalt ni kjøttdeigprøver. *stx*<sub>2a</sub>-positive *E. coli* ble forsøkt isolert fra PCR-positive matriksprøver (oppformert buljong lagret på -80 °C). Resultatene viste at det var mulig å isolere *stx*<sub>2a</sub>-positive *E. coli* fra to av de ni prøvene (prøve 2017-22-212 og 2017-22-576). Totalt ti *stx*<sub>2a</sub>-positive kolonier ble isolert og identifisert med MALDI-TOF. Fra de resterende syv PCR-positive matriksprøvene var det ikke mulig å isolere *stx*<sub>2a</sub>-positive kolonier.

Tabell 7 viser en oversikt over de *stx*<sub>2a</sub>-positive isolatene, med informasjon om prøvenummer, type agarmedium, kolonimorfologi og resultater fra MALDI-TOF. Tabellen viser at det ble isolert fem *stx*<sub>2a</sub>-positive kolonier, både fra prøve 2017-22-212 og 2017-22-576. Vedlegg 2 viser kolonimorfologi på to ulike agarmedium. MALDI-TOF analysen bekreftet ni av de ti undersøkte isolatene som *E. coli* (en fullstendig oversikt over MALDI-TOF resultatene er vist i vedlegg 3).

**Tabell 7.** En oversikt over *stx*<sub>2a</sub>-positive isolater

#	Prøve ID	Koloni nr.	Isolert fra	Kolonimorfologi	MALDI-TOF
1	2017-22-212	10	CHROMagar	Blå	<i>E. coli</i>
2	2017-22-212	15	CHROMagar	Blå	<i>E. coli</i>
3	2017-22-212	37	SMACagar	Stor, lys rosa	<i>E. coli</i>
4	2017-22-212	38	SMACagar	Stor, lys rosa	<i>E. coli</i>
5	2017-22-212	44	SMACagar	Stor, lys rosa	<i>E. coli</i>

6	2017-22-576	23	CHROMagar	Blå med mørk prikk	<i>E. coli</i>
7	2017-22-576	29	SMACagar	Mørk rosa	<i>E. coli</i>
8	2017-22-576	32	SMACagar	Rosa med mørk prikk	<i>Enterobacter asburiae</i>
9	2017-22-576	39	SMACagar	Stor, lys rosa	<i>E. coli</i>
10	2017-22-576	47	SMACagar	Stor, lys rosa	<i>E. coli</i>

### 3.3 Isolering av *stx*- og *eae*-positive *E. coli*

På forhånd hadde 308 kjøttdeigprøver blitt screenet for tilstedeværelse av *stx*- og *eae*-gener. Prøver positive for begge virulensgenene ble testet for serogruppe-assosierte gener (O26, O103, O145 og O157), og de som var negative for undersøkte O-grupper skulle undersøkes videre i denne oppgaven. *E. coli* med gener for *stx* og *eae* ble forsøkt isolert fra 15 kjøttdeigprøver (4,9 % av det totale antallet). Pooler med DNA fra isolatene ble brukt som templat i real-time PCR, og resultatene viste at *stx*- og *eae* ble påvist i tre av prøvene (2017-22-576, 2017-22-709 og 2017-22-979). Resultatene viser også at ingen av de isolerte koloniene hadde tilstedeværelse av både *stx*- og *eae*-gener, og siden dette var et kriterium for videre karakterisering ble ingen av isolatene inkludert videre.

Tabell 8 gir en oversikt over prøvenummer, type agarmedium og morfologien til koloniene som ble isolert. Tabellen viser at to isolater var både *stx*<sub>1</sub>- og *stx*<sub>2</sub>-positive.

**Tabell 8.** En oversikt over *stx*- eller *eae*-positive isolater

#	Prøve ID	Koloni nr.	<i>stx</i> <sub>1</sub>	<i>stx</i> <sub>2</sub>	<i>eae</i>	Isolert fra	Kolonimorfologi
1	2017-22-576	31	-	-	+	SMACagar	Rosa med mørk prikk
2	2017-22-576	32	+	+	-	SMACagar	Stor, lys rosa
3	2017-22-576	33	-	-	+	SMACagar	Stor, lys rosa
4	2017-22-576	36	-	-	+	SMACagar	Stor, lys rosa
5	2017-22-709	21	-	-	+	CHROMagar	Blå
6	2017-22-709	27	-	-	+	SMACagar	Stor, lys rosa
7	2017-22-709	28	-	+	-	SMACagar	Stor, lys rosa
8	2017-22-979	36	-	-	+	SMACagar	Stor, lys rosa
9	2017-22-979	37	-	-	+	SMACagar	Stor, lys rosa
10	2017-22-979	40	+	+	-	SMACagar	Stor, lys rosa

### 3.4 Karakterisering av *stx*<sub>2a</sub>-positive *E. coli*

Totalt fire *stx*<sub>2a</sub>-positive *E. coli*-isolater fra to ulike kjøttdeigprøver (2017-22-212 og 2017-22-576) ble videre karakterisert. Disse ble isolert fra to ulike agarskåler, og der flere kolonier hadde lik morfologi på samme agarmedium, ble den med lavest Ct-verdi valgt.

#### 3.4.1 O-gruppe typing

Påvisning av de fem vanligste O-serogruppene assosiert med sykdom hos mennesker; O157, O111, O26, O103 og O145, ble gjort med real-time PCR. Resultatene viste at de fire *stx*<sub>2a</sub>-positive *E. coli*-isolatene var negative for samtlige O-grupper som ble undersøkt.

Også STEC O45, O55, O91, O104, O113, O121, O128 og O146 er assosiert med sykdom hos mennesker. De *stx*<sub>2a</sub>-positive isolatene ble derfor også undersøkt for disse overflateantigenene ved hjelp av en agglutineringsstest med antisera. Resultatene viste at ingen av isolatene kunne serotypes med tilgjengelig antisera; det ble ikke påvist noen O-grupper (se vedlegg 4).

#### 3.4.2 Virulens karakterisering

De *stx*<sub>2a</sub>-positive isolatene ble ytterligere screenet for *stx*<sub>1</sub>- og *eae*-virulensgener. Real-time PCR-resultatene viste at samtlige *E. coli*-isolater var *stx*<sub>1</sub>-positive og *eae*-negative.

Videre ble isolatene *stx*<sub>1</sub>-subtypet. Resultatene viste at *stx*<sub>1a</sub>-genet ble påvist for alle de fire *stx*<sub>2a</sub>-positive isolatene. *stx*<sub>1c</sub> og *stx*<sub>1d</sub> ble ikke identifisert (se vedlegg 5).

### 3.5 Oppsummering: Karakterisering av fire *stx*<sub>2a</sub>-positive *E. coli*

Tabell 9 oppsummerer resultatene fra karakteriseringen av fire *stx*<sub>2a</sub>-positive *E. coli* isolert fra to ulike kjøttdeigprøver. Ingen av de undersøkte O-gruppene ble påvist. Samtlige isolater var *stx*<sub>1a</sub>- og *stx*<sub>2a</sub>-positive, og *stx*<sub>1c</sub>-, *stx*<sub>1d</sub>- og *eae*-negative. I tillegg har to isolater blitt sendt til helgenomsekvensering.

**Tabell 9.** Karakterisering av *stx*<sub>2a</sub>-positive *E. coli* isolert fra norsk kjøttdeig

Prøve ID	Koloni nr.	Morfologi	O-gruppe	Virulensgener					WGS**
				<i>stx</i> <sub>1a</sub>	<i>stx</i> <sub>1c</sub>	<i>stx</i> <sub>1d</sub>	<i>stx</i> <sub>2a</sub>	<i>eae</i>	
2017-22-212	15	Blå på CHROM	IP*	+	-	-	+	-	Ja
2017-22-212	44	Stor, lys rosa på SMAC	IP	+	-	-	+	-	Nei
2017-22-576	23	Blå med mørk prikk på CHROM	IP	+	-	-	+	-	Ja
2017-22-576	39	Stor, lys rosa på SMAC	IP	+	-	-	+	-	Nei

\* IP = ikke påvist

\*\* WGS = Whole genome sequencing

### 3.6 Helgenomsekvensering

DNA fra to isolater ble sendt til GATC Biotech, og karakterisert med webverktøyene SerotypeFinder og VirulenceFinder. Resultatene fra helgenomsekvenseringen er vist i tabell 10.

Prøve nr. 212-15 (kjøttdeigprøve 2017-22-212, koloni nr. 15) har blitt estimert til å være av serotype O22:H8, i tillegg til å inneha flere virulensgener som koder for ulike proteiner. Prøve nr. 576-23 (kjøttdeigprøve 2017-22-576, koloni nr. 23) har serotype O153/O178:H19, og er også bærer av ulike gener som koder for forskjellige virulensfaktorer. Resultatene fra helgenomsekvenseringen bekreftet også at begge isolatene var *stx*<sub>1a</sub>- og *stx*<sub>2a</sub>-positive, og negative for *stx*<sub>1c</sub>-, *stx*<sub>1d</sub>- og *eae*-gener.

**Tabell 10.** Helgenomsekvensering av *stx*<sub>2a</sub>-positive *E. coli*-isolater

Prøve nr.	Serotype	Virulensgener	Proteinfunksjon
212-15	O22:H8	<i>stx</i> <sub>1a</sub>	Shigatoksin, subtype 1a
		<i>stx</i> <sub>2a</sub>	Shigatoksin, subtype 2a
		<i>ehxA</i>	Enterohemolysin
		<i>iha</i>	Adheranse
		<i>iss</i>	Økt overlevelse i serum
		<i>lpfA</i>	Fimbrier
		<i>celb</i>	Endonuklease colicin E2
		<i>cma</i>	Colicin M
		<i>cba</i>	Colicin B
		<i>subA</i>	Subtilase toksin subenhet
		<i>gad</i>	Glutamat dekarboksylase
		<i>espP</i>	Ekstracellulær serinprotease, plasmidkodet
576-23	O153/O178:H19	<i>stx</i> <sub>1a</sub>	Shigatoksin, subtype 1a
		<i>stx</i> <sub>2a</sub>	Shigatoksin, subtype 2a
		<i>ehxA</i>	Enterohemolysin
		<i>iha</i>	Adheranse
		<i>iss</i>	Økt overlevelse i serum
		<i>lpfA</i>	Fimbrier
		<i>gad</i>	Glutamat dekarboksylase

## 4. Diskusjon

*E. coli*-stammer som bærer *stx*-gener har evnen til å produsere Shigatoksin. Spesielt STEC med genvarianten *stx*<sub>2a</sub> har vist å kunne forårsake alvorlig sykdom som hemorrhagisk kolitt og HUS hos menneske. Til tross for dette er STEC med subtype *stx*<sub>2a</sub> lite undersøkt i mat og dyr. Hensikten med denne studien var derfor å undersøke forekomsten av *stx*<sub>2a</sub>-genet i norsk storfekjøttdeig, og forsøke å isolere og karakterisere *stx*<sub>2a</sub>-positive STEC. Det er sterk assosiasjon mellom STEC-stammer som er bærere av *eae*-genet og evnen til å forårsake alvorlig sykdom hos mennesker (Mora et al., 2007), og derfor ble det også forsøkt å isolere bakterier positive for *stx*- og *eae*.

### 4.1 Screening av kjøttdeigprøver for tilstedeværelse av *stx*<sub>2a</sub>-genet

Ved screening av 71 *stx*<sub>2</sub>-positive kjøttdeigprøver for tilstedeværelse *stx*<sub>2a</sub>, indikerte PCR-resultatene i denne studien at genet var tilstede i 12,7 % av prøvene (totalt ni kjøttdeigprøver). Dette kan tilsynelatende virke høyt, men påfølgende isolering av STEC er nødvendig for å bekrefte at PCR-positivt resultat er fremkalt av virulensgener som også er tilstede i de isolerte koloniene (Auvray et al., 2009).

Påvisning av STEC fra næringsmidler er spesielt utfordrende fordi selv et fåtall bakterier (< 100) er nok til å forårsake alvorlig sykdom hos menneske. Bakteriens lave infektive dose innebærer også at vekst i næringsmidler ikke er nødvendig for å forårsake infeksjon (Livsmedelsverket, 2016). Sensitive laboratoriemetoder som kan påvise et lavt antall STEC fra matriksprøver er nødvendig, men for å oppnå detekterbare nivåer av bakterien er et oppformeringssteg avgjørende for påvisning og isolering (Fratamico et al., 2009; Verhaegen et al., 2016). Ved oppformering økes antall STEC ved å inkubere prøvematerialet i et ikke-selektivt næringsmedium; BPV brukes blant annet i tilfeller der det er forventet lave nivåer (eks pga. mangfoldig mikroflora i prøven), for å resuscitere stressede STEC eller for oppformering fra fryst tilstand (ISO/TS13136:2012(E); Verhaegen et al., 2016).

Positivt PCR-resultat kan blant annet være fremkalt av frie Shigatoksin-kodende bakteriofager (Stx-fager) (EFSA, 2013). Stx-fagene bærer *stx*-gener, og dersom en apatogen *E. coli* tar opp disse bakteriofagene ved transduksjon kan denne gjøres om til en patogen STEC. Studier har vist at Stx-fager kan finnes fritt (frie Stx-fager) i mat og miljø forurenset med feces (Martinez-Castillo et al., 2013). Stx-fagene kan fungere som «overlevelseskapsler» for *stx*-gener, og på

den måten kan de opprettholdes over lang tid utenfor en vertscelle. Stx-fagene i denne formen kan forbli infektive, og kan senere tas opp av en mottakelig vert. Dette kan være et problem spesielt i næringsmiddelindustrien fordi Stx-fagene ikke nødvendigvis blir inaktivert (er mer resistente) med samme behandling nødvendig for å fjerne bakteriene (Bergan et al., 2012). Stx-fagenes antall og bestandighet kan være en viktig årsak til genetisk variasjon og utvikling av nye STEC-stammer (Muniesa et al., 1999). Man kan altså ikke utelukke at PCR-positive resultater for *stx* skyldes tilstedeværelse av frie Stx-fager (Martinez-Castillo et al., 2013).

Dersom det er døde bakterier som hadde *stx*-genet tilstede i prøven, vil også disse kunne gi positivt PCR-signal. I tillegg er det også vist at *stx*-gener kan mistes (Karch et al., 1992). Evnen til å ta opp og miste *stx*-gener endrer dermed bakteriens patogenitet, og en STEC-stamme som har mistet sitt Stx-fag-genom kan bli ufarliggjort (Bielaszewska et al., 2007; Feng et al., 2001).

## 4.2 Isolering

Resultatene fra denne studien viste at *stx*<sub>2a</sub>-positive STEC ble isolert fra to av ni kjøttdeigprøver. Fra de syv resterende PCR-positive prøvene var det ikke mulig å isolere *stx*<sub>2a</sub>-positive kolonier. Dette gir en isolasjonsrate for *stx*<sub>2a</sub> på 22 % av de *stx*<sub>2a</sub>-positive prøvene. Det finnes ikke, så vidt vi vet, lignende studier på forekomsten av *stx*<sub>2a</sub> i kjøttdeig eller for den saks skyld næringsmidler generelt, slik at sammenlignbare data ikke er tilgjengelig.

Isolering er nødvendig for å bekrefte at det PCR-positive resultatet er fremkalt av gener som også er tilstede i levende bakterieceller (ISO/TS13136:2012(E)). Det er problematisk å isolere STEC fra PCR-positive prøver, og isolasjonsraten fra komplekse matriksprøver er ofte lav (Auvray et al., 2009; Perelle et al., 2007). Det er også nødvendig med påvisningsmetoder som kan skille STEC fra apatogene *E. coli*. Spesielt non-O157 STEC er vanskelig å isolere da disse ikke har typiske biokjemiske egenskaper som gjør at de skiller seg fra andre *E. coli*. For STEC O157:H7 er isolasjonsraten generelt høyere da det finnes selektive medium spesifikt for denne serotypen. I tillegg er IMS en effektiv metode for å isolere O157 fra bakgrunnsflora (EFSA, 2013). IMS er derimot mindre effektivt for isolering av non-O157 STEC-stammer (Fratamico et al., 2009).

*E. coli* med ulik morfologi kan være bærere av *stx*-gener, så for å øke seleksjon av potensielle STEC (øke sjansen for å oppdage mistenkelige *E. coli*-kolonier) ble to forskjellige medier

benyttet. I dette forsøket ble *stx*<sub>2a</sub>-positive STEC isolert fra både CHROMagar™ O157 og SMACagar. På CHROMagar™ O157 var kolonimorfologien enten blå eller blå med en mørk prikk, og på SMACagar var morfologien enten store og lyserosa eller små og rosa med en mørk prikk (se figur 6.2, vedlegg 2). Det samme var tilfellet for de *stx*- og *eae*-positive isolatene. Dette kan betraktes som typisk *E. coli*-morfologi på SMACagar og CHROMagar™ O157, men fenotypisk variasjon på ulike medier forekommer og *stx*<sub>2a</sub>-positive STEC kan ikke skilles fra andre *E. coli* ved hjelp av kolonimorfologi. Kolonier med ulike morfologi bør derfor vurderes som mistenkelige og inkluderes ved isolering av STEC.

Lav STEC-isolasjonsrate av *stx*-positive screeningprøver har også vært tilfellet i tidligere studier (Hoang Minh et al., 2015). En mulig årsak til dette er at STEC er tilstede i et svært lavt antall i forhold til bakgrunnsfloraen i prøven, eller som nevnt tidligere tilstedeværelse av døde bakterier eller frie Stx-fager i kjøttdeigprøven (Hoang Minh et al., 2015).

Produksjon av Shigatoksin og intimin er de to viktigste virulensmekanismene til en typisk STEC-stamme (Paton & Paton, 1998), og screening for tilstedeværelse eller fravær *stx*- og *eae*-gener er innledende steg i påvisningen av patogene STEC. I denne studien ble det forsøkt å isolere bakterier positive for både *stx*- og *eae*-gener. Resultatene viste at *stx*- og *eae*-positive *E. coli* ble isolert fra tre av de 15 prøvene i pooler. Det var derimot ingen av isolatene som hadde tilstedeværelse av både *stx*- og *eae*-genet i samme koloni. Dette understreker viktigheten av å isolere bakteriene; ved deteksjon av flere virulensgener i samme prøve betyr ikke dette nødvendigvis at den samme bakterien bærer gener for flere av virulensfaktorene (Kagkli et al., 2011; Madic et al., 2009). Prøver som er positive på PCR, og der man ikke greier å isolere bakterier som inneholder virulensgener, er utfordrende både for myndigheter, produsenter og rådgivere.

### 4.3 Identifisering av *E. coli*

MALDI-TOF ble benyttet for å identifisere isolatene som *E. coli*. Da *stx*<sub>2a</sub>-positive isolater ble identifisert med MALDI-TOF viste resultatene at det ene isolatet var en *Enterobacter asburiae*. En mulig forklaring på dette kan være at *Enterobacter* har et gen som ligner *stx*<sub>2a</sub>-genet og at primeren derfor binder uspesifikt og gir et positivt PCR-resultat. Eventuelt kan det ha skjedd en kontaminering av skålene med *Enterobacter asburiae*, slik at det er en blanding av *E. coli* og *E. asburiae* som er testet på PCR.



Denne verifisering er viktig da *stx*<sub>2</sub>-subtyper er vist å kunne være tilstede i andre *Enterobacteriaceae* enn *E. coli*, som *Citrobacter freundii* (*stx*<sub>2d</sub>), *Enterobacter cloacae* (*stx*<sub>2a</sub>) og *Escherichia albertii* (*stx*<sub>2d</sub>), i tillegg til *Acinetobacter haemolyticus* (*stx*<sub>2a</sub>) (Scheutz et al., 2012b). Dessuten kan positive PCR-signaler skyldes at primeren har dannet uspesifikke bindinger til DNA-templatet; dersom gensekvensen er svært lik kan primer binde og amplifisere «feil» gen. For eksempel har *stx*<sub>2a</sub> og *stx*<sub>2c</sub> nært beslektede DNA-sekvenser (Jinnerot et al., 2018).

#### 4.4 Karakterisering av *stx*<sub>2a</sub>-positive STEC

Forskjellige stammer av STEC representerer ulik risiko for alvorlig sykdom, og variant av Shigatoksin/Stx-subtype, i kombinasjon med tilstedeværelse av andre virulensfaktorer er vist å gjøre noen stammer mer virulente enn andre. Karakterisering av isolater er derfor essensielt for å vurdere den mulige risikoen.

I denne studien ble fire *stx*<sub>2a</sub>-positive *E. coli*-isolater fra to ulike prøver karakterisert, og resultatene fra O-gruppe typingen viste at ingen av de fem vanligste serogruppene assosiert med sykdom ble påvist. Siden humanpatogene STEC ikke er begrenset til kun disse serogruppene ble også O-antigenene O45, O55, O91, O104, O113, O121, O128 og O146 undersøkt, men heller ikke disse serogruppene ble påvist hos isolatene.

To av de *stx*<sub>2a</sub>-positive isolatene ble sendt til sekvensering for videre karakterisering, og resultatene fra helgenomsekvensering viste at prøve nr. 212-15 (kjøttdeigprøve 2017-22-212, koloni nr. 15) ble estimert til å være av serotype O22:H8, og prøve nr. 576-23 (kjøttdeigprøve 2017-22-576, koloni nr. 23) hadde serotype O153/O178:H19.

*E. coli* O22:H8 er sjeldent assosiert med sykdom hos menneske (Martorelli et al., 2017), og man har lite kunnskap om denne. Fernández og medarbeidere konkluderte i sin studie med at STEC O178:H19, som har blitt isolert fra HUS-pasienter, kan være bærer av virulensgener forbundet med utvikling av alvorlig sykdom, og at det burde vurderes å teste for serotypen rutinemessig (Fernández et al., 2013).

I følge EFSA er STEC-stammer som tilhører serogruppene O26, O103, O111, O145 og O157 («top five») de som oftest er assosiert med alvorlig sykdom og utbrudd i Europa (EFSA, 2013). Disse STEC-stammene er ansett som de mest patogene, og er av spesiell bekymring for folkehelsen (Perelle et al., 2007). Det finnes for øvrig både *stx*-positive og *stx*-negative

stammer innenfor de ulike O-serogrupper (Perelle et al., 2007), slik at påvisning av serogruppe ikke er mål på om stammen har sykdomsfremkallende egenskaper. O-gruppen benyttes hovedsakelig til påvisning av bakterien (fenotype), og ukjent serogruppe gjør det derfor vanskelig å finne rett bakterie ved for eksempel utbruddsoppklaring.

Patogene stammene av STEC har gener for Stx1 og/eller Stx2, i tillegg kan de inneha det intimin-kodende genet *eae* (Boerlin et al., 1999; Kagkli et al., 2011). Det har flere ganger blitt observert at STEC isolert fra HUS-pasienter ofte har virulensgenene *stx<sub>2a</sub>* og *eae* (Friedrich et al., 2002; Jenkins et al., 2003; Persson et al., 2007). Resultatene fra virulenskarakteriseringen viste at de *stx<sub>2a</sub>*-positive *E. coli* isolatene var *stx<sub>1a</sub>*-positive og *stx<sub>1c</sub>*-, *stx<sub>1d</sub>*- og *eae*-negative. Resultatene fra helgenomsekvenseringen bekreftet også at dette var tilfellet for de to undersøkte isolatene. Sekvenseringsresultatene viste også at isolatene fra begge prøver (serotype O22:H8 og O153/O178:H19) i tillegg hadde gener for ulike virulensfaktorer, blant annet *ehxA*, *iha*, *lpfA* og *espP*, som koder for henholdsvis enterohemolysin, adheranse, fimbrier og serinprotease (se tabell 10). En studie av Miko og medarbeidere undersøkte serotype O178:H19, og fant at stammer av STEC O178:H19 ble isolert fra storfe og produkter av storfe, men også en stamme ble isolert fra en pasient med HUS. Flere av disse stammene (inkludert HUS-stammen) var i likhet med resultatene i denne studien *eae*-negative, og positive for *stx<sub>1a</sub>*-, *stx<sub>2a</sub>*-, *ehxA*-, *iha*-, *lpfA*- og *espP*-virulensgener (Miko et al., 2014). De konkluderte i sin studie med at de *stx<sub>2a</sub>*-positive, *eae*-negative STEC O178:H19, med de hittil mindre kjente virulensfaktorene, muligens kan bidra til å øke stammens patogenitet (mulighet for adheranse og toksinproduksjon), og at disse stammene potensielt utgjør en risiko for alvorlig sykdom (Miko et al., 2014).

Alle fire *stx<sub>2a</sub>*-positive isolater som ble undersøkt i denne studien var negative for det intimin-kodende genet *eae*. Intimin er ansett som en viktig virulensfaktor, slik at fravær kan indikere at stammene er mindre virulente/humanpatogene. Allikevel har LEE-negative STEC-stammer vært årsak til sporadiske tilfeller og utbrudd av hemorragisk kolitt og HUS (Mora et al., 2007; Scheutz, 2014), noe som tyder på at produksjon av intimin ikke er essensielt for STEC patogenese (Mora et al., 2007). Dessuten, med tilstedeværelse av andre virulensgener, er det mulighet for andre potensielle virulensmekanismer.

## 4.5 Konklusjon og videre arbeid

Så vidt vi vet er ikke *stx*<sub>2a</sub>-positive STEC undersøkt i kjøttdeig eller næringsmidler tidligere. Dette er derfor den første studien på forekomsten av *stx*<sub>2a</sub> i kjøttdeig, og sammenlignbare data er ikke tilgjengelig.

Resultatene i denne studien viste at ni av de 71 (12,7 %) screeningprøvene var positive for *stx*<sub>2a</sub>-genet. Videre ble *stx*<sub>2a</sub>-positive STEC isolert fra totalt to av ni kjøttdeigprøver, og fra disse ble fire *stx*<sub>2a</sub>-isolater karakterisert. STEC-isolatene var *stx*<sub>2a</sub>- og *stx*<sub>1a</sub>-positive, noe som kan tyde på at de er humanpatogene. Allikevel ble ingen av de vanligste serogruppene assosiert med sykdom, og heller ikke det intimin-kodende genet *eae*, nødvendig for å binde seg i tarmen påvist. Isolatene hadde derimot gener for andre potensielle virulensmekanismer, også for evne til adheranse, men betydningen av disse er foreløpig mindre kjent. Basert på isolatenes virulensprofil kan man ikke utelukke muligheten for at de kan forårsake sykdom hos mennesker.

For øvrig tyder resultatene fra denne studien på at forekomst av *stx*<sub>2a</sub>-positive *E. coli* i norsk storfekjøttdeig er lav. Allikevel ble *stx*<sub>2a</sub>-positive STEC isolert fra to prøver, noe som indikerer at kontaminering av STEC har funnet sted i ett eller annet trinn i næringsmiddelkjeden. Det er viktig å opprettholde gode slakterutiner for å unngå kontaminering og krysskontaminering, og på den måten forhindre at STEC kommer inn i næringsmiddelkjeden. Det skal i den sammenheng nevnes at kjøttdeig er et produkt som varmebehandles, og ved høy nok kjernetemperatur vil ikke STEC kunne overleve.

Det er utfordrende å isolere STEC, og PCR-positive prøver uten funn av bakterien fra matriksprøven er problematisk. Videre utvikling av raske og sensitive laboratoriemetoder for påvisning, isolering og karakterisering er vesentlig. Fra et fremtidig perspektiv vil også utvikling av nye patogene varianter av STEC, som kan oppstå gjennom utveksling av virulensgener, være av betydning for påvisningsmetodene i fremtiden. I den sammenheng kan sekvenseringsteknologi spille en stor rolle. Det er viktig å gjennomføre tilsvarende kartlegginger for å få oppdatert kunnskap om og for å følge med på utviklingen av forekomsten av *stx*<sub>2a</sub>-positive STEC og STEC generelt.

## 5. Litteraturliste

- Auvray, F., Lecureuil, C., Dilasser, F., Taché, J., & Derzelle, S. (2009). Development of a real-time PCR assay with an internal amplification control for the screening of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. *Letters in Applied Microbiology*, *48*(5), 554-559. doi:10.1111/j.1472-765X.2009.02561.
- Auvray, F., Lecureuil, C., Tache, J., Leclerc, V., Deperrois, V., & Lombard, B. (2007). Detection, isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in retail-minced beef using PCR-based techniques, immunoassays and colony hybridization. *Letters in Applied Microbiology*, *45*(6), 646-651.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology*, *19*(5), 455-477. doi:10.1089/cmb.2012.0021.
- Bergan, J., Dyve Lingelem, A. B., Simm, R., Skotland, T., & Sandvig, K. (2012). Shiga toxins. *Toxicon*, *60*(6), 1085-1107. doi:https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.07.016
- Bielaszewska, M., Prager, R., Köck, R., Mellmann, A., Zhang, W., Tschäpe, H., Karch, H. (2007). Shiga Toxin Gene Loss and Transfer In Vitro and In Vivo during Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 Infection in Humans. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(10), 3144-3150. doi:10.1128/AEM.02937-06.
- Boerlin, P., McEwen, S. A., Boerlin-Petzold, F., Wilson, J. B., Johnson, R. P., & Gyles, C. L. (1999). Associations between Virulence Factors of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and Disease in Humans. *Journal of Clinical Microbiology*, *37*(3), 497-503.
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, *30*(15), 2114-2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170.
- Buchholz, U., Bernard, H., Werber, D., Böhmer, M. M., Remschmidt, C., Wilking, H., Dreesman, J. (2011). German outbreak of *Escherichia coli* O104: H4 associated with sprouts. *New England Journal of Medicine*, *365*(19), 1763-1770.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). (2015). Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet): *FoodNet 2015 Surveillance Report* (Final Data). Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, CDC. 2017.
- Croxen, M. A., & Finlay, B. B. (2009). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*, *8*, 26. doi:10.1038/nrmicro2265 <https://www.nature.com/articles/nrmicro2265#supplementary-information>.
- Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., & Finlay, B. B. (2013). Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, *26*(4), 822-880. doi:10.1128/CMR.00022-13.

- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). (2013). *Scientific Opinion on VTEC-serovars and scientific criteria regarding pathogenicity assessment*. EFSA Journal 2013;11(4):3138.
- EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). (2017). *The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016*. EFSA Journal 2017;15(12):5077.
- Feng, P., Dey, M., Abe, A., & Takeda, T. (2001). Isogenic Strain of Escherichia coli O157:H7 That Has Lost both Shiga Toxin 1 and 2 Genes. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8(4), 711-717. doi:10.1128/CDLI.8.4.711-717.2001.
- Fernández, D., Krüger, A., Polifroni, R., Bustamante, A. V., Sanso, A. M., Etcheverría, A. I., Padola, N. L. (2013). Characterization of Shiga toxin-producing Escherichia coli O130:H11 and O178:H19 isolated from dairy cows. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3, 9. doi:10.3389/fcimb.2013.00009.
- Folkehelseinstituttet. (2017). Årsrapport 2016: *Overvåkning av infeksjonssykdommer som smitter fra mat, vann og dyr, inkludert vektorbårne sykdommer*. Tilgjengelig på: <https://www.fhi.no/globalassets/dokumenterfiler/rapporter/2016/overvakning-av-infeksjonssykdommer-som-smitter-fra-mat-vann-og-dyr.-arsrapport-2016.pdf>
- Folkehelseinstituttet. (2018). Utbrudd av E. coli-infeksjon i Norge. Lokalisert 05.05.2018 på World Wide Web: <https://www.fhi.no/sv/utbrudd/oversikt-over-storre-utbrudd/utbrudd-av-e.-coli-infeksjon-eks.eh/>
- Franer, K., Jore, S., Ocampo, J. M. F., Nygård, K., Guzman-Herrador, B., Stene-Johansen, K., Dao, P., Sandbu, S., Viksmoen Watle, S. S., Thorstensen Brandal, L., Kapperud, G., & Vold, L. (2016). Årsrapport: *Mat- og vannbårne infeksjoner 2015*. Meldingssystemet for smittsomme sykdommer (MSIS), Folkehelseinstituttet. Statistikk 2016. ISSN (elektronisk): 2387-6441.
- Franzin, F. M., & Sircili, M. P. (2015). Locus of Enterocyte Effacement: A Pathogenicity Island Involved in the Virulence of Enteropathogenic and Enterohemorrhagic Escherichia coli Subjected to a Complex Network of Gene Regulation. *BioMed Research International*, 2015, 534738. doi:10.1155/2015/534738.
- Fratamico, P. M., 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 Pathogens and Disease*, 6(5), 605-611.
- Friedrich, A. W., Bielaszewska, M., Zhang, W.-L., Pulz, M., Kuczius, T., Ammon, A., & Karch, H. (2002). Escherichia coli Harboring Shiga Toxin 2 Gene Variants: Frequency and Association with Clinical Symptoms. *The Journal of Infectious Diseases*, 185(1), 74-84. doi:10.1086/338115.

- Haugum, K., Brandal, L. T., Lindstedt, B. A., Wester, A. L., Bergh, K., & Afset, J. E. (2014). PCR-Based Detection and Molecular Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains in a Routine Microbiology Laboratory over 16 years. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(9), 3156-3163. doi:10.1128/JCM.00453-14.
- Hoang Minh, S., Kimura, E., Hoang Minh, D., Honjoh, K.-i., & Miyamoto, T. (2015). Virulence characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from raw meats and clinical samples. *Microbiology and Immunology*, 59(3), 114-122. doi:10.1111/1348-0421.12235.
- Hunt, J. M. (2010). Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* (STEC). *Clinics in Laboratory Medicine*, 30(1), 21-45. doi:https://doi.org/10.1016/j.cll.2009.11.001.
- Hussein, H. S., & Bollinger, L. M. (2005). Prevalence of Shiga toxin–producing *Escherichia coli* in beef cattle. *Journal of food protection*, 68(10), 2224-2241.
- ISO/TS13136:2012(E). *Microbiology of food and animal feed - Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens - Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups.*
- Jenkins, C., Willshaw, G. A., Evans, J., Cheasty, T., Chart, H., Shaw, D. J., Smith, H. R. (2003). Subtyping of virulence genes in verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) other than serogroup O157 associated with disease in the United Kingdom. *Journal of Medical Microbiology*, 52(11), 941-947. doi:doi:10.1099/jmm.0.05160-0.
- Jinnerot, T., Johannessen, G.S., Söderlund, R., Urdahl, A. M., Aspán, A. & Sekse, C. (2018). *The prevalence and genomic context of Shiga toxin 2a genes in E. coli found in cattle.* Poster presented at: VTEC symposium; 2018 May 6-9; Florence, Italy.
- Joensen, K. G., Scheutz, F., Lund, O., Hasman, H., Kaas, R. S., Nielsen, E. M., & Aarestrup, F. M. (2014). Real-Time Whole-Genome Sequencing for Routine Typing, Surveillance, and Outbreak Detection of Verotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(5), 1501-1510. doi:10.1128/JCM.03617-13.
- Joensen, K. G., Tetzschner, A. M., Iguchi, A., Aarestrup, F. M., & Scheutz, F. (2015). Rapid and easy in silico serotyping of *Escherichia coli* using whole genome sequencing (WGS) data. *Journal of Clinical Microbiology*, JCM. 00008-00015.
- Johannessen, G. S., Cudjoe, K. S. & Urdahl, A. M. (2012). *Sluttrapport: Kartlegging av potensielt sykdoms fremkallende Escherichia coli i kjøtt importert fra 3. land.* Veterinærinstituttets rapportserie 12-2012. Oslo: Veterinærinstituttet, 2012.
- Johnsen, G., Wasteson, Y., Heir, E., Berget, O. I., & 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(3), 193-200. doi:https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00518-3.

- Kagkli, D.-M., Weber, T. P., Van den Bulcke, M., Folloni, S., Tozzoli, R., Morabito, S., Van den Eede, G. (2011). Application of the Modular Approach to an In-House Validation Study of Real-Time PCR Methods for the Detection and Serogroup Determination of Verocytotoxigenic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(19), 6954-6963. doi:10.1128/AEM.05357-11.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 123.
- Karch, H., Meyer, T., Rüssmann, H., & Heesemann, J. (1992). Frequent loss of Shiga-like toxin genes in clinical isolates of *Escherichia coli* upon subcultivation. *Infection and Immunity*, 60(8), 3464-3467.
- L'Abée-Lund, T. & Wasteson, Y. (2015). *Matforgifting – Smitte gjennom mat og vann* (s. 78-95). ISBN 978-82-02-47788-2.
- LeJeune, J. T., Hancock, D., Wasteson, Y., Skjerve, E., & Urdahl, A. M. (2006). Comparison of *E. coli* O157 and Shiga toxin-encoding genes (*stx*) prevalence between Ohio, USA and Norwegian dairy cattle. *International Journal of Food Microbiology*, 109(1), 19-24. doi:https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.005.
- Livsmedelsverket. (2016). *Förekomst av shigatoxinproducerande Escherichia coli (STEC) i svenskt nötkött*. Tilgjengelig på <https://www.livsmedelsverket.se/globalassets/rapporter/2016/forekomst-av-shigatoxinproducerande-e--coli-i-svenskt-notkott.pdf>
- Madic, J., Lecureuil, C., Dilasser, F., Derzelle, S., Jamet, E., Fach, P., & Auvray, F. (2009). Screening of food raw materials for the presence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O91:H21. *Letters in Applied Microbiology*, 48(4), 447-451. doi:doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02549.
- Majowicz, S. E., Scallan, E., Jones-Bitton, A., Sargeant, J. M., Stapleton, J., Angulo, F. J., Kirk, M. D. (2014). Global Incidence of Human Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections and Deaths: A Systematic Review and Knowledge Synthesis. *Foodborne Pathogens and Disease*, 11(6), 447-455. doi:10.1089/fpd.2013.1704.
- Martinez-Castillo, A., Quirós, P., Navarro, F., Miró, E., & Muniesa, M. (2013). Shiga Toxin 2-Encoding Bacteriophages in Human Fecal Samples from Healthy Individuals. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(16), 4862-4868. doi:10.1128/AEM.01158-13.
- Martorelli, L., Albanese, A., Vilde, D., Cantet, R., Bentancor, A., Zolezzi, G., Cataldi, A. (2017). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O22:H8 isolated from cattle reduces *E. coli* O157:H7 adherence in vitro and in vivo. *Veterinary Microbiology*, 208, 8-17. doi:https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.06.021.
- Meldingssystem for smittsomme sykdommer (MSIS). (2018). *MSIS-statistikk*. Lokalisert 01.07.2018 på World Wide Web: <http://www.msis.no/>

- Melton-Celsa, A. R. (2014). Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function. *Microbiology Spectrum*, 2(2), 10.1128/microbiolspec.EHEC-0024-2013. doi:10.1128/microbiolspec.EHEC-0024-2013.
- Miko, A., Rivas, M., Bentancor, A., Delannoy, S., Fach, P., & Beutin, L. (2014). Emerging types of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O178 present in cattle, deer, and humans from Argentina and Germany. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4, 78. doi:10.3389/fcimb.2014.00078.
- Mora, A., Blanco, M., Blanco, J. E., Dahbi, G., López, C., Justel, P., Blanco, J. (2007). Serotypes, virulence genes and intimin types of Shiga toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from minced beef in Lugo (Spain) from 1995 through 2003. *BMC Microbiology*, 7, 13-13. doi:10.1186/1471-2180-7-13.
- Muniesa, M., Lucena, F., & Jofre, J. (1999). Comparative Survival of Free Shiga Toxin 2-Encoding Phages and *Escherichia coli* Strains outside the Gut. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(12), 5615-5618.
- Navarro-Garcia, F. (2014). *Escherichia coli* O104:H4 Pathogenesis: an Enteroaggregative *E. coli*/Shiga Toxin-Producing *E. coli* Explosive Cocktail of High Virulence. *Microbiology Spectrum*, 2(6). doi:doi:10.1128/microbiolspec.EHEC-0008-2013.
- O'Brien, A. D., Melton, A. R., Schmitt, C. K., McKee, M. L., Batts, M. L., & Griffin, D. E. (1993). Profile of *Escherichia coli* O157:H7 pathogen responsible for hamburger-borne outbreak of hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome in Washington. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(10), 2799-2801.
- Paton, J. C., & Paton, A. W. (1998). Pathogenesis and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(3), 450-479.
- 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. *Molecular and Cellular Probes*, 18(3), 185-192. doi:https://doi.org/10.1016/j.mcp.2003.12.004.
- Perelle, S., Dilasser, F., Grout, J., & Fach, P. (2007). Screening food raw materials for the presence of the world's most frequent clinical cases of Shiga toxin-encoding *Escherichia coli* O26, O103, O111, O145 and O157. *International Journal of Food Microbiology*, 113(3), 284-288. doi:https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.08.014.
- Persson, S., Olsen, K. E., Ethelberg, S., & Scheutz, F. (2007). Subtyping method for *Escherichia coli* Shiga toxin (verocytotoxin) 2 variants and correlations to clinical manifestations. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(6), 2020-2024.
- QIAGEN. (2006). *DNeasy® Blood & Tissue Handbook*. Tilgjengelig på <file:///C:/Users/vi1563/Downloads/EN-DNeasy-Blood--Tissue-Handbook.pdf>
- QIAGEN. (2016). *QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook*. Tilgjengelig på [file:///C:/Users/vi1563/Downloads/HB-0329-004-1102728-HB-QIAamp-DNA-Mini-Blood-Mini-0516-WW%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/vi1563/Downloads/HB-0329-004-1102728-HB-QIAamp-DNA-Mini-Blood-Mini-0516-WW%20(2).pdf)



- Scheutz, F. (2014). Taxonomy Meets Public Health: The Case of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 2(3). doi:doi:10.1128/microbiolspec.EHEC-0019-2013.
- Scheutz, F., Morabito, S., Tozzoli, R., & Caprioli, A. (2012a). Identification of three vtx1 and seven vtx2 subtypes of verocytotoxin encoding genes of *Escherichia coli* by conventional PCR amplification. *WHO Collaboration Centre for Reference and Research on Escherichia and Klebsiella, SSI. Statens Serum Institut. Copenhagen S, Denmark*.
- Scheutz, F., Teel, L. D., Beutin, L., Piérard, D., Buvens, G., Karch, H., O'Brien, A. D. (2012b). Multicenter Evaluation of a Sequence-Based Protocol for Subtyping Shiga Toxins and Standardizing Stx Nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(9), 2951-2963. doi:10.1128/JCM.00860-12.
- Schimmer, B., Nygard, K., Eriksen, H.-M., Lassen, J., Lindstedt, B.-A., Brandal, L. T., Aavitsland, P. (2008). Outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Norway caused by stx(2)-positive *Escherichia coli* O103:H25 traced to cured mutton sausages. *BMC Infectious Diseases*, 8, 41-41. doi:10.1186/1471-2334-8-41.
- Sekse, C., O'Sullivan, K., Granum, P. E., Rørvik, L. M., Wasteson, Y., & Jørgensen, H. J. (2009). An outbreak of *Escherichia coli* O103:H25 — Bacteriological investigations and genotyping of isolates from food. *International Journal of Food Microbiology*, 133(3), 259-264. doi:https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.05.026.
- Sekse, C., Johannessen, G.S., Økland, M., Kvitle, B., Begum, M., Melvold, C. F., Urdahl, A. M. (2015). *Survey of potentially zoonotic E. coli of serotype O26, O103, O111, O145 and O157 in cattle*. Poster presented at: VTEC Meeting Boston; 2015 Sep13-16; Boston, USA.
- Silva, C. V., Tavares, C. R. C., Adam, C. J. C., & Souza, F. E. E. (2017). Shiga-toxin Producing *Escherichia coli*: Pathogenicity, Supershedding, Diagnostic Methods, Occurrence, and Foodborne Outbreaks. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(6), 1269-1280. doi:doi:10.1111/1541-4337.12302.
- Sperandio, V., & Nguyen, Y. (2012). Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2(90). doi:10.3389/fcimb.2012.00090.
- Statens Serum Institute. (2016). *E.coli for O serotyping for boiled culture*. Tilgjengelig på <http://www.ssidiagnostica.com/upload/files/english/packaging-inserts/e-coli/Insert%20E%20coli%20O%20serotyping%2096537.pdf>
- Stevens, M. P., & Frankel, G. M. (2014). The Locus of Enterocyte Effacement and Associated Virulence Factors of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 2(4). doi:doi:10.1128/microbiolspec.EHEC-0007-2013.
- Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., & Denamur, E. (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 207. doi:10.1038/nrmicro2298.

- Ternent, H., Innocent, G., Filshie, L., Taylor, D., Steele, W., McEwen, S., Mellor, D. (2004). Frozen storage of Escherichia coli O157 in buffered peptone water and its detection on bovine carcasses. *Journal of food protection*, 67(1), 40-45.
- Tozzoli, R., & Scheutz, F. (2014). Diarrhoeagenic Escherichia coli infections in humans. *Pathogenic Escherichia Coli, Molecular and Cellular Microbiology*, 1-18.
- Urdahl, A. M., Bruheim, T., Cudjoe, K., Hofshagen, M., Hopp, P., Johannessen, G. & Sunde, M. (2009). *Kartlegging av E. coli hos sau – sluttrapport*. Veterinærinstituttets rapportserie 05-2009. Oslo: Veterinærinstituttet, 2009.
- Verhaegen, B., Van Damme, I., Heyndrickx, M., Botteldoorn, N., Elhadidy, M., Verstraete, K., De Reu, K. (2016). Evaluation of detection methods for non-O157 Shiga toxin-producing Escherichia coli from food. *International Journal of Food Microbiology*, 219, 64-70. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.006>.
- Veterinærinstituttet. (2015). *Zoonoserapporten 2014: Om sykdommer som kan smitte mellom dyr og mennesker – Norges situasjon*. Tilgjengelig på: <https://www.vetinst.no/rapporter-og-publikasjoner/rapporter/2015/zoonoserapporten-2014>
- Veterinærinstituttet. (2017). *Zoonoserapporten 2016*. Tilgjengelig på: <https://www.vetinst.no/rapporter-og-publikasjoner/rapporter/2017/zoonoserapporten-2016>
- Vold, L., Johansen, B. K., Kruse, H., Skjerve, E., & Wasteson, Y. (1998). Occurrence of shigatoxinogenic Escherichia coli O157 in Norwegian cattle herds. *Epidemiology & Infection*, 120(1), 21-28.

## 6. Vedlegg

### 6.1 Vedlegg 1

En oversikt over resultatene fra screening for *stx*<sub>2a</sub> med real-time PCR er vist i tabell 6.1. Ct-verdier er vist for de *stx*<sub>2a</sub>-positive prøvene.

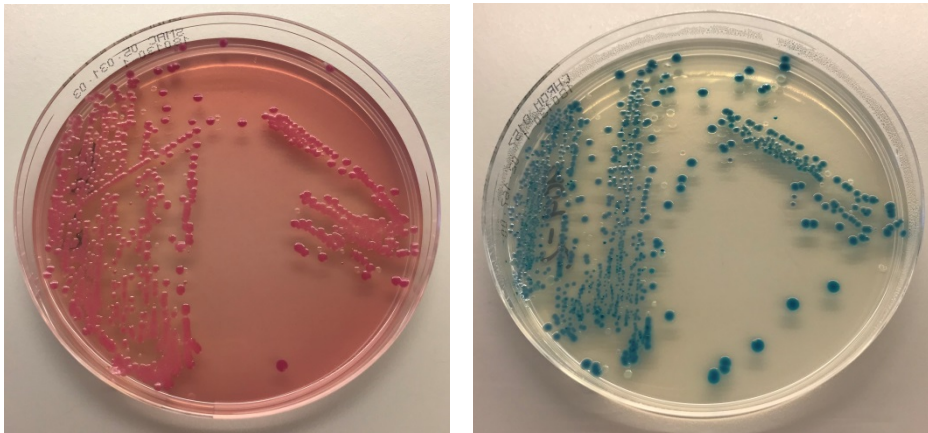
**Tabell 6.1.** Real-time PCR-resultater fra screening av DNA ekstrahert fra kjøttdeigprøver

Prøve ID	Resultat screening	
	<i>stx</i> <sub>2</sub>	<i>stx</i> <sub>2a</sub> (Ct)
2017-22-66	(pos)*	33,89
2017-22-212	pos	39,10
2017-22-576	pos	31,55
2017-22-615	pos	40,92
2017-22-824	pos	41,47
2017-22-826	pos	42,11
2017-22-905	pos	41,27
2017-22-917	pos	39,57
2017-22-1047	pos	37,14

\* Svakt positivt resultat

### 6.2 Vedlegg 2

Figur 6.2 viser *E. coli*-kolonimorfologi på to ulike agarmedium. I forsøk på å isolere *E. coli* med tilstedeværelse av *stx*<sub>1</sub>-, *stx*<sub>2</sub>-, *stx*<sub>2a</sub>- og *eae*-gener ble det benyttet SMACagar og CHROMagar™ O157.



**Figur 6.2.** Typisk *E. coli*-morfologi på SMACagar (t.v.) og CHROMagar™ O157 (t.h.)

### 6.3 Vedlegg 3

Identifisering av bakterieisolater ble gjort med MALDI-TOF. Analysen bekreftet ni av de ti undersøkte isolatene som *E. coli*, som vist i tabell 6.3. Isolat nr. 32 fra prøve ID 2017-22-576 ble identifisert til å være av slekten *Enterobacter*. Her ble metoden gjentatt på åtte nye kolonier fra gjeldende prøve, og samtlige ble identifisert som *Enterobacter*. For MALDI-TOF er en treffverdi («score value»)  $\geq 2$  å regne som pålitelig identifisering.

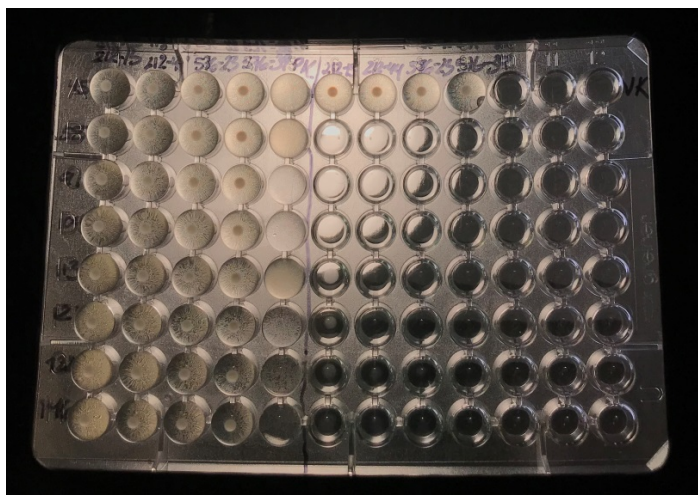
**Tabell 6.3.** Identifisering av bakterieisolater med MALDI-TOF

#	Prøve ID	Koloni nr.	Organisme (best treff)	Treffverdi	Organisme (nest best treff)	Treffverdi
1	2017-22-212	10	<i>Escherichia coli</i>	2,62	<i>Escherichia coli</i>	2,51
2	2017-22-212	15	<i>Escherichia coli</i>	2,52	<i>Escherichia coli</i>	2,44
3	2017-22-212	37	<i>Escherichia coli</i>	2,47	<i>Escherichia coli</i>	2,38
4	2017-22-212	38	<i>Escherichia coli</i>	2,50	<i>Escherichia coli</i>	2,38
5	2017-22-212	44	<i>Escherichia coli</i>	2,38	<i>Escherichia coli</i>	2,35
6	2017-22-576	23	<i>Escherichia coli</i>	2,33	<i>Escherichia coli</i>	2,29
7	2017-22-576	29	<i>Escherichia coli</i>	2,41	<i>Escherichia coli</i>	2,35
8	2017-22-576	32	<i>Enterobacter asburiae</i>	2,21	<i>Enterobacter kobei</i>	2,16

9	2017-22-576	39	<i>Escherichia coli</i>	2,44	<i>Escherichia coli</i>	2,31
10	2017-22-576	47	<i>Escherichia coli</i>	2,38	<i>Escherichia coli</i>	2,33

## 6.4 Vedlegg 4

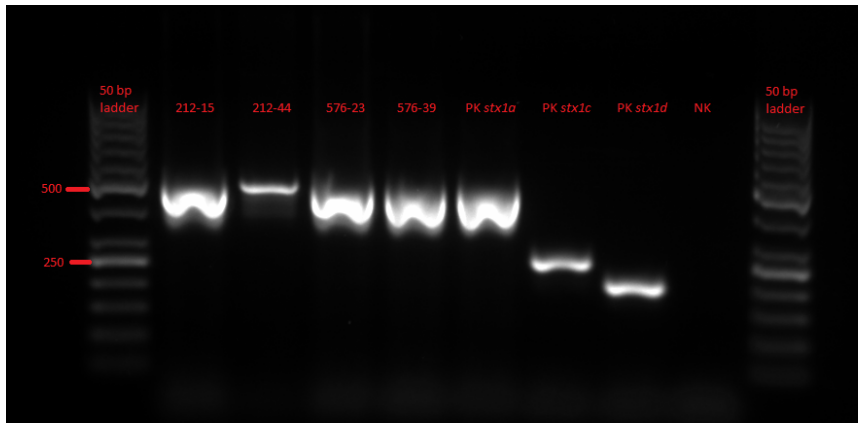
Figur 6.4 viser resultatene fra agglutineringsstesten med antisera. Agglutineringssees som et jevnt dekke i hele brønnen, og tolkes som positiv reaksjon, mens en velavgrenset «knapp» i bunnen av brønnen tyder på negativ reaksjon. Resultatene viste at ingen av de undersøkte O-gruppene ble påvist for de fire *stx*<sub>2a</sub>-positive isolatene.



**Figur 6.4. Agglutineringsstesten med antisera for bestemmelse av serogrupper.** Isolat nr. 15 og 44 fra prøve 2017-22-212 (rad 1, henholdsvis brønn 1 og 2 på figuren) og isolat nr. 23 og 39 fra prøve 2017-22-576 (rad 1, henholdsvis brønn 3 og 4 på figuren) ble undersøkt for overflateantigenene O45, O55, O91, O104, O113, O121, O128 og O146. Bildet viser at ingen av de undersøkte O-gruppene ble påvist. Rad 1, brønn nr. 6-9 er negative kontroller. Det ble benyttet positive kontroller for O45, O55 og O113.

## 6.5 Vedlegg 5

Figur 6.5 viser PCR-produktene fra subtyping av *stx*<sub>1</sub> visualisert på agarosegel. Bildet viser at *stx*<sub>1a</sub>-genet ble påvist for alle de fire *stx*<sub>2a</sub>-positive isolatene, mens *stx*<sub>1c</sub> og *stx*<sub>1d</sub> ble ikke identifisert.



**Figur 6.5. *stx*<sub>1</sub>-subtyping.** Figuren viser at det i brønn 1 og 10 er applisert 50 bp DNA ladder. Brønn 2-5 viser at *stx*<sub>1a</sub>-genet på identifisert for samtlige isolater. *stx*<sub>1a</sub>- positiv kontroll (PK) er vist i brønn 6. Brønn 7 og 8 er *stx*<sub>1c</sub>- og *stx*<sub>1d</sub>-positive kontroller. Negativ kontroll (NK) er vist i brønn 9.





**Norges miljø- og biovitenskapelige universitet**  
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet  
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
Norway