



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2021 30 stp

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KMB)

Forekomst av Shigatoksinproduserende *Escherichia coli* i kvernet kjøtt og kjøttdeig av svin i Norge

Occurrence of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* in minced meat and meat from pork in Norway

Marte Solvår Bækken

Matvitenskap – Mattrygghet, kvalitet og hygiene

Forord

Arbeidet med denne oppgaven var et avsluttende prosjekt i masterstudiet i matvitenskap ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU). Masteroppgaven er skrevet i samarbeid med Veterinærinstituttet i Oslo/Ås, ved seksjon, forskning mattrygghet og dyrehelse, som en del av DiSCoVeR (Discovering the sources of Salmonella, Campylobacter, VTEC and antimicrobial resistance).

Jeg vil gjerne takke min veileder ved NMBU, Helge Holo. Jeg vil også rette en takk til laboratorieingeniørene ved seksjon for mikrobiologi, Marianne Økland og Tone Mathisen som alltid har tatt seg tid til å hjelpe meg.

En spesielt stor takk vil jeg rette til mine veiledere Gro Johannesen og Camilla Sekse for upåklagelig veiledning, støtte og faglige diskusjoner, og ikke minst for at de alltid har hatt troen på meg. Deres hjelp har vært uvurderlige for meg i prosessen med å skrive masteroppgave.

Til slutt vil jeg takke min familie, venner og kjæreste Vegard Orvedal for tålmodighet og støtte.

Ås, 1 juni 2021

Marte Solvår Bækken

Sammendrag

Shigatoksinproduserende *Escherichia coli* (STEC), også kjent som Verotoksinproduserende *E. coli* er stammer av *E. coli* som bærer gener som koder for Shigatoksin (*stx*), enkelte har i tillegg det intiminkodende genet *eae* som en viktig virulensfaktor. STEC kan forårsake alvorlig sykdom som hemorrahgisk kolitt og hemolytisk uremisk syndrom (HUS) hos mennesker. Selv om storfe betraktes som det viktigste STEC-reservoaret for infeksjon hos mennesker og matbårne utbrudd tidligere oftest ble sett i sammenheng med storfeprodukter, har matbårne utbrudd i senere tid blitt sett i sammenheng med en rekke andre næringsmidler, deriblant produkter fra svin.

I denne studien ble forekomsten av STEC fra prøver av norsk kvernet kjøtt og kjøttdeig av svin undersøkt, ved å påvise tilstedeværelse av de genetiske markørene *stx*₁, *stx*₂ og *eae*, i tillegg til å forsøke å isolere STEC fra *stx*-positive prøver. Prøver positive for *stx*₂ ble også undersøkt for *stx*_{2a}. Mikrobiell anrikning av prøver etterfulgt av DNA ekstraksjon med påfølgende screening av virulensgener og forsøk på isolering av STEC ble utført i henhold til ISO/TS 13136:2012.

Resultatet fra studien viste at 46/157 (29, 3 %) svinekjøttprøver var positive for *stx*-gener, hvorav 17 (10,8 %) var *stx*₁-positive og 37 (23,6 %) var *stx*₂. Begge forsøkene på isolering av STEC fra de *stx*-positive prøver ga negativt resultat. De *stx*₂-positive prøvene ble undersøkt for tilstedeværelse av *stx*_{2a}, men resultatet var negativt.

Selv om resultatet var negativt kan en ikke utelukke at det er STEC til stede, men det viser utfordringen med STEC PCR-positive og kultur negative resultater.

Abstract

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC), also known as Verocytotoxin-producing *E. coli* (VTEC) are strains of *E. coli* that carry genes encoding Shigatoxin (*stx*), some also have the intimin-encoding gene *eae* as an important virulence factor. STEC can cause serious illnesses such as hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome (HUS) in humans. Although cattle are considered the most important STEC reservoir for infection in humans and previously foodborne outbreaks were most often seen in relation with products from bovine, foodborne outbreaks have recently been connected to several other foods, including pig products.

In this study, the presence of STEC from samples of Norwegian minced meat of pigs was investigated, by detecting the presence of *stx*₁, *stx*₂ and *eae*, in addition isolation of presumptive STEC from *stx*-positive samples were conducted. *stx*₂-positive samples were also analysed for presence of *stx*_{2a}. The microbial enrichment followed by DNA extraction, subsequent screening of virulence genes and attempts of isolation of STEC from PCR positive samples was performed according to ISO / TS 13136: 2012.

This study revealed that 46/157 (29.3%) of the minced meat samples were positive for *stx*-genes, of which 17 (10.8%) were *stx*₁-positive and 37 (23.6%) were *stx*₂. No STEC strains were isolated from *stx*-positive samples, despite two attempts. The *stx*₂-positive samples were examined for presence of *stx*_{2a}, but the presence was not detected.

Even though the results were negative, the possibility of STEC presence cannot be excluded, nonetheless it reflects the challenge with STEC PCR-positive and culture negative results.

Innholdsfortegnelse

Forord	i
Sammendrag	ii
Abstract	iii
Ordliste	vi
1 SPESIALPENSUM OM PRØVEOPPARBEIDELSE	1
1.1 PRØVEOPPARBEIDELSE	1
1.1.1 KVANITITATIVE OG KVALITATIVE METODER	2
1.1.2 SELEKTIVITET	2
1.1.3 SENSITIVITET.....	2
1.1.4 SPESIFISITET	2
1.1.5 PRØVEUTTAK	3
1.1.6 PRØVEMATERIALET	3
1.1.7 PRØVESTØRRELSE OG DETEKSJONSGRENSE	3
1.1.8 GENERELLE OG SELEKTIVE ANRIKNINGSBULJONGER.....	4
1.1.9 HOMOGENISERING	4
1.1.10 DYRKNINGSBETINGELSER.....	4
1.1.11 ATMO SFÆRISKE FORHOLD	4
1.1.12 VANNAKTIVITET	5
1.1.13 TEMPERATUR	5
1.1.14 TID	6
1.2 UTFORDRINGER MED PRØVEOPPARBEIDELSE.....	6
1.3 DNA EKSTRAKSJON	7
2 INTRODUKSJON	9
2.1 ESCHERICHIA COLI	9
2.2 SHIGATOKSIN-PRODUSERENDE <i>E. COLI</i> (STEC)	9
2.2.1 VIRULENSFAKTORER	10
2.2.2 SHIGA TOKSIN	11
2.2.3 ADHESJON / INTIMIN.....	12
2.3 STEC RESERVOAR OG SMITTEVEIER.....	13
2.4 SYKDOM FORÅRSAKET AV STEC	14
2.5 MATBÅRNE UTBRUDD FORÅRSAKET AV STEC INTERNASJONALT OG I NORGE 15	
2.5.1 INTERNASJONALT	15
2.5.2 I NORGE.....	16
2.6 FOREKOMST AV STEC I DYR OG MAT I NORGE.....	16
2.7 FORKOMST AV STEC I SVIN INTERNASJONALT OG I NORGE.....	17

2.8	DETEKSJON OG KARAKTERISERING AV STEC	18
2.9	TIDLIGERE METODIKK	18
2.10	NYERE METODIKK	19
2.10.1	KONVENSJONELL PCR OG REAL-TIME PCR	20
2.11	Formålet med oppgaven	22
3	MATERIALER OG METODE.....	23
3.1	Materiale.....	23
3.1.1	Innsamling av prøvemateriale	23
3.2	Metode.....	23
3.3	SCREENING AV VIRULENSGENER.....	25
3.3.1	PRØVEOPPFORMERING	25
3.3.2	DNA EKSTRAKSJON	25
3.3.3	REAL-TIME PCR	26
3.4	STØRRELSESBESTEMMELSE AV PCR PRODUKTER	30
3.5	ISOLERING OG IDENTIFISERING AV STEC	30
3.5.1	ISOLERING AV STEC FRA PCR-POSITIVE KJØTTDEIGPRØVER.....	30
3.5.2	ISOLERING AV STEC FRA TRE UTVALGTE PRØVER	31
4	RESULTATER.....	32
4.1	SCREENING AV EKSTRAHERET DNA	32
4.1.1	DNA-kvalitet	32
4.1.2	INNLEDENDE SCREENING AV <i>stx</i> OG <i>eae</i>	32
4.1.3	SCREENING AV <i>stx</i> _{2a}	34
4.2	ISOLERING AV STEC	34
4.2.1	SCREENING FOR <i>stx</i> OG/ELLER <i>eae</i> I POOLER AV KOLONIER.....	34
4.2.2	REANALYSE AV TRE UTVALGTE PRØVER	34
5	DISKUSJON	37
5.1	Utbredelse.....	37
5.2	HOVEDRESULTATER.....	37
5.3	METODOLOGISKE UTFORDRINGER	40
5.3.1	FRYST PRØVEMATERIALE	40
5.3.2	ISOLERING	40
5.3.3	REAL-TIME PCR	41
5.3.4	KARAKTERISERING.....	42
5.4	KONKLUSJON OG VIDERE ARBEID	44
6	LITTERATURLISTE.....	45

Vedlegg 1

Ordliste

A/E lesions	(Attaching and effacing lesions)
a _w	Vannaktivitet
bp	Basepar
BPV	Bufret peptonvann
DAEC	Diffust adherende <i>E. coli</i>
DALYs	Disability-adjusted life years
DVS	Destillert vann
EAEC	Enteroaggregative <i>E. coli</i>
ECDC	Det europeiske smittevernbyrået
EFSA	European Food Safety Authority
EHEC	Enterohemoragisk <i>Escherichia coli</i>
EIEC	Enteroinvasiv <i>Escherichia coli</i>
EØS	Det europeiske økonomiske samarbeidsområdet
EPEC	Enteropatogen <i>Escherichia coli</i>
ETEC	Enterotoksisk <i>Escherichia coli</i>
Gb3	Globotriaosylceramide
HUS	Hemolytisk-uremisk syndrom
IAC	Intern amplifikasjonskontroll
IBD	Intimin bindingsdomen
IMS	Immunomagnetisk separasjon
ISO	Den internasjonale standardiseringsorganisasjonen
LEE	Locus of enterocyte effacement
mPCR	Multiplex polymerase chain reaction
MQ	MilliQ-vann
NAC	No amplification control
NMKL	Nordisk metodikkomié
rpm	Revolutions per minute
STEC	Shigatoksinproduserende <i>Escherichia coli</i>
Stx	Shigatoksin

<i>stx</i>	Shigatoksin-gen
T3SS	Type III sekresjonssystem
TESSy	The European Surveillance System
Tir	Translocated intimin receptor
VAGs	Virulensassosierte gener
VTEC	Verotoksinproduserende <i>Escherichia coli</i>
WGS	Helgenomsekvensering

1 SPESIALPENSUM OM PRØVEOPPARBEIDELSE

Prøvetaking og undersøkelse av næringsmidler og utstyr brukt i bearbeidelse av næringsmidler, som kan inneholde sykdomsfremkallende mikroorganismer, er viktig for å sikre trygg mat. Hvordan prøvetakingen foregår og hvordan undersøkelser/analyser blir gjennomført, med alle påvirkningsfaktorer som innvirker på analysen, har mye å si for resultatet som oppnås.

1.1 PRØVEOPPARBEIDELSE

Prøveopparbeidelse handler om å gjøre klar en prøve til en spesifikk analyse som skal utføres. En prøve er en eller flere deler av ett materiale satt sammen til en prøve som skal analyseres, f.eks. for biologiske, kjemiske eller mikrobiologiske komponenter. Prøvematerialet kan i og for seg være nesten hva som helst og derfor vil spesialpensumet begrenses til å omhandle prøveopparbeidelse av næringsmiddelsprøver til bakteriologiske analyser og viktige påvirkningsfaktorer.

Det er i ISO 6887-1:2017 «Mikrobiologi i næringsmidler og fôr, Opparbeiding av analyseprøver, opprinnelig suspensjon og tierfortynninger for mikrobiologiske undersøkelser» (ISO 6887-1:2017) innført presiseringer når det kommer til forskjellige prøver som vil bli brukt i oppgaven. Laboratorieprøve er den prøven som sendes inn til laboratoriet beregnet for inspeksjon og analyse. Testprøven er den prøven som blir utarbeidet fra laboratorieprøven i henhold til prosedyre spesifisert i utvalgt metode. Fra testprøven blir en testdel med kjent masse eller volum tatt ut for videre prøveoppformering.

Det er mange hensyn å ta ved opparbeidelse av prøver tatt fra næringsmidler. Det er viktig at analyser tar høyde for tilstanden til prøvematerialet, er det ferskt, tørket, fryst, etc., for det vil kunne påvirke analysen. Bakterier har ulike dyrkningsbetingelser, som vil si at de har ulike krav til bl.a. atmosfærisk forhold, temperatur, pH, vannaktivitet og næringsstoffer for å vokse, samt konkurrerende flora. Metoder som utarbeides må være sensitive og spesifikke slik at den klarer å påvise bakterien og samtidig begrense/hemme forstyrrende bakgrunnsflora. Alle disse faktorene må tilpasses hver enkelt bakterie for å kunne selektere ut og påvise ønsket bakterie. Dette utnyttes i selektive medium som har spesielle egenskaper som favoriserer spesifikke bakterier og dermed demper uønsket bakgrunnsflora.

De standardiserte metodene som brukes for påvisning av ulike bakterier er viktig å følge for å kunne oppnå en viss reproduktibilitet av resultatene (NMKL No. 32, 2017). Det vil si at

analysen skal kunne utføres av forskjellig personell og laboratorier og allikevel kunne oppnå nogen lunde samme resultater.

1.1.1 KVANITITATIVE OG KVALITATIVE METODER

For påvisning av bakterier i næringsmidler kan det brukes kvalitative og kvantitative analyser. Kvantitative målinger sikter mot å finne en verdi for mengden av bakterier i en prøve, som vil være et øyeblikksbilde av det som er i prøven akkurat da. Det vil alltid være en viss måleusikkerhet som gjør det umulig å oppgi eksakt mengde bakterier i prøven. Mens kvalitative målinger tar sikte på å vise tilstedeværelse eller fravær av bakterien i en prøve. Oppgaven vil ha hovedfokus på kvalitativ metode.

1.1.2 SELEKTIVITET

Opplysninger om selektivitet er viktig for metoder laget for å selekttere spesifikke mikroorganismer. Selektivitet er et mål for inklusivitet som er deteksjon av målorganismen og eksklusivitet som er ikke deteksjon av ikke-målorganismer. Inklusivitet og eksklusivitet evalueres under validering av en metode. Da blir et stort antall relevante målstammer kontrollert for inklusivitet og ikke relevante stammer for eksklusivitet (NMKL No. 32, 2017).

1.1.3 SENSITIVITET

For næringsmidler generelt forventes det veldig lav forekomst av patogene bakterier på grunn av hvordan næringsmidler til menneskelig konsum blir behandlet og oppbevart (kjøletemperatur). I tillegg er det enkelte patogener som kan forårsake sykdom ved inntak av svært lav mengde bakterier, dette gjelder bl.a. STEC som kan gi sykdom ved inntak av mindre enn 100 bakterier. Ved forventet lavt bakterieinnhold kan det være utfordrende å påvise bakterien, det er derfor viktig med oppformering for å øke sannsynligheten for å påvise bakterien. Det er av den grunn også viktig å benytte analyser med høy sensitivitet.

Sensitiviteten til analysen/metoden er et mål på metodens evne til å detektere målorganismene, med andre ord sannsynlighet for påvisning av målbakterien. For å oppnå dette benyttes det ofte en kombinasjon av generelle og selektive oppformeringsbuljonger (NMKL No. 32, 2017).

1.1.4 SPESIFISITET

Bakterier kan vokse i mange forskjellige næringsmidler og ofte består mikrobiotaen av flere forskjellige bakteriearter og/eller bakteriestammer samtidig. Spesifikke analysemetoder er tilpasset spesifikke bakterier for å sikre spesifisitet. Spesifisiteten til metoden som benyttes er viktig for å skille mellom den ønskede målbakterien som skal bestemmes fra andre organismer og interfererende stoffer som er til stede i prøven (NMKL No. 32, 2017).

1.1.5 PRØVEUTTAK

Før prøveopparbeidelsen kan starte må prøven tas ut (prøveuttak). Prøven som skal sendes til analyse kan tas ut på forskjellige måter. Vanlige prøvetakingsmetoder er sammensatte prøver som består av blandede prøver av et antall av samme matvare, dyrefôr, dyr eller miljø, hvorfra en testdel tas til undersøkelse på laboratorium og samlet (pooled) prøve er det den fullstendige blandingen av prøven som tas som en helhet for undersøkelse på laboratoriet (ISO 6887-1:2017).

Laboratorieprøvene brukt i denne masteroppgaven bestod av 400 g svinekjøttdeig i pakker hentet fra butikkhylle. Ideelt sett skal det tas ut 100 g testprøve fra ulike deler av laboratorieprøven for deretter å ta ut testdel på 25 g (her tre stk.) fra testprøven. Det er testdelen som videre blir brukt i den første fortynningen. Denne metoden benyttes for å sikre et representativt utvalg av laboratorieprøven fordi bakterien kan være ujevnt fordelt i laboratorieprøven.

1.1.6 PRØVEMATERIALET

Som kort nevnt tidligere vil tilstanden til prøvematerialet påvirke analysen. Frysing av prøvematerialet vil generelt påvirke mikrobiotaen og kan også redusere bakterieantallet. Hvor stor påvirkningen er vil også avhenge av bakterien og hvilket næringsmiddel den befinner seg i, men fryste prøver vil medføre stressede bakterier og i ISO/TS 13136:2012 står det spesifisert hvordan nedfryste STEC-prøver skal behandles/gjenopplives: «La frosne produkter tine ved romtemperatur, og overfør deretter testdelen (x g eller x ml) til en peristaltisk blenderpose eller rør som inneholder 9x ml BPV (bufret peptonvann)».

1.1.7 PRØVESTØRRELSE OG DETEKSJONSGRENSE

Prøvestørrelsen er viktig fordi den har stor betydning for deteksjonsgrensen til analysen. Deteksjonsgrense i bakteriologiske metoder er en målt analysekonsentrasjon, oppnådd ved en gitt måleprosedyre. Med andre ord den laveste konsentrasjon som kan detekteres ved analyse og et mål på den minste konsentrasjonen av en analytt (bakterie) som med en angitt grad av sannsynlighet kan skilles fra en blankprøve (NMKL No. 32, 2017).

I mikrobiologisk kriterium fra det europeiske lovverket 2073:2005 defineres kriterium som når et næringsmiddel kan aksepteres basert på fravær av, forekomst av eller antall mikroorganismer (kvalitativ metode). F.eks. er det i prøvetakningsplanen gitt at det ikke skal forekomme én *Salmonella* i fem prøver av 25 g. Teoretisk sett skal en klare å finne 1 *Salmonella* i 25 g prøvemateriale, men det kan diskuteres om en oppnår dette i praksis. Hvis bakterien ikke blir

påvist i prøven, kan den fortsatt finnes der, men med en så lav konsentrasjon at valgt metode ikke kan detektere bakterien.

I noen tilfeller kan det være ønskelig at disse fem prøver av 25 g skal slås sammen til en stor totalprøve på 125 g. Dette er bl.a. fordi det tar kortere tid og dermed er billigere, men det vil også være ønskelig å analysere større prøvemengder der en vet at bakterien er ujevnt fordelt i produktet. Problemet er at det vil være mye vanskeligere å finne én *Salmonella* i 125 g prøve enn én i 25 g prøve. Utfallet blir at metoden vil være mindre sensitiv.

1.1.8 GENERELLE OG SELEKTIVE ANRIKNINGSBULJONGER

Ved den første fortynningen av prøven er det viktig å velge en anrikningsbuljong som tilfører de riktige næringsstoffene for den bakterien som skal oppformeres. Det benyttes ofte ikke-selektive og/eller selektive anrikningsbuljonger. BPV er en ikke-selektiv anrikningsbuljong som bl.a. brukes ved oppformering av *E. coli* og *Salmonella*. Andre bakterier som ikke har spesifikke krav til vekst, vil også vokse i den ikke-selektive anrikningsbuljongen. For enkelte patogener som f.eks. *Salmonella* gjøres det deretter en selektiv oppformering, gjerne kalt en to trinn oppformering, der prøven overføres til en selektiv buljong. På denne måten kan en sikre vekst ved den generelle oppformeringen for så begrense vekst av uønskede bakterier og fremme vekst av *Salmonella* ved bruk av selektiv buljong.

1.1.9 HOMOGENISERING

I sammenheng med prøveoppbehandling av næringsmidler handler homogenisering om å blande anrikningsbuljongen og prøvematerialet. Det er viktig for å sikre at små klumper av prøvemateriale, som kan inneholde patogene bakterier, blir løst opp og kommer i kontakt med oppformeringsbuljongen, for lettere å oppnå vekst av bakterien det undersøkes for. Det er vanlig å benytte en peristaltisk blender (Stomacher), men bruk av soniekering eksisterer også.

1.1.10 DYRKNINGSBETINGELSER

Bakterienes ulike dyrkningsbetingelser utnyttes for å utelukke eller begrense vekst av bakgrunnsflora i næringsmidler.

1.1.11 ATMOSFÆRISKE FORHOLD

Bakterier har ulikt krav til oksygen i sin atmosfære, enkelte er avhengig av oksygen (aerobe), mens for andre er oksygen toksisk (anaerobe). Det er også bakterier som kan både vokse med og uten oksygen (fakultativ anaerobe) og enkelte som krever en atmosfære med redusert oksygeninnhold (mikroaerofil). Det betyr at ulike bakterier vil dominere forskjellige

næringsmidler og forskjellige steder i næringsmiddelet. Det er også mulig å benytte ulike gasspakninger for å påvirke vekst av ulike bakterier.

Campylobacter er et eksempel på en mikroaerofil bakterie som krever en atmosfære med ca. 5 % oksygen og ca. 10 % CO₂. Det gjør det enkelt å selektene ut *Campylobacter* fra en rekke andre patogene bakterier.

1.1.12 VANNAKTIVITET

Bakterier har ulik evne til å vokse ved forskjellige vannaktiviteter (a_w). a_w er definert som vanndamptrykket til varen dividert på vanndamptrykket til rent vann. De fleste mikroorganismer trives mellom a_w 0,98 og 0,995. De fleste patogene bakteriene som forekommer i næringsmidler vil stoppe og vokse rundt a_w 0,95, med et viktig unntak *Listeria monocytogenes* og *Staphylococcus aureus* som vokser helt ned til henholdsvis a_w 0,92 og 0,86. Lav vannaktivitet kan oppnås ved å tilsette f.eks. salt eller sukker.

1.1.13 TEMPERATUR

Bakterier deles ofte inn etter hvilken temperatur de vokser best psykrofile, mesofile og termofile. Psykrofile bakterier vokser ved lave temperaturer, men har stort sett en vekstoptimumstemperatur på rundt 20 °C. Mesofile bakterier vil som regel ha en optimumstemperatur som ligger rundt vertens (ofte pattedyr) kroppstemperatur (35-40 °C). De fleste patogene bakteriene som forekommer i næringsmidler befinner seg innenfor den mesofile gruppen, men det er noen få patogene bakterier som vokser ved lavere temperatur og regnes som psykrotrofe.

Siden forskjellige bakterier har ulik optimumstemperatur for vekst kan inkubasjonstemperatur brukes for å selektene visse type bakterier. Et godt eksempel på dette er *Yersinia enterocolitica* som er kuldeelskende og kan vokse helt ned til under kjøleskapstemperatur. Det er derfor mulig å selektene bakterien ved å senke inkubasjonstemperatur ned til 30 °C, da annen bakterievekst vil kunne hemmes.

Som nevnt tidligere vil oppformering av *Salmonella* foregå som en to trinns prosess. Denne to trinns prosessen innebærer at inkubasjon etter første fortynning med generell buljong foregår ved 37 °C og etter overføring av prøve til selektiv buljong vil inkubasjonen foregå ved 41,5 °C. På denne måten vil både temperatur og buljongsammensetning bidra til å selektene *Salmonella*.

1.1.14 TID

Bakterier vokser ved at de deler seg i to og fordobles i antall. Dette medfører en at de har en eksponentiell vekst, i en begrenset tidsperiode til det ikke er mer næring. Hvor fort bakterien deler seg blir kalt generasjonstid og den vil variere mellom ulike bakterier. Veksthastigheten til en bakterie avhenger av bl.a. temperatur og veksten vil være raskere ved bakteriens optimumstemperatur (Univeristetet i Oslo, 2021).

Det er gjort noen publikasjoner som har sett på hvordan sammensetningen av mikrobiota endrer seg under oppformeringsprosessen og hvor lang tid en må bruke for å gjenfinne kunstig tilsatt bakterier (Jarvis et al., 2015; Leonard et al., 2015; Ottesen et al., 2013). Leonard et al. (2015) så bl.a. på hvordan mikrofloraen til spinat tilsatt STEC, endret seg gjennom 24 timers oppformering. De kom frem til at minimumstiden som måtte til for å kunne gi en pålitelig bestemmelse av STEC var ni timer og berikelse utover 11 timer økte ikke muligheten for å oppdage STEC merkbart da bakteriens vekstfase så ut til å gå over i stasjonær fase.

I en studie publisert i 2016 ble det brukt NGS (Next generation sequencing) for å karakterisere mikrobiomet, ved fire timers intervaller, for tre forskjellige anrikningsmetoder for oppformering av *L. monocytogenes* fra naturlig kontaminert iskrem. Resultatet viste at *L. monocytogenes* var proporsjonalt større ved time 0 enn da den ble testet 4, 8 og 12 timer senere ved alle tre anrikningss metodene, men etter 24 timer var det *L. monocytogenes* som var dominerende igjen (Ottesen et al., 2016).

1.2 UTFORDRINGER MED PRØVEOPPARBEIDELSE

Et vedvarende problem under forsøk på å gjenopprette patogener fra matbårne utbrudd er at interfererende bakterier også blir anrike og forstyrrer effektiv påvisning og gjenoppliving. I tillegg til uønskede bakterier kan andre interferende stoffer fra næringsmidlene hemme oppveksten/fremveksten av den ønskede bakterien. Hvert næringsmiddel har sin egen mikrobiota som vil respondere på anrikningsforhold i henhold til kompleks økofysiologi (Ottesen et al., 2016). Planter kan f.eks. lage bioaktive anti-quorumsignaler, en forsvarsrespons, som virker som antagonister og kan blokkere quorumsignalene i bakteriene. Quorumsensing er hos bakterier en kommunikasjon mellom celler av bakterier som brukes til å koordinere felles atferd med tilpasning til økt celletetthet (Universitetet i Oslo, 2019).

Interfererende bakterier som har antagonistisk virkning på målbakterien kan også bli oppformert under oppformering. Et eksempel er at *Paenibacillus* ssp., som er i stand til å

hemme og drepe Salmonella, også blir anrikt/oppformert sammen med Salmonella fra tomater og koriander (Ottesen et al., 2016).

Taksonomien og dynamikken til medianrikede arter er sannsynligvis unike for hvert næringsmiddel og spiller en viktig rolle ved opparbeidelse av patogene bakterier. Derfor vil anrikelsesmetoder for spesifikke måtbårne bakterier dra nytte av bedre forståelse av det taksonomiske mangfoldet og hvordan de ulike bakteriene interfererer med hverandre. Dette er viktige grunner for hvorfor det fortsatt arbeides med å forbedre og optimalisere anrikningmetoder for kulturmetoder av patogener i miljø-, mat- og kliniske prøver (Ottesen et al., 2016).

Dette viser et potensiale for å bruke metagenomisk tilnærming for påvisning av STEC på ferske råvarer. Om dette kan benyttes med høy nok sensitivitet vil det kunne eliminere behovet for først å isolere og dyrke opp bakterien for å kunne detektere og karakterisere den. Vurdering av sensitiviteten til metoden har vist at karakterisering kan oppnås ved selv ved svært lave nivåer (10 CFU / 100 g) av tilsatt STEC (Leonard et al., 2015), men det krever mer uttesting for å være pålitelig i reelle prøver.

1.3 DNA EKSTRAKSJON

For rask påvisning av patogene bakterier i næringsmidler brukes molekylære teknikker for påvisning, normalt basert på deteksjon av spesifikke målsekvenser på DNA eller RNA ved bruk av amplifikasjonsprosesser, spesielt PCR (Ceuppens et al., 2014). DNA til analysen må ekstraheres fra bakteriecellene i det aktuelle næringsmiddelet. Denne DNA ekstraksjonen er også en form for prøveoppbehandling som påvirkes av en rekke faktorer.

For å kunne frigjøre DNA fra en celle må cellen lyses. Bakterier har mange fellestrekk i struktur og oppbygning og veldig forenklet kan en si at celleveggen består av peptidoglykaner og fosfolipidmembran/er. Ulikheter i celleveggen, skiller bakterier Gram-positive eller Gram-negative. Hos Gram-positive bakterier er peptidoglykanlaget mye tykkere enn hos Gram-negative, noe som gjør de mer hardføre og robuste. Av den grunn er det vanskeligere å lysere Gram-positive celler og det er derfor lagt inn flere steg i ekstraksjonsmetoder for Gram-positive bakterier.

Det kan være utfordrende å ekstrahere DNA fra patogene bakterier i næringsmidler fordi næringsmidler er fysiske og kjemisk komplekse matrikser som inneholder komplekse mikrobielle samfunn. Det mikrobielle samfunnet vil være forskjellig fra næringsmiddel til næringsmiddel og vil ha ulike innvirkning på DNA ekstraksjonen og påfølgende PCR

reaksjoner. Hemmende komponenter vil nesten alltid være til stede, men kan begrenses slik at den ikke påvirker påfølgende analyser. Derfor bør en, i de tilfeller det er mulig, benytte ekstraksjonsmetoden som er tilpasset det spesifikke prøvematerialet som skal undersøkes (Sekse et al., 2017). Det er av den grunn viktig at ekstraksjonsprosessen evalueres og optimaliseres for hver enkelt analyse og hvert enkelt prøvemateriale.

2 INTRODUKSJON

2.1 ESCHERICHIA COLI

Escherichia coli, også kjent som *E. coli*, er en Gram-negativ, fakultativt anaerob, stavformet bakterier som tilhører familien *Enterobacteriaceae*. Bakterien er i stand til å bevege seg ved hjelp av peritrike flageller som sitter på overflaten til bakterien. Bakterien er en vanlig kommensal bakterie i tarmen til virveldyr. Flertallet av stammene er apatogene, men enkelte stammer kan også være allsidige patogener, som kan forårsake alvorlige tarminfeksjoner hos verten (Tenaillon et al., 2010).

Arten *E. coli* har stor grad av genotypisk og fenotypisk diversitet (plastisk genom) og et gjennomsnittlig *E. coli* genom inneholder opp mot 5000 gener der ca. 2000 av disse er en del av kjernegenomet hos alle stammene. De resterende 2000 genene kan variere mellom stammene, noe som gjør at enkelte *E. coli* kan anskaffe seg virulensassosierte gener (VAGs), som gjør dem i stand til å forårsake sykdom via ulike mekanismer. Det plastiske genomet til *E. coli* er med på å forklare hvorfor enkelte stammer er apatogene, mens andre kan gi alvorlig sykdom (Granum, 2015). Til dags dato er det identifisert mer enn 700 forskjellige serotyper av *E. coli*. Disse er delt inn i forskjellige serotyper i henhold til deres «O» (somatiske eller lipopolysakkarid) og «H» (flagell) antigener (Berhilevych et al., 2018).

E. coli isolert fra verter med intestinal sykdom har blitt gruppert inn i seks hovedkategorier basert på basert på deres evne til å produsere toksiner og til å feste og invadere tarmepitelceller. De intestinale patotypene av *E. coli* som gir enteritt er enteropatogene *E. coli* (EPEC), Shigatoksin-produserende *E. coli* (STEC) også kjent som verotoksinproduserende *E. coli* (VTEC), som inkluderer enterohemorrhagisk *E. coli* (EHEC), enterotoksiske *E. coli* (ETEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC) og diffust adherende *E. coli* (DAEC) (Sperandio & Hovde, 2015). Den mest kjente patotypen av *E. coli* er STEC, der serotype O157:H7 er hyppigst assosiert med alvorlig matforgiftning.

2.2 SHIGATOKSIN-PRODUSERENDE *E. COLI* (STEC)

Fordi alle EHEC produserer Shigatoksin (Stx) er de også kjent som STEC som vil bli benyttet i denne oppgaven. Shigatoksin-produserende *E. coli*, inkluderer de mest virulente stammene av *E. coli* og kan defineres som de stammer av *E. coli* som produserer minst en klasse av det potente cytotoksinet kalt Stx. Det eksisterer mer enn 472 serotyper av STEC og enkelte av serogruppene skiller seg ut ved å oftere blir isolert fra mennesker over hele verden. Den mest kjente er O157, men også O26, O103, O111 og O145 er blant de serogruppene som oftest blir

isolert fra mennesker. Andre kjente serogrupper er O45, O91 og O146 (Sperandio & Hovde, 2015). Den mest kjente serotypen O157:H7 ble for første gang påvist i et større utbrudd med hamburgerkjøtt i USA i 1982. Antallet serotyper og egenskapene deres endres stadig på grunn av det plastiske genomet.

Enkelte seropatotyper ser ut til å være nærmere knyttet til spesifikke reservoar og spesifikke sykdommer. Det ser imidlertid ut til å være en større sammenheng mellom virulensprofilen, dvs. *stx*-subtypen og det kliniske forløpet av sykdommen, enn til selve serotypen.

Stx-toksiner forårsaker akkumulering av væske tarmene og lesjoner i colon gjennom ødeleggelse av kryptepitel (Marjanca Starčič, 2019). Infeksjon av STEC hos mennesker kan forårsake kombinasjoner av vannaktig diaré, blodig diaré og hemolytisk uremisk syndrom (HUS, enkelt sagt nyresvikt). I noen tilfeller, spesielt hos eldre, barn og personer med nedsatt immunforsvar, kan alvorlige komplikasjoner som nyresvikt og eventuelt død oppstå (Granum, 2015).

Flere stammer av STEC har ofte, i tillegg til å produsere Stx, andre gener/genetiske elementer som koder for virulensfaktorer. Eksempel på dette er mobile genetiske elementer (MGE) f.eks. plasmider, bakteriofager, transposoner, patogenitetsøyer og innsettingssekvens-elementer. Disse spiller en viktig rolle i overføring av gener mellom bakterieceller og gjør det mulig for bakterien å tilpasse seg nye miljøer og fremme utviklingen av nye patogener. Av den grunn er de også viktig for virulensfaktorer STEC kan tilegne seg.

Plasmider kan være svært forskjellige og kan være bærere av gener for bl.a. antibiotikaresistens og adhesiner. De fleste STEC stammer assosiert med alvorlig sykdom er bærere av store enterohemolysin-kodende (*ehxA*) plasmider som bidrar til STEC sin kliniske manifestasjon.

2.2.1 VIRULENSFAKTORER

Hos STEC er bakteriofager viktige for uttrykk av *stx* og horisontal genoverføring og gendiversifisering (EFSA, 2020). Produksjonen av Stx reguleres av bakteriofager som bærer *stx*-gener og som lyserer stammer av STEC. (Berhilevych et al., 2018).

Genetiske informasjonen som er horisontalt ervervet er gruppert på genomiske øyer, gjerne kalt patogenitetsøyer. Slike patogenitetsøyer har ikke bare tillatt organismen å feste seg til tarmepitelceller hos mennesker og dyr, for å utkonkurrere kommensal *E. coli* og andre bakterier på infeksjonsstedet, men også for å forårsake alvorlig sykdom (Sperandio & Hovde, 2015).

STEC infeksjon er en kompleks prosess som innebærer uttrykk av en rekke gener. Først og fremst må verten innta tilstrekkelig antall bakterieceller for å bli syk. Når cellene er inntatt må de passere gjennom magesekken/magesyren og tynntarmen før de når tykktarmen, der tilheftning til tarmslimhinnen finner sted. Overlevelse gjennom de øverste delene av gastrointestinal traktus er essensiell for at bakterien skal forårsake sykdom og det avhenger av flere genprodukter som *ure*, *ecf*, *katP* og *stcE* (EFSA, 2020).

2.2.2 SHIGA TOKSIN

Den viktigste virulensfaktoren til STEC Stx. Stx er kodet av *stx*₁ og *stx*₂ gener som er lokalisert på lambdoide bakteriofager inkorporert i bakteriegenomet (profag) (Macori et al., 2020). Når profagen ligger latent i bakteriegenomet vil den ha en lysogen syklus (passiv), men fagene kan induseres til å gå inn i en lytiske syklus (aktiv). Induksjon til lytisk syklus kan oppstå etter at bakteriene blir eksponert for DNA-skadelige midler som f.eks. UV-lys, antibiotikum eller lave jernforhold. Når bakteriofagen induseres vil nye fagpartikler, sammen med Stx, bli produsert i stort antall. På grunn av belastningen dette påfører bakteriecellen vil den til slutt lysere og toksinet frigjøres sammen med fagpartikler. Shigatoksiner som frigjøres virker på vertscellen, mens bakteriofagene som frigjøres kan infisere nye ikke-patogene *E. coli* celler og dermed spre *stx*-gener til nye bakterier. På denne måten kan bakteriofager konvertere ikke-patogene bakteriestammer til STEC (Granum, 2015).

Shigatoksin er en del av en generell klasse av proteintoksiner referert til som AB₅ holotoksiner (Silva et al., 2017). Shigatoksiner har samme generelle struktur (seks-komponent-protein) og virkningsmekanisme. Toksinet består av to underenheter, én komponent som er A enhet og resterende fem komponenter som danner B enhet (pentamer) (Granum, 2015). B-enhet binder seg til gangliosider, slik som globotriaosylceramide (Gb3) funnet Paneth-celler i tarmslimhinnen hos mennesker og overflaten av nyreepitelceller (Croxen & Finlay, 2010; Granum, 2015). A1 domene til enhet A blir frigjort av en intracellulær protease og blir tatt opp ved endocytose. Videre transporteres den til golgiapparatet og endoplasmatiske retikulum, før det translokteres til cytosol i cellen der det inaktiverer 60S underenhet av ribosomet gjennom enzymatisk aktive komponenter (spesifikke N-glykosidaser). (Granum, 2015; Silva et al., 2017) Et enkelt holotoksinmolekyl som leveres og behandles riktig er tilstrekkelig til å drepe en målcelle ved å hemme proteinsyntese (Silva et al., 2017).

En undersøkelse, utført i 1977, av prøver isolert fra personer med diaré viste et toksin som hadde karakteristiske cytotoxiske effekter på nyreceller til afrikanske grønne aper.

Etterfølgende undersøkelser bestemte at disse giftstoffene kunne deles inn i to hovedgrupper: Stx1 og Stx2 (Sperandio & Hovde, 2015). Det er beskrevet fire subtyper av toksinet Stx1 (Stx1, Stx1b, Stx1c og Stx1d), som videre deles inn i en rekke genetiske varianter, og 12 subtyper av Stx2 (Stx2a, Stx2, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f og Stx2g), som igjen deler seg i totalt 93 genetiske varianter. De to hovedgruppene er relativt ulike hverandre og det er omtrent 55 % forskjell i deres aminosyresekvens (EFSA, 2020). Alle hovedgrupper av Stx kodes av et tilsvarende gen *stx*, som vil si at Stx2a kodes av *stx*_{2a}.

I dag er *stx*₂ oftere assosiert med sykdom sammenlignet med *stx*₁. Blant *stx*₂ er subtypene *stx*_{2a}, *stx*_{2c} og *stx*_{2d} nærmest beslektet og stammer som produserer disse subtypene er oftere forbundet med hemorrahgisk kolitt og HUS hos mennesker (Fuller et al., 2011). Subtype *stx*_{2a} regnes som den mest virulente. Stammer kan være bærere av gener for begge subtypene, samt flere enn én *stx*₂ subtype samtidig, men stammer med mer enn én *stx*₁-undertype er ikke beskrevet (EFSA, 2020). Noen subtyper, *stx*_{2e}, *stx*_{2f} og *stx*_{2g}, er i hovedsak funnet i dyr (Sperandio & Hovde, 2015).

2.2.3 ADHESJON / INTIMIN

STEC kan i tillegg til å produsere Stx, ha spesifikke gener som koder for adhesjon, *eae*. For *eae*-positive STEC spiller proteinet intimin og dens reseptor Tir (Translocated intimin receptor) en viktig rolle i A/E (attaching and effacing) lesjoner i tykktarmen, etter initiell adhesjon via andre mekanismer. Intimin og Tir kodes av genet *eae* og er lokalisert på en patogenitetsøy på bakteriekromosomet LEE (locus of enterocyte effacement) (Granum, 2015; World Health Organization, 2019).

Når *eae*-positive STEC kommer i nær kontakt med vertsceller uttrykkes Tir. Det er via membranproteinintimin bakterien kan uttrykke Tir på celleoverflaten og videre translokere Tir via type III-sekresjonssystem (T3SS) til tarmepitelcellemembranen på verten, der den fungerer som et bindingssted for bakterien via intimin bindingsdomen (IBD) på celleoverflaten til *E.coli* (Ross & Miller, 2007). Kontakten mellom bakterie og tarmepitelcellen initierer en cellulær respons og det dannes en pidestall-lignende struktur som sikrer en tettere binding mellom bakterie og epitelcelle (Granum, 2015). Denne tilknytningen fører til aktinrekruttering i tarmepitelcellen og dannelse av A/E-lesjon, som er forløperen til forstyrrelse av tarmcellemembranen og diaré hos infiserte individer (Ross & Miller, 2007).

I tillegg til å binde seg til det bakterieavledede Tir-molekylet, bindes intimin også til integriner og nukleolin på vertscelleoverflaten. Den molekylære «sprøyten» (apparatet som er nødvendig

for å endre signalhendelser i dannelsen av aktinrike pidestaller) kan til slutt injisere 50 forskjellige distinkte effektormolekyler i vertscellene (Sperandio & Hovde, 2015).

Adheransefaktorer intimin er ofte til stede hos høyvirulente STEC. Kombinasjonen av *stx*₂ og adhesjonsgenet *eae* har spesielt vært assosiert med utviklingen alvorlig sykdom som HUS og hemorrahagisk kolitt og det har blitt foreslått en uspesifikk synergi mellom adhesinet intimin og *stx*₂. I en undersøkelse fra Tyskland ble det funnet at 76 % av pasienter med STEC infeksjon (O157) med sorbitolfermentering hadde HUS. Denne spesifikke STEC stammen er typisk positiv for både *stx*_{2a} og *eae* (Granum, 2015).

2.3 STEC RESERVOAR OG SMITTEVEIER

Storfe blir sett på som det naturlige reservoaret til STEC, men andre drøvtyggerarter kan også være reservoar til bakterien (Sperandio & Hovde, 2015). STEC har også blitt isolert fra et bredt spekter av husdyr og ville pattedyr, fugler og insekter; disse dyrene kan være mindre signifikante kilder til STEC, men spiller en viktig rolle i spredning av bakteriene (Pires et al., 2019). STEC kan også overleve, gjerne opptil flere måneder, utenfor dyrene i for eksempel avføring til storfe, jord og vann (Marjanca Starčič, 2019).

STEC-kolonisering hos storfe er vanligvis asymptomatisk fordi de ikke har den vaskulære reseptoren lobotriaosylceramide-3 (Gb3) for *stx*. Fravær av reseptoren hindrer toksinet i å bli tatt opp ved endocytose og transportert til andre organer som kan være følsomme for toksinet, og dermed blir de ikke syke (Sperandio & Hovde, 2015). I motsetning til storfe kan svin ha kliniske manifestasjoner på grunn av STEC-infeksjoner. Ødem sykdom er forårsaket av *E. coli*-stammer som uttrykker *stx*_{2e}-genet og rammer ofte grisunger ved ablaktasjon (avvenning fra melk fra purke) og kan gi alvorlig nevrologisk forstyrrelser som kan være dødelig (Tseng et al., 2015).

STEC overføres til mennesker hovedsakelig gjennom konsum av kontaminert mat, som rå eller underkokt storfekjøtt, rå melk, fekal forurensset vann, frukt og grønnsaker (Verhaegen et al., 2016). Det er også oppdaget tilfeller av smitte ved direkte kontakt med dyr, miljøforurensning og overføring mellom mennesker gjennom fekal-oral smitte (EFSA, 2020). Det rapporteres om at kontaminert storfekjøtt og meieriprodukter er to av de viktigste kildene til infeksjon av STEC hos mennesker (Wieczorek & Osek, 2020), men sammen med anbefalinger fra myndigheter om å spise mer frukt og grønt som salat og spirer, som gjerne konsumeres rått, ser en også en økning av STEC utbrudd i sammenheng med slike produkter (Hou et al., 2013).

Under slakteprosessen kan enkelte skrotter forurenses, direkte fra egen avføring eller andre fekalt forurensede slakteskrotter og dermed kontaminere produkter til humant konsum. Denne faren gjelder først og fremst produkter som ikke blir varmebehandlet, samt deig- og kjøttdeigprodukter der bakterien blir jevnt fordelt i produktet og det ikke blir sikret høy nok kjernetemperatur under tilberedning (Granum, 2015).

STEC overlever ikke varmebehandling som pasteurisering, steking og koking, men hvis ikke matvarer varmebehandles tilstrekkelig kan bakterien utgjøre en risiko for sykdom. Sykdomsfremkallende STEC har en lav infektiv dose og det er blitt estimert at inntak av 100-1000 bakterier er nok til å forårsake sykdom og for enkelte serogrupper (O157 og O111) er estimatet enda lavere (> 100 bakterier) (Granum, 2015; Paton & Paton, 1998). I tillegg har STEC evnen til å overleve godt i miljøet på grunn av organismens karakteristiske trekk. STEC er både salttolerant og syretolerant, som gjør den i stand til å passere magesekken til tross for magesyren. Det er vist at STEC kan overleve over en måned ved pH 3.6-3.9. STEC kan også overleve med lav vannaktivitet. Til sammen fører dette til at STEC konkurrerer godt med annen bakterieflora og dermed kan overleve lenge i omgivelsene (Granum, 2015). Det gjør at kontaminasjon, ikke bare fra dyret, men også fra omgivelsene kan utgjøre en fare for smitte.

2.4 SYKDOM FORÅRSAKET AV STEC

STEC sitt potensiale til å forårsake sykdom avhenger av en rekke faktorer, infektiv dose, følsomhet til verten, virulenskombinasjoner og genuttrykk, men også om maten er beregnet på å bli konsumert etter teknologiske behandling (f.eks. pasteurisering eller matlaging) eller som ferdigmat/ferskt vil være av betydning.

Sykdom fra STEC kan variere fra asymptomatisk bærertilstand til hemorrhagisk kolitt og HUS. Sykdomsforløpet starter gjerne med vandig diare som utvikler seg til en kraftig og blodig diaré i løpet av noen dager, gjerne med magekramper og buksmerter. Den smittede kan også få feber, men dette er mer varierende fra pasient til pasient (Granum, 2015). De fleste smittede blir imidlertid friske innen 10 dager (Marjanca Starčič, 2019). Som nevnt innledningsvis er barn, eldre og personer med nedsatt immunforsvar spesielt utsatt for å utvikle alvorlige komplikasjoner som nyresvikt/HUS og eventuelt død (Gyles, 2007).

Risikoen for alvorlig sykdom er knyttet sammen ved virulensfaktorene identifisert for en STEC stamme. STEC-stammer med kombinasjonen av *stx_{2a}* og adhesengener *eae* og *aggR* er oftere sett i assosiasjon med hemorrhagisk kolitt og HUS. Stammer med andre Stx subtyper kan forårsake diare, men deres assosiasjon med HUS er mindre sikker og kan være svært variabel.

Alle STEC bør imidlertid vurderes som sykdomsfremkallende for mennesker (World Health Organization, 2019).

2.5 MATBÅRNE UTBRUDD FORÅRSAKET AV STEC INTERNASJONALT OG I NORGE

2.5.1 INTERNASJONALT

STEC har vært årsak til mange matbårne utbrudd og sporadiske tilfeller, spesielt i den industrialiserte delen av verden (Granum, 2015), og er en av de vanligste årsakene til gastrointestinal sykdom rundt om i verden i dag (EFSA, 2020). I 2015 kom verdens helseorganisasjon ut med en rapport der de estimerte at matbårne STEC-utbrudd forårsaket mer enn 1 million sykdomstilfeller i 2010. Disse resulterte i mer enn 100 dødsfall og nesten 13 000 «disability-adjusted life years (DALYs)» leveår justert for funksjonshemming (Havelaar et al., 2015). DALYs kombinerer informasjon om både sykkelighet og dødelighet (Stoltenberg, 2020).

Tilfeller av STEC-infeksjoner hos mennesker rapporteres av EU medlemsland og EØS-land (Det europeiske økonomiske samarbeidsområdet) i samsvar med beslutning nr. 1082/2013/EU av Europaparlamentet (European Parliament) og rådet til EU (Council of the EU). Årlig blir tilfellene rapportert til det europeiske overvåkingssystemet TESSy holdt av Det europeiske smittevernbyrået (ECDC) (EFSA, 2020). Alle land som er en del av EU eller EØS, med unntak av Portugal, rapporterte om tilfeller av STEC hos mennesker i perioden 2012-2017.

Det første rapporterte utbruddet som involverte STEC, ble oppdaget i USA i 1982 på grunn av hamburgerkjøtt forurenset med O157:H7 (Marjanca Starčič, 2019). I 1993 ble det igjen rapportert om et nytt utbrudd med hamburgerkjøtt av samme serotype, med denne ganger i et mye større omfang. Flere hundre mennesker ble syke, tre barn døde og flere fikk livsvarige nyreskade (Granum, 2015). I 2000 ble igjen O157:H7 sammen med *Campylobacter jejuni* påvist å være årsaken til et stort utbrudd i vannforsyningen i byen Walkerton i Canada. Det samlede estimerte antall tilfeller assosiert med utbruddet var over 2300 personer og seks personer omkom (Bruce-Grey-Owen Sound Health Unit, 2000).

Tidligere var det denne serotypen som dominerte med tanke på sykdom og utbrudd med STEC, men i senere tid er det funnet mange andre serotyper som også forårsaker store utbrudd. Utbruddsstammen i det foreløpig største utbruddet av STEC var *E. coli* O104:H4 isolert fra spirer. Det ble registrert i Tyskland i 2011 og det ble rapportert 3816 tilfeller, hvor 845 av disse utviklet HUS og 54 døde (Marjanca Starčič, 2019; Sperandio & Hovde, 2015). Utbruddsstammen var opprinnelig en *E. coli* variant tilhørende gruppen EAEC som gjennom

utveksling av virulensgener (transdusert med *stx*_{2a}-kodende bakteriofag) hadde ervervet evnen til å produsere Stx (Sperandio & Hovde, 2015).

I 2020 kom EFSA (European Food Safety Authority) rapport om STEC og folkehelserisiko ved kontaminert av mat med STEC. EFSA skriver at det i denne perioden var serogruppene O157, O26, O103, O91 og O104 som var de fem mest utbredte årsakene humane STEC-infeksjoner i EU. De skriver også at serogruppene O157 og O26 oftest var forbundet med alvorlige STEC-infeksjoner (HUS, sykehusinnleggelse, blodig diare) (EFSA, 2020). I USA er det serogruppene O157, O26, O45, O103, O111, O121 og O145 som er de viktigste i sammenheng med STEC-infeksjon hos mennesker.

2.5.2 I NORGE

I 2006 hadde Norge det mest omfattende utbruddet hittil og det ble forårsaket av *E. coli* O103:H2. Til sammen ble 18 personer smittet og 16 av disse var barn. Ti av barna utviklet HUS hvorav ett barn døde. Sannsynlig smitekilden ble utpekt å være morrpølse. Gjennom molekylærbiologiske typingsmetoder ble isolatene verifisert til å være identiske med utbruddsstammene isolert fra pasientene (Granum, 2015). Det ble i 2009 registrert et nytt STEC utbrudd som skyltes sorbitolfermenterende *E. coli* O157 med ukjent smittekilde. Utbruddet forårsaket 13 syke barn, der ni utviklet HUS og én døde (Fraser et al., 2016).

Det ble i 2019 meldt inn 511 tilfeller av infeksjon med STEC, som er en liten økning sammenlignet med tidligere år 2018 (495 tilfeller) og 2017 (406 tilfeller). STEC infeksjonene i 2019 førte til 122 sykehusinnleggelser, fleste i aldersgruppen 0-9 år, der ti pasienter utviklet HUS, men ingen døde. Fra 2010 til 2016 var antallet meldte tilfeller av STEC-infeksjon mye lavere enn det den var fra 2017-2019, men antall tilfeller som utvikle HUS fortsatte derimot å holde seg lavt. Dette kan forklares med at det er blitt innført dyrkningsuavhengig diagnostikk (PCR) som videre har først til at flere pasienter undersøkes for STEC. Økningen er fortsatt bekymringsverdig fordi STEC kan gi svært alvorlig sykdom (Lyngstad et al., 2020).

2.6 FOREKOMST AV STEC I DYR OG MAT I NORGE

I Norge blir det ikke gjennomført regelmessige undersøkelser av STEC i mat og dyr, men det gjennomføres stort sett mindre kartlegginger for å få vite noe om forekomst av STEC i spesifikke næringsmidler/matrikser/dyr.

En kartlegging ble gjennomført for å undersøke forekomsten av STEC i bl.a. sau og storfe. Bakgrunnen for undersøkelsen var utbruddet med morrpølse fra 2006, som beskrevet over, forårsaket av *E. coli* O103:H25. Forekomsten av enkelte *E. coli* O-grupper (O26, O103, O111,

O145 og O157) i norsk sauebesetning ble kartlagt. Prøver fra i overkant av 500 sauebesetninger ble hentet inn i to omganger (2006 og 2007) og analysert. Under 1 % av besetningene hadde forekomst av *stx*- og *eae*-positive stammer tilhørende serotypene O26:H11, O103:H2 og O157:H7. Det ble ikke påvist *E. coli* O111, *stx*-positive og *eae*-positive *E. coli* O145, men det ble påvist *stx*-negative og *eae*-positive *E. coli* O145 i 28,9 % av besetningen (Folkehelseinstitutt et al., 2006).

I perioden 2011-2012 ble det tatt ut prøver fra importert saue- og storfekjøtt for å undersøke tilstedeværelse av sykdomsfremkallende *E. coli*. Det ble funnet en lav forekomst (0,6 %) av *stx*₁-positive, *eae*-positive *E. coli* O103 forsendelsene av sauekjøtt, men fordi det kun ble tatt ut prøver fra 13 forsendelser med importert sauekjøtt vil resultatet ikke være et reelt estimat på forekomsten. Det ble derimot tatt ut prøver fra 177 storfekjøttforsendelser. Det ble ikke påvist *stx*-positive prøver, men i 2,8 % av forsendelsene ble det påvist *eae*-positive *E. coli* O26 i 2,8 %. Det ble ikke påvist *stx*-positive *E. coli* O26, O111, O145 eller O157 (Gro S. Johannessen et al., 2012).

I 2018 ble det gitt ut en rapport om zoonotisk *E. coli* hos norsk storfe. Det ble tatt ut avføringsprøver fra 179 melkekubesetninger. Resultatene viste at forekomsten av STEC av serogruppene O26, O91, O103, O121, O145 og O157 er lav i norske melkekubesetninger (Gro S. Johannessen & Økland, 2018).

I 2017 ble det tatt prøver fra kvernet kjøtt og kjøttdeig av norsk storfe. Prøvene ble undersøkt for forekomst av genetiske markører (*stx*₁, *stx*₂ og *eae*) forbundet med STEC og positive prøver ble videre undersøkt for genetiske markører for serogruppene O26, O91, O103, O121, O145 og O157. Det ble til slutt forsøkt å isolere STEC fra 27 utvalgte prøver. 73 prøver var positive for *stx*-gener og 33 prøver var positive for både *stx*- og *eae*-gener. Uavhengig av serogruppe ble det isolert 2 STEC, en O26 (*stx*₁ og *eae* positiv) og en O91 (*stx*₂ positiv). Resultatene tyder på at det er lav forekomst av STEC fra overnevnte serogrupeer, men at de kan forekomme. Undersøkelsen ga viktig oppdatert kunnskap fordi det er lenge siden forrige studie ble gjennomført og den i stor grad kun fokuserte på *E. coli* O157:H7 (Gro S. Johannessen & Økland, 2018).

2.7 FORKOMST AV STEC I SVIN INTERNASJONALT OG I NORGE

Selv om storfekjøtt blir sett på som den viktigste kilden til STEC for mennesker, er det beskrevet STEC-måtbåren sykdom assosiert med svinekjøtt. Det har bl.a. blitt beskrevet utbrudd av STEC

O157:H7 assosiert med eksponering av forurenset svinekjøtt i Canada (Trotz-Williams et al., 2012).

Gjennom en toårs periode fra jan. 1998 til des. 1999 ble det i Norge gjennomført en studie der storfe, sau og gris ble undersøkt for tilstedeværelsen av STEC O157:H7. Tarminnhold fra 1976 griser ble undersøkt og det ble funnet isolater fra to griser fra forskjellige flokker. En oppfølgingsstudie avdekket en annen positiv testgris fra en av disse besetningene. PCR-analyse viste at isolatene var bærere av *stx*₂ og intimin proteinet *eae*, samt flic-H7 flagellum. Det totale funn av O157:H7 for storfe, sauer og griser var lav sammenliknet med andre land (Johnsen et al., 2001).

En rekke land har siden da undersøkt forekomsten av ikke bare O157:H7, men også ikke-O157-stammer av STEC i svineprodukter, svineskrotter og fecesprøver fra svin. Italia (Bardasi et al., 2015; Ercoli et al., 2016; Villani et al., 2005), Polen (Wieczorek & Osek, 2020), Ukraina (Berhilevych et al., 2018), Frankrike (Bouvet et al., 2002) og USA (Tseng et al., 2015). Resultatene tyder på at forekomsten av STEC i svinekjøtt er lav, men noe høyere for svineskrotter og enda høyere for fecesprøver. Resultatene viser også at STEC ofte er *stx*₂-positive som i overveiende grad bærer *stx*_{2e}-genet.

2.8 DETEKSJON OG KARAKTERISERING AV STEC

Fordi STEC finnes i et bredt spekter av næringsmidler har utviklingen av metoder for påvisning av bakterien i komplekse matrikser vært essensiell. En av hovedutfordringene er behovet for raske og sensitive metoder som kan brukes på et bredt spekter av næringsmidler og skille mellom stammer av STEC (Verhaegen et al., 2016).

2.9 TIDLIGERE METODIKK

Tidligere ble alvorlig sykdom i forbindelse med STEC-utbrudd oftest sett i sammenheng med *E. coli* O157 (H7 eller H-), uttrykk av antigen for flageller (H7) eller mangler antigen for flageller (H-). Dette var grunnlaget for, tidligere mye brukte, serogruppebaserte metoder som f.eks. NMKL, nr. 164: *E. coli* O157 - påvisning i næringsmidler og fôr. Tradisjonelt ble STEC O157 isolert ved bruk av immunomagnetisk separasjon (IMS). Teknikken separerer *E. coli* O157 fra matriksen, ved hjelp av magnetiske kuler som er dekket av spesifikke antistoffer mot O157 antigenet. Videre utnyttet den klassiske *E. coli* O157:H7 sin manglende evne til å fermentere sorbitol. Ved å dyrke kule-bakteriekomplekset på selektivt medium sorbitol-MacConkey-agar (SMAC) vil *E. coli* O157:H- danne fargeløse/klare kolonier, i motsetning til kolonier som fermenterer sorbitol og danner rosa kolonier. Videre må utvalgte kolonier

agglutineres med anti-O157 antiserum for å bekrefte tilstedeværelse av ikke sorbitolfermenterende O157. Andre selektive medier som også benyttes er f.eks. CHROMAgar O157 som utnytter at *E. coli* O157:H7 er β -glukuronidase-negativ og dermed vil danne gammelrosafargede kolonier. En ulempe med denne metoden er at den ikke kan brukes til å påvise andre STEC serotyper og sorbitolfermenterende O157:H-, da disse vil se ut som alle andre *E. coli* (Haugum et al., 2014), i tillegg til at den kun sier noe om serogruppe og ingenting om virulenspotensialet. Metoden benyttes fortsatt i dag, men der er blitt obligatorisk å konfirmere tilstedeværelsen av de viktigste virulensgenene *stx* og *eae* på bakterieisolatene som isoleres av et referanselaboratorium (Granum, 2015).

IMS benyttes også for andre O-grupper. Spesifikke antistoffer må lages for hver O-gruppe og på grunn av den raske utviklingen av nye serogruyper av STEC, er det et krevende arbeid. Det er derfor i stor grad blitt vanlig å gå over til DNA-baserte metoder som baserer seg på PCR for direkte påvisning av virulensgener hos STEC-stammer som den internasjonale standarden ISO/TS 13136:2012 (Sperandio & Hovde, 2015).

2.10 NYERE METODIKK

Det er i dag vanlig å benytte seg av kulturavhengige påvisningsmetoder for screening av STEC i prøver. Dette inkluderer anrikelse i selektive medier og påfølgende bruk av DNA-baserte metoder for påvisning, som real-time PCR, etterfulgt av forsøk på isolering av bakterien (Haugum et al., 2014).

DNA-baserte metoder vil starte med påvisning av gener som koder for Stx (*stx*₁ og *stx*₂), med påfølgende isolering og verifisering av bakterieisolatet (Granum, 2015; Haugum et al., 2014). Det er også vanlig og screene etter andre virulensgener som f.eks. *eae* og *ehxA* i STEC-stammer (Haugum et al., 2014).

I 2012 ble den internasjonale standarden ISO/TS 13136:2012 Mikrobiologi av mat og dyrefôr Real-time PCR-basert metode for påvisning av matbårne patogener - Horizontal metode for påvisning av STEC og bestemmelse av O157, O111, O26, O103 og O145 utgitt. Det er en standard for påvisning av STEC i produkter beregnet for konsum og fôring av dyr, miljøprøver innen matproduksjon og mathåndtering, og miljøprøver i primærproduksjonen, samt bestemmelse av serogruppene O157, O111, O26, O103 og O145, som er blant de som anses for å ha høyest potensial til å forårsake alvorlig sykdom hos mennesker (ISO/TS13136:2012; Verhaegen et al., 2016).

Den spesifiserte metoden omfatter flere steg som kort kan beskrives i 5 punkter:

1. Oppformering av matriksprøver (feces eller næringsmidler)
2. DNA-ekstraksjon
3. Påvisning av virulensgener (*stx* og *eae*) med bruk av real-time PCR
4. Påvisning av serogruppeassosierte gener
5. Isolering av STEC fra PCR-positive prøver

Metoden er svært sensitiv og bidrar til økt sannsynligheten for å finne positive prøver.

Isolering av STEC og påfølgende karakterisering er nødvendig for å bekrefte at det PCR-positive signalet kommer fra gener til stedet på det isolerte bakterieisolatet (Verhaegen et al., 2016). Ved positivt resultat for en av genene assosiert med serogruppene over kan en serogruppespesifikk anrikning (SSE) utføres på den gjenværende anrikningskulturen. Det kan være med på å lette isolasjonen av STEC. Deretter strykes SSE på TBX (Trypton-bile-glucuronic agar) eller annet egnet medium som SMAC. Det er også mulig å ikke utføre SSE og stryke anrikningsbuljongen direkte på TBX. Karakterisering av isolatene skjer ofte ved påvisning av virulensgener (*stx*) som bestemmes med PCR. Som et alternativ til dette benyttes helgenomsekvensering (WGS). WGS muliggjør rask diagnostikk og typing som er viktig i bl.a. utbruddsetterforskning. Dette er mer attraktivt i dag fordi kostnaden for WGS har sunket (Joensen et al., 2014).

For påvisning av STEC er det nødvendig å kombinere både fenotypiske og genotypiske metoder for å kunne skille isolater fra hverandre. Dette er tids- og arbeidskrevende noe som også gjør prosessen kostbart. I tillegg er den kulturbaserte isoleringen av STEC problematisk. Det er viktig å velge et passende anriknings- og isolasjonsmedium, som skal fremme vekst av STEC, men samtidig hemme bakgrunnsflora og sikre isolering og konfirmering av STEC fra en rekke matvarer (Verhaegen et al., 2016).

2.10.1 KONVENSJONELL PCR OG REAL-TIME PCR

PCR er en kvantitativ metode som benyttes til amplifisering av små spesifikke fragmenter av DNA eller RNA. Det benyttes et temperaturprogram som starter med høy temperatur slik at templatet (mål-DNA) blir denaturert og separert til enkelttrådet DNA, deretter senkes temperaturen for at primer skal binde seg til komplementær-sekvensen til mål-DNA. Til slutt må temperaturen økes for at polymerasen skal kunne forlenge primerne og syntetiserer DNA-tråden. Hele denne prosessen vil foregå i sykluser opptil 35 ganger. For hver syklus som fullføres doubles mengden av det spesifikke DNA-fragmentet og etter 30-35 sykluser vil den

spesifikke sekvensen som tidligere ikke kunne påvises blant millioner av andre sekvenser enkelt bli identifisert som et tydelig bånd på agarose-DNA-gel (Fossum & Dissen, 2021; James D. Watson et al., 2013).

Real-time PCR baserer seg på prinsippene fra konvensjonell PCR, men det er mulig å måle konsentrasjonen av DNA-templat gjennom hver amplifikasjonssyklus på grunn av tilstedeværelsen av DNA-bindende fargestoffer som frigjør et fluorescerende signal. Prober merket med fluoriserende fargestoff blir tilsatt reaksjonen og ved akkumulering av målgenet detekteres fluorescenssignalet. Dette skjer fordi proben binder seg til den spesifikke DNA-sekvensen (gitt av mål-DNA), og ved syntetisering av DNA degraderes proben noe som fører til at det fluoriserende fargestoffet frigis. For at resultatet skal gi positivt utslag må fluorescenssignalet over en terskelverdi (Ct-verdi, også kalt Cq-verdi), som er det tidspunktet i PCR-syklusen der fluorescensintensiteten er større enn bakgrunnsfluorescens. Følgelig, jo større mengde mål-DNA i utgangsmaterialet, desto raskere vil en signifikant økning i fluorescerende signal vises, noe som vil gi en lavere Ct-verdi. Ct-verdien gir et mål på hvor mye DNA-templat som er i prøven. Med real-time PCR er det også mulig å beregne opprinnelig mengde templat fra verdien. Real-time PCR er mer følsom og spesifikk i forhold til konvensjonelle PCR (Wong & Medrano, 2005).

Ofte benyttes PCR i en multiplex-versjon (mPCR) for rask påvisning av tilstedeværelsen av virulensgener i STEC-prøver (Berhilevych et al., 2018). Prinsippet bak multiplex PCR er den samme som den for konvensjonell PCR, med unntak av at det kreves mer enn ett par primere. mPCR har også blitt brukt sammen med real-time PCR. Primerne kan spesifikt kombineres med deres tilsvarende DNA-templat, og mer enn ett DNA-fragment vil bli amplifisert i en reaksjon samtidig (Shang et al., 2020).

2.11 Formålet med oppgaven

Som beskrevet i introduksjonen har STEC sitt hovedreservoar hos drøvtyggere, men i senere tid har matbårne utbrudd blitt sett i sammenheng med en rekke andre næringsmidler, deriblant produkter fra svin. I denne studien ble 157 prøver fra norsk kvernet kjøtt og kjøttdeig av svin inkludert. Formålet med denne masteroppgaven var:

- i. Undersøke forekomsten av *stx*₁, *stx*₂, og *eae* i norsk kvernet kjøtt og kjøttdeig av svin.
- ii. Undersøke *stx*₂-positive prøver for *stx*_{2a}.
- iii. Forsøke i isolere STEC fra *stx*-positive prøver.

3 MATERIALER OG METODE

3.1 Materiale

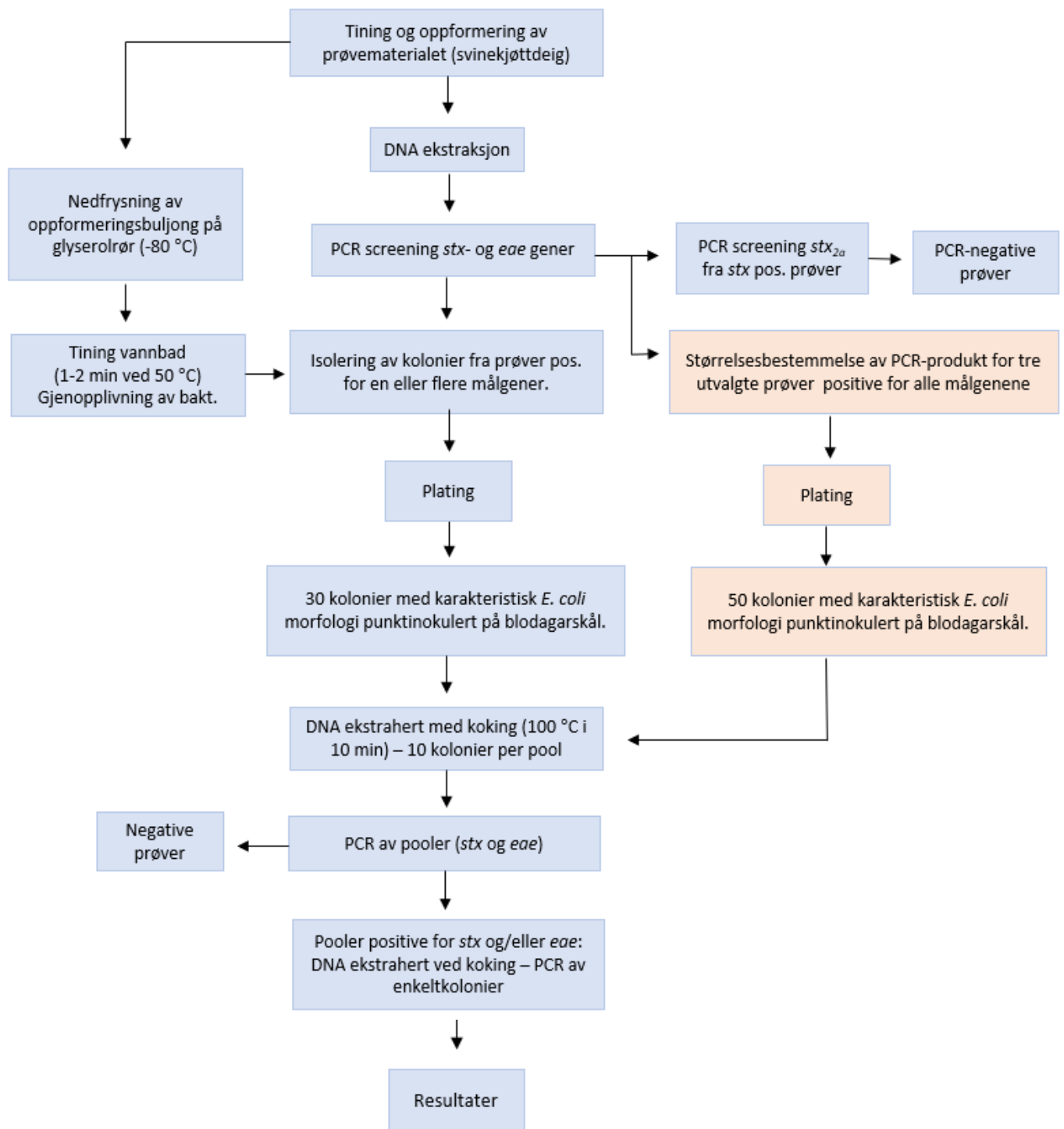
3.1.1 Innsamling av prøvemateriale

Mattilsynet hentet i 2019 inn kvernet kjøtt og kjøttdeig av norsk svin for å undersøke tilstedeværelse av *Yersinia enterocolitica*. Prøvene ble tilfeldig plukket fra butikk gjennom et helt år. Det ble totalt tatt ut 168 prøver ganger tre til OK-programmet (Johannessen & Svindland, 2021). To av parallellene ble fryst ned og oppbevart ved -80 °C. I denne oppgaven ble det nedfryste prøvematerialet fra Mattilsynets prosjekt brukt for å undersøke tilstedeværelsen av Shigatoksin-produserende *E. coli* i kvernet kjøtt og kjøttdeig av svin.

3.2 Metode

I denne studien ble prøvematerialet oppformert og undersøkt for tilstedeværelse av genetiske markører (*stx* og *eae*). Det ble også gjort forsøk på isolering av STEC fra PCR- positive prøver for en eller flere genetiske markører.

Studien følger ISO/TS 13136:2012 (International Organization for Standardization, 2012) for deteksjon og isolering av STEC. Et flytskjema over oppgaven vises i figur 1 og fungerer som en oversikt over de ulike trinnene i laboratorieforsøkene og metodene som ble benyttet.



Figur 1: Flytskjema for studien med en overordnet oversikt over trinnene i laboratorieforsøkene.

3.3 SCREENING AV VIRULENSGENER

3.3.1 PRØVEOPPFORMERING

Fryste svinekjøttdeigprøver lagret i stomacherposser (25 g) ved -80 °C, ble tint i romtemperatur og tilsatt 225 g ± 5 g bufret peptonvann (BPV-ISO) før de ble homogenisert i 30 sekunder. Prøvene ble oppformert i inkubator ved 37 °C ± 1 °C i 18-24 timer. For hver femte kjøttdeigprøve ble det også tatt ut 1000 µl bufret BPV-ISO (blankprøve) som, frem til måling av DNA-utbytte på Nanodrop gjennomgikk den samme behandling som svinekjøttdeigprøvene. Etter endt inkubasjon ble 1 ml oppformeringsbuljongen overført til eppendorfrør for videre DNA ekstraksjon. To rør med 1.7 ml glyserol ble også tilsatt oppformeringsbuljong (3.25 ml) og disse ble lagret ved -80 °C for videre isolering av bakterier.

3.3.2 DNA EKSTRAKSJON

DNA ble ekstrahert fra oppformeringsbuljong ved bruk av et kommersielt kit, mens DNA-ekstraksjon i sammenheng med isolering og rendyrking av kolonier ble utført ved koking.

3.3.2.1 EKSTRAHERING AV DNA MED KIT

DNA fra oppformeringsbuljongen ble ekstrahert ved bruk av DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Tyskland) i henhold til produsentens anvisning.

Eppendorfrør med 1 ml oppformeringsbuljong ble sentrifugert i 10 min ved 7500 rpm. (revolutions per minute). Supernatanten ble kastet og pelleten ble løst med 180 µl Buffer ATL. Deretter ble det tilsatt 20 µl Proteinase K før alt ble blandet med vortex og inkubert i termomikser ved 56 °C og 800 rpm. i 30 min. Prøven i eppendorfrøret ble deretter blandet i vortexer før og etter tilsetning av 200 µl AL buffer og 200 µl etanol. Alt innhold ble deretter overført til en DNeasy Mini spin-kolonne og sentrifugert i 1 min ved 8000 rpm. Oppsamlingsrør med filtrat ble kastet og kolonnen ble satt i nytt 2 ml oppsamlingsrør før det ble tilsatt 500 µl Buffer AW1 og igjen sentrifugert i 1 min ved 8000 rpm. Oppsamlingsrør med filtrat ble kastet og kolonnen ble igjen satt i nytt 2 ml oppsamlingsrør før det ble tilsatt 500 µl Buffer AW2 og sentrifugert i 3 min ved 14000 rpm. Oppsamlingsrør og filtrat ble kastet og kolonnen ble overført til 1.5 ml eppendorfrør før 100 µl Buffer AE ble pipettert direkte på membranen. Etter 1 min inkubasjon ved romtemperatur ble eppendorfrør med kolonne sentrifugert for siste gang i 1 min ved 8000 rpm. Det eluerte utbyttet ble målt ved bruk av Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA). Ferdig ekstrahert DNA ble oppbevart i fryser (-18 °C) og senere brukt som templat for real-time PCR.

3.3.2.2 DNA EKSTRAKSJON MED KOKING

Ti og ti kolonier fra skåler (beskrevet i punkt 3.5.1) ble poollet sammen ved å ta en podeøse med kolonimateriale fra hver koloni i 1,5 ml eppendorfrør med 100 µl destillert vann (DSV). DNA ble ekstrahert ved at rørene ble plassert i varmeblokk og kokt ved 100 °C i 10 min, etterfulgt av sentrifugering ved 10 000 rpm. i 10 min. Ekstrahert DNA ble brukt som templat for PCR-reaksjon.

Enkeltkolonier fra PCR-positive pooler ble undersøkt ved at kolonimasse fra rendyrkede kolonier på blodagarskål ble overført til hvert sitt eppendorfrør. Ellers ble kokingen gjennomført på samme måte som for poolene.

3.3.3 REAL-TIME PCR

Real-time PCR ble brukt til deteksjon av målgenene *stx*₁, *stx*₂, *eae* og *stx*_{2a}. Mastermix bestående av prober og primere ble tilsatt alle brønner (beskrevet i punkt 3.3.3.3), mens templatet og kontroller (beskrevet i punkt 3.3.3.4) ble tilsatt angitte brønner.

Brett med brønner ble forseglet med en gjennomsiktig plastfilm og kjørt på enten Stratagene Mx3005P qPCR Systems (Agilent Technologies, USA) eller CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad Laboratories, USA). Datainnsamling og -analyse av PCR-resultat ble behandlet av Bio-Rad CFX Manager 3.1-programvare. Det ble benyttet et real-time PCR program for deteksjon av *stx*₁, *stx*₂ og *eae* og et annet for *stx*_{2a}. Oversikt over program med angitt temperatur (°C) og tider (sekunder) vises i tabell 1.

PCR produkter ble detektert ved hjelp av prober merket med fluoriserende fargestoff. *stx*₁ ble merket med FAM og *stx*₂ med HEX, *eae* og internkontroll IAC ble merket med henholdsvis FAM og HEX, mens *stx*_{2a} ble merket med HEX. Oversikt over primere og prober benyttet til deteksjon av virulensgenene, oppgitt som forward (F) og revers (R) primer og probe (P), vises i tabell 2.

Tabell 1: Real-time PCR-program for *stx*₁, *stx*₂, *eae* og *stx*_{2a}.

Målgjen	Real-time PCR-program	Tid (sekunder)	Temperatur (°C)
<i>stx</i> ₁ , <i>stx</i> ₂ og <i>eae</i>	Pre-PCR: Dekontaminering	120	50
	Pre-PCR: Aktivisering av polymerase og denaturering av templat.	600	95
	PCR 45 sykler:		
	Trinn 1: Denaturering	15	95
	Trinn 2: Annealing og DNA-syntese	60	60
<i>stx</i> _{2a}	Pre-PCR: Aktivisering av polymerase og denaturering av templat.	180	95
	PCR 35 sykler:		
	Trinn 1: Denaturering	3	95
	Trinn 2: Annealing og DNA-syntese	30	60

3.3.3.1 REAL-TIME PCR SCREENING FOR TILSTEDEVÆRELSE AV *stx*₁, *stx*₂ OG *eae*

Ekstrahert DNA ble tint i romtemperatur eller benyttet rett etter DNA-ekstraksjon. DNA ble sentrifugert (10 000 rpm. i 10 min) før det sammen med mastermiks for *stx*₁ / *stx*₂ og *eae* (tabell 3) ble tilsatt sine respektive brønner som beskrevet i punkt 3.3.3.3 og deretter screenet for målgjenene (*stx*₁, *stx*₂ og *eae*) med real-time PCR.

3.3.3.2 REAL-TIME PCR SCREENING FOR TILSTEDEVÆRELSE AV *stx*_{2a}

PCR-positive prøver for *stx*₂ ble videre undersøkt for tilstedeværelse av *stx*_{2a}. DNA-templat fra fryser ble tint og sentrifugert 10 000 rpm. i 10 min før det sammen med mastermiks for *stx*_{2a} (tabell 4) ble tilsatt sine respektive brønner som beskrevet i punkt 3.3.3.3. Real-time PCR-program benyttet for *stx*_{2a} vises i tabell 1.

Tabell 2: Primere og prober benyttet for screening av virulensfaktorer.

Gen	F og R primere og P	Sekvens (5' – 3')	Lokasjon innad i sekvensen	Amplikasjons- størrelse (basepar)	GenBank accession No.
<i>stx</i>₁ Referanse (ISO/TS13136:2012)	<i>stx</i> ₁ -F* <i>stx</i> ₁ -R* <i>stx</i> ₁ -P	TTT GTY ACT GTS ACA GCW GAA GCY TTA CG CCC CAG TTC ARW GTR AGR TCM ACR TC FAM-CTG GAT CTC AGT GGG CGT TAT GTA A-BHQ1	878 – 906 983 – 1008 941 – 971	131	M16625
<i>stx</i>₂ Referanse (ISO/TS13136:2012)	<i>stx</i> ₂ -F* <i>stx</i> ₂ -R* <i>stx</i> ₂ -P	TTT GTY ACT GTS ACA GCW GAA GCY TTA CG CCC CAG TTC ARW GTR AGR TCM ACR TC HEX-TCG TCA GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC-BHQ1	785 – 813 887 – 912 838 – 864	128	X07865
<i>eae</i> Referanse (ISO/TS13136:2012)	<i>eae</i> -F <i>eae</i> -R <i>eae</i> -P	CAT TGA TCA GGA TTT TTC TGG TGA A CTC ATG CGG AAA TAG CCG TTA FAM-ATA GTC TCG CCA GTA TTC GCC ACC AAT- ACC- TAMRA	899 – 924 1000 – 979 966 – 936	102	Z11541
<i>stx</i>_{2a} Referanse (Jinnerot et al., 2020)	VT2a-QfLNA1- F VT2a-QrLNA2- R VT2a-Qp	GGCGG+TTTT+ATT+TGCATTA+G CG+TC+AAC+CTT+CACTGT+A HEX-CRCAATCCGCCGCCATTGCATTAACAGAA-BHQ1	754 – 774 1079 – 1102 1079 – 1100	113	X07865

* OBS: *stx*₁ og *stx*₂ bruker identisk primersett.

3.3.3.3 MASTERMIX

Mastermix med prober og primere ble laget etter standardisert metode for deteksjon av de spesifikke virulensgenene. Alle reagenser til mastermiks ble tint ved romtemperatur og blandet under avtrekk på rentrom. Mastermiks og templat ble overført til brett med brønner i DNA-workstation. Sammensetningen av mastermiks for *stx* og *eae* vises i tabell 3 og for *stx*_{2a} vises i tabell 4.

Tabell 3: Sammensetning av mastermiks for amplifisering av virulensgenene *stx*₁/*stx*₂ og *eae*.

	<i>stx</i> ₁ / <i>stx</i> ₂		<i>eae</i>
	(μl)/reaksjon		(μl)/reaksjon
Brilliant III Ultra-Fast	12,5	Brilliant III Ultra-Fast	12,5
Primer F (50 μM)	0,5	Primer F (50 μM)	0,3
Primer R (50 μM)	0,5	Primer R (50 μM)	0,3
Probe <i>stx</i> ₁ (5 μM) FAM	1,0	Probe <i>eae</i> (5 μM) FAM	1,0
Probe <i>stx</i> ₂ (5 μM) HEX	1,0	10x Exo IPC Mix HEX *	2,5
Nucleasefritt vann	4,5	Nucleasefritt vann	2,9
		Exo IPC DNA 1:10 *	0,5
Totalt volum mastermiks	20,0		20,0
DNA templat	5,0		5,0
Totalt volum	25,0		25,0

* Intern amplifikasjonskontroll (IAC) benyttes i mastermiks for *eae*. 10x Exo IPC mix tilsettes på rentrom, mens Exo IPC DNA tilsettes i workstation.

Tabell 4: Sammensetning av mastermiks for amplifisering av *stx*_{2a}.

	<i>stx</i> _{2a}
	(μl)/reaksjon
Brilliant III Ultra-Fast	10,00
Primer F (10 μM)	0,66
Primer R (10 μM)	0,66
Probe <i>stx</i> _{2a} (10 μM) HEX	0,202
Nucleasefritt vann	3,48
Totalt volum mastermiks	15,0
DNA templat	5,00
Totalt volum	20

3.3.3.4 KONTROLLER

Det inkluderes flere typer kontroller for å sikre integriteten til hvert trinn i real-time PCR-analysen. Alle brønner med kontroller inneholdt 20 µl mastermiks (15 µl for *stx*_{2a}) og 5 µl kontrollmateriale. To kontroller ble benyttet uavhengig av hvilket gen det ble screenet for, en positivkontroll av *E. coli* O157:H7 (EDL933) og NTC (no target kontroll), med andre ord negativkontroll som bestående av MilliQ-vann (MQ).

Intern amplifikasjonskontroll ble i denne oppgaven brukt i mastermiks for deteksjon av *eae* og er viktig for å kunne oppdage falsk-negative resultater som kan skyldes PCR-inhibitorer, samtidig som den vil kontrollere at DNA virker normalt i PCR-reaksjonen. En måte å verifisere at negativkontrollen er korrekt. Negativt resultat for påvisning av målsekvens og positivt resultat for IAC indikerer ingen tilstedeværelse av mål-sekvens og et negativt resultat for både mål-sekvensen og IAC antyder PCR-inhibitorer. For screening av *eae* ble det i tillegg også benyttet en brønn for NAC (no amplification control) bestående av 5 µl 10x Exo IPC Block. Blokken skal blokkere IAC.

Reagenser til IAC medfølger i kit Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific som består av primere og probe (10x Exogenous Internal Positive Control (Exo IPC) Mix), IAC mål-DNA (Exo IPC DNA) og blokk løsning (10x Exo IPC Block) (TaqMan®, Applied Biosystems).

3.4 STØRRELSBESTEMMELSE AV PCR PRODUKTER

Tre prøver positive for *eae*, *stx*₁ og *stx*₂, i den innledende PCR-screeningen ble valgt ut på bakgrunn av deres C_q-verdi for størrelsesbestemmelse av PCRprodukt ved bruk av TapeStation 4200 (Agilent Technologies, USA). Det ble brukt 1 ml ekstrahert DNA og 3 µl D1000 Sample buffer. Dette ble vortexet sammen i 1 min og deretter sentrifugert 1 min (6000 rpm).

3.5 ISOLERING OG IDENTIFISERING AV STEC

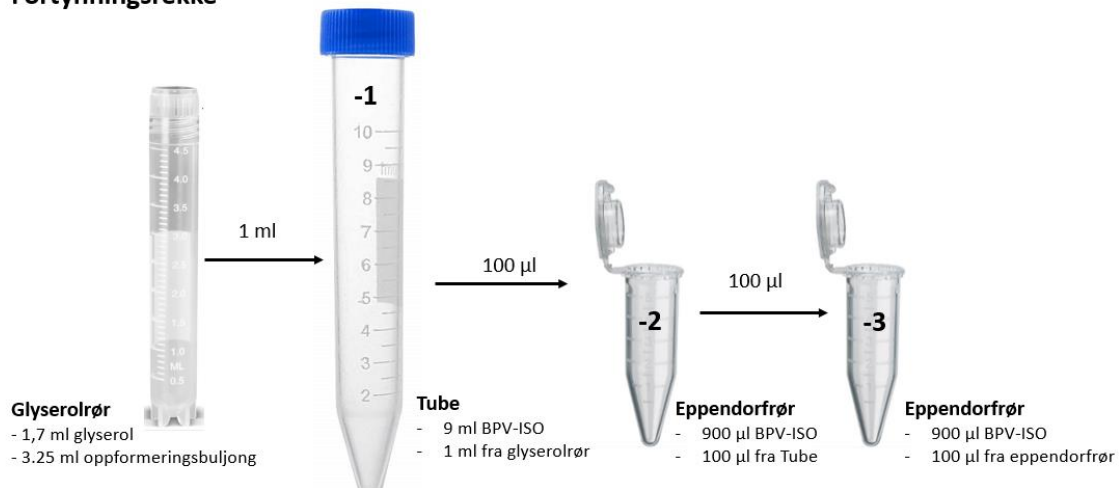
3.5.1 ISOLERING AV STEC FRA PCR-POSITIVE KJØTTDEIGPRØVER

På bakgrunn av resultatene fra den innledende real-time PCR-analysen for genetiske markører, ble det videre forøkt å isolere STEC. Prøver PCR-positive for *stx*₁ eller *stx*₂, samt prøver PCR-positive for to eller flere målgener, ble valgt ut for videre isolering.

Oppformert buljong lagret på -80 °C, ble tint i vannbad ved 50 °C (omtrent 1-2 minutter) og inkubert ved romtemperatur i omtrent 60 minutter, før 1 ml ble overført til 9 ml rør med BPV-ISO og deretter inkubert ved 37 °C i 3 timer. Etter inkubasjon ble prøven blandet med vortexer og to ekstra fortynninger laget (10⁻² og 10⁻³), se figur 2. Deretter ble 10 µl, fra hver av de tre

fortynningene, strøket ut med steril podeøse på to forskjellige agarmedier TBXAgar (OXOID, Thermo Fisher Scientific, USA) og SMACagar (Sorbitol Mac Conkey agar) (OXOID, Thermo Fisher Scientific, USA) og inkubert ved 37 °C over natten.

Fortynningsrekke



Figur 2: Oversikt hvordan fortynningsrekke ble laget fra Glyserolrør 10^0 til eppendorfrør 10^{-3} .

Videre ble det plukket 30 kolonier med karakteristisk *E. coli* morfologi som punktvis ble avsatt på blodagarskål. 10 og 10 enkeltkolonier fra samme prøve ble poollet sammen i 1,5 ml eppendorfrør med 100 µl MQ. Blodagarskålene ble satt til inkubasjon ved 37 °C over natten. DNA fra de poolede prøvene ble ekstrahert ved koking (se punkt 3.3.2.2) og DNA ble brukt som templat for påvisning av *stx*-gener med real-time PCR som beskrevet i punkt 3.3.3.3.

3.5.2 ISOLERING AV STEC FRA TRE UTVALGTE PRØVER

På bakgrunn av resultater fra TapeStation ble det på nytt forsøkt å isolere STEC fra disse prøvene. I den andre runden for isolering ble prøvene strøket ut på TBXAgar, SMACagar og CHROMAgar O157 og deretter ble det plukket 50 kolonier fra hver prøve ved punktavsetting. Poolene ble så screenet for både *stx* og *eae* med real-time PCR. Isolering av STEC ble videre utført som beskrevet i punkt 3.5.1.

Dersom pool var PCR-positiv for ett eller begge målgenene ble enkeltkoloniene (avsatt på blodagarskål) undersøkt hver for seg. DNA ble igjen ekstrahert ved koking (se punkt 3.3.2.2) for PCR analyse for aktuelt målgen.

4 RESULTATER

Totalt ble 157 prøver av kvernet svinekjøtt og svinekjøttdeig undersøkt for forekomst av Shiga toksin-produserende *E. coli*. Resten av prøvene ble ikke undersøkt på grunn av feil prøvemateriale eller utgått holdbarhetsdato. Oversikt over alle prøvene ligger i vedlegg 1.

4.1 SCREENING AV EKSTRAHERT DNA

4.1.1 DNA-kvalitet

Kvaliteten til ekstrahert DNA fra samtlige prøver ble undersøkt med Nanodrop og resultatet viste at DNA-kvaliteten lå innenfor akseptabelt område, tabell med oversikt over DNA-kvalitet ligger i vedlegg 2.

4.1.2 INNLEDENDE SCREENING AV *stx* OG *eae*

Real-time PCR-screening ble innledningsvis gjennomført for samtlige prøver. Prøvene ble undersøkt for tilstedeværelse av de genetiske markørene *stx*₁, *stx*₂ og *eae*. Positive resultater fra screeningen vises i tabell 5 og 6.

Tabell 5: Prøver positive for hver av de genetiske markørene *stx*₁, *stx*₂ og *eae*, samt antall *stx*-positive prøver.

Virulensgener	Totalt antall prøver undersøkt	Antall positive prøver	Antall positive prøver (%)
<i>stx</i> ₁	157	17	10,8
<i>stx</i> ₂		37	23,6
<i>eae</i>		97	61,8
<i>stx</i>		46	29,3

Tabell 5 viser at det til sammen er 54 prøver som var positive for *stx*-gener, hvorav 17 (11 %) var *stx*₁-positive og 37 (24 %) var *stx*₂-positive og 97 (61,8 %) prøver var positive for *eae*-genet. Åtte av de 17 prøvene positive for *stx*₁ var også positive for *stx*₂. Til sammen var det 46 prøver som var positive for *stx*-gener og ble tatt videre til isolering.

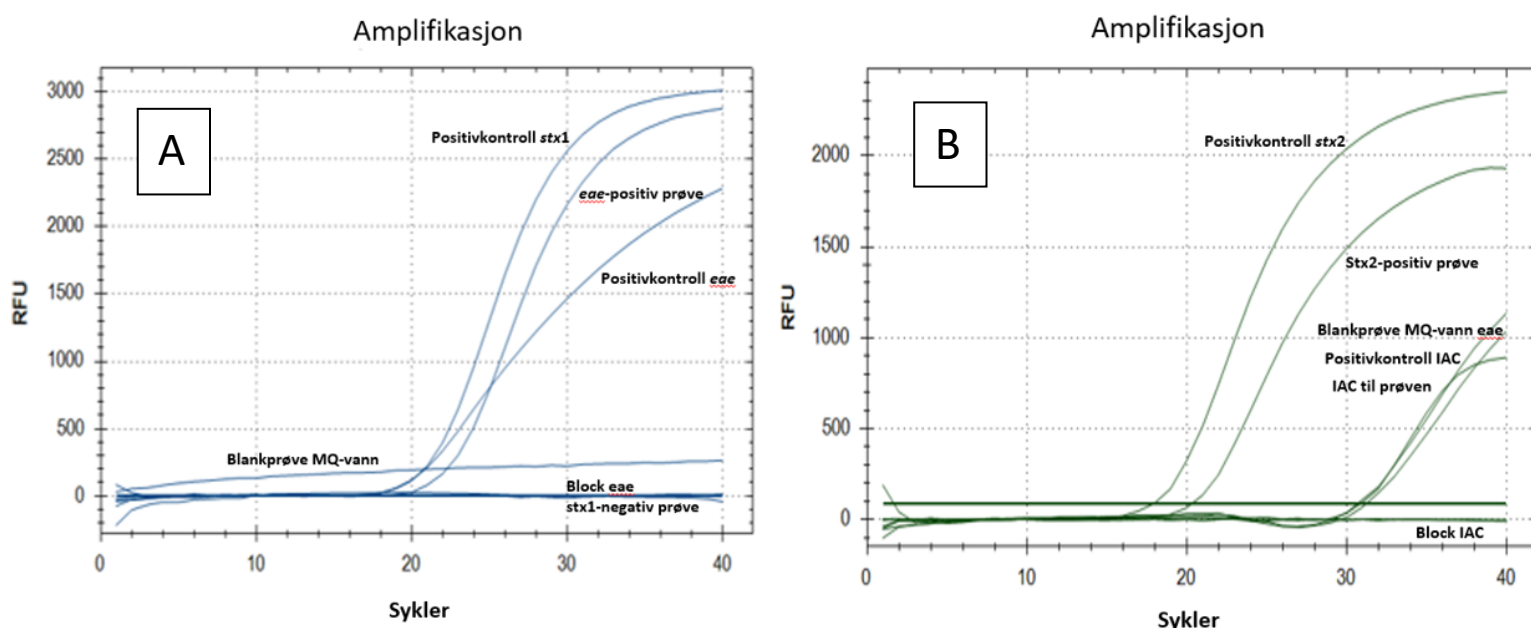
Flere av prøvene var positive for flere genetiske markører samtidig og de ulike kombinasjonene og antall prøver positive for kombinasjonen vises i tabell 6.

Tabell 6: Hvilke kombinasjoner av genetiske markører *stx*-positive prøver hadde.

Kombinasjon av virulensgener	Antall positive prøver	Antall positive prøver (%)
<i>stx</i> ₁ + <i>stx</i> ₂ + <i>eae</i>	8	5,1
<i>stx</i> ₁ + <i>eae</i>	6	3,8
<i>stx</i> ₂ + <i>eae</i>	27	17,2
<i>stx</i> ₁	3	1,9
<i>stx</i> ₂	2	1,3
Total	46	29,2

Tabell 6 viser at åtte (5,1 %) av prøvene var positive for alle de genetiske markørene samtidig. Det var seks prøver som kun var positive for *stx*₁ og *eae*, mens 27 prøver var positive for kun *stx*₂ og *eae*. Det var bare 3 og 2 prøver som kun var positive for henholdsvis *stx*₁ og *stx*₂. Det gjorde at til sammen var det 41 (25,5 %) prøver som var positive for *stx*-gener og *eae* samtidig.

Alle Cq-verdier for de genetiske markørene og internkontrollen fra real-time PCR screeningen er gitt i vedlegg 1. Figur 3 viser en grafisk illustrasjon av resultatet fra real-time PCR screening for én prøve. Del A (blå) viser grafer for *stx*₁ og *eae*, mens del B viser grafer for *stx*₂ og IAC.



Figur 3: Illustrasjon av grafisk fremstilt resultat fra en real-time PCR screening. Delt i to deler. A er for *stx*₁ og *eae*. B er for *stx*₂ og IAC.

Cq-verdi for IAC ble brukt som en vurdering av resultatene, se vedlegg 1. Cq-verdier som lå utenfor intervallet 26-32 (3 prøver), ble analysert om igjen og resultatet viste at kun en av prøvene fortsatt lå utenfor intervallet, prøve 114 med Cq-verdi på 20,67.

4.1.3 SCREENING AV *stx*_{2a}

De 37 prøvene som var positive for *stx*₂ ble deretter screenet for tilstedeværelse av *stx*_{2a}. Det ble ikke påvist *stx*_{2a} i noen av prøvene.

4.2 ISOLERING AV STEC

4.2.1 SCREENING FOR *stx* OG/ELLER *eae* I POOLER AV KOLONIER

Prøver PCR-positive for *stx*-gener (n = 46) ble strøket ut og dyrket på medier (TBX og SMAC) og 30 kolonier fra hver prøve ble poolert 10 og 10 sammen (til sammen 3 pooler per prøve), og undersøkt for tilstedeværelse av *stx* med real-time PCR. I første runde var resultatet negativt for alle poolene.

4.2.2 REANALYSE AV TRE UTVALGTE PRØVER

Fordi forsøk på isolering for samtlige prøver ga negativt resultat, ble det bestemt å undersøke om PCR-resultatene kunne være falske positive, ved å størrelsesbestemme PCR-produkt på TapeStation. Prøveflyten er beskrevet i figur 1 (bokser med gulfarge). Utvalg av prøver ble gjort på bakgrunn av Cq-verdier.

4.2.2.1 REAL-TIME PCR SCREENING AV UTVALGTE PRØVER

Tre prøver ble screenet på nytt før undersøkelse med TapeStation (se punkt 4.2.2.2). Resultatet fra real-time PCR screening vises i tabell 7.

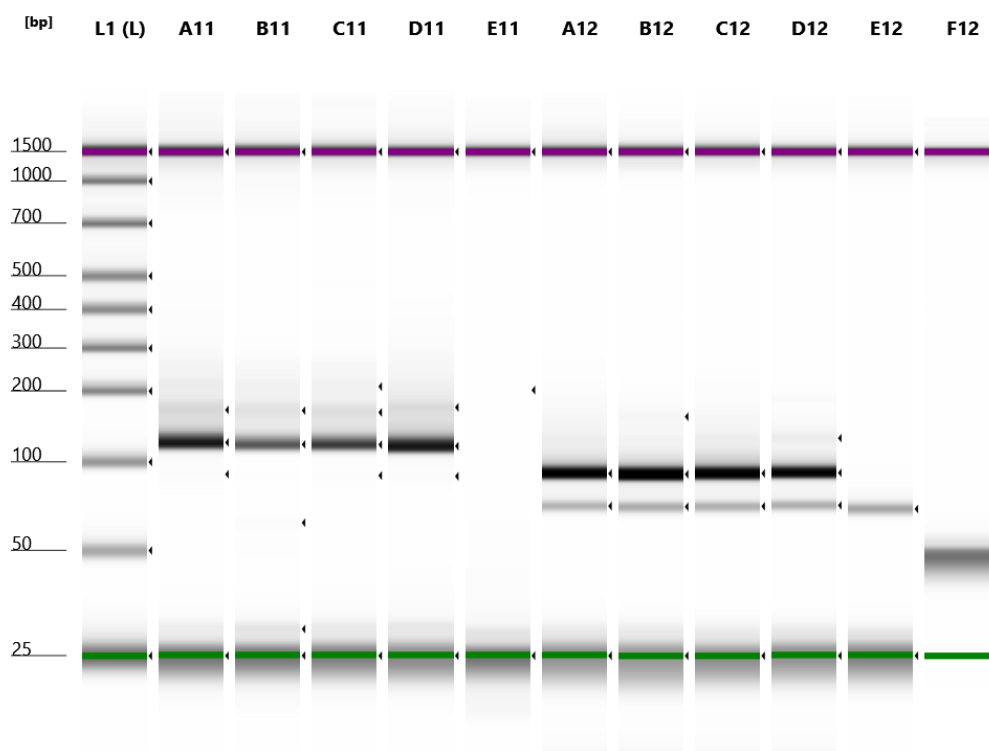
Tabell 7: Cq-verdier for *stx*₁, *stx*₂, *eae* og IAC fra real-time PCR screening av de tre utvalgte prøvene.

Prøve nr.	Cq-verdi <i>stx</i> ₁	Cq-verdi <i>stx</i> ₂	Cq-verdi <i>eae</i>	Cq-verdi IAC
2019-22-415	30,46	30,18	25,38	31,72
2019-22-448	34,02	31,39	23,54	32,00
2019-22-1309	25,03	25,84	24,72	31,63

Tabell 7 viser at Cq-verdien for *stx*₁, *stx*₂, *eae* og IAC ligger henholdsvis mellom 25-31, 25-31, 24-26 og 30-32.

4.2.2.2 ELEKTROFORESE MED TAPESTATION

Etter ny screening for *stx*₁, *stx*₂ og *eae* i de tre utvalgte prøvene, ble størrelsen på PCR produktene bestemt ved bruk av elektroforese med TapeStation. Tre prøver (2019-22-415, 2019-22-448 og 2019-22-1309) ble valgt ut med bakgrunn i Cq-verdi. Resultatet for størrelsesbestemmelsen vises i figur 4.



Figur 4: Bestemmelse av PCR-produkt ved bruk av elektroforese med TapeStation for prøve 2019-22-415 (*stx* = A11, *eae* = A12), 2019-22-448 (*stx* = B11, *eae* = B12) og 2019-22-1309 (*stx* = C11, *eae* = C12). Resterende brønner inneholder kontroller.

Figur 4 viser båndstørrelsen i basepar (bp.) for de tre utvalgte prøvene, samt en positiv, en negativ kontroll og block til *eae*. Det er fire tydelige bånd for *stx* fra A11-D11 som har en båndstørrelse i overkant av 127 bp. De tre prøvene (A11, B11 og C11) har samme båndstørrelse som positivkontrollen i D11. De seks neste båndene A12-F12 tilhører *eae*, A12-C12 er prøvene, D12 er positivkontroll, E12 er negativkontroll og F12 er block. Her har prøvene lik båndstørrelse (ca. 95 bp.), som er det samme som positivkontrollen.

4.2.2.3 ISOLERING FRA TRE UTVALGTE PRØVER

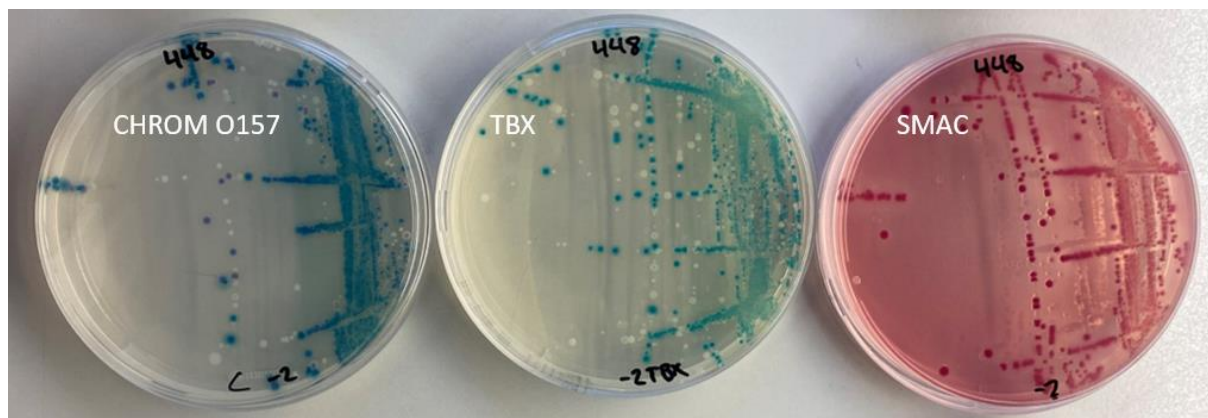
Det ble på nytt forsøkt å isolere *stx*-positive kolonier fra de tre utvalgte prøvene. Det ble også forsøkt å isolere *eae*-positive kolonier i den andre runden med isolering. Oppformerte prøver

ble strøket ut og dyrket på medier (TBX, SMAC og CHROM) (se figur 5) og 50 kolonier fra hver prøve ble pooler sammen 10 og 10 (til sammen 5 pooler per prøve) og undersøkt med real-time PCR. Resultatet vises i tabell 6.

Tabell 6: *eae*-positive pooler og kolonier detektert med real-time.

Prøve ID	Innledende real-time PCR screening (<i>stx</i> og <i>eae</i>)	<i>stx</i> -positive pooler	<i>eae</i> -positive pooler	Isolert fra medium	<i>eae</i> -positive kolonier
2019-22-415	+	-	-	-	-
2019-22-448	+	-	+	TBX	-
2019-22-1309	+	-	+	CHROM	-

Tabell 6 viser at det ikke ble påvist noen *stx*-positive pooler, men to pooler var positive for *eae*. En pool fra prøve 2019-22-448 plukket fra TBX skål, og en fra 2019-22-1309 plukket fra CHROM skål.



Figur 5: Utstryk av prøve på de tre forskjellige agarmediene: CHROM O157, TBX og SMAC.

4.2.2.4 SCREENING AV ENKELTKOLONIER FOR POSITIVE POOLER

De to *eae*-positive poolene ble rendyrket og enkeltkoloniene ble screenet med real-time PCR. Resultatet var negativt for alle koloniene.

5 DISKUSJON

5.1 Utbredelse

E. coli-stammer med *stx*-gener har evne til å produsere Shigatoksin og er i dag en av de vanligste årsakene til gastrointestinal sykdom i verden. Matbårne utbrudd tilknyttet STEC har de siste tiårene blitt sett i sammenheng med stadig nye næringsmidler deriblant svin. STEC har blitt isolert fra gris og svineprodukter, i noen tilfeller assosiert med tilfeller av hemorrahagisk kolitt og HUS i mennesker (Bardasi et al., 2015; Bouvet et al., 2002; Ercoli et al., 2016; Trotz-Williams et al., 2012; Villani et al., 2005; Wiczorek & Osek, 2020).

På grunn av det plastiske genomet til *E. coli*, som fører til anskaffelse av nye virulensgener fra andre organismer, overføring mellom *E. coli* bakterier, samt tap av virulensgener, kan nye stammer forekomme på en uforutsigbar måte over tid. Utbruddet med spirer i Tyskland og Frankrike fra 2011 av *E. coli* O104: H4 er et eksempel på denne genomiske plastisiteten (EFSA, 2020). Dette gjør at samme STEC serotyper kan bære ulike typer virulensgener og derfor er det ikke gitt at de utgjør den samme risikoen for sykdom (World Health Organization, 2019). Data fra sentral Europa og Italia viste at serotype O26:H11 som tidligere kun produserte Stx1, i tillegg ervervet evnen til å produsere Stx2, men nylig kun produserte Stx2 (EFSA, 2020). Alle STEC skal derfor vurderes som sykdomsfremkallende for mennesker, men det er vist at en kombinasjonen av virulensgenene *stx*_{2a} og *eae* oftere er assosiert med alvorlige former for STEC-indusert sykdom (International Organization for Standardization, 2012).

Kunnskap om utbredelsen av Shigatoksin-gener hos norsk svin er svært begrenset. Tre isolater av STEC fra intestinallyt innhold fra svin ble funnet under en studie gjennomført i 1998 og 1999. Isolatene av STEC O157:H7 ble undersøkt med PCR og resultatet viste at de var bærere av *stx*₂ og *eae* (Johnsen et al., 2001).

Denne studien er den første som tar for seg isolering av STEC fra norsk kvernet svinekjøtt og svinekjøttdeig. Målet med denne oppgaven var å undersøke tilstedeværelsen av Shiga toksin-produserende *E. coli* i norsk svinekjøtt og svinekjøttdeig, ved å påvise tilstedeværelse av de genetiske markørene *stx*₁ og *stx*₂, samt *eae*-genet som koder for adhesjon (Ross & Miller, 2007), samt å forsøke å isolere STEC fra prøver som er positive for *stx*-gener.

5.2 HOVEDRESULTATER

Fra 157 prøver av svinekjøtt og svinekjøttdeig som ble analysert i denne studien, ble det ikke isolert noen STEC. Resultatet for innledende real-time PCR screening viser derimot høy

forekomst av gener assosiert med STEC. Det ble påvist 17 (10,8 %) *stx*₁-positive prøver, 37 (23,6 %) *stx*₂-positive prøver og 46 (29,3 %) prøver som var positive for både *stx*₁ og *stx*₂. Av de *stx*₁-positive prøvene var det kun tre prøver som ikke også var *eae*-positive og fra de *stx*₂-positive var det bare to prøver som ikke var *eae*-positive. Til sammen var det 41 prøver som både var *stx*- og *eae*-positive.

Det er flere andre studier som har detektert *stx*-positive prøver med PCR uten å isolere STEC eller med isolasjon av få isolater fra produkter av svin. I en studie utført i Italia ble 675 svineprøver bestående av ferskt kjøtt og tørkede svineprodukter undersøkt for tilstedeværelse av STEC. Det ble til sammen påvist 19 (2,8 %) *stx*-positive prøver, men ingen STEC-isolater ble påvist (Ercoli et al., 2016). Forekomsten av STEC-gener er mye lavere enn det som er observert i vår studie. Det kan bl.a. komme av ulik tilstanden på produktene analysert (tørket og ferskt vs. kvernet kjøttdeig), prøveuttaksmetode som ikke er beskrevet og bruk av ulik oppformeringsbuljong. Utfallet med ingen isolerte STEC var likt.

Selv om real-time PCR-positive resultater kan indikere tilstedeværelse av *stx* i prøve, er det ikke uvanlig at et lavt antall/eller ingen STEC blir isolert i den påfølgende kulturbaserte isoleringen (Macori et al., 2020). I en annen studie fra Italia ble det detektert STEC virulensgener i 41 av 213 (19%) svinepølseprøver som ble undersøkt og ett STEC-isolat ble påvist (Bardasi et al., 2015).

En rekke land har undersøkt fecesprøver av svin eller svineskrotter for tilstedeværelsen av STEC. I Polen ble 120 svineskrotter undersøkt for STEC. Totalt var 37 (30,8 %) prøver positive for STEC-gener ved real-time PCR, og isolering av bakterien viste at fem (13,5 %) av de PCR-positive prøvene var positive for *stx*₂, mens ingen var positive for *stx*₁ (Wieczorek & Osek, 2020). I Ukraina ble 100 svineskrotter undersøkt og det ble funnet 35 (35 %) positive prøver for *stx*₁, *stx*₂ og *eae* fra. Av disse ble det bekreftet tilstedeværelse av *stx*₁ fra to isolater, *stx*₂ fra to isolater, mens ingen isolater var positive for *eae*-genet (Berhilevych et al., 2018). En studie fra Frankrike viste at av 2146 prøver (svineskrotter og svinekjøtt) undersøkt var 26 % av svineskrottene og 12 % av svinekjøttet *stx*-positive, ved PCR-screening. Det er uvisst hvor mange isolater som ble isolert fra disse prøvene, fordi alle *stx*-positive prøver, også 876 miljøprøver ble tatt med. Fecesprøver og prøver fra svineskrotter kan ikke direkte sammenlignes med dette studie, men det viser at det er vanskelig å finne isolater selv om det er påvist STEC-gener ved PCR. Dessuten viser det at svin kan ha STEC, som videre kan overføres til svinekjøttprodukter.

Fordi ingen STEC-isolater ble funnet i dette prosjektet ble det bestemt å undersøke tre prøver på nytt. Tre prøver positive for alle genetiske markører og passende Cq-verdi ble screenet på nytt og PCR-produktet ble størrelsesbestemt med TapeStation. Ved å størrelsesbestemme PCR-produktet kan en verifisere at størrelsen samsvarer med forventet størrelse og dermed sikre at resultatet ikke er falskt positivt. Det kan være vanskelig å skille mellom *stx*₁ og *stx*₂ da det bare er tre bp. som skiller dem fra hverandre. Lengden på baseparene for *stx*₁ og *stx*₂ skal være henholdsvis 131 og 128 og for *eae* skal lengden på baseparene være 102 (ISO/TS13136:2012). Resultatet fra analysen viste at de tre prøvene hadde omtrent riktig lengde ca. 127 bp. for *stx* og 95 bp. for *eae*. Båndene lå også omtrent likt med positivkontrollene for både *stx* og *eae*. Det ble derfor antatt at dette var reelle positive prøver. Forsøk på isolering fra de tre utvalgte prøvene ga også negativt resultat.

Det kan være flere årsaker til at det ikke var mulig å isolere STEC. Den innledende PCR screening vil i tillegg til å detektere levende celler også fange opp døde bakterieceller og skadede celler i en levedyktig, men ikke dyrkbar tilstand som ikke vil kunne bli isolert. Dette kan komme av stressende miljøforhold.

En annen forklaring for STEC PCR-positive og kultur negative resultater er at det skyldes Stx-fagpartikler. Shigatoksinet er kodet på bakteriofager (*stx*-bakteriofager) som ikke nødvendigvis er integrert i STEC-kromosomet, men som kan eksistere, over lengre tid, som frie partikler i miljøet (Macori et al., 2020). Frie *stx*-fager vil kunne detekteres under screeningen, men vil ikke bli påvist ved dyrking.

De *eae*-positive prøvene kan ikke forklares med frie bakteriofager, da genet befinner seg på en patogenitetsøy LEE i genomet til bakterien. Det kan tyde på at det døde eller ikke dyrkbare bakterier, eller fritt DNA. Det ble i 2019 gjennomført en studie i Irland som tok for seg problematikken med PCR-positive og kultur negative resultater. Der 155 feces prøver fra storfe ble undersøkt. Resultatet viste at for av de 53 PCR-positive, men kulturnegative prøver var det 31 prøver (58,5 %) som skyldtes tilstedeværelsen av skadede eller døde celler som ikke var i stand til å danne kolonier på kulturmedium (Macori et al., 2020) og to (3,8 %) prøver som skyldes frie Stx-fagpartikler. De resterende 20 prøver hadde en ukjent årsak.

Sannsynligheten for blodig diare, HUS eller begge deler er signifikant høyere for pasienter infisert med den klassiske STEC O157:H7 som innehar *stx*_{2a} eller *stx*_{2a} i kombinasjon med andre *stx*-undertyper (Byrne et al., 2020). I denne studien ble de 37 *stx*₂-positive prøver screenet for tilstedeværelsen av *stx*_{2a}, men resultatet var negativt for alle prøvene. Det er foreløpig begrenset

med kunnskap om STEC i svin og dermed også hvilke subtyper som finnes, men det er kjent at *stx_{2e}* gir ødemsyke på gris og er en subtype som oftere er assosieres med svin. Derfor er ikke resultatet oppnådd i studien overraskende. I USA ble det fra 1040 fecesprøver funnet 285 STEC isolater fra *stx*-positive prøver undersøkt med PCR. De fleste isolatene (97,9 %) hadde genet *stx_{2e}*. Fire isolater hadde *stx₁* genet og to isolater hadde *stx₂* genet og testet negativt for *stx_{2e}* (Tseng et al., 2015). Det er også flere andre studier som har vist at *stx₂*-positive STEC fra svin ofte bærer *stx_{2e}*-genet (Bouvet et al., 2002; Wiczorek & Osek, 2020).

5.3 METODOLOGISKE UTFORDRINGER

5.3.1 FRYST PRØVEMATERIALE

Prøvematerialet i denne studien har vært fryst og det vil kunne redusere antallet levende STEC som kan gjenopplives. I utgangspunktet vil det være forventet lav forekomst av STEC i svin, men kanskje spesielt i produkter som er rettet mot humant konsum slik prøvematerialet i denne studien er. Når prøven fryses vil bakteriecellene påvirkes fordi krystallisering av vann under fryseprosessen kan ødelegge bakterieceller. Rask frysing vil føre til flere, men mindre krystaller og er derfor å foretrekke med tanke på å bevare bakteriene i prøvematerialet. Prøvene til denne studien ble fryst ved -80 °C som er bra, men når det i utgangspunktet er få bakterieceller i prøven vil det være av betydning om noen av disse blir drept.

For å behandle frosne prøver ble BPV-ISO benyttet som anrikningsbuljong for å gjenopplive bakterier. Bruken av BPV er spesifisert i (ISO/TS 13136:2012), som denne studien følger, for prøver som antas å inneholde stressede bakterier. BPV-ISO er en generell oppformeringsbuljong og den vil derfor også anrike en rekke andre bakterier som kan utgjøre en konkurranse for STEC. Problemer med forstyrrende bakgrunnsflora bør også vurderes i sammenheng med problemene knyttet til isolasjon fra produkter av svin.

Betydningen av frysing med glyserol etter oppformering vil ha mindre å si fordi det da er forventet mange bakterieceller i prøven, i tillegg til at glyserol er med på å beskytte cellene mot krystalliseringen av vannet i prøven.

5.3.2 ISOLERING

Det er viktig å velge et passende anriknings- og isolasjonsmedium, som skal fremme vekst av STEC, men samtidig hemme bakgrunnsflora og sikre isolering og konfirmering av STEC fra en rekke matvarer (Verhaegen et al., 2016). Foreløpig finnes det ingen veldig gode medium for undersøkelse av STEC og det gjør den kulturbaserte isoleringen av STEC vanskelig. Det finnes noen selektive medier for STEC som benytter seg av selektive egenskaper og kjente

biokjemiske egenskaper for å favorisere STEC, samt tilsetninger som skal hemme uønsket bakgrunnsflora. Av ISO 13136:2012 fremkommer det at ved mistanke om STEC skal TBX medium (*E. coli* spesifikk) eller annet spesifikt medium som f.eks. SMAC (*E. coli* O157 spesifikk) benyttes. Fordi STEC er så mange ulike *E. coli* varianter er dette foreløpig det beste alternativet og i første runde med isolering ble TBX og SMAC benyttet. *E. coli* med ulike morfologi kan bære *stx*-gener, derfor vil bruk av to forskjellige medier med ulike grunnprinsipper føre til en bredere selektering av kolonier og øke sannsynligheten for seleksjon av potensielle STEC. For å øke sannsynligheten for påvisning av STEC-isolater må relativt mange kolonier plukkes. Ifølge ISO/TS 13136:2012 skal det plukkes opp til 50 kolonier med *E. coli* morfologi per prøve.

For å isolere STEC er det nødvendig med både fenotypiske og genotypiske metoder og det er et svært tidkrevende arbeid. Fordi det var mange prøver (46 stk.) som skulle undersøkes og tiden tilgjengelig var begrenset ble det bestemt at det skulle plukkes 30 kolonier per prøve i den første runden med isolering. Ved det andre forsøket med isolering var prøveantallet begrenset til tre og det ble derfor bestemt at det skulle plukkes 50 kolonier per prøve for å øke sannsynligheten for å påvise *stx*- og/eller *eae*- positive kolonier. Det ble også valgt å ta med et ekstra medium CHROMagar O157, i tillegg til TBX og SMAC. Ved å benytte enda et medium med annet grunnprinsipp vil det bli en bredere selektering av kolonier, i tillegg til at det kan bli enklere å velge kolonier med typisk morfologi.

Fordi det er være vanskelig å plukke kolonier med typisk morfologi, kan en spekulere i om det kunne vært mulig å isolere STEC ved å plukke enda flere kolonier.

5.3.3 REAL-TIME PCR

Real-time PCR er i dag ansett som den beste tilnærmingen for å undersøke tilstedeværelse eller fravær av spesifikke gener. Det er viktig å være klar over alle valgene som er tilgjengelig i alle aspekter av denne teknologien. I motsetning til tradisjonell PCR er det kompleksiteter med real-time PCR som kan påvirke det samlede resultatet, men med gode eksperimentdesign og riktige kontroller kan real-time PCR være en av de mest følsomme, effektive og reproducerbare metodene for å måle tilstedeværelse eller fravær av spesifikke gener og genuttrykk (Wong & Medrano, 2005). Real-time PCR tilnærmingen benyttet for å detektere gener i svinekjøttprøvene fulgte spesifikasjonene i ISO/TS13136:2012.

Prøvematerialet vil kunne inneholde PCR-inhibitorer som vil påvirke resultatet til screeningen om de ikke blir fjernet. Ulike metoder for DNA ekstraksjon vil kunne gi ulike mengde og ulike

renhet av DNAet og noen kit er spesialtilpasset spesifikke matrikser, mens andre er mer generelle. I denne studien ble DNA ekstrahert ved bruk av DNeasy Blood & Tissue Kit, som er tilpasset prøver fra vev og/eller blodprøver, og er beregnet på molekylærbiologiske applikasjoner, som for eksempel real-time PCR. Forurensninger og PCR-enzym-inhibitorer fjernes i to effektive vasketrinn med buffer før prøven elueres i vann eller buffer og er klar til bruk. Dette er viktige steg for å øke nøyaktigheten og sensitiviteten til PCR. For å kontrollere at inhibering ikke har forekommet benyttes en internkontroll, den vil skille sanne negative prøver fra inhibering. Internkontroll (IAC) ble inkludert i alle kjøringene med real-time PCR for *eae*. Er prøven negativ for målsekvens og negativ for IAC indikerer det inhibering. På denne måten ble Cq-verdi for IAC brukt som en vurdering av real-time PCR-resultatene, se vedlegg 1. Det var tre Cq-verdier for prøver som lå utenfor intervallet 25-32 og disse ble analysert om igjen. Resultatet viste at kun en av prøvene fortsatt lå utenfor intervallet med en Cq-verdi på under 8. Fordi IAC lå jevnt, med unntak av denne prøven, vil en anta at resultatene fra real-time PCR-en er til å stole på.

Fordi metoden benytter PCR for påvisning av tilstedeværelse av *stx*-gener vil den ikke være begrenset til å bare detektere noen serotyper/grupper, men vil detektere og identifisere alle STEC. Selv om bruk av real-time PCR fører til forbedret påvisning av ikke-O157 STEC serotyper, kan det også føre til påvisning av en rekke serotyper/serogrupper med virulensgener som har mindre potensial for å forårsake alvorlig sykdom hos mennesker. Det er derfor i mange tilfeller fortsatt vanskelig å skille mellom om høy- og lavrisiko STEC-stammer, noe som fører til utfordringer til å foreta en pålitelig vurdering av den kliniske risikoen og folkehelserisiko knyttet til diagnostisering av ikke-O157 STEC-infeksjoner (Haugum et al., 2014). Det er foreløpig vanskelig å skille mellom de ulike subtypene av *stx*-genene i den innledende PCR-screeningen og det er derfor helt nødvendig å isolere bakterier for å kunne si noe om potensialet til å forårsake sykdom.

5.3.4 KARAKTERISERING

Forskjellige stammer av STEC som er bærere av andre virulensgener, som *eae*, har vist seg å være mer virulente og representerer en større risiko for alvorlig sykdom. For å kunne skille mellom patogene og apatogene, eller høy- og lav-patogene stammer er det essensielt å karakterisere isolater.

Karakterisering av isolater kan innebære å undersøke serogruppe og virulens ved hjelp av PCR, men i dag er det også mulig å benytte helgenomsekvensering. For å kunne karakterisere

et isolat må det først isoleres og i denne studien ble det ikke funnet noen isolater og dermed ble det ikke gjennomført en karakterisering.

5.4 KONKLUSJON OG VIDERE ARBEID

Den innledende screeningen av genetiske markører indikerte en høy forekomst av virulensgener i norsk kjøtt og kjøttdeig fra svin. Det ble påvist *stx*-gener i 29,3 % av prøvene og 89 % av de *stx*-positive var også positive for *eae*. Ingen av forsøkene på isolering fra *stx*-positive prøver ga STEC-isolater. Forsøk på å påvise *stx*_{2a} med real-time PCR ga også negativt resultat.

Resultatene viser at det kan være vanskelig å isolere STEC til tross for betydelig mengde *stx*-positive screeningresultater og noen viktige årsaker som bør vurderes er tilstedeværelsen døde bakterieceller og skadede celler i en levedyktig, men ikke dyrkbar tilstand, samt tilstedeværelsen av frie *stx*-bakteriofager.

I og med at kunnskapen om utbredelsen av STEC i norsk svin er svært begrenset kunne det vært interessant å undersøke feces prøver fra norske svinebesetninger, ev. også svaberprøver fra slakt, for tilstedeværelse av *stx*-gener, som *stx*_{2e}, samt O-grupper og flere serotyper. Med fordel kan det også bli gjennomført nye studier på svinekjøttprodukter som f.eks. pølse, som bl.a. Italia har gjort flere ganger.

Videre arbeid bør ha fokus på forbedret metodikk, med fokus på både prøveopparbeidelse, seleksjon av STEC etter oppformering og andre analyser. Det vil muligens kunne bidra til å forenkle oppgaven med å isolere STEC fra PCR-positive prøver.

Noen studier har vist potensialet til metagenomisk tilnærming for påvisning av STEC og hvordan det vil kunne eliminere behovet for først å isolere og dyrke opp bakterien for å kunne detektere og karakterisere den, gitt at det er høy nok sensitivitet. Ved bruk av metagenomikk kan det også vært mulig å se på hvilke bakterier som er til stede før og etter oppformering, og om det da hadde vært mulig å detektere STEC før oppformering, samt hvordan BPV påvirker oppformeringen. Foreløpig er det utfordringer med sensitiviteten, og fortsatt er real-time PCR den mest sensitive metoden til å påvise gener. Det er nødvendig med mer forskning på fagfeltet før det kan tas i bruk.

6 LITTERATURLISTE

- Bardasi, L., Taddei, R., Nocera, L., Ricchi, M. & Merialdi, G. (2015). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in meat and vegetable products in Emilia Romagna Region, years 2012-2013. *Italian journal of food safety*, 4(1).
- Berhilevych, O., Kasianchuk, V., Deriabin, O. & Kukhtyn, M. (2018). Isolation of Shiga toxin-producing strains of *Escherichia coli* from beef and swine carcasses and the characterization of their genes. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 9(2).
- Bouvet, J., Montet, M., Rossel, R., Le Roux, A., Bavai, C., Ray-Gueniot, S., Mazuy, C., Atrache, V. & Vernozy-Rozand, C. (2002). Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) and *E. coli* O157: H7 in French pork. *Journal of applied microbiology*, 93(1), 7-14.
- Bruce-Grey-Owen Sound Health Unit. (2000). *The investigative report of the Walkerton outbreak of waterborne gastroenteritis*.
<https://www1.publichealthgreybruce.on.ca/About-Us/Publications/Walkerton-Outbreak>
- Byrne, L., Adams, N. & Jenkins, C. (2020). Association between Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* O157: H7 stx Gene Subtype and Disease Severity, England, 2009–2019. *Emerging Infectious Diseases*, 26(10), 2394.
- Ceuppens, S., Li, D., Uyttendaele, M., Renault, P., Ross, P., Ranst, M. V., Cocolin, L. & Donaghy, J. (2014). Molecular methods in food safety microbiology: interpretation and implications of nucleic acid detection. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 551-577.
- Croxen, M. A. & Finlay, B. B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*, 8(1), 26-38.
- EFSA. (2020). Pathogenicity assessment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the public health risk posed by contamination of food with STEC. *EFSA Journal*, 18(1), e05967.
- Ercoli, L., Farneti, S., Zicavo, A., Mencaroni, G., Blasi, G., Striano, G. & Scuota, S. (2016). Prevalence and characteristics of verotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from pigs and pork products in Umbria and Marche regions of Italy. *International journal of food microbiology*, 232, 7-14.
- Folkehelseinstitutt, N., Veterinærinstituttet & Veterinærhøgskole, N. (2006). *E. coli* O103 sluttrapport spekemat.
- Fossum, S. & Dissen, E. (2021). PCR (polymerasekjedereaksjon). I *Store medisinske Leksikon*.
- Fuller, C. A., Pellino, C. A., Flagler, M. J., Strasser, J. E. & Weiss, A. A. (2011). Shiga toxin subtypes display dramatic differences in potency. *Infection and immunity*, 79(3), 1329-1337.

- Granum, P. E. (2015). *Matforgiftning : smitte gjennom mat og vann* (4. utg. utg.). Cappelen Damm akademisk.
- Gro S. Johannessen, Kofitsyo S. Cudjoe & Anne Margrete Urdahl. (2012).
- Gro S. Johannessen, C. S., Marianne & Økland, A. M. U., Mona Torp (2018). Zoonotiske E. coli i norske kjøttvarer.
- Gyles, C. L. (2007). Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *Journal of animal science*, 85(suppl_13), E45-E62.
- Haugum, K., Brandal, L., Lindstedt, B.-A., Wester, A., Bergh, K. & Afset, J. (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.
- Havelaar, A. H., Kirk, M. D., Torgerson, P. R., Gibb, H. J., Hald, T., Lake, R. J., Praet, N., Bellinger, D. C., De Silva, N. R. & Gargouri, N. (2015). World Health Organization global estimates and regional comparisons of the burden of foodborne disease in 2010. *PLoS medicine*, 12(12), e1001923.
- Hou, Z., Fink, R. C., Sugawara, M., Diez-Gonzalez, F. & Sadowsky, M. J. (2013). Transcriptional and functional responses of *Escherichia coli* O157: H7 growing in the lettuce rhizoplane. *Food Microbiology*, 35(2), 136-142.
- International Organization for Standardization. (2012). Microbiology of food and animal feed — Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens — Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups. I.
- ISO 6887-1:2017.). ISO 6887-1:2017. Mikrobiologi i næringsmidler og fôr. Opparbeiding av analyseprøver, opprinnelig suspensjon og tierfortynninger for mikrobiologiske undersøkelser. Del 1: Generelle regler for opparbeidelse av opprinnelig suspensjon og tierfortynninger I.
- ISO/TS13136:2012.). ISO/TS 13136:2012 (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 serogroup. International Organization for Standardization, Geneva. I.
- James D. Watson, Tania A. Baker, Stephen P. Bell, Alexander Gann, Michael Levine & Richard Losick. (2013). *Molecular Biology of the Gene*.
- Jarvis, K. G., White, J. R., Grim, C. J., Ewing, L., Ottesen, A. R., Beaubrun, J. J.-G., Pettengill, J. B., Brown, E. & Hanes, D. E. (2015). Cilantro microbiome before and after nonselective pre-enrichment for *Salmonella* using 16S rRNA and metagenomic sequencing. *BMC microbiology*, 15(1), 1-13.

- Jinnerot, T., Tomaselli, A. T. P., Johannessen, G. S., Söderlund, R., Urdahl, A. M., Aspán, A. & Sekse, C. (2020). The prevalence and genomic context of Shiga toxin 2a genes in *E. coli* found in cattle. *Plos one*, 15(8), e0232305.
- 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.
- Johannessen, G. S. & Svindland, C. S. (2021). *Patogene Yersinia enterocolitica i svineprodukter*.
- 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.
- Leonard, S. R., Mammel, M. K., Lacher, D. W. & Elkins, C. A. (2015). Application of metagenomic sequencing to food safety: detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* on fresh bagged spinach. *Applied and environmental microbiology*, 81(23), 8183-8191.
- Lyngstad, T. M., Astrup, E., Brandal, L. T., Eide, H. N., Feruglio, S. L., Grøneng, G. M., Johansen, T. B., Jore, S., Lange, H., Lund, H., MacDonald, E., Naseer, U., Nygård, K. & Vold, L. (2020). Overvåking av infeksjonssykdommer som smitter fra mat, vann og dyr, inkludert vektorbårne sykdommer (Årsrapport 2019) FHI.
- Macori, G., McCarthy, S. C., Burgess, C. M., Fanning, S. & Duffy, G. (2020). Investigation of the causes of shigatoxigenic *Escherichia coli* PCR positive and culture negative samples. *Microorganisms*, 8(4), 587.
- Marjanca Starčič, E. (2019). *The Universe of Escherichia coli*. IntechOpen.
- NMKL No. 32. (2017). NMKL prosedyre Nr. 32. Verifikasjon av mikrobiologiske metoder. I.
- Ottesen, A., Ramachandran, P., Reed, E., White, J. R., Hasan, N., Subramanian, P., Ryan, G., Jarvis, K., Grim, C. & Daquigan, N. (2016). Enrichment dynamics of *Listeria monocytogenes* and the associated microbiome from naturally contaminated ice cream linked to a listeriosis outbreak. *BMC microbiology*, 16(1), 1-11.
- Ottesen, A. R., Gonzalez, A., Bell, R., Arce, C., Rideout, S., Allard, M., Evans, P., Strain, E., Musser, S. & Knight, R. (2013). Co-enriching microflora associated with culture based methods to detect *Salmonella* from tomato phyllosphere. *Plos one*, 8(9), e73079.
- Paton, J. C. & Paton, A. W. (1998). Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clinical microbiology reviews*, 11(3), 450-479.
- Pires, S. M., Majowicz, S., Gill, A. & Devleeschauwer, B. (2019). Global and regional source attribution of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections using analysis of outbreak surveillance data. *Epidemiology & Infection*, 147.

- Ross, N. T. & Miller, B. L. (2007). Characterization of the binding surface of the translocated intimin receptor, an essential protein for EPEC and EHEC cell adhesion. *Protein Science*, 16(12), 2677-2683.
- Sekse, C., Holst-Jensen, A., Dobrindt, U., Johannessen, G. S., Li, W., Spilberg, B. & Shi, J. (2017). High throughput sequencing for detection of foodborne pathogens. *Frontiers in microbiology*, 8, 2029.
- Shang, Y., Xu, Y., Huang, K., Luo, Y. & Xu, W. (2020). Multiplex pyrosequencing quantitative detection combined with universal primer-multiplex-PCR for genetically modified organisms. *Food chemistry*, 320, 126634.
- Silva, C. J., Brandon, D. L., Skinner, C. B. & He, X. (2017). *Shiga toxins : A Review of Structure, Mechanism, and Detection* (1st ed. 2017. utg.). Springer International Publishing : Imprint: Springer.
- Sperandio, V. & Hovde, C. J. (2015). *Enterohemorrhagic Escherichia coli and other shiga toxin-producing E. coli*. ASM Press.
- Stoltenberg, C. (2020). DALY. I. <https://sml.snl.no/DALY>
- Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B. & Denamur, E. (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 8(3), 207-217.
- Trotz-Williams, L. A., Mercer, N. J., Walters, J. M., Maki, A. M. & Johnson, R. P. (2012). Pork implicated in a Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 outbreak in Ontario, Canada. *Canadian Journal of Public Health*, 103(5), e322-e326.
- Tseng, M., Fratamico, P., Bagi, L., Manzinger, D. & Funk, J. (2015). Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) in swine: prevalence over the finishing period and characteristics of the STEC isolates. *Epidemiology & Infection*, 143(3), 505-514.
- Univeristetet i Oslo. (2021). *Vekst*.
<https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/v/vekst.html>
- Universitetet i Oslo. (2019). *Quorum*.
<https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/q/quorum.html>
- Verhaegen, B., Van Damme, I., Heyndrickx, M., Botteldoorn, N., Elhadidy, M., Verstraete, K., Dierick, K., Denayer, S., De Zutter, L. & 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.
- Villani, F., Russo, F., Blaiotta, G., Moschetti, G. & Ercolini, D. (2005). Presence and characterisation of verotoxin producing *E. coli* in fresh Italian pork sausages, and preparation and use of an antibiotic-resistant strain for challenge studies. *Meat science*, 70(1), 181-188.
- Wieczorek, K. & Osek, J. (2020). Identification and molecular characteristics of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) from bovine and pig carcasses isolated in Poland during 2014–2018. *Food Microbiology*, 92, 103587.

- Wong, M. L. & Medrano, J. F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39(1), 75-85.
- World Health Organization. (2019). *Shiga Toxin-producing Escherichia Coli (STEC) and Food: Attribution Characterization and Monitoring* (Bd. 19). World Health Organization.

Vedlegg 1

Cq-verdier og resultater fra TapeStation for samtlige prøver

Prøvenummer	Cq-verdi				NanoDrop		
	<i>stx</i> ₁	<i>stx</i> ₂	<i>eae</i>	IAC	Nukleinsyre- innhold (ng/ µl)	260/280	260/230
24		20,3	18,42	31,22	70,5	1,97	1,64
25	31,25		29,07	29,26	46,3	2,02	1,73
40			17,88	31,28	36,6	2,02	1,81
59			34,36	28,66	63,9	2,01	2,16
61			35,33	29,44	56,5	1,97	1,86
67				28,85	78,7	2,03	2,01
71			21,16	30,34	74,1	1,95	1,83
80				29,19	59,3	1,99	1,77
89			20,03	30,76	69,6	1,93	1,47
92*		20,67	21,62	32,78	54,8	2,02	2,01
97				29,03	73,2	1,95	1,51
110				29,52	58,4	1,98	1,76
111				29,31	53,8	2,07	2,03
112			39,78	29,66	54,5	1,91	1,89
113				29,5	49,4	1,9	1,3
114*				20,67	56,7	1,82	0,94
124				29,71	57,6	1,95	1,9
144			28,02	29	61,2	2,05	1,61
167			20,51	30,88	51,7	1,97	1,75
176*		25,2	22,54	30,48	78,6	2,08	2,07
184				28,94	38	1,99	1,46
202		35,39	25,39	31,09	18,4	1,9	1,35
213	35,77		21,87	31,67	20,8	1,91	0,89
214				28,76	24,1	2,01	0,83
231				28,95	16,2	1,81	1,33
234				30,19	27,3	1,92	1,32
245		27,84	23,96	31,2	22,1	1,85	0,79
249			26,94	30,72	35,8	2,01	1,35
261			36,14	28,15	24,3	1,94	1,16
266				29,41	16,4	1,85	1,27
290			27,19	30,64	21,2	1,88	1,45
291		26,7	25,8	30,57	21,7	1,87	1,37
301				29,16	16,8	1,94	1,72
318			27,82	29,49	20,6	1,92	1,6
321				28,8	32,8	1,95	2,19
360				29,38	18,9	1,75	1,25
372			27,36	30,16	33,6	2,03	1,45
375				29,98	38,9	2,05	1,81
379				28,79	21,2	1,98	1,59
399				28,11	19,9	1,92	1,5
400			31,08	28,61	40,6	2	1,23

401				28,39	75	2,09	1,55
415**	32,03	30,14	27,5	29,16	52,7	2,04	2,29
431			23,04	30,66	62,1	2,05	1,53
438		26,94	27,91	29,46	33	2,02	1,81
439				28,71	39,9	2,02	1,8
448**	34,78	31,44	25,84	29,95	49	1,98	1,7
490		28,51	29,17	28,53	38,2	2,02	2,11
514				28,44	25,1	1,92	2,12
527		24,95		28,51	31,9	2,04	1,9
555			38,35	28,71	35,4	2,01	1,73
556			39,5	28,16	77,2	2,08	2,13
557			27,08	28,08	47,8	1,99	2,07
558				28,2	35,3	2,06	1,89
559				28,4	82,3	2,08	1,99
588				28,59	42,6	2,07	2,06
600		19,23	23,36	30,16	40,6	2,05	1,69
601		36,29	27,73	29,78	40,9	2,02	1,63
602	29,26	27,43	23,4	30,03	29,6	2,1	0,9
626		38,88	27,67	28,32	46,2	2,02	2,16
633		36,89	20,04	30,11	28,2	1,95	1,37
640		36,13	34,01	29,24	18	2,16	0,76
645			29,46	29,64	41,8	2,01	1,05
661			27,57	30,06	38,4	2,02	2,08
663		39,12	39,22	29,46	26,5	1,96	1,78
680			32,16	29,1	15,5	1,95	1,88
691				29,91	46,8	1,96	1,38
692		32,12	30,65	29,06	30,1	1,93	1,76
695*			23,52	31,4	21,4	1,87	0,95
724			21,13	31,09	46,8	1,99	2,03
725				29,46	28,1	1,95	1,83
726				29,2	34,7	1,9	1,82
734				28,93	48,6	1,97	1,47
735				29,2	16,9	1,82	2,13
736				29,08	22,8	1,85	1,53
737				28,81	48,4	1,96	2,07
744				29,21	26,4	1,86	1,44
745	26,41			28,87	47,7	2,02	1,23
754		26,81	27,27	29,95	33,6	1,85	1,7
755			30,65	28,7	19,7	1,7	1,2
756				29,24	22,7	1,86	1,15
759				29,39	39,4	1,89	1,62
766				29,41	16,6	1,77	1,51
790		32,12	31,17	29,44	20,2	1,73	0,77
791				29,81	30,3	1,82	1,02
836			30,49	28,03	32,6	1,83	1,07
848				28,55	26,2	1,82	1,24
855	36,2	33,8	29,68	27,71	16,2	1,76	0,63
861				28,34	19,6	1,78	1,53
870	29,72	30,37	28,87	28,23	19,7	1,89	1,88

877				28,28	39	1,88	1,45
881			38,39	27,48	20,8	1,86	1,03
882				28,8	26,2	1,89	0,9
883				28,01	111,3	1,94	1,46
884			26,56	30,31	19,5	1,78	1,17
885			32,02	27,8	14,9	1,71	1,11
886				27,31	41,3	1,83	1,75
887	23,15			28,01	23,3	1,85	1,12
888				26,58	57	1,99	1,58
907			27,5	28,14	24	1,78	1,42
927	25,68			27,43	25,7	1,8	0,86
928	27,29		32,19	28,79	18	1,87	0,47
929			27,74	27,95	16,9	1,79	0,58
932			24,44	30,25	12,9	1,85	0,45
948		33,09	29,31	26,42	10,2	1,9	0,36
949		31,25	26,31	29,49	19,5	1,87	0,5
954	32,36		26,29	30,94	17,2	1,85	0,58
981		26,63	23,57	28,32	24,2	1,88	0,7
990			37,25	28,01	36,7	2,01	0,67
991		27,62	29,65	28,65	17,9	2,01	0,52
1004			35,62	29,23	36,1	1,91	0,97
1017				28,17	25	1,84	0,67
1018			31,35	28,94	33,1	1,99	0,83
1019			37,06	29,5	23,5	1,92	0,63
1031		31,83	20,55	31,14	24,6	1,86	0,75
1048*			35,31	29,26	17,6	1,78	1,27
1068				28,97	18,8	1,86	1,23
1069				29,03	23	1,91	1,64
1084			26,33	30,13	17,6	1,78	1,27
1111		32,37	27,26	28,75	20,1	1,88	1,3
1112*	34,89	25,99	23,58	30,61	18,9	1,81	1,27
1115	32,21		25,9	29,68	33,2	1,86	1,26
1120				29,02	16,9	1,93	1,36
1162				28,86	33,6	1,86	1,48
1163		30,49	27,04	29,16	16,4	1,75	1,13
1164			24,36	29,7	13	1,73	1,37
1165		32,55		28,79	12,9	1,74	0,59
1175			23,5	30,4	16,8	1,86	1,48
1176			36,84	29,65	16,7	1,65	1,23
1187			24,88	29,65	15	1,72	0,62
1188		28,78	26,25	29,09	15,4	1,85	1,59
1189			37,18	29,13	13,9	1,8	0,99
1201			19,01	30,65	25,6	1,9	1,39
1205			34,91	28,67	23,3	1,92	0,89
1222			37,34	28,19	23	1,81	1,39
1237			24,81	29,6	21,7	1,83	1,13
1243		28,78	27,64	28,28	34	2	1,28
1244				28,41	26,7	1,9	1,57
1255				28,27	21,6	1,92	1,29

1258	32,57	29,19	26,15	28,33	14,9	1,87	0,56
1271			36,85	26,85	24,2	1,92	1,62
1272*				29,68	24,5	1,98	1,36
1273			37,38	27,73	22,8	1,93	1,5
1274				28,26	39,7	1,97	1,81
1275			22,68	28,97	20,8	1,82	1,35
1287*				29,91	14,8	1,87	1,62
1309**	23,71	25,84	26,48	28,13	21	1,99	0,77
1333*			37,35	30,05	40,6	1,44	0,87
1343			23,1	29,23	19,2	1,72	1,26
1346		31,49	25,92	29,29	17,9	1,96	0,63
1368			34,98	28,11	78,5	1,58	1,07
1386			36,14	28,39	32,8	1,87	1,75
1407			31,55	28,05	15,9	1,94	1,52
1430			37,44	28,09	51,1	1,98	1,81
1479				28,03	51,2	1,94	1,7
1480			39,43	27,86	84,6	2	1,87
1481*	34,31	31,46	24,91	30,52	47,5	1,96	1,62

* Prøvene ble kjørt om igjen på grunn av for lav eller høy Cq-verdi. Det er kun Cq-verdi fra siste screening som er inkludert i tabellen.

** Prøven ble kjørt på nytt før størrelsesbestemmelse av PCR produkt. Resultate vises i tabell 7.



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway