

## Slutrapport S0730324

### Risikfaktorer för förekomst av *E.coli* O157: H7 (EHEC) i mjölkko-besättningar samt möjligheter till ett organiserat bekämpande, år 1 och 2.

#### Bakgrund

Blodig diarré hos människor orsakad av toxinproducerande *Escherichia coli* (EHEC) kan leda till allvarliga komplikationer som hemolytisk anemi och njursvikt (hemolytiskt uremiskt syndrom, HUS), hjärnskador och dödsfall. Nötkreatur är den viktigaste reservoaren för bakterien och kan vara smittbärare utan att visa några som helst sjukdomssymtom. När EHEC-bakterier påträffas hos djur kallas de istället VTEC (verotoxinproducerande *E. coli*). Sedan 1996 fram till 2011 har 46 gårdar med i första hand nötkreatur infekterade med VTEC O157 visats ha direkt samband med inträffade humanfall.

Det förekommer även andra serotyper av VTEC som kan smitta från nötkreatur och orsaka sjukdom hos människa, t.ex. O26 och O121. Dessa serotyper har dock bara i enstaka fall kunnat knytas till kontakt med nötkreatur och inte orsakat några större utbrott i Sverige.

Vid ett EHEC utbrott 2002 i Skåne, där smittkällan var fermenterad korv, smittades 28 personer varav 9 (32 %) fick HUS och krävde intensivvård. Under 2005 rapporterades ett större utbrott med 135 fall där smittkällan var sallad. Det utbrottet drabbade framförallt vuxna personer och 11 personer (8 %) utvecklade HUS. Båda dessa EHEC utbrott orsakades av den så kallade Hallandstypen av O157:H7, som är den bakteriellstam som orsakat flest fall av allvarlig sjukdom hos människor som smittats i Sverige.

I Halland har ca 20 % av nötkreatursbesättningarna beräknats vara infekterade med VTEC O157. Det har uppskattats att ca 25 % av de infekterade besättningarna är infekterade med den så kallade Hallandstypen. Det är också inom den regionen som under alla år flest humanfall diagnostiserats. Norr om Dalälven är prevalensen hos nötkreatur mycket låg. Relativt få välkontrollerade studier har genomförts för att försöka kartlägga olika riskfaktorer för att enskilda nötkreatur eller besättningar är infekterade med VTEC O157. Majoriteten av de epidemiologiska studier som genomförts rör studier av den specialiserade köttjursproduktionen i Nordamerika och har liten relevans under svenska eller nordiska förhållanden. Molekylära typningsmetoder har under de senaste åren använts vid SVA med stor framgång för att öka kunskapen om VTEC O157:H7 i Sverige. I dag görs molekylär smittspårning med hjälp av s.k. MLVA-teknik och man använder markörer för hypervirulens (s.k. klad 8 typning) för att klassificera fynd av VTEC O157 i grupper med olika patogenitet. Dessa resultat jämförs med motsvarande analyser gjorda på stammar av VTEC O157:H7 hos sjuka människor i samarbete med Smittskyddsinstitutet.

Den så kallade "Hallandstypen" av VTEC O157:H7 tillhör klad 8 och är mycket lik en stam som orsakat omfattande utbrott av EHEC hos människor i USA med hög sjuklighet och även dödsfall.

Utän att ha en grundläggande kunskap om epidemiologin rörande VTEC O157:H7 infektionen i svenska mjölkbesättningar, kan inte adekvata och välavvägda åtgärder vidtas för att sanera infekterade besättningar och förhindra att fria besättningar nyinfekteras. Detta fyraåriga forskningsprojekt avser att skaffa sådan kunskap. I denna slutrapport redogörs för de första två åren av forskningsprojektet.

## **Material och metoder**

### *Bakteriologiska analyser*

Miljö prover och individuella träckprover har analyseras med SVA´s ackrediterade rutinmetod för diagnostik av VTEC O157. Proverna anrikas i selektiv anrikningsbuljong (mTSB med novobiocin, 41,5° i 18-24 timmar). Därefter sker en specifik anrikning med paramagnetiska kulor via s.k. immunomagnetisk separation (IMS) varefter de paramagnetiska kulorna sås ut på selektiva agarplattor (CT SMAC). Plattorna inkuberas i 37°C i 18-24 timmar och granskas sedan för växt av misstänkta VTEC O157 kolonier. Misstänkta bakteriekolonier konfirmeras vidare med agglutinerings, biokemiska testar och PCR teknik.

### *Molekylärbiologiska tekniker som använts i projektet*

PCR-teknik används för att undersöka om E. coli-bakterier som har odlats fram på agarplattor har gener som kodar för sjukdomsframkallande egenskaper som verotoxin (vtx1 ,vtx2 ) intimin (eaeA) och enterohemolysin (EHEC-Hly). Vi använder här en multiplex PCR-metod som förutom att analysera för dessa fyra gener också inkluderar PCR för H7, som är en klonal markör för VTEC O157:H7 (den serotyp som räknas som mest humanpatogen). VTEC O157:H7 kan vidare indelas i undergrupper, bla genom fagtypning och pulsfält-gel elektrofores (PFGE). Den s.k. Hallandstypen kännetecknas av att den är av fagtyp 4, bär på två olika vtx2 gener och grupperas tillsammans vid fingerprinting med PFGE.

MLVA-teknik (Multiple loci variable number tandem repeat analysis) är en ny metod som bygger på skillnader i antal upprepade DNA-sekvenser hos utvalda och väl karakteriserade områden i bakteriens DNA. Varje område amplifieras med hjälp av PCR teknik och storleken bestäms. Utifrån denna storleksbestämning kan antalet upprepade DNA-sekvenser hos den analyserade stammen beräknas. Resultatet blir en sorts kod för den analyserade bakterien, som sedan kan jämföras med andra bakteriers koder, och som lätt kan jämföras med referensdatabaser, vilket inte är lika enkelt med PFGE-metoden som tidigare användes för typning.

En annan metod för att karakterisera isolat av bakterier är s.k. SNP typning (Single nucleotide polymorphism). Här jämför man enstaka baskillnader i förvalda DNA sekvenser. För VTEC O157 använder man metoden för att dela upp isolerade stammar i olika s.k. klader, och genom att jämföra de olika kladerna mot hur svår sjukdom som utvecklats hos människor som smittats, har man identifierat vissa mer patogena klader. I Sverige har det hittills hittats en sådan mer patogen klad, klad 8, i Sverige även kallad "Hallandstypen" (se ovan). Alla positiva isolat av VTEC O157 från undersökningar utförda i mjölkbesättningar i detta

forskningsprojekt har analyserats eller kommer att analyseras med MLVA-teknik och även klad-typas.

### *Miljöprover*

Tre typer av miljöprover har utvärderats i detta forskningsprojekt och jämförts med analys av träckprover från alla individuella djur i totalt 31 mjölkbesättningar.

1. Sockprov: Varje sockprov består av 2 tubgasbitar som träs över stövlarna. Därefter har provtagningen utförts genom att gå runt i alla områden i stallavdelningen (boxar/ djupströbädd/ spaltgolv etc.) där djuren vistas för att få ett så representativt miljöprov som möjligt.
2. Samlingsprov från träck: Färsk träck från golvet/ströbädden på minst 10 olika ”plockställen” har samlats till ett prov. Handskar har bytts mellan varje prov.
3. Dammprov: Kompresser fuktade med PBS buffert har använts för att torka damm som legat på stallinredningen där djuren vistats.

### *Dataanalys*

Samband mellan potentiella riskfaktorer och prevalens/incidens av VTEC O157 har skattats med ”generalized linear (mixed) models” med olika ”link functions” beroende på svarsvariablernas fördelning. GIS har använts för att beskriva och analysera geografiska och tidsmässiga smittspridningsmönster. De i studien ingående besättningarnas livdjursinköp har inhämtats från Jordbruksverkets databas CDB. Överensstämmelse mellan miljö- och individprover har skattats med etablerade epidemiologiska metoder som används för utvärdering av diagnostiska tester.

## **Resultat**

### *Förekomst av VTEC O157 infektioner bland mjölkbesättningar i Halland: en långtidsstudie*

I en inledande studie undersöktes sammanlagt 98 mjölkbesättningar i två regioner i Halland med strategisk miljöprovtagning bestående av s.k. sockprover från golvytor, samlingsprover av gödsel och dammprover. All provtagning gjordes bland kalvar/ungdjur från 6v till 12 månaders ålder, den åldersgrupp som visat högst infektionsfrekvens i flera andra studier. Totalt hittades 8 besättningar positiva för VTEC O157/H7 vid den första provtagningsomgången våren 2008. Av de 8 positiva gårdarna var 3 positiva beträffande ”Hallandstypen”. De 8 positiva gårdarna och 12 slumpmässigt utvalda tidigare negativa besättningar undersöktes på nytt hösten 2008 med miljöprover samt även provtagning från individuella djur för att utvärdera tillförlitligheten av diagnostik baserad på miljöprover. Av de 8 tidigare positiva gårdarna var 5 gårdar fortfarande positiva för VTEC O157:H7 vid den andra provtagningen. Fyra av de 12 tidigare negativa gårdarna var i den andra provtagningen positiva. Individuellt positiva djur hittades bara i besättningar där något miljöprov var positivt (1). Dessa 98 mjölkbesättningar i Halland undersöktes även våren 2009 med miljöprover.

VTEC O157:H7 påvisades då i 14 besättningar, varav 10 var nyinfekterade (2, 6). Samtliga i studien ingående mjölkbesättningar undersöktes på nytt med miljöprover under våren 2010. Alla stammarna av VTEC O157 har analyserats med så kallad MLVA-teknik och även typats med SNP teknik för att konstatera hur stor andel av de påvisade stammarna som tillhör den så kallade hypervirulenta klad 8. Samtliga undersökta gårdar har även lagts in på karta med GIS teknik och alla djurinköp som gjorts till besättningarna under studieperioden har inhämtats via CDB. De resultat som erhållits är mycket intressanta och finns nu som ett manuskript under bearbetning (3).

Undersökningen visar att besättningarna i de två undersökta regionerna i Halland skiljer sig åt avseende flera undersökta parametrar. I en av de undersökta regionerna (region T) fann vi att en majoritet (10 av 12) av de klad 8 positiva besättningarna låg inom ett mycket begränsat geografiskt område och att dessa stammar hade ett mycket likartat MLVA-mönster. I region T kunde vi inte finna någon korrelation mellan inköp av djur och infektion med VTEC O157. Däremot fanns ett klart samband mellan inköp av djur och infektion med VTEC O157 i den andra undersökta regionen (region L). De MLVA-typer som påvisades i region L hade även de ett mönster specifikt för regionen (med ett undantag) och här påvisades bara två besättningar infekterade med klad 8. I figur 1 redovisas de MLVA typer som påvisats i denna studie i de två olika regionerna.

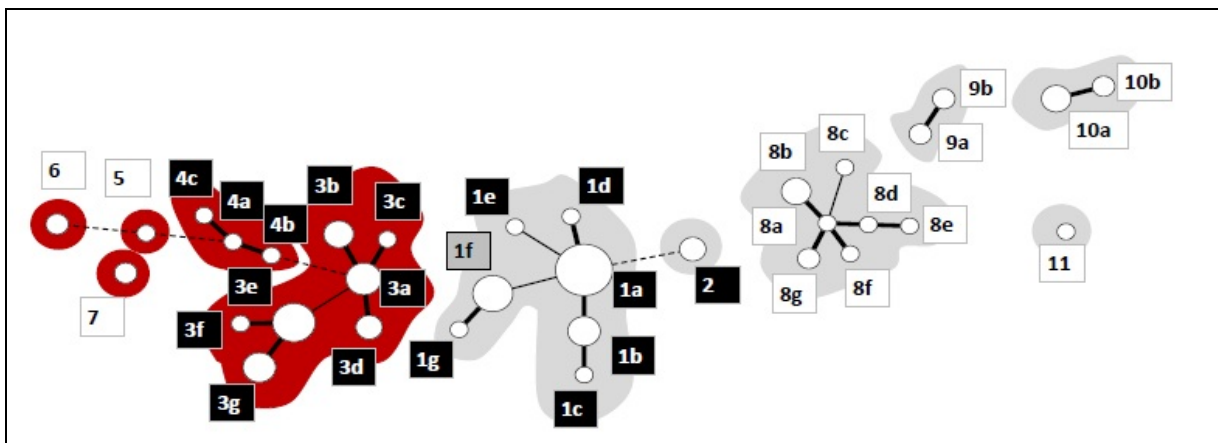


Fig 1. VTEC O157:H7-stammar från mjölkbesättningar i Halland grupperade efter MLVA-typ (cirkel) med typbeteckning (rutor). Cirkelns storlek visar det relativa antalet VTEC-stammar av respektive MLVA-typ. De minsta cirkelarna visar att den typen isolerats enbart vid ett tillfälle. Svarta rutor representerar MLVA-typer från region T och vita rutor MLVA-typer från region L. Den grå rutorna representerar en MLVA-typ som fanns i båda regionerna. Röd färg visar VTEC-stammar som tillhör klad 8.

Det har även visats i denna studie att många mjölkbesättningar självsaneras från en infektion med VTEC O157 utan att specifika åtgärder vidtagits för att bli av med infektionen. Det skall dock påpekas att på grund av de nyinfektioner som inträffat i andra förut fria besättningar har inte prevalensen av infekterade besättningar reducerats under denna studieperiod. Dock har alla djurägare med infekterade besättningar informerats om att VTEC

O157 påträffats och fått mer generella råd om smittskydd och råd för att undvika att smittan skulle kunna överföras och orsaka sjukdom hos människa. De djurägare som erhållit besked om att besättningen måste betraktas som infekterad med VTEC O157 och speciellt med klad 8 har naturligtvis inte varit glada över beskedet, men i flera fall uttryckt att de efter beskedet vidtagit åtgärder för att minska riskerna för att framför allt barn skulle kunna smittas.

#### *Sanering av en större besättning med gårdsslakteri*

Inom ramen för forskningsprojektet har även en studie genomförts för att beskriva effekterna av olika saneringsåtgärder i en större köttdjursbesättning med gårdsslakteri, där människor insjuknat efter konsumtion av charkprodukter från denna gård. Gården är nu att betrakta som helt fri från en infektion med Hallandstypen/klad 8 av VTEC O157 och en redogörelse för resultat av det genomförda saneringsarbetet presenterades vid Veterinärkongressen 2009 (7). En utförligare vetenskaplig artikel med uppföljande provtagningar som bekräftar att besättningen blivit fri från infektionen är under bearbetning (4).

#### *Miljöprovtagning*

De preliminära resultaten av våra undersökningar visade på att miljöprovtagningen fungerar utmärkt för att klassa besättningar som lågrisk- respektive högriskbesättningar avseende VTEC O157/H7 (8, 9). En utförlig vetenskaplig artikel som ingående beskriver de genomförda undersökningarna och miljöprovernas tillförlitlighet är nu publicerad i en internationell vetenskaplig tidskrift (5).

### **Diskussion**

De genomförda studierna av VTEC O157 infektioner i mjölkbesättningar under de första två åren av detta fyraåriga forskningsprojekt har genomförts mycket nära den uppgjorda forskningsplanen och genererat mycket intressanta resultat. Vi har kunnat visa att miljöprover är ett mycket bra sätt att kartlägga en besättnings infektionsstatus på ett relativt enkelt och inte så kostsamt sätt, jämfört med att provta ett stort antal individuella djur. Detta framkom redan i en begränsad studie av 20 besättningar i Halland under det första året i detta forskningsprojekt (1, 3, 8). I en utökad studie som genomförts med medel från Jordbruksverket har detta ytterligare kunnat bekräftas och resultaten av alla genomförda undersökningar finns nu publicerade i en internationell vetenskaplig tidskrift (5).

Undersökningen rörande VTEC O157 infektionens utbredning bland de 98 studerande besättningarna inom två områden i Halland har genererat många intressanta resultat som kan komma att få stor betydelse för olika åtgärder de kommande åren för att försöka förhindra att den hypervirulenta klad 8 stammen av VTEC O157 sprids till mjölkbesättningar i fria områden och områden med en mycket låg prevalens. Ytterligare 125 besättningar från Halland, Västergötland, Småland och Gotland följs nu i nästa fas av projektet med upprepade miljöprover. Detta projekt har samordnats med Svenska Djurhälsovården, SVA och Jordbruksverket. Djurägarna får information om besättningens status och de besättningar som är positiva för VTEC O157 får också rådgivning för att bli av med smittan så snart som

möjligt samt råd för att undvika smitta till människor. Det finns nu även planer på att i en eller flera mjölkbesättningar som visat sig svårsanerade testa effekten av ett VTEC O157 vaccin (9).

Sammanfattningsvis har de två första åren av detta SLF finansierade forskningsprojekt genomförts i stort enligt den genomförda planen och genererat ny viktig kunskap rörande VTEC O157 infektioner i svenska mjölkbesättningar. Viktiga resultat är att:

- 1) Det är möjligt att med miljöprover med hög sannolikhet kunna konstatera om en besättning är infekterad eller fri från infektion med VTEC O157.
- 2) Flera mjölkbesättningar infekterade med den hypervirulenta klad 8 av samma subtyp inom ett begränsat område i Halland tyder starkt på att besättningarna i denna region smittats i första hand via indirekta kontakter mellan besättningarna, t.ex. via kontakter mellan djur på bete eller via gemensam maskinsamverkan när det gäller gödselhanteringen i detta område. I denna region av Halland kunde smittan inte knytas till inköp av djur, däremot fanns ett samband mellan inköp av djur och VTEC O157 infektion i den andra studerade regionen.
- 3) Av de undersökta mjölkbesättningarna i Halland var ca 70% helt negativa avseende VTEC O157 vid samtliga provtagningar.
- 4) En majoritet av VTEC O157 infekterade mjölkbesättningar självsaneras från infektionen under en relativt kort tidsperiod utan att specifika saneringsåtgärder vidtagits.

De erhållna resultaten av denna studie talar starkt för att det vore angeläget att mjölkbesättningar i regioner fria från smitta med VTEC O157, och speciellt från den högvirulenta klad 8 varianten, bara köper livdjur från besättningar som genom provtagning visats vara fria från infektionen.

## **Publikationer**

1. Olofsson H., Alenius S., Emanuelson U., Tråven M., Aspán A., Eriksson E. Prevalence of E.coli O157:H7 and comparison of sampling methods for detection of E.coli O157:H7 in Swedish dairy herds. Epidemiology and Transmission of VTEC and other Pathogenic Escherichia coli, Stockholm, September 25-26, 2008.
2. Olofsson H., Alenius S., Emanuelson U., Tråven M., Aspán A., Eriksson E. Prevalence of VTEC O157:H7 in Swedish dairy herds – an ongoing epidemiological study STEC/VTEC epidemiology from around the world, VTEC 2009, Buenos Aires, Argentina, 10-13 maj, 2009.
3. Olofsson H., Söderlund R, Alenius S., Emanuelson U., Tråven M., Aspán A., Eriksson E. (2013). A longitudinal study of VTEC O157:H7 in dairy herds in two areas in a high prevalence region (manuscript in preparation).

4. Olofsson H., Alenius S., Emanuelson U., Tråven M., Aspán A., Törnqvist M, Dreimanis I, Eriksson E. (2013). Handling of a Swedish beef cattle farm with an on-farm abattoir in order to eradicate a VTEC O167: H7 outbreak strain (manuscript in preparation).
5. Widgren, S., Eriksson, E., Aspan, A., Emanuelson, U., Alenius, S. & Lindberg, A. (2013). Environmental sampling for evaluating verotoxogenic Escherichia coli O157:H7 status in dairy cattle herds. J. Vet. Diagn. Invest. 25, 189-198.

### **Övrig resultatförmedling till näringen**

6. Olofsson H. VTEC O157:H7, Preliminära resultat från Halland. Svensk Mjolk – D&U-konferensen, 26-27 augusti 2009.
7. Olofsson H. VTEC i en dikobesättning med gårdsslakteri. Veterinärkongressen, 5-6 november 2009.
8. Eriksson E. Utvärdering av miljöprover vid provtagning för VTEC O157:H7 i nötbесättningar. Veterinärkongressen, 5-6 november 2009.
9. Eriksson E. Kan man göra något åt VTEC O157:H7 i nötbесättningar? Svensk Mjolk – D&U-konferensen, augusti 2011. <http://www.svenskmjolk.se/Aktuellt/Seminarier-och-Konferenser/Djurhalso---Utfodringskonferensen-DU/DU-2011/DU-2011>.