

ESCHERICHIA COLI O157 OG ANDRE VTEC I FJØRFE

Innledning

I forbindelse med et forskningsprosjekt på Norsk senter for økologisk landbruk på Tingvoll ble det påvist i sommer 2002 *E. coli* O157:H7 fra fecesprøver fra flere dyr på gården: storfe, sau og fjørfe. Saken vakte mye oppmerksomhet spesielt i lokalpressen, og forvaltningen hadde ansvar for oppfølgingstiltak og videre prøvetaking på gården. Det var ikke noe grunnlag for å si hvor smitten er kommet fra eller hvorfor dyrene er blitt bærere av *E. coli* O157:H7, men ut i fra resultater virket det som om gården på et tidspunkt i sommer var ganske gjennominfisert med *E. coli* O157:H7.

Fjørfe regnes stort sett ikke som noe viktig reservoar for O157:H7, men noen publikasjoner har vist at hvis fjørfe først infiseres, kan de være bærere ganske lenge.

I og med at fjørfe var blitt identifisert som bærere av *E. coli* O157:H7 tok vi forholdet alvorlig opp og undersøkte problemstillingen videre for å se om det er aktuelt å sette i gang videre analyser. Det ble utført litteratursøk i flere forskningsdatabaser og tatt kontakt med fagmiljøer med kompetansen i *E. coli* O157:H7 (NVH ved Yngvild Wasteson som er resursperson for *E. coli* O157:H7, VI ved Liv Marit Rørvik som er leder for det aktuelle forskningsprosjekt på Tingvoll, University of Aberdeen fordi Skottland har den høyeste forekomst av *E. coli* O157:H7 i storfe i verden og har utviklet mye kompetanse på området).

Resultater av litteratursøk

Litteratursøk er utført for tidsperioden 1984 – 2002 og for områder:

- metoder for påvisning av *E. coli* O157:H7/påvisning i fugler/fjørfe,
- faktorer som påvirker kolonisering av fugler/fjørfe, dose response, miljø vektorer, og
- mulighet for kontroll av bakterien i produkter

Påvisning og prevalens

I litteraturen er det beskrevet diverse metoder for påvisning av *E. coli* O157:H7, flere av dem som er av eldre dato og kan ha bidratt til lavere sensitivitet og dermed gitt falske negative svar. Noen av eldre metoder for påvisning starter med påvisning av bakterien, og bruker forskjellige oppformeringsmetoder som gjør analysen tidskrevende og mindre sensitiv. I de siste år er det kommet fram nye metoder (17) som påviser toksiner (VT1 og VT2) i matrix med Vero cell test først og deretter blir selve bakterien isolert fra materialet. Videre blir toksingener og *eae* gener undersøkt ved bruk av PCR (*eae* gener koder for produksjon av intimin som gjør det mulig for bakterien å feste seg til tarmen og utgjør viktig faktor i bestemmelsen om bakterien er patogen for mennesker). På den måten blir ikke andre VTEC enn O157:H7 oversett som ved bruk av tradisjonelle skål metoder som isolerer kun enkelte stammer. Metoden er DNA basert og veldig sensitiv også.

VTEC, inklusive *E. coli* O157 var påvist i flere forskjellige fuglearter som måker og duer, fjørfe og fjørfeprodukter. I forbindelse med testing av påvisningsmetoder ble det i 1997 påvist VT *E. coli* O157 i måker i Morecambe Bay (18). Ifølge personlig opplysning (ikke publiserte data) ble dette undersøkelse gjentatt året etter og da var prevalens enda høyere (antallet var doblet). I 2001 ble det påvist Shigatoksin produserende *E. coli* hos duer i Roma med 10,8 %

prevalens (17). Denne artikkel beskriver en ny og raskere metode og antyder mulig artstilpasning av bakterien da det er påvist en ny variant av Shigatoksin – Stx2f (VT2f). I tillegg beskriver denne artikkel at det finnes mange andre VTEC som produserer toksiner, har gener for intimin og cytolethal distending toxin enn bare O157, derfor er det viktig å påvise toksingener først. Begge disse artikler viser også mulige vektorer for overføring av smitte fra naturen til produksjon i tilfelle biosikkerhet ved oppdrett blir senket.

Prevalens i fjørfe, både kylling og kalkun, på slakteri er blitt påvist til alt fra 0 til 9,2 %, påvist i forskjellige land/tider med forskjellige metoder (6, 9, 14, 19). Det finnes ikke studier som har sett etter total VTEC situasjon i fjørfe; dvs alle verotoksin (shigatoksin) produserende *E. coli*.

Den første påvisning av *E. coli* O157:H7 i fjørfeprodukter som ble funnet i litteratursøket er fra 1987 og beskriver påvisning i 1,5 % av prøver tatt ut i Madison område i Wisconsin. Autor konkluderer med at fjørfeprodukter kan bli naturlig forurenset med bakterien. Det ble også påvist *E. coli* O157:H7 i fjørfeprodukter i 1997 (8) da det ble påvist ikke toksinproduserende stammer i naturlig forurensete produkter. I og med at det ble brukt metode for påvisning av enkelt variant av VTEC det er mulig at andre toksinproduserende stammer ble oversett. I tillegg var påviste stammer sorbitol+ og antatt som ikke patogene for mennesker, noe som er i den senere tid blitt forandret da det er kjent sorbitol+ varianter som produserer toksin, men det ser ut til å være geografisk betinget (personlig opplysning). I 1999 ble det publisert to artikler som beskriver påvisning av verocytotoksin produserende *E. coli* O157 i kloakksvaberprøver i slakterier og i oppdrett (6, 19). I Slovakia (6) ble det påvist 9,2 % prevalens av *E. coli* O157:H7 i kylling ved slakteri. Denne artikkelen refererer til en metode som er ukjent og vi har ikke fått svar fra forfatteren om sensitiviteten av metode, men det ble brukt ikke-selektiv oppformeringstrinn som kunne ha bidratt til lavere sensitivitet. I så fall er det mulig at prevalens hadde vært enda høyere ved bruk av mer sensitive metoder. Stammer påvist i denne undersøkelsen var både VT1 og VT2 positive. I den andre artikkel er det beskrevet påvisning av *E. coli* O157 i kalkun. Strøprøver ble tatt ut i dyrerom og analysert med IMS metoden. Det ble påvist prevalens på 1,3 % positive prøver. Isolerte stammer ble videre undersøkt for produksjon av toksin (Vero cell test) og deretter analysert for VT1 og VT2 gener, *eae* gener og enterohaemorrhagic hemolysin (*hly*_{EHEC}) gener. Et av de isolatene fra kalkun fikk påvist VT2 gen, *eae* gen og *hly*_{EHEC} gen. Positive prøver kom fra fire forskjellige oppdrett hvor kun kalkun ble produsert. Det er ikke kjent om oppdrettsformen for kalkun i denne undersøkelsen var åpen, dvs at dyr kunne bevege seg i åpne, avgrensede områder hvor de kunne blitt utsatt for smitte fra naturen. Spørsmålet er sendt til forfatteren av artikkel og svar blir videreformidlet så snart det kommer. Ifølge personlig opplysning er det ikke unaturlig at *E. coli* O157 ble påvist i kalkun fordi i denne typen produksjon blir det brukt mer åpne former som senker biosikkerhet sammenlignet med oppdrett av kylling.

Faktorer som påvirker kolonisering av fugler/fjørfe, dose response, miljø vektorer

I begynnelsen av 1980tallet ble det registrert de første utbruddene av sykdom forårsaket av *E. coli* O157:H7 isolert fra storfe kjøtt. 1985 ble det i en artikkel beskrevet muligheter for kolonisering av tarmen hos kylling (16). Daggamle kylling ble peroralt infisert og kolonisering ble påvist i opptil 90 dager. Bakterien ble funnet i store antall i blindtarmen (opptil 10⁶) og i litt mindre antall i kolon. Dette har vist at kylling kan opptre som vert og reservoar for *E. coli* O157:H7 uten at dyr viste sykdomstegn. I en annen studie (13) ble det påvist at fjørfe kan bli bærere i opptil 11 måneder selv etter at de er blitt utsatt for svært lave antall bakterier. I tillegg ble det undersøkt muligheter for kontaminering av egg fra høner som skiller bakterien. Bakterien ble påvist fra eggskall, men ikke fra egghvit eller eggplomme. I

denne studien ble ikke egg vasket, noe som kan fjerne eggets beskyttende hinne og eventuelt bidra til kontaminering av egg hvit eller eggplomme. Studien har vist at fjørfe kan bli bærere av *E. coli* O157:H7 i perioden som er lengre enn vanlig produksjonsprosess og dermed bli kilde til smitte for mennesker. I en studie i 1996 (12) ble det undersøkt noen faktorer som kan påvirke koloniseringsmuligheten i fjørfe. Outer-membrane protein OMP ble pekt ut som viktig faktor i festelsen av *E. coli* O157:H7 i tarmen hos fjørfe. I to studier (20, 21) ble det undersøkt vector pathway og dose response for utbrudd forårsaket både av mat og miljøet. Det ble regnet ut at dose response for smitte fra miljøet var svært lav (20) og for barn var det 4-24 bakterier. I en artikkel som er sendt til publisering (21) ble det undersøkt hvilken modell er best brukt i bestemmelsen av dose response for *E. coli* O157 og hvor stor den var for en del utbrudd. Studien viser svært lav dose response for alle grupper mennesker, spesielt barn. Skjebnen til *E. coli* O157:H7 etter at den er blitt skilt ut og inkorporert i fjørfegjødsel ble undersøkt i en studie fra 2000. Nedgang i antall *E. coli* O157:H7 ble saktere enn for *Salmonella typhimurium* og var avhengig av temperaturen. Det ble konkludert at utvikling av amoniakk i fjørfegjødsel var en viktig faktor i deaktivering av bakterien.

Mulighet for kontroll av bakterien i produkter

I litteraturen er det også funnet muligheter for kontroll av noen av VTEC både ved primær produksjon og videre bearbeiding av fjørfekjøtt. Broilact (competitive exclusion product) som er brukt mot *Salmonella* i daggamle kyllinger har vist effekt mot *E. coli* O157:H7 og *E. coli* O20:K:H8 (11). Begge stammer er isolerte fra kylling tidligere.

Ved videre bearbeidelse av fjørfekjøtt er det mulig å kontrollere og delvis redusere antall ved varmebehandling og D-verdier (tid nødvendig å redusere antall mikroorganismer med 1 log) er betraktelig lavere for fjørfeprodukter enn for storfekjøtt (10). Det er blitt undersøkt effekt av forskjellige tilsetningsstoffer mot *E. coli* O157:H7 ved forskjellige temperaturer. Forfatter konkluderer at fjørfekjøtt utgjør et godt substrat for vekst av *E. coli* O157:H7 og effekten av de tilsetningsstoffer testet i dette forsøket er avhengig av temperaturen (noen tilsetningsstoffer kan faktisk øke overlevelsessevne av bakterien ved kjøletemperaturer). Denne artikkel refererer til to sykdomsutbrudd som har forbindelse med fjørfekjøtt (22). Påvirkning av *Lactobacillus lactis* ble undersøkt mot *E. coli* O157:H7. Det ble funnet at det er nødvendig med høyt antall *L. lactis* for å forhindre vekst av *E. coli* O157:H7, og effekten skyldes hovedsakelig produksjon av hydrogen peroksid (23). Resistens av *E. coli* O157:H7 og muligheter for bekjempelse av den ble undersøkt. Bruk av laktat og/eller etanol kan hjelpe og øke drapeseffekt av syremidler (24). Bakgrunn for effekten av en slik behandling er beskrevet i litteraturen også (25). Overlevelse og vekst av *E. coli* O157:H7 i produkter iblandet majones ble undersøkt (1). Det ble funnet at majones med sin lave pH kan ikke hindre vekst av *E. coli* O157:H7 uansett konsentrasjon.

Funnene i litteraturen viser at det finnes muligheter for kontroll av VTEC i produksjonsprosessen, men den beste bekjempelsen blir fortsatt å holde mikroorganismen utenfor produksjonslokaler. Dette betyr bekjempelse ved primærproduksjon ved evaluering/innføring av strenge hygiene tiltak.

Konklusjon

Med dagens kunnskap om smittestatus i fjørfe generelt kan vi si at det er reelle muligheter for overføring av *E. coli* O157 eller andre VTEC smitte til fjørfe. Spesielt vil åpne driftsform bidra til overføring av smitte via ville fugler (smittestatus i Norge ukjent) eller kontakt med skadedyr. I tillegg vil produsenter som har oppdrett av andre dyr som storfe og sau i tillegg til fjørfe utgjøre større risiko for overføring av VTEC til fjørfe gjennom menneskelig aktivitet.

Infisering av fjørfe ville ikke gi utslag som sykdom hos fjørfe. Dette vil vanskeliggjøre oppdagelsen av smitte ved besetninger og bidra til muligheter for kontaminering av slakterier og produkter. Litteratursøket gjengir dog situasjon i andre land som har noe høyere smittepress enn Norge. Dette er kanskje i ferd med å endre seg etter hvert (den 15. november ble det oppdaget smitte ved en storfe besetning i Sør Fron og 13 tonn kjøtt ble trukket fra markedet). På grunn av geografiske forhold og forskjellige driftsformer i dyreoppdrett har Norge en fordel, men spredning av de biologiske risikofaktorer blir bare forsinket i forhold til andre land.

Forslag til veien videre

I og med at lavere smittepress i Norge generelt tilsier at vi for øyeblikket ikke er veldig utsatt for VTEC smitte i fjørfe tror jeg at vi ikke trenger å sette inn noen spesielle tiltak for bekjempelse av VTEC. I tillegg kan det nevnes at det er innført strenge tiltak for bekjempelsen av Salmonella som kan bidra til hindring av VTEC smitte (selv om noen resultater viser at VTEC overlever lengre i naturen enn Salmonella og smittestatus til naturlige vektorer er ikke kjent). Allikevel, artikkel fra 2001 (19) viser at kontaminering av fjørfe kan være i anmarsj og derfor er det nødvendig å holde seg oppdatert på utvikling gjennom videre regelmessig litteratursøk, kontakter med kompetansesikler i Norge og utland og eventuell deltakelse ved kurs/konferanser med VTEC som tema. I tillegg vil det være ønskelig å undersøke om de tiltak som er satt i gang for bekjempelsen av Salmonella klarer å forhindre VTEC smitten også. Dette kan gjøres ved sammenligning av industri kyllingoppdrett som er i høyt grad biosikker med oppdrett som er mer åpen (økologisk oppdrett for eksempel). I Norge finnes det ikke mye av økologisk oppdrett og andre mer åpne driftsformer er ikke i bruk. Derfor kan det bli interessant å sammenligne situasjon i andre land (Nederland som har fått påvist VTEC smitte i kalkun og Skottland som har den høyeste smittepress i Europa). For å sikre at det blir påvist andre VTEC enn *E. coli* O157 også, det er ønskelig å undersøke tilstedeværelse av toksiner i matriks (kloakksvabere eller strøprøver) og deretter isolere eventuelle VTEC. Det finnes tilgjengelige metoder for en tilsvarende undersøkelse per i dag.

Et slikt prosjekt kan bli utført med deltakelse av NVH (Yngvild Wasteson), VI, Fagsenter for Fjørfe og Prior som deltagere fra Norge. Andre partnere kan kontaktes etter hvert.

Referanser:

- 1: Arias ML, Monge-Rojas R, Antillon F, Chaves C. Growth and survival of *Escherichia coli* O157: H7 in meat, poultry and vegetables mixed with different concentrations of mayonnaise. Rev Biol Trop. 2001 Sep-Dec; 49(3-4):1207-12.
- 3: Levine P, Rose B, Green S, Ransom G, Hill W. Pathogen testing of ready-to-eat meat and poultry products collected at federally inspected establishments in the United States, 1990 to 1999. J Food Prot. 2001 Aug; 64(8):1188-93.
- 4: Henry YM, Natrajan N, Lauer WF. Detex for detection of *Escherichia coli* O157 in raw ground beef and raw ground poultry. J AOAC Int. 2001 May-Jun; 84(3):752-60.
- 5: Himathongkham S, Riemann H, Bahari S, Nuanualsuwan S, Kass P, Cliver DO. Survival of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* O157:H7 in poultry manure and manure slurry at sublethal temperatures. Avian Dis. 2000 Oct-Dec;44(4):853-60.

- 6: Pilipcinec E, Tkacikova L, Naas HT, Cabadaj R, Mikula I.
Isolation of verotoxigenic *Escherichia coli* O157 from poultry. *Folia Microbiol (Praha)*. 1999;44(4):455-6.
- 7: Jeffrey JS, Kirk JH, Atwill ER, Cullor JS.
Research notes: Prevalence of selected microbial pathogens in processed poultry waste used as dairy cattle feed. *Poult Sci*. 1998 Jun;77(6):808-11.
- 8: Vernozy-Rozand C, Mazuy C, Ray-Gueniot S, Boutrand-Loei S, Meyrand A, Richard Y.
Detection of *Escherichia coli* O157 in French food samples using an immunomagnetic separation method and the VIDAS *E. coli* O157. *Lett Appl Microbiol*. 1997 Dec;25(6):442-6.
- 9: Chapman PA, Siddons CA, Gerdan Malo AT, Harkin MA.
A 1-year study of *Escherichia coli* O157 in cattle, sheep, pigs and poultry. *Epidemiol Infect*. 1997 Oct;119(2):245-50.
- 10: Juneja VK, Snyder OP Jr, Marmer BS.
Thermal destruction of *Escherichia coli* O157:H7 in beef and chicken: determination of D- and z-values. *Int J Food Microbiol*. 1997 Apr 15;35(3):231-7.
- 11: Hakkinen M, Schneitz C.
Efficacy of a commercial competitive exclusion product against a chicken pathogenic *Escherichia coli* and *E coli* O157:H7. *Vet Rec*. 1996 Aug 10;139(6):139-41.
- 12: Zhao S, Meng J, Doyle MP, Meinersman R, Wang G, Zhao P.
A low molecular weight outer-membrane protein of *Escherichia coli* O157:H7 associated with adherence to INT407 cells and chicken caeca. *J Med Microbiol*. 1996 Aug;45(2):90-6.
- 13: Schoeni JL, Doyle MP.
Variable colonization of chickens perorally inoculated with *Escherichia coli* O157:H7 and subsequent contamination of eggs. *Appl Environ Microbiol*. 1994 Aug;60(8):2958-62.
- 14: Smith HR, Cheasty T, Roberts D, Thomas A, Rowe B.
Examination of retail chickens and sausages in Britain for verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 1991 Jul;57(7):2091-3.
- 15: Doyle MP, Schoeni JL.
Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. *Appl Environ Microbiol*. 1987 Oct;53(10):2394-6.
- 16: Beery JT, Doyle MP, Schoeni JL.
Colonization of chicken cecae by *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. *Appl Environ Microbiol*. 1985 Feb;49(2):310-5.
- 17: Morabito S., Dell'Omo G., Agrimi U., Schmidt H., Karch H., Cheasty T., Caprioli A.
Detection and characterisation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in feral pigeons. *Veterinary Microbiology* 82 (2001) 275-283
- 18: Wallace J.S., Cheasty T., Jones K.
Isolation of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from wild birds. *Journal of Applied Microbiology* 1997, 82, 399-404
- 19: Heuvelink A.E., Zwartkruis-Nahuis J.T.M., van den Biggelaar F.L.A.M., Van Leeuwen W.J., de Boer E.
Isolation and characterisation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from slaughter pigs and poultry. *International Journal of Food Microbiology* 52 (1999) 67-75
- 20: Strachan N.J.C., Fenlon D.R., Ogden I.D.
Modelling the vector pathway and infection of humans in an environmental outbreak of *Escherichia coli* O157
FEMS Microbiology Letters 203 (2001) 69-73
- 21: Strachan N.J.C., Doyle M.P., Kasuga F., Ogden I.D.
Dose response modelling of *Escherichia coli* O157 incorporating data from foodborne and environmental outbreaks. (sent til publiserings i *International Journal of Food Microbiology*)
- 22: Conner D.E., Gena S.H.
Temperature and food additives affect growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 in poultry meat
Diary, Food and Environmental Sanitation, Vol. 16, No. 3, 150-153
- 23: Brashears M.M., Reilly S.S., Gilliland S.E.

Antagonistic action of cells of *Lactobacillus lactis* toward *Escherichia coli* O157:H7 on refrigerated raw chicken meat. *Journal of Food Protection*, vol. 61. No. 2. 1998, 166-170

24: Jordan S.L., Glover J., Majcolm L., Thomson-Carter F.M., Booth I.R., Park S.F.
Augmentation of killing of *Escherichia coli* O157 by combinations of lactate, ethanol and low-pH conditions. *Applied and environmental Microbiology*, Mar. 1999, 1308-1311

25: Roe, A.J., McLaggan D., Davidson I., O'Byrne C., Booth I.R.
Perturbation of anion balance during inhibition of growth of *Escherichia coli* by weak acids. *Journal of Bacteriology*, Feb. 1998, 767-772