

Geografisk kartläggning av inhemska fall av olika undertyper av EHEC/VTEC O157:H7 åren 1995-1997

Anna Blom



UPPSALA
UNIVERSITET

Teknisk- naturvetenskaplig fakultet
UTH-enheten

Besöksadress:
Ångströmlaboratoriet
Lägerhyddsvägen 1
Hus 4, Plan 0

Postadress:
Box 536
751 21 Uppsala

Telefon:
018 – 471 30 03

Telefax:
018 – 471 30 00

Hemsida:
<http://www.teknat.uu.se/student>

Abstract

Geografisk kartläggning av inhemska fall av olika undertyper av EHEC/VTEC O157:H7 åren 1995-1997

Geographic mapping of Swedish subtypes of EHEC/VTEC O157:H7, during 1995-1997

Anna Blom

Verotoxin-producing *Escherichia coli* (EHEC/VTEC) can cause human and animal illness. The main reservoir for EHEC/VTEC serotype O157:H7 is cattle, but these often exhibit no clinical symptoms. The specific serotype O157:H7 is also often associated with a wide spectrum of human clinical illness, varying from no symptoms, watery or bloody diarrhoea, haemorrhagic colitis, to the severe haemolytic uraemic syndrome (HUS) which can even cause death. Cattle carrying these bacteria can often be the source of human infection. All these circumstances make the epidemiological investigations of these bacteria very important.

The purpose of the present study was to examine the possible correlation in geographic distribution of different EHEC/VTEC O157:H7 subtypes isolated from human cases 1995-1997 and from cattle in an abattoir prevalence study in 1996-1997. Comparing subtypes of O157 H:7 is a possible way to find out if cattle is the source of a human infection, provided that they share the same subtype. I found that some subtypes occurred in both human and cattle samples. Results also showed some geographic correlations between human and cattle samples, suggesting that some but presumably not all human infections can be related to domestic cattle.

Handledare: Yvonne Andersson
Ämnesgranskare: Lars-Göran Josefsson
Examinator: Elísabet Andrésdóttir
ISSN: 1650-8319, STS07039

Populärvetenskaplig beskrivning

EHEC/VTEC är benämningen på en infektion som en viss typ av bakterien *Escherichia coli* (*E. coli*) orsakar. I Sverige är benämningen för infekterade djur VTEC och för människor som bär på infektion EHEC. EHEC/VTEC är en zoonos vilket innebär att smittan kan överföras mellan djur och människor. Den huvudsakliga reservoaren för bakterien är nötkreatur. Däremot påvisar mänskliga bärare av infektionen mycket oftare symptom än djuren. En sjukdomsbild kan innebära diarréer, ibland blodiga sådana. Hos människor kan även svårare symptom förekomma, nedbrytning av röda blodkroppar samt njursvikt- (hemolytiskt-uremiskt syndrom – HUS). Enstaka infektioner har även lett till dödsfall till följd av HUS.

Hur många som drabbas i Sverige årligen varierar stort. Statistik från 1988 visar enstaka fall varje år fram till 1994. Från 1995 däremot har det under vissa år varit utbrott med hundratals fall.

Detta examensarbete omfattar en geografisk kartläggning av stammar inom serotypen O157:H7 av EHEC/VTEC åren 1995-1997 i Sverige. Studien har genomförts med hjälp av dataprogrammet geografiskt informationssystem (GIS) med syfte att undersöka huruvida geografisk korrelation förekommer hos djur- och mänskliga stammar. Förutom den geografiska kartläggningen återges en ämnesbeskrivning av EHEC/VTEC och redogörelse av bakomliggande material och kriterier för de data som finns med undersökningen.

Examensarbetet har påvisat att GIS är ett bra verktyg då man vill visualisera huruvida geografisk korrelation förekommer mellan olika stammar av EHEC/VTEC. Med hänsyn till att denna undersökning endast omfattar begränsade data kan inga starka generella slutsatser dras. För de aktuella åren kan dock en viss korrelation mellan djur- och humanstammar påvisas.

Innehållsförteckning

1 Inledning	3
1.1 Introduktion	3
1.2 Syfte	3
1.3 Avgränsningar	4
1.4 Genomförande	4
2 Beskrivning av EHEC/VTEC/STEC O157:H7	5
2.1 Utseende	5
2.2 EHEC, VTEC och STEC	6
2.3 Toxiner	6
2.4 Serotyp: VTEC O157:H7	7
2.5 Bakteriens miljö och överlevnad	7
2.6 Smittkällor och smittvägar	8
2.7 Symtom och behandling	8
2.8 Förebyggande åtgärder	9
2.9 Förekomst	9
3 Situationen i Sverige	9
3.1 Humanfall	9
3.2 Djurfall	11
4 Material och metoder	13
4.1 Humanprover	13
4.1.1 Studiens utformning	13
4.1.2 Laborativa metoder	13
4.1.3 Undertypning med hjälp av Pulsfält-gelelektrofores (PFGE)	14
4.1.4 Undertypningskriterier	16
4.1.5 Bearbetning av data	17
4.1.6 Geografisk sammanställning	18
4.2 Djurprover	19
4.2.1 Studiens utformning	19
4.2.2 Laborativa metoder	19
4.2.3 Laborativa resultat	19
4.2.4 Bearbetning av data	19
4.2.5 Geografisk sammanställning	20
5 Resultat	20
5.1 Humanfall	20
5.1.1 Geografisk plats och antal inträffade humanfall per ort	20
5.1.2 Antal humanundertyper per ort	22
5.2 Djurfall	27
5.2.1 Geografisk plats och smittfall per ort	27
5.2.2 Förekomst av olika undertyper	28
6 Diskussion	30
6.1 Djur- och humanundertyper	30
6.2 Geografisk utbredning av undertypade djur- och humanstammar	31

7 Sammanfattning och slutsatser	32
8 Referenser	33
8.1 Tryckta källor	33
8.2 Muntliga källor	34
8.3 Internet	34
8.4 Figurer och tabeller	35

1 Inledning

1.1 Introduktion

Smittsamma sjukdomar för såväl människor som djur uppträder ständigt vilket medför problem för individen och samhället som en oundviklig följd. Över tiden uppkommer nya allvarliga sjukdomar som ersätter tidigare sjukdomarna i betydelse. Ofta är preventiva åtgärder ett effektivt sätt för att komma till rätta med smittspridningen. För att uppnå detta krävs dock kunskap om mikroorganismens ekologiska nisch och hur den smittar. God kunskap om smittvägar och åtgärder för att förhindra smittspridning är en förutsättning för att både smittade och osmittade personer ska kunna ta sitt ansvar för att förhindra smittspridning. Smittskyddsinstitutet (SMI) är den statliga myndighet där avdelningen för epidemiologi (EPI) har sitt säte. EPI ansvarar för övervakning och smittspårning av smittsamma sjukdomar bland människor. Vad beträffar djur är Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA) det organ som sköter det epidemiologiska arbetet, främst avdelningarna för bakteriologi och sjukdomskontroll.

Detta examensarbete omfattar en geografisk kartläggning av serotypen O157:H7 av den smittsamma och på humansidan anmälningspliktiga infektionen EHEC/VTEC som orsakas av en speciell typ av bakterien *Escherichia coli* (*E. coli*). Normalt är *E. coli* en ofarlig bakterie som förekommer i tarmen hos de flesta varmblodiga djurarter och således hos oss människor. Det finns dock vissa typer av *E. coli* som är sjukdomsframkallande, varav Enterohemorragisk *E. coli* (EHEC) är av sådan typ. Första kända humanfallet av infektion inträffade i början av 1980-talet i USA och orsakades av kontaminerade livsmedel¹.

EHEC eller VTEC som den också kallas, är en zoonos vilket innebär att smittan kan överföras mellan djur och människa. Nötkreatur är den vanligaste reservoaren för bakterien. Smittan påvisas således främst hos nötkreatur, men även andra djur, framförallt idisslare. Djur kan vanligtvis bära på smittan utan att uppvisa symtom. Bakterien kan överföras till människan via direkt eller indirekt kontakt med smittade djur eller människor. Exempel på smittvägar är kontaminerade livsmedel och dricksvatten. Mest drabbade av infektionen är barn, äldre och andra grupper med nedsatt immunförsvar.² Symtombilden för infektionen är oftast diarré, ibland blodig sådan. Andra typer av svårare symtom kan också förekomma, som nedbrytning av de röda blodkropparna samt njursvikt- (hemolytiskt-uremiskt syndrom – HUS), andra koagulations- och blödningsrubbningar samt neurologiska symtom. Enstaka infektioner har även lett till dödsfall.³

1.2 Syfte

Syftet med detta examensarbete, som initierades av SMI och SVA, är att med en deskriptiv analys undersöka om det finns en korrelation mellan den geografiska spridningen av olika undertyper av EHEC/VTEC O157:H7 isolerade dels från humanfall under åren 1995-1997 och från nötkreatur undersökta med avseende på VTEC O157:H7 i en prevalensstudie vid slakterier, åren 1996 och 1997. En undertyp är

¹ Kisterman et al., 2004

² SVA et al., 2002

³ SMI, 2006

en förfinad indelning av bakterien där laborativa metoder används för att gruppera bakterier efter deras unika DNA-profiler.

Med hjälp av dataprogrammet Geografiskt informationssystem (GIS) ska förekomsten av de olika undertyperna redovisas geografiskt på en karta över Sverige. Utifrån den kartläggningen är ambitionen att besvara följande frågeställningar:

- Korrelerar de förekommande undertyperna av djurstammar och humanstammar med varandra geografiskt?

Sekundära frågeställningar:

- Förekommer samma undertyper av djur- och humanstammar?
- Vilka undertyper är vanligast?
- Varierar undertyperna under dessa år?

1.3 Avgränsningar

Den första studien i Sverige för att undersöka förekomsten av VTEC O157 hos djur genomfördes 1996-1997. Studien resulterade i 37 positiva prover av totalt 3071. Samtliga positiva djurprover från den studien användes i denna undersökning. Med utgångspunkt från djurstudien har humanprover analyserats för samma tidsperiod och även 1995. Anledning till att 1995 har tagits med i denna studie är att under detta år skedde en explosionsartad ökning av antalet humanfall. 1995 rapporterades mer än 100 fall jämfört med tidigare år då enstaka fall per år anmälts. Anmälningsplikten för infektionen infördes 1996 på humansidan men en frivillig rapportering fanns redan 1995. Tidsperioden för denna undersökning avgränsas således till åren 1995-1997 för humanfall och 1996-1997 för djurfällen.

Jag har gått igenom samtliga dokumenterade humanfall åren 1995-1997 för att i möjligaste mån få ett bra urval.

1.4 Genomförande

Personal från SVA och SMI har konsulterats för utformningen av och information om materialet för examensarbetet eftersom båda myndigheterna är involverade i studien⁴. Materialet till undersökningen fanns inte att tillgå i sin helhet vid examensarbetets början utan har distribuerats till mig efter hand. Jag satte mig in i datamaterialet genom att träffa den person⁵ som 1999 laborativt särskiljt och namngivit undertyperna. Då endast ett ej representativt urval av humanstammarna från de aktuella åren undertypats så började arbetet med att ta fram information om alla registrerade humanfall åren 1995-1997. För att få en bra geografisk kartläggning valdes sedan ytterligare prover ut för att ingå i denna undersökning. Denna urvalsprocess var tidskrävande främst på grund av att materialet var svårtillgängligt, men även för att provsvaren skulle anpassas till en undertypning som skett för flera år sedan. Dokumentation från denna tidsperiod finns inte i de databaser som nu används på dessa myndigheter. I denna del av materialbearbetningen har jag fått hjälp av Kunskapscentrum för mikrobiologiskt

⁴ SMI; Yvonne Andersson (EPI), Sven Löfdahl, Margareta Ramberg (KCB). SVA; Anna Aspán (bakteriologen), Sofia Boqvist och Jenny Frössling (sjukdomskontroll).

⁵ Anna Aspán, SVA

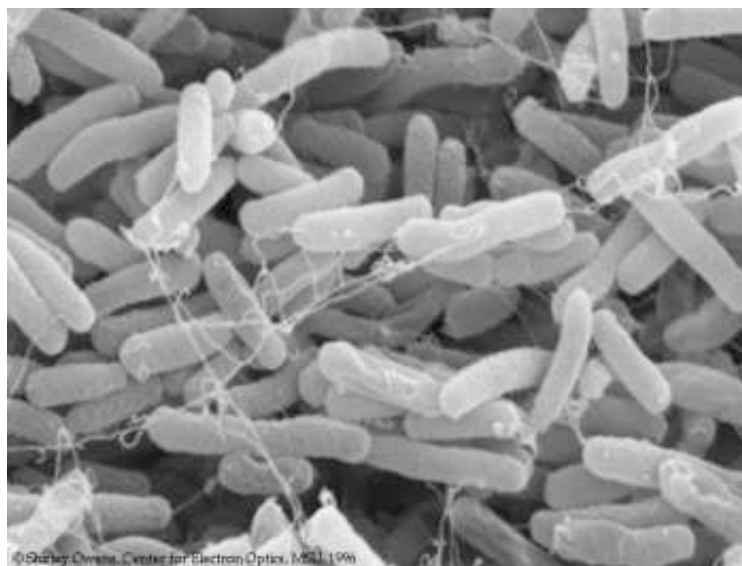
centrum (KCB) på SMI⁶. Materialet för de djur och humanfall som tagits med i denna studie har till att börja med bearbetats i Excel. Den deskriptiva geografiska analysen har skett med hjälp av programvaran ArcGis® 9, Geographic Information Systems (GIS). Detta dataprogram har jag inhämtat kunskap om under arbetets gång, eftersom jag tidigare aldrig använt det. Bland annat har jag genomfört en nätbaserad GIS-kurs. Utifrån de olika geografiska platserna visualiserade på kartor, har materialet analyserats och givit en bild av den geografiska situationen för de olika EHEC/VTEC O157:H7 undertyperna de aktuella åren.

2 Beskrivning av EHEC/VTEC/STEC O157:H7

E. coli är en bakterie som förekommer i tarmen hos de flesta varmblodiga djurarterna och hos oss människor. Den är normalt ofarlig och medverkar vid matsmältningen och tros inverka på bildandet av vissa vitaminer. Men EHEC/VTEC är en speciell typ av *E. coli* som inte är harmlös för värdorganismen. Den kan tvärtom orsaka infektion med i vissa fall svåra symtom. Bakterier som kan framkalla sjukdom kallas med gemensam term för patogena bakterier.

2.1 Utseende

Bakterier är encelliga organismer i storleken 0,001-0,02 millimeter som kan delas in i olika grupper med avseende på deras egenskaper. Indelningen brukar ske grovt efter utseende, reaktion vid gram-färgning och förmåga att växa i närvaro/frånvaro av syre.⁷ *E. coli* är till utseendet en stavformad bakterie som reagerar gramnegativ vid färgning på grund av cellväggens sammansättning. *E. coli* bakterier i förstoring visas i figur 1.



Figur 1 - *E. coli* bakterier. Förstoring av bakterier med hjälp av SEM - scanning electron microscopy.

⁶ Sven Löfdahl & Margareta Ramberg, (KCB) SMI

⁷ SVA, 2006

2.2 EHEC, VTEC och STEC

Som rubriken antyder finns det flera olika benämningar för denna typ av sjukdomsframkallade *E. coli*. I princip menar man samma sak med de olika förkortningarna. EHEC syftar på sjukdomen *Enterohemorragisk E. coli infektion* vilket är det kliniska namnet för svår tarminflammation med tillhörande blödningar. Infektionens namn härstammar från grekiskan, enteron (tarm) haima (blod) och rhage (bristning)⁸. Beteckningarna verotoxinproducerande *E. coli* (VTEC) och shigatoxinproducerande *E. coli* (STEC) används synonymt och härledes från de toxiner som bakterien bildar. EHEC kan således inkluderas i den större grupperingen som varierande kallas VTEC eller STEC.⁹

I Sverige används vanligtvis VTEC som benämning för smittbärande djur, vilka dock vanligtvis inte visar tecken på några symtom. Däremot kan vissa varianter av VTEC orsaka sjukdomssymtom hos människor. I fallet smittade människor benämns infektionen vanligen EHEC. I Sveriges smittskyddslag används benämningen EHEC på samtliga humanfall, vilket förklarar varför man i Sverige använder EHEC som benämning inom humanmedicin¹⁰.

Internationellt används nästan uteslutande begreppen VTEC eller STEC för att beskriva dessa toxinproducerande *E. coli* stammar, för både djur och humanfall.¹¹

Generellt i Sverige används således benämningen VTEC för att beskriva smittbärande djur och EHEC betecknar de humanfall som smittats av VTEC och har fått infektionen. Försättningsvis i detta arbete kommer däremot endast förkortningen VTEC att användas, oavsett om djur eller människor åsyftas.

2.3 Toxiner

VTECs förmåga att producera verotoxin är en av flera så kallade virulensegenskaper som påverkar bakteriens förmåga att orsaka sjukdom hos bäraren. Eftersom VTEC är en tarmbakterie är det vid tarmslemhinnan som bakterien fäster och utsöndrar toxiner. Det sker alltså ingen spridning av själva bakterien i blodbanan.¹² Det finns två huvudtyper av toxiner. För dessa förekommer två benämningar shigatoxin (STX) och verotoxin (VT) 1 och 2. Bakterien kan producera en eller båda typerna. En annan virulensfaktor som påverkar bakteriens förmåga att orsaka sjukdom hos värdorganismen är *eae*-genen. *Eae*-genen kodar för faktorer som påverkar bakteriens förmåga att fästa till celler i tarmen. Ibland krävs det att flera virulensfaktorer samspelar och påverkar värdorganismen för att bakterien ska orsaka infektion.¹³

⁸ Danielsson-Tham, 1999

⁹ Plym Forsell, 2003

¹⁰ Andersson Y., 2006

¹¹ SMI, 2006

¹² Sartz & Karpman, 2007

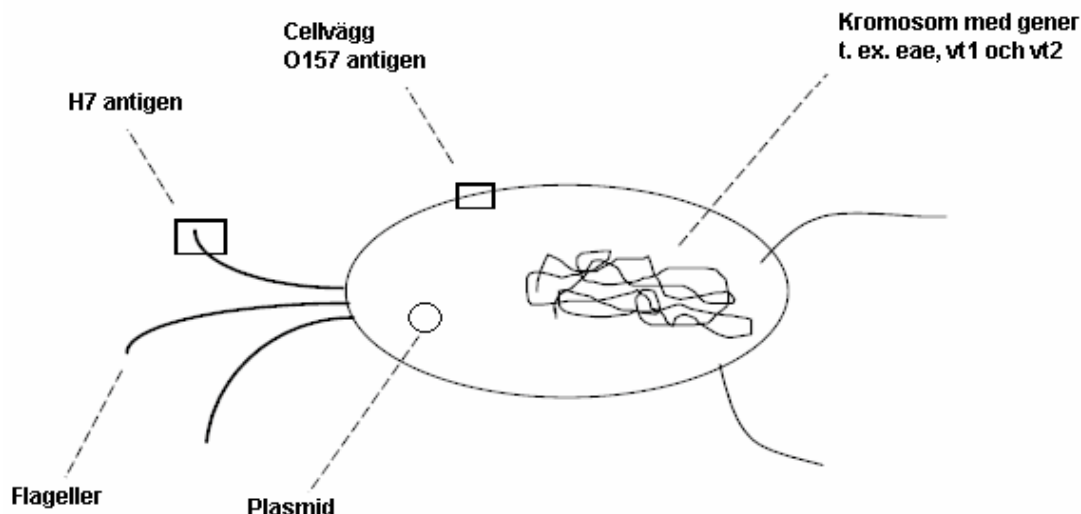
¹³ SLV, 2007

2.4 Serotyp: VTEC O157:H7

E. coli bakterien kan delas in i olika serotyper, klassificerade efter hur antigenerna O och H uttrycks på bakteriens yta. Serotyperna av O- antigenet uppgår till 173 i antal (O1-O173) medan det finns 56 olika sorts typer av H- antigenet (H1-H56).¹⁴

Många olika serotyper kan ge upphov till infektion, till exempel O26, O103, O91, O111, O145 och O146¹⁵. I Sverige är det vanligast att O157:H7 orsakar sjukdom. Från djur har det isolerats över 200 serotyper av VTEC. Minst 60 av dessa serotyper har man kunnat säkert associera även med humana sjukdomsfall.¹⁶

Sammanfattningsvis är det serotypstillhörigheten i kombination med förmågan att producera virulensfaktorer som avgör om *E. coli* bakterien kan orsaka sjukdom hos värdorganismen. Det är inte alltid tillräckligt med toxiner som virulensfaktor för att sjukdom ska uppstå. Alla virulensfaktorer är inte kartlagda ännu och forskning pågår fortfarande inom området.



Figur 2 - Schematisk bild av VTEC. Förenklad schematisk bild över vissa typiska egenskaper hos VTEC O157:H7- bakterien. Flagell=rörelseorgan, Plasmid=arvs massa utanför bakteriekromosomen, Kromosom=arvs massa, eae=gen som kodar för virulensfaktorn intimin, VT1 och 2=cytotoxiner

2.5 Bakteriens miljö och överlevnad

VTEC är en tålig bakterie, den kan överleva månadsvis i naturen i till exempel strandängar och vattendrag. Bakterien kan vid lämpliga förhållanden till och med växa till i den externa miljön.¹⁷

¹⁴ Duffy et al., 1999

¹⁵ Eriksson et al., 2006

¹⁶ Plym Forsell, 2003

¹⁷ Berggren, 2006

VTEC överlever infrysning och kylagring och tål även sura miljöer som bland annat vissa typer av konservering och yoghurtprodukter innebär. Bakterien dör dock vid upphettning till 60-70°C.¹⁸

2.6 Smittkällor och smittvägar

Den väsentligaste reservoaren för VTEC är nötkreatur. Eftersom VTEC är en zoonos så kan smittan spridas mellan djur och människor. Smittspridningen kan ske på olika sätt. Det kan vara genom direktkontakt med smittade djur, via livsmedel och dricksvatten eller via den externa miljön. Smitta kan även ske från person till person.

Alla dessa smittvägar har förekommit i Sverige i varierande grad.¹⁹ Inkubationstiden är 1-8 dygn, vanligast dock 3-4 dygn.²⁰

En människa blir smittad då bakterien kommer in i munnen. Smitt dosen som krävs är mycket låg, det räcker med mindre än 100 bakterier.²¹ Lättast drabbas människor med nedsatt eller ofullständigt utvecklat immunförsvar, däribland äldre och barn.²² Kontakten med bakterien kan vara direkt eller indirekt men bakterien kan även spridas via vektorer.

I många VTEC-fall kan smittkällan knytas till livsmedel. Smittan kan ha orsakats av kontaminering vid slakt eller av bevattning med förorenat vatten på grödor. Köksredskap som används till flera olika livsmedel utan rengöring kan utgöra en smittkälla. Otillräcklig lagad mat, grönsaker och opastöriserad mjölk, juicer och yoghurt har även de varit orsak till VTEC-fall.

Bakteriens spridning i miljön sker i huvudsak av smittbärande djur på betesängar samt genom gödsel. Bakterien kan föras vidare med gödsel via till exempel vattendrag eller via grödor som fått gödsel som växtnäring. Det finns flera dokumenterade utbrott under sommarmånaderna som man misstänker är kopplade till friluftsbad med närhet till betande djur.

När smitta sker från person till person sker det främst inom familjer eller till exempel på daghem eller vårdhem.²³

2.7 Symtom och behandling

En VTEC-infektion kan ge upphov till varierande symtombild, från inga symtom alls till i värsta fall dödsfall. Det finns infekterade människor, men främst djur, som inte påvisar några som helst symtom. Vid sjukdom är ofta inledande symtom magkramper och diarré. Feber, illamående och kräkningar förekommer mer sällan. Diarrén kan utvecklas till hemorrhagisk colit (blodiga diarréer) i uppskattningsvis 30-75% av fallen.²⁴ I svårare fall kan den kliniska bilden utvecklas till HUS (hemolytiskt-uremiskt syndrom). Detta sker hos cirka 5% av patienterna och värst drabbade är barn under fem

¹⁸ SVA, SLV et al., 2002

¹⁹ Plym Forsell, 2003

²⁰ SMI, 2007

²¹ Boqvist, 2006

²² Boqvist, Vågsholm, et al., 2006

²³ Boqvist, Andersson, et al., 2006

²⁴ SLV, 2006

år. Vid HUS skadas njurarna med njursvikt som följd. Trombocytvärdena kan sjunka så lågt att blödningar lätt uppkommer. HUS behandlas ofta med intensivvård och dialys. Ingen effekt av antibiotikabehandling har konstaterats. I sällsynta fall kan HUS leda till dödsfall.²⁵

2.8 Förebyggande åtgärder

Genom god hand- och livsmedelshygien, tillräcklig upphettning av livsmedel och pastörisering av mjölk, kan risken för smitta och smittspridning begränsas.

Vid misstanke om att smitta skett via direktkontakt med djur eller indirekt till exempel via opastöriserad mjölk sker provtagning på gården i fråga. Skulle det visa sig att gården har varit orsaken till smittan finns en handlingspolicy (det så kallade 5GD dokumentet) som stöd för rekommenderat förfarande med avsikt att förhindra vidare smittspridning. Dessa åtgärder gäller bara den gård som kan kopplas till smittan. Potentiella gårdar i närområdet omfattas inte av handlingsplanen. Handlingspolicyn är vägledande och har inget lagligt stöd. Nedan följer några förkortade utdrag som exempel på de råd som finns i handlingspolicyn.

- Särskilda besöks- och hygienrutiner bör upprättas.
- Besök bör begränsas till behörig personal i smittad besättning
- Försäljning av djur bör ej ske från smittad gård.
- Betande djur bör hållas på sådant sätt att offentliga badplatser inte kan förorenas.
- Gödsel bör endast spridas som växtnäring om den genomgått någon form av hygienisering.
- Särskilt god hygien bör eftersträvas i kalv- och ungdjursbesättningar.²⁶

2.9 Förekomst

VTEC som orsak till blodig diarré är känd sedan 1977.²⁷ Men det var i USA 1982 som VTEC uppmärksammades mer allmänt första gången efter att 47 människor insjuknat i kraftiga och blodiga diarréer. Alla som insjuknat hade ätit hamburgare från samma hamburgerkedja till vilken smittan spårades. Undersökningen visade att hamburgerköttet innehöll toxinproducerande VTEC och att värmebehandlingen hade varit otillräcklig så att bakterier överlevt.²⁸

3 Situationen i Sverige

3.1 Humanfall

I Sverige har det varit möjligt att diagnostisera VTEC sedan 1988. Frivillig humanfallsrapportering till SMI har funnits sedan dess fram tills införandet av anmälningsplikten av VTEC O157 som infördes 1996. Den 1 juli 2004 blev samtliga serotyper av VTEC anmälningspliktiga²⁹.

²⁵ SMI, 2006

²⁶ Boqvist, 2006

²⁷ SMI, 2007

²⁸ Danielsson-Tham, 1999

²⁹ SVA, et. al., 2005

Från 1988 fram till och med 1994 diagnostiserades 0-3 fall per år. Av dessa var cirka hälften VTEC O157 och resterande andra serotyper.³⁰ VTEC O157 blev uppmärksammas 1995 då ett flertal personer insjuknade på olika platser i Sverige. Utbrottet 1995 skedde i slutet av året och sträckte sig till början av 1996. Trots epidemiologiska utredningar kunde ingen misstänkt smittkälla konstateras. 1996/1997 misstänktes ännu ett utbrott där man fann flera insjuknade som badat i samma sjö.³¹ Under 2000-talet har det skett tre stora utbrott 2002, 2004 och 2005. Det skånska utbrottet 2002 insjuknade 27 personer med VTEC O157 infektion. Åtta av dessa personer utvecklade HUS som krävde intensivvård. Den epidemiologiska undersökningen påvisade att det varit en ökad risk att insjukna om man ätit rökt medvurst. Det andra stora utbrottet var i samband med Gothia Cup 2004. Då insjuknade 14 personer från olika delar av Sverige av en och samma undertyp av VTEC O157. Den troliga smittorsaken var mat som serverats under turneringen.³² Det senaste stora utbrottet ägde rum 2005 och omfattade 135 personer främst från Halland och Västra Götaland. Den epidemiologiska förklaringen till det utbrottet var att personerna ätit av lokalproducerad sallad som bevattnats med förorenat kanalvatten.³³ I tabellerna I och II presenteras statistik för inhemska humanfall av VTEC länsvis i Sverige. För Åren 1996 till juli 2004 rapporterades endast serotypen O157 från juli 2004 och framåt rapporteras samtliga serotyperna för VTEC. Ur tabellen kan man få en fingervisning om var i Sverige de smittade bor. Tyvärr framgår det ingen epidemiologiska förklaringen till fallen. För mer statistik hänvisas till SMI:s hemsida. Siffror från och med 1 juli 2004 kan inte jämföras med tidigare år eftersom de senare åren omfattar alla serotyper. Före det omfattar siffrorna bara en serotyp, O157.

Tabell I – Antal rapporterade inhemska humaninfektioner med VTEC.

Landsting	1996(tot)	1997 (tot)	1998 (tot)	1999 (tot)	2000 (tot)	2001 (tot)	2002 (tot)	2003 (tot)	2004 (tot)	2005 (tot)	2006 (tot)
Blekinge		0	0	0	0	0	0	0	1	1	2
Dalarna		1	0	0	1	0	0	0	0	3	0
Gotland		0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Gävleborg		0	0	0	3	3	0	2	0	3	2
Halland		45	11	7	10	18	24	8	6	44	23
Jämtland		0	0	0	1	0	0	1	1	3	5
Jönköping		5	1	5	1	2	4	5	16	37	15
Kalmar		0	0	0	0	0	2	0	5	2	4
Kronoberg		0	4	0	0	0	1	1	1	6	10
Norrbottn		0	0	0	0	1	0	0	1	1	1
Skåne		8	4	3	9	11	44	14	20	20	35
Stockholm		9	1	4	7	4	2	3	16	30	16
Södermanland		1	0	1	0	2	1	1	0	2	1
Uppsala		0	1	0	1	3	3	2	1	2	4
Värmland		0	1	0	0	0	2	0	2	4	1
Västerbotten		0	3	0	0	1	1	1	1	2	1
Västernorrland		0	1	0	0	1	0	0	1	1	1
Västmanland		2	0	0	1	0	0	3	2	0	0
Västra Götaland		45	21	22	28	12	23	8	34	124	33
Örebro		0	4	2	1	1	0	4	0	0	0
Östergötland		1	0	0	2	3	1	0	2	16	24
Totalt	69	117	52	45	65	62	108	53	110	301	178

Källa Smittskyddsinstitutet 2007

³⁰ Smittsamma sjukdomar i Sverige 1996, SMI Epidemiologiska enhetens årsrapport

³¹ Boqvist, Andersson, et al., 2006

³² SMI, 2007

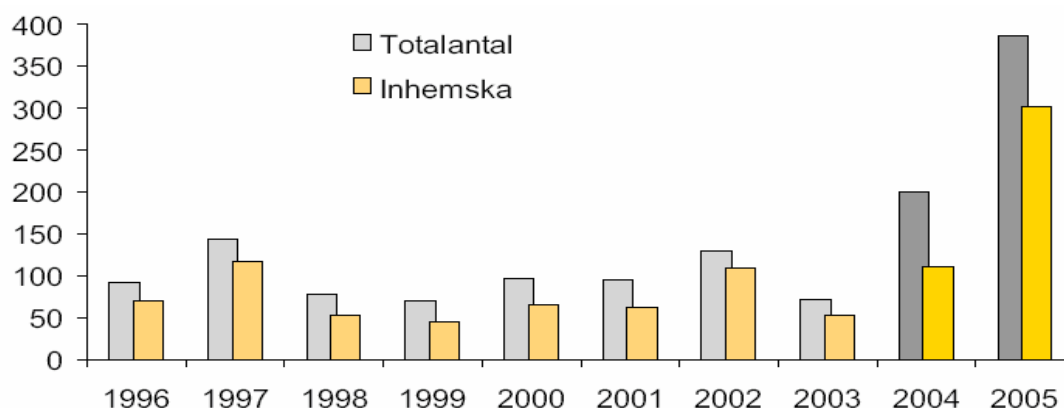
³³ SVA et. al., 2005

Tabell II – Antal rapporterade inhemska humanfall med VTEC per 100 000 invånare

Landsting	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
Blekinge	0	0	0	0	0	0	0	0,665181	0,663588	1,32069	0
Dalarna	0,348579	0	0	0,357681	0	0	0	0	1,087922	0	0
Gotland	0	0	1,7	0	0	0	0	0	0	0	0
Gävleborg	0	0	0	1,070847	1,075731	0	0,721761	0	1,08698	0,72555	0
Halland	16,61424	4,0426611	2,6	3,644023	6,521928	8,640677	2,856092	2,114254	15,39172	7,962362	0,692379
Jämtland	0	0	0	0,767495	0	0	0,781519	0,784782	2,361684	3,936388	0
Jönköping	1,5217457	0,30466163	1,5	0,305145	0,609769	1,219293	1,522177	4,858836	11,20604	4,524355	0,301624
Kalmar	0	0	0	0	0	0,851694	0	2,132233	0,854905	1,71104	0
Kronoberg	0	2,23818796	0	0	0	0,565122	0,563777	0,5609	3,362418	5,566844	0
Norrbottn	0	0	0	0	0,391158	0	0	0,395906	0,397235	0,397005	0
Skåne	0,7170547	0,35756427	0,3	0,798747	0,970725	3,856263	1,218382	1,722773	1,710185	2,954833	0,253271
Stockholm	0,5131685	0,05639022	0,2	0,386002	0,218434	0,10841	0,161652	0,85429	1,587348	0,834157	0,156404
Södermanland	0,3886514	0	0,4	0	0,778856	0,387193	0,384842	0	0,763665	0,380085	0
Uppsala	0	0,34349978	0	0,340743	1,014964	1,007388	0,667276	0,330509	0,657101	1,250293	0,312573
Värmland	0	0,35789828	0	0	0	0,730385	0	0,731136	1,463657	0,365645	0,365645
Västerbotten	0	1,15986855	0	0	0,391553	0,391889	0,391016	0,389294	0,776241	0,388227	0,388227
Västernorrland	0	0,39481217	0	0	0,40625	0	0	0,409509	0,41028	0,409873	0
Västmanland	0,7709328	0	0	0,389019	0	0	1,15529	0,766269	0	0	0
Västra Götaland	3,0293137	1,41278001	1,5	1,876888	0,801109	1,528532	0,529176	2,234057	8,112767	2,145248	0,325038
Örebro	0	1,45434978	0,7	0,365115	0,365575	0	1,460814	0	0	0	0
Östergötland	0,2408594	0	0	0,486037	0,728145	0,242091	0	0,480781	3,843354	5,742094	0,478508
Totalt	1,3220928	0,58727592	0,5	0,732354	0,696677	1,209629	0,591413	1,220677	3,326793	1,953199	0,208487

Källa Smittskyddsinstitutet 2007

Ett antal större utbrott har ägt rum men det är vanligare att sporadiska fall av VTEC O157 infektioner förekommer.³⁴ I figur 3 illustreras antalet rapporterade humanfall för VTEC. Som tidigare så gäller att från 1 juli 2004 inrapporterades samtliga serotyper. Innan rapporterades endast O157.



Figur 3 - Stapeldiagram över VTEC-smittade personer. Gul stapel motsvarar inhemsk smitta och grå stapel totalsmitta. Eftersom samtliga serotyper anmälts från 1 juli 2004 markeras dessa staplar med en mörkare grå färg för att skilja dem från tidigare år.

3.2 Djurfall

1996 introducerades den första VTEC undersökningen som gjorts på djursidan. Syftet var att ta reda på förekomsten av VTEC O157 hos nötkreatur som gick till slakt. Träckprover undersöktes från slaktade djur. Slakteristudier har sedan dess genomförts samtliga år fram till 2002. Resultatet kan utläsas i tabell III. Även andra studier har genomförts för att kartlägga smitta hos djurbesättningar

³⁴ Boqvist, Andersson, et al., 2006

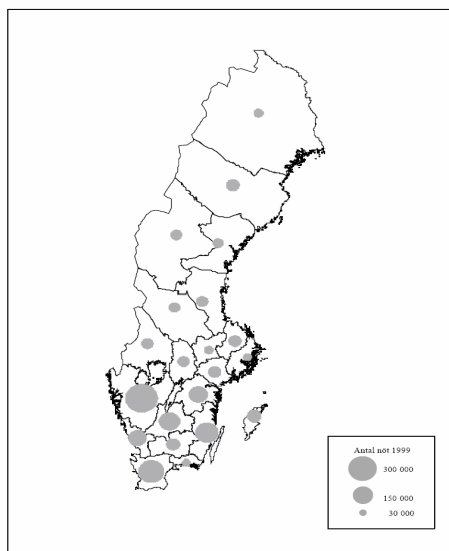
Jordbruket har som mål att slaktprevalensstudie för VTEC O157 hos nöt ska genomföras vart tredje år.

Tabell III – Prevalens/förekomst för VTEC O157 vid slakteriprovtagning av nötkreatur i Sverige.

År	Antal prov	Antal positiva prov VTEC O157	Prevalens (%)
1996/1997	3 072	37	1,2
1998	2 000	7	0,4
1999	2 057	15	0,7
2000	2 003	34	1,7
2001	1 998	26	1,3
2002	2 032	29	1,4

Källa SVA-vet, 2006

Mellan en och fyra gårdar har årligen kunnat visas vara orsakande smittkälla för människa, de flesta belägna på Västkusten. Geografisk fördelning av den totala nötkesättningen har jag inte fått fram för den aktuella undersökningsperioden, men uppgifter från 1999 visar att Västkusten har stor andel jämfört med andra landskap i Sverige, se figur 4. Vissa humana VTEC O157 –fall har kunnat spåras till kesättningar med nöt, get och får. För att härleda en smitta till en gård krävs dels en koppling till gården samt att bakteriens genom överrensstämmar hos djuret på gården och den smittade människan (samma undertyp).³⁵ Det kan vara svårt att säkert bevisa detta samband med tanke på att endast en bakteriekoloni undersöks per prov. Detta nyckelhålspektiv kan medföra att man inte hittar samband som ändå kanske finns.³⁶



Figur 4 - Den geografiska fördelningen av det totala antalet nötkreatur 1999. Cirkelnar anger antal nötdjur. Stor cirkel 300 000, mellan cirkel 150 000 och liten cirkel 30 000.

³⁵ Boqvist, Andersson, et al., 2006

³⁶ Boqvist, 2006

4 Material och metoder

4.1 Humanprover

4.1.1 Studiens utformning

Till grund för detta examensarbete är den undertypning av humanprover från åren 1995-1999, som gjordes av SVA 1999. De då kartlagda humanundertyperna kunde sedan jämföras med resultaten från den prevalensstudie för djur som genomfördes 1996-1997. Eftersom det saknades dokumentation om urvalet för vilka humanprover som undertypats 1999 gick det inte att endast använda dem för en vidare analys och sammanställning av det epidemiologiska läget för de aktuella åren. Alla humanprover för 1995-1997 har med anledning av det även undersökts för att utröna vilka som ska tas med i analysen i denna studie. Därmed innehåller denna deskriptiva geografiska visualisering delvis humanprover som undertypades på SVA 1999 samt de kompletteringar som har tillförts igenom denna studie.

4.1.2 Laborativa metoder

Detta stycke ger en förenklad beskrivning av de analysprinciper som används i det laborativa arbetet för att påvisa VTEC O157:H7 och som användes av SMI för perioden 1995-1997.

Provet kommer in som ett fecesprov (prov från avföring) från patient eller som ett isolat från ett annat laboratorium. Odling av provet sker på en platta med medium som selekterar för gramnegativa aeroba tarmbakterier. Tillväxt av bland annat VTEC främjas därmed. Provet på plattan är uppdelat i primär, sekundär samt territoriärstryk. Från primärstryket slammas de utväxta bakterierna. Slamningen kokas. Upphettningen dödar bakterierna och deras DNA frigörs.

Med "polymerase chain reaction" (PCR) amplifieras sedan DNA för VTEC-specifika gener. Minimala kriterier för att diagnostisera VTEC är påvisande av toxinerna VT1 och/eller VT2. Om även *eae* genen kan påvisas med PCR så styrks diagnosen av typisk VTEC som kan orsaka sjukdom. PCR processen sker i flera olika steg i ett visst antal cykler med varierande temperatur, för att den utvalda delen av genomet ska amplifieras. Efter PCR processen separeras de amplifierade DNA-fragmenten med gelelektrofores och färgas med etidiumbromid. Med hjälp av UV-ljus kan DNA-fragment visualiseras som fluorescerande band och man kan urskilja fragment med samma storlek. Resultatet dokumenteras med fotografering. Bandens storlek jämförs med en referens med kända storleksmarkörer som körts i samma gel.³⁷ Utifrån referensen kan provsvaren tolkas. Generellt sett ska alltså ett positivt prov ha ett fluorescerande band av rätt storlek. För VTEC ska det alltså finnas band för verotoxin VT1 och/eller VT2.

4.1.2.1 Serotypning

Slutligen görs en serotypning. Den kan vara PCR-baserad även den eller så görs ett agglutinationstest. Vid PCR amplifieras typiska och särskiljande gensekvenser från O157:H7. Vid agglutinationstestet används antiserum. Bakteriernas antigen agglutinerar

³⁷ Cambell et al., 2002

med antikropparna i antiserumet, om de tillhör den eftersöka serotypen³⁸ Båda metoderna används vid SMI. Numera är dock PCR den vanligaste metoden.

4.1.2.2 Kvalitet och säkerhetsaspekter

PCR är en känslig metod där mängden DNA för varje temperaturcykel av amplifiering fördubblas. Därför är det viktigt att stor försiktighet och renlighet iakttagas så att inte proverna kontamineras med främmande DNA, som i värsta fall kan ge upphov till felaktiga resultat.³⁹

Alla ämnen som orsakar infektionssjukdom hos människa klassificeras efter farlighetsgrad med en stigande skala 2-4 enligt regler som fastställs av Arbetsmiljöverket. VTEC hamnar i skyddsklass 3(**). Klass 3 innebär hög risk; "Kan orsaka allvarliga infektioner med begränsade möjligheter att bota eller förebygga eller som har hög smittsamhet" De två asteriskerna betyder att smitta normalt inte sker via luften.⁴⁰ I praktiken innebär det att arbete vid SMI med levande verotoxigena stammar sker vid en speciell säkerhetsbänk och att handskar och andningsskydd används.⁴¹

4.1.2.3 Laborativa metoder SVA

Det laborativa arbetet vid SVA omfattar egentligen bara djurprover. För de humanprover som undertypats på SVA har isolat skickats från SMI. De inkomna isolaten kontrollerades för VTEC genom PCR analys innan undertypningen påbörjas.

4.1.3 Undertypning med hjälp av Pulsfält-gelelektrofores (PFGE)

Ett steg i klassificeringen av VTEC är att dela in den efter serotyp (efter att fastställa i detalj vilka O- och H- antigener bakterien har). O157:H7 är den specifika serotyp som kartläggs i denna studie. Inom serotypen kan förfinad indelning ske, vilket kallas undertyper. I detta examensarbete förekommer benämningarna undertyp och undertypning för att redovisa resultat av en sådan indelning. Olika metoder för undertypning, det vill säga indelning och karaktärisering av bakterier kan användas. Vanligtvis består en undertypningsmetod av att man undersöker bakteriens DNA⁴². Pulsfält-Gelelektrofores (PFGE) är en sådan metod som används mycket både i Sverige och internationellt. PFGE metoden är ett mycket värdefullt verktyg i det epidemiologiska arbetet för att spåra en smittkälla. Med hjälp av PFGE kan man fastställa om stammar från olika bärare är av samma undertyp med hjälp av analys av hela genomets bandmönster och på så vis kan en trolig smittokälla fastställas.⁴³ Smittspårning kan liknas vid en brottsutredning. För att binda en misstänkt till ett brott måste denne kunna bindas till brottsplatsen. Med DNA-teknik kan sådana samband styrkas.

4.1.3.1 PFGE - Tillvägagångssätt

E. coli bakteriens genom består av ca 5 miljoner baspar vilket gör att genomet lätt kan falla sönder. Den intakta isolerade VTEC bakterien gjutes därför in i en agarosgelbit så att genomet skyddas och kan hållas intakt. För att rena provet till att enbart bestå av

³⁸ Ramberg M., 2006

³⁹ Lindberg, 2006

⁴⁰ Arbetsmiljöverket, 2006

⁴¹ Lindberg, 2006

⁴² Gautom Romesh, 1997

⁴³ Ibid

DNA tillsätts olika ämnen för att ta bort proteiner och cellväggar. Innan det renade DNA:t ska genomgå PFGE metoden och gutas in i den stora gelen tillsätts restriktionsenzym.

För *E. coli* är XbaI ett ofta använt restriktionsenzym, som även passar för denna typ av studier.⁴⁴ Enzymet känner igen en viss kombination av nukleotider och klipper var gång den sekvensen förekommer. Genomet delas på så vis upp i fragment. PFGE metoden innebär att fragmenten vandrar i gelen med hjälp av elektriska fält i tre olika riktningar vilket får DNA-fragmenten att vandra varierande åt de olika riktningarna. Pulslängden för de olika riktningarna varierar, detta medför en hög upplösning för de olika fragmenten och att stora fragment kan separeras.⁴⁵ Det är framförallt den goda separationen av stora fragment som skiljer PFGE från konventionell agarosgelelektrofores.

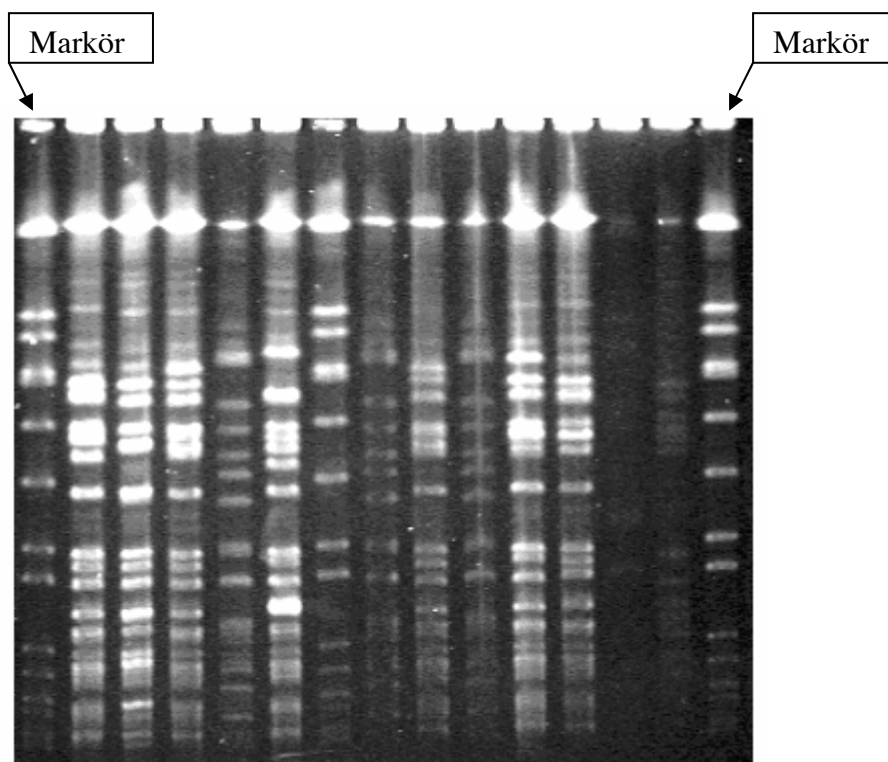
Varje genom får sin distinkta DNA profil i form av ett unikt bandmönster, vilket kan jämföras mot en referens och andra bakteriers profiler. Figur 5 är ett exempel på hur ett sådant bandmönster kan se ut. Ju mer lika profilerna är desto mer närbesläktade anses två fynd av en bakterie vara. Två identiska profiler klassificeras som en undertyp. Tillvägagångssättet hur bandmönstren kan tolkas visas i figur 6.

4.1.3.2 Analys

Resultaten av fragmenteringen av DNA analyseras dels i ett datorprogram (GelCompar 4.0) där DNA profilerna jämförs med varandra samt att man gör en visuell bedömning av bandmönstren.

⁴⁴ Ibid

⁴⁵ Tärnberg M, 2006



Figur 5 - Fluorescerande bandmönster. Ett exempel på hur genomet delats upp i olika band med hjälp av PFGE metoden. Första och sista DNA profilerna är storleksmarkörer.

4.1.4 Undertypningskriterier

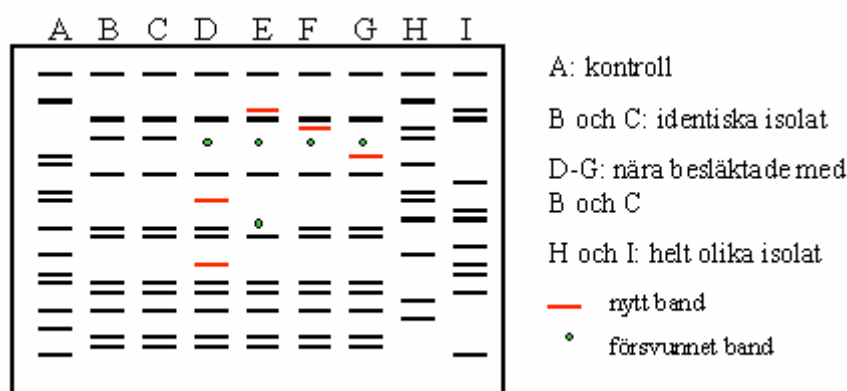
Varje undertyp har fått en beteckning. Kriteriet för att ge samma beteckning till bakterieisolat är att deras DNA-profiler är lika. För att skilja två undertyper åt krävs minst ett bands skillnad i det bandmönster som erhålls med PFGE metoden. I denna studie har således kriterierna för en specifik undertyp utgått från ett bands skillnad mellan olika genoms bandmönster.

Undertyperna har namngivits med en bokstav och en siffra utom de genom vars DNA-mönster inte varit lika någon annat genom, dessa kallas "unik". Bland djurproverna används beteckningen "INGEN_MATCH" istället för "unik". För de undertyper som sinsemellan är mer lika varandra tillhör samma grupp. Undertyper inom en grupp har samma bokstav. Undertyperna inom H och R är mer lika varandra än de övriga undertyperna. Beteckningen H härstammar från att dessa varianter av undertyper upptäcktes i Halland, där de sedermera har blivit vanligt förekommande men också delvis spridit sig i till andra landskap. Däremot har de undertyper som betecknas med R ingen logisk bakomliggande förklaring.

För de fall som tagits med i undersökningen och som inte undertypats vid SVA har Sven Löfdahl och Margareta Ramberg⁴⁶ konsulterats för att tilldela proverna undertyper i överensstämmelse med det typningssystem som användes vid SVA, 1999. Varje prov har analyserats med utgångspunkt från PFGE metodens analysresultat. För nytillkomna prover som inte tillhört tidigare definierade undertyper har nya beteckningar skapats.

⁴⁶ Arbetar vid bakteriologen (KCB), SMI Solna.

Avslutningsvis har det skett en översiktlig genomgång av alla prover, gamla som nyttillkomna, för att se över att beteckningar och likheter mellan human och djurprover kontrollerats.⁴⁷



Figur 6 - En illustration över hur olika tänkbara bandmönster kan tolkas. Genom B och C skulle enligt exemplet tilldelas samma undertypsbeteckning.

4.1.5 Bearbetning av data

1995 rådde en frivillig rapportering av VTEC till SMI medan det för de resterande två åren rådde anmälningsplikt.⁴⁸ Med utgångspunkt från de registrerade uppgifterna för samtliga år har smittfallsdata bearbetats.

De prover som undertypats vid SVA har länkats till en geografisk plats utgående från provbeteckningens E-nr⁴⁹, där jag med hjälp av en databas vid SMI har fått fram uppgifter var i landet provet härstammar ifrån. Flera av typningarna från SVA omfattade prover med utländsk smittkälla. I vissa fall förekom även dubletter från samma patient. Denna upptäckt innebar att jag inte skulle kunna genomföra geografisk kartläggning bara utifrån dessa data.

Fortsättningsvis användes sammanställda listor från epidemiologiska avdelningen vid SMI för urval och bearbetning av VTEC-fall. Från dessa listor har data använts som överrensstämmar med de uppställda urvalskriterierna:

Urvalskriterier för att kunna användas i denna studie:

- VTEC O157 - fastställd, isolerad bakterie som finns vid SMI, Solna
- Smittad i Sverige, uppgift om ort (bostadsort) och helst länsbokstav
- Primärsmittad eller ej uppenbart sekundärsmittad
- Ett prov per patient då det förekommer att en patient provtagits vid flera tillfällen.
- Undertypad eller i efterhand kunnat tilldelas en undertyp

⁴⁷ Aspán A., 2006

⁴⁸ Smittskyddsinstitutet, 2007

⁴⁹ Varje registrerat fall får ett identifikationsnummer, så kallat E-nr

Det ursprungliga antalet fall samt använda fall fick följande fördelning för respektive år:

1995: 100st (totalt), 73 användes

1996: 118st (totalt), 64 användes

1997: 162st (totalt), 76 användes

För de prover som kompletterats till undersökningen har det varit tidskrävande att kategorisera dem enligt de undertypningsbeteckningarna som användes 1999 vid SVA. Med identifikationsnummer som utgångspunkt har de prover vars undertyp saknats sökts fram i pappersrullar med sammanställda fylogenetiska grupperingar. De E-nr som har lika genom har fått samma undertypsbeteckning. För de prover som inte har genom som kan liknas med SVA-studien har nya beteckningar tillkommit. De ”nya” humanfallen som i efterhand på så vis tillförts studien har i efterhand jämförts med djurproverna för att se om det finns någon matchning.

Data har bearbetats i Excel för att anpassas till den deskriptiva kartanalysen i GIS. Alla smittfall har hanterats årsvis och data har sållats bort på vägen utifrån urvalskriterier och tillgänglighet av information. Eftersom det är en geografisk kartläggning är dokumentation av ort av stor vikt. För att placera ut smittfallen efter geografisk plats i GIS har länsbokstav kombinerat med ortnamn används. Ibland har bristande dokumentering gett upphov till att enstaka smittfall inte kommit med, då uppgifter om ort och/eller län saknats. Där länsbokstav saknats och ortsnamnet ändå har kunnat härledas till ett län har platsen tagits med. Vid sporadiska inhemska fall finns oftast ingen smittort definierad eller registrerad vilket har medfört att bostadsort konsekvent har används i samtliga fall som underlag till den geografiska kartläggningen över smittfallen i Sverige.

4.1.6 Geografisk sammanställning

Vid införandet av datamängden i GIS har kombinationen av länsbokstav och ortnamn jämförts mot ett färdigt register. Detta register samt ett kartprogram, där platserna prickas in, (en Sverigekarta med län och sjöar) fanns färdiga att tillgå, något som SMI hade införskaffat. Förändringar av länsindelningen har genomförts sedan datamaterialet dokumenterades. Sedan 1998 finns det 21 län i Sverige⁵⁰. Detta har inneburit att datamaterialet har modifierats för att anpassas till de nu gällande länsindelningarna. Layouten för synliggörandet av de geografiska platserna har varierats för att på ett bra sätt visualisera och analysera resultaten.

Kartbilderna kan delas in i följande kategorier:

Visualisering av geografisk plats:

- med symboler
- med symboler som påvisar antalet smittfall per ort
- med pajdiagram där förekomsten av olika undertyper per plats visualiseras med hjälp av olika färgkoder

⁵⁰ Senaste länsindelning förändrades var 1998 med ett inrättande av västra Götalands län som ersatte Göteborgs, Bohus, Älvsborgs län samt Skaraborgs län. Skåne län uppkom 1997 som en sammanslagning av Malmöhus län och Kristianstads län.
Länsstyrelsen, Nationalencyklopedin, 2006

4.2 Djurprover⁵¹

4.2.1 Studiens utformning

Vad beträffar VTEC-utbrott i andra länder så har det visats att mjölk- och köttdjur är bärare av VTEC O157:H7. Om så även var fallet hos svenska djur hade inte tidigare undersökts i Sverige. En nationell kartläggning och övervakning av nötkreatur, en slaktprevalensstudie, inleddes därför i april 1996 för att undersöka förekomsten av VTEC O157:H7 hos svenska nötkreatur.

Mot slutet av 1990-talet uppgick antalet nötkreatur till ca 1,8 miljoner i Sverige. Syftet med studien var att med ett konfidensintervall på 90% utreda förekomsten av VTEC O157:H7 för 0,1% av den totala djurmängden vilket resulterar i ett minimum av 1800 prover. Proverna togs från 16 stora slakterier som täcker 90% av slakthanteringen av kött i Sverige. Nötkreaturen kom från både mjölk- och köttproducerande gårdar. Insamlingsperioden förlades från april 1996 till augusti 1997 med målet att ta prover från 3000 djur. Fecesproverna samlades in av veterinärer på varje slakthus enligt givna instruktioner.

4.2.2 Laborativa metoder

De insamlade fecesproverna analyserades vid SVA med en metodik som kallas immunomagnetisk separation (IMS). Då används bland annat magnetiska kulor täckta med *E. coli* O157-antikroppar för att upptäcka förekomsten av VTEC O157:H7.⁵² För att ta reda på vilka toxiner bakterien kodar för fortsatte det laborativa arbetet med PCR. PFGE metoden användes sedan för att undertypa bakterierna

4.2.3 Laborativa resultat

Totalt analyserades 3071 prover, 37 av dessa var positiva för VTEC O157:H7. Samtliga prover innehöll verotoxin 1 (VT 1) och/eller verotoxin 2 (VT 2). PFGE metoden resulterade i att 18 av de 37 proverna klassades som unika undertyper. Fem grupper med 2 eller fler isolat med identiska utseenden påvisades. Färre köttdjur (631) än djur från mjölkgårdar (1928) ingick i provtagningen. Av de resterande provtagna djuren var 43 antingen kött- och eller mjölkdjur, resterande 469 djur saknade uppgift.

4.2.4 Bearbetning av data

Slaktprevalensstudien vars prover var positiva för VTEC O157 var redan sammanställd i Execelformat och innehöll även diverse annan information som jag fick ta del av. Deltagandet i prevalensstudien skulle innefatta en viss anonymitet för gårdarna. Därför fanns gårdarnas geografiska läge identifierade med endast postnummer. För de flesta djurgårdar fanns femsiffrigt postnummer att tillgå men för en handfull gårdar fanns bara de tre första siffrorna i postnumret angivet. En mer precis geografisk kartläggning med hjälp av postnummer kräver dock ett femsiffrigt nummer. I sökandet efter fullständigt postnummer kontaktades Svenska Posten AB. De kunde inte få fram Ortsnamn med hjälp av ofullständigt postnummer utan hänvisade till Internettjänsten Dataline Sweden ABs sökverktyg på Internet⁵³. Det är ett dedikerat sökverktyg för postnummer. Med det sökverktyget var det möjligt att bestämma postort med endast tre siffror i postnumret.

⁵¹ Albihi et al., 2003

⁵² Eriksson et al., 2006

⁵³ www.datalinesweden.se

Sökning med tresiffrigt postnummer gav dock ibland sökresultat med flera olika alternativa ortsnamn. Det ortsnamn som hade flest träffar valdes i de fallen ut för att ingå i studien. Dessutom jämfördes det geografiska läget för de olika alternativen. Det visade sig att de olika orterna låg mycket nära varandra med ett uppskattat avstånd på max ett par mil. Oavsett vilken ort som valdes av alternativen var deras geografiska läge så pass nära att det inte skulle påverka kartbilden. När ortsnamn identifierats kunde ett fullständigt postnummer för den orten väljas och alla djurgårdar hade därmed fått en geografisk identifikation med femsiffrigt postnummer.

Av de 37 positiva proverna kunde således alla härledas till en geografisk plats med postnummer. Därmed kunde materialet användas i sin helhet.

4.2.5 Geografisk sammanställning

De aktuella gårdarnas postnummer har förts in i datorprogrammet GIS. Med hjälp av verktyg i programmet har gårdarnas postnummer jämförts mot ett färdigt postnummerregister. På så sätt har orterna prickas in på en Sverigekarta för kartläggning av platserna. Samma kartprogram för att visualisera Sveriges län och sjöar har används som för humanmaterialet.

5 Resultat

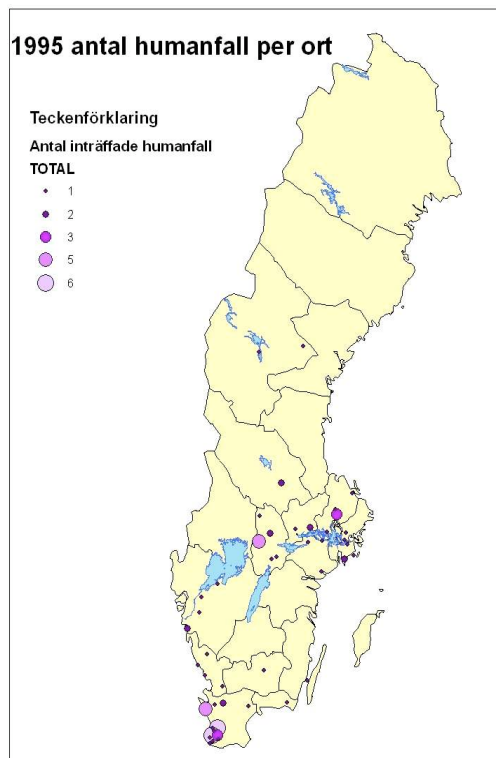
5.1 Humanfall

Resultatet presenteras i text samt visuellt för de tre åren baserat på kategoriseringen - *geografisk plats*, - *antal smittfall per ort*, - *antal undertyper per ort*

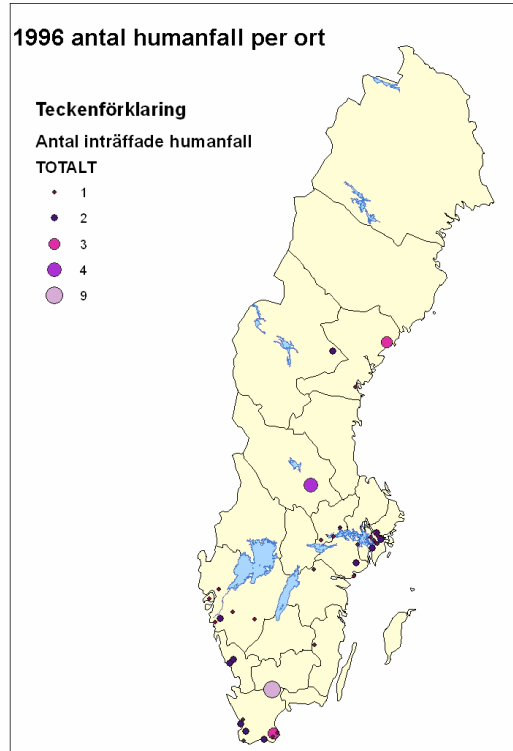
5.1.1 Geografisk plats och antal inträffade humanfall per ort

År 1995 är 46 geografiska platser representerade i Sverige. Motsvarande siffra för 1996 och 1997 var 39 respektive 28. De första åren 1995 och 1996 finns det humanfall i mer nordligare delar av Sverige än vad som påträffades 1997, vilket framgår av figur 8. Men för alla tre åren förekommer inga platser i de nordligaste delarna av Sverige. För de två första åren ligger majoriteten av fallen i Mälardalen samt sydvästra Sverige. 1997 visar en dominans av orter i Hallands och Västra Götalands län.

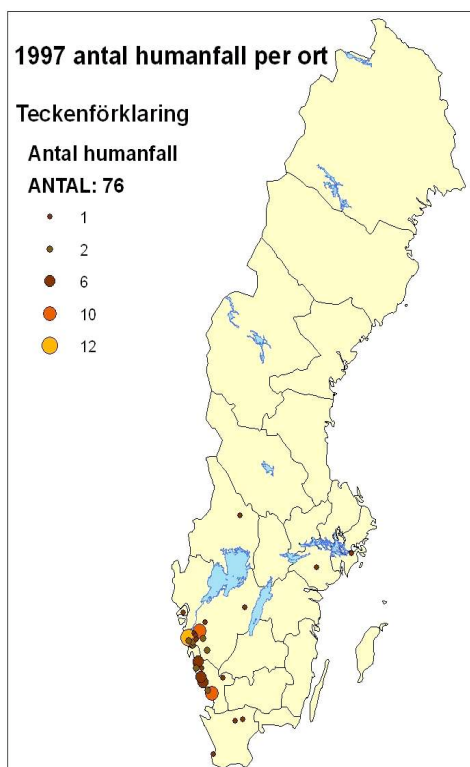
Kartorna i figur 7 visar antal humanfall per ort. Det största antalet fall i en och samma ort är 6, 9 och 12 fall för respektive år. I figur 7a kan man se att för år 1995 är det i Skåne län som den ort med flest humanfall är lokaliserad. Det är dessutom till orter i Skåne län som de flesta smittfall är lokaliserade. 1996 var spridningen större och endast ett fåtal orter har flera humanfall tillhörande en och samma ort, se figur 7b. Figur 7c visar att år 1997 domineras av flera humanfall per ort längs Hallands och Västra Götalands län.



Figur 7a



Figur 7b

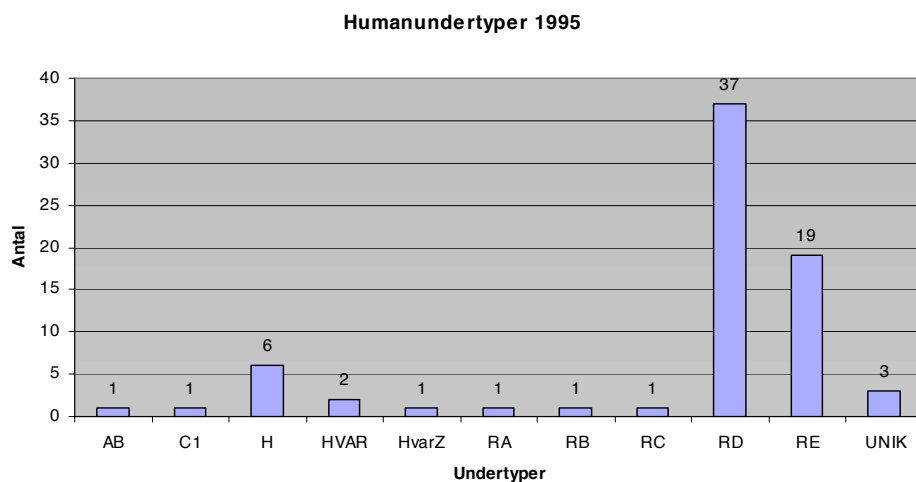


Figur 7c

Figur 7a,b,c - Lokalisering och antal smittfall per ort. Kartorna visar antal smittfall per ort respektive år.

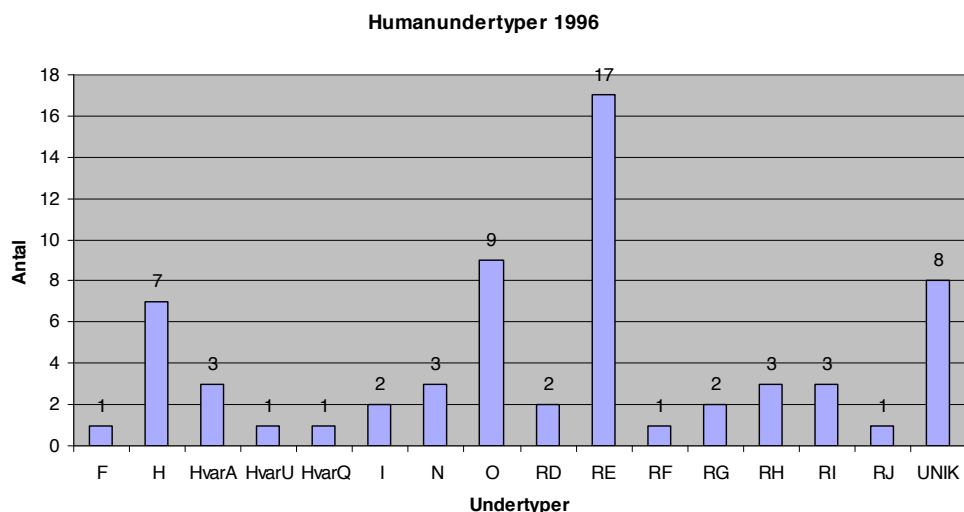
5.1.2 Antal humanundertyper per ort

För 1995 visade det sig att 11 olika undertyper kunde identifieras bland de 73 humanfallen. Undertypen RD är mest frekvent och förekommer mest i södra Svealand och södra Götaland, se figur 11. RE är den näst vanligaste undertypen följt av H och dess olika varianter. Dominansen av RD och RE syns mycket tydligt i figur 8.



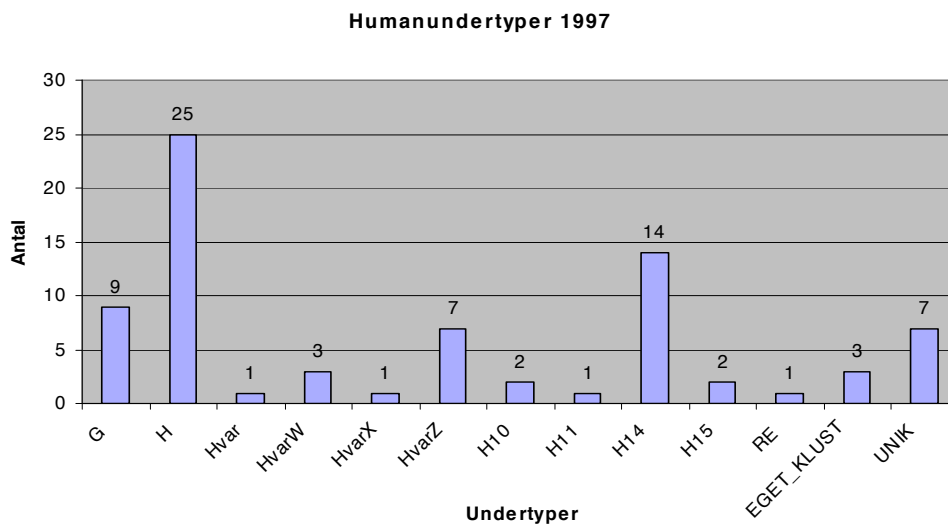
Figur 8 - Humanundertyper 1995. 1995 dominerar undertypen RD bland de 11 humanundertyperna.

År 1996 infördes anmälningsskyldighet för VTEC O157. För detta år visar undersökningen att det finns 16 olika undertyper bland de 64 humanfallen. Den dominerade undertypen det här året var RE. Jämfört med 1995 är det större spridning bland undertyperna 1996 se figur 12. Dels är det fler undertyper men även så varierar antalet per undertyp mer, se figur 9.

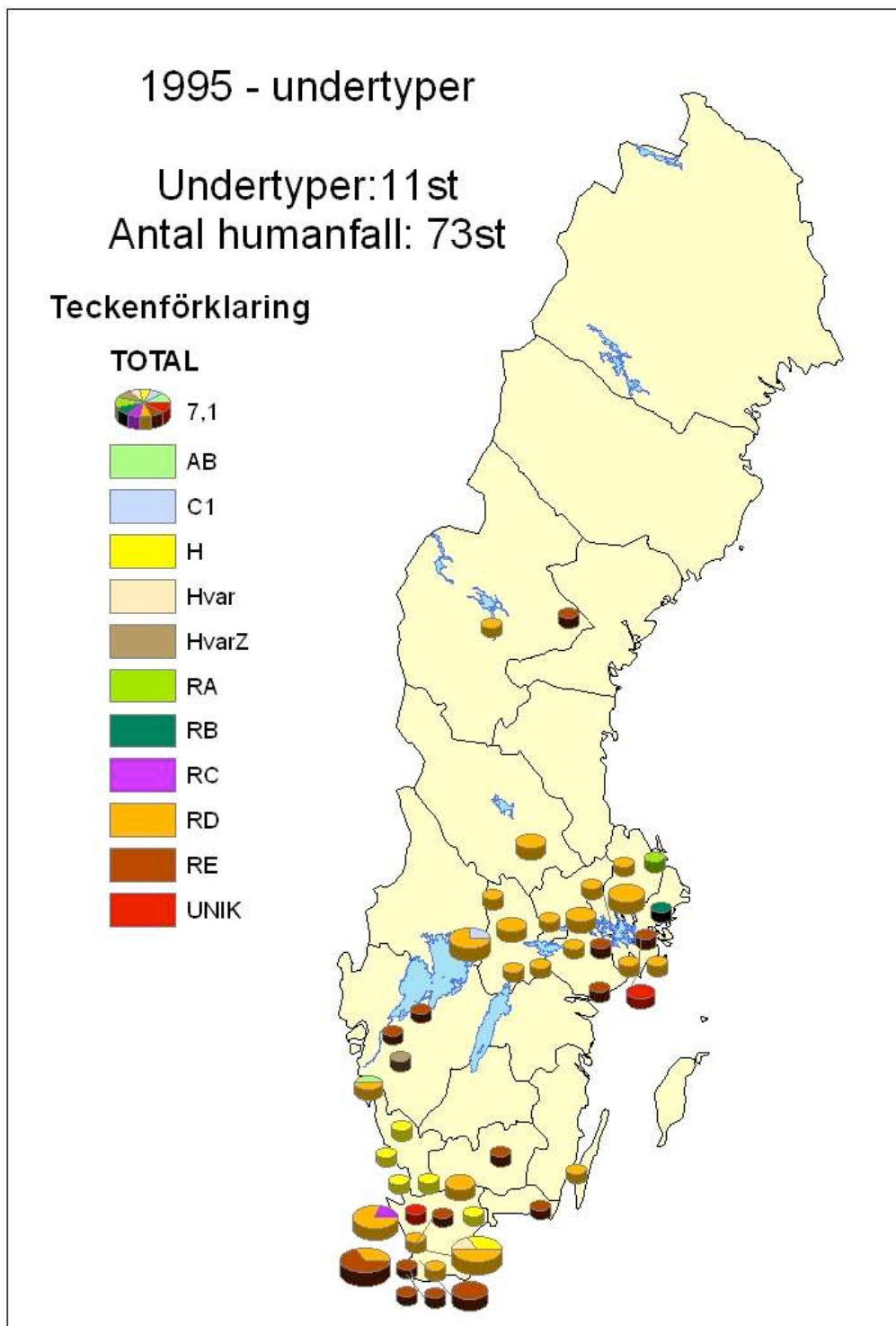


Figur 9 - Humanundertyper 1996. 1996 förekom 16 humanundertyper.

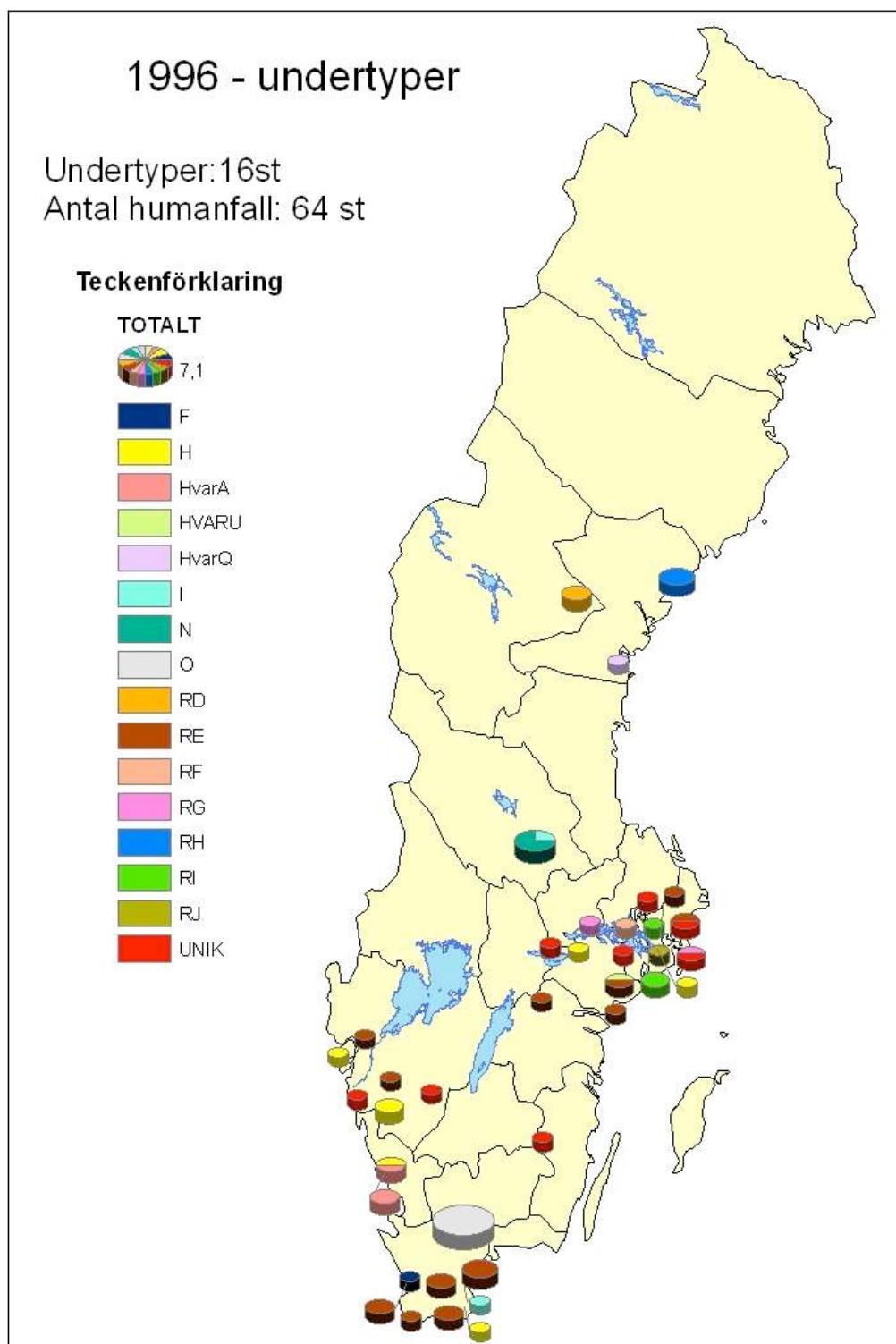
För det sista undersökningsåret 1997 finns det endast få representanter av undertypen RE och RD förekommer inte alls. Här är det istället undertypen H som dominerar. Andra varianter av H är även de frekventa under 1997. Stapeldiagrammet i figur 10 visar att av de 13 undertyperna som förekom detta år är 9 av dessa H eller varianter av H. Dessa undertyper förekommer främst i Hallands län och däromkring, se figur 13.



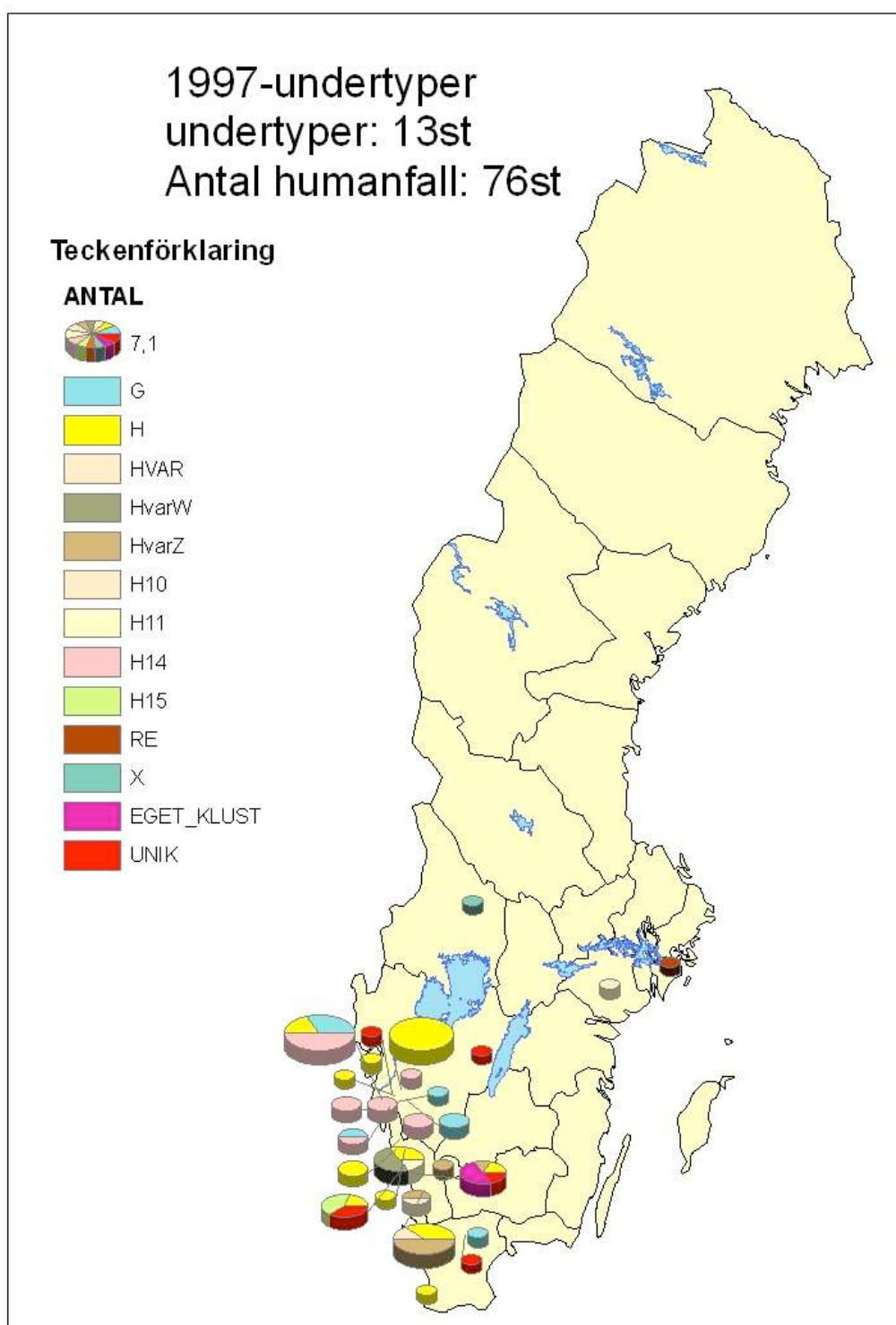
Figur 10 - Humanundertyper 1997. 1997 års humanundertyper är 13 till antalet och domineras av H.



Figur 11 - Humanfall i Sverige 1995. Cirklarna påvisar den geografiska platsen och dess färg undertypen. Storleken på cirklarna illustrerar antalet fall per ort.



Figur 12 - Humanfall i Sverige 1996. Cirkelarna påvisar den geografiska platsen och dess färg undertypen. Storleken på cirkelarna illustrerar antalet fall per ort.



Figur 13 - Humanfall i Sverige 1997. Cirklarna påvisar den geografiska platsen och dess färg undertypen. Storleken på cirklarna illustrerar antalet fall per ort.

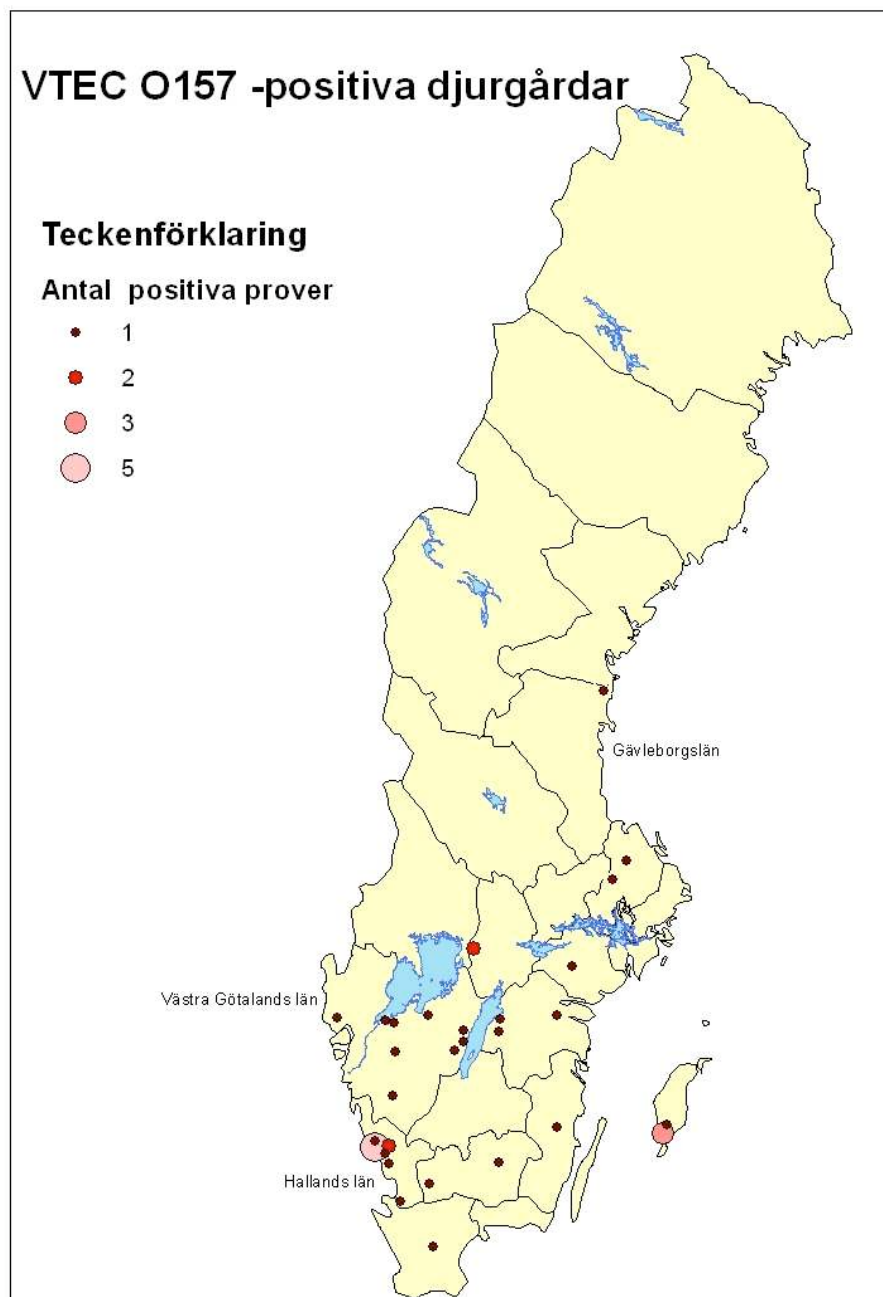
5.2 Djurfall

Djurproverna som används i denna studie kommer från den prevalensstudie som genomfördes under perioden april 1996 till augusti 1997.

Resultatet presenteras med text, diagram och kartor.

5.2.1 Geografisk plats och smittfall per ort

Av de 37 djurprover som visade sig vara VTEC-positiva är majoriteten från gårdar belägna i södra delen av Sverige, se figur 14. Hallands län med 11 positiva prover är det län som har flest, följt av Västra Götalands län. Det nordligaste positiva djurprovet återfanns i norra delen av Gävleborgs län.

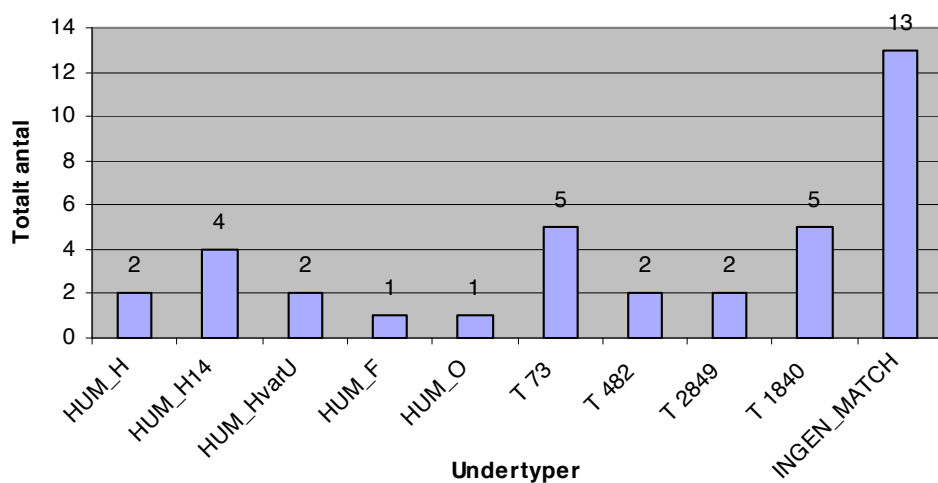


Figur 14 - Djursmittfall per ort. Kartan visar att av de 37 djurproverna kan de flesta knytas till Hallands län.

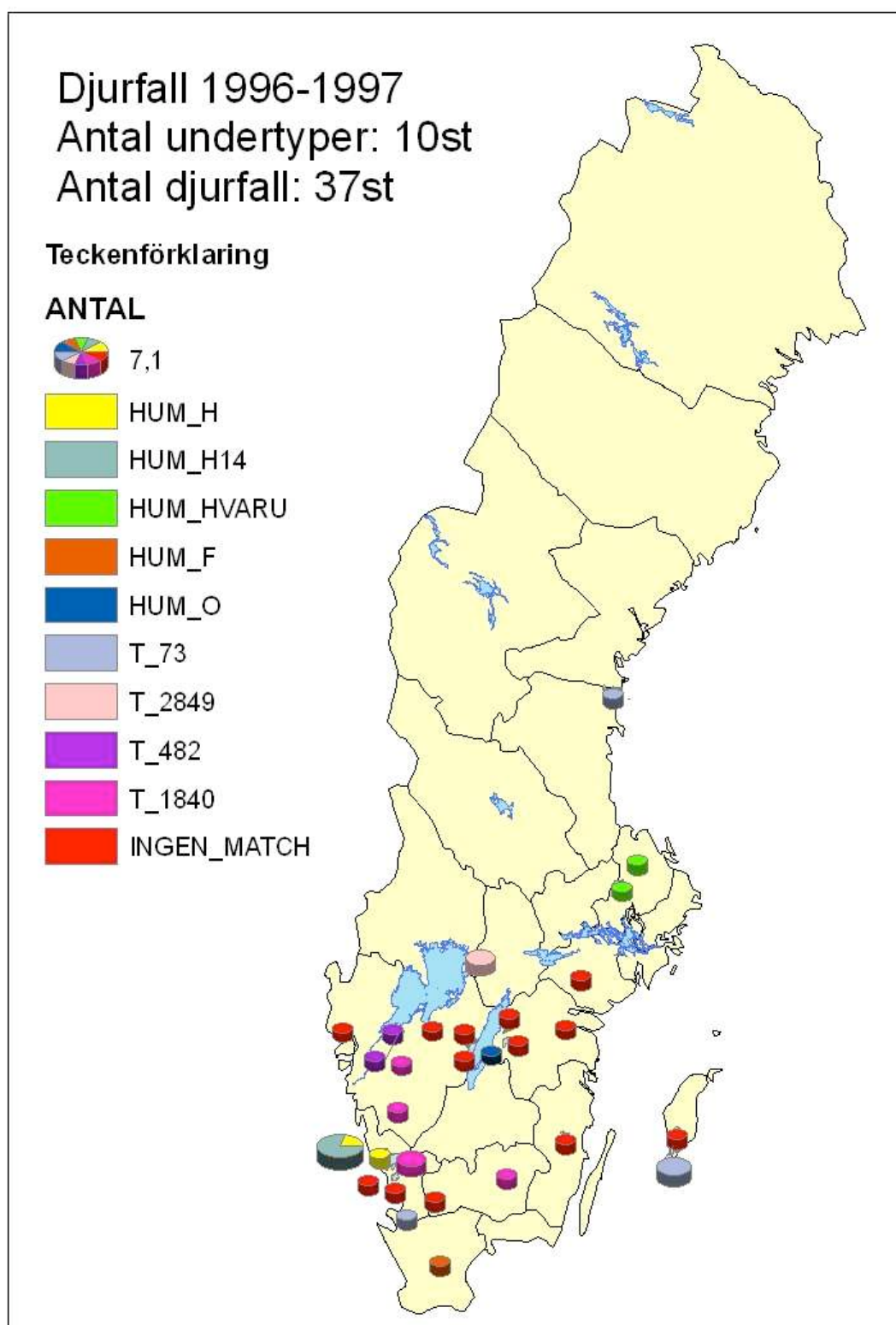
5.2.2 Förekomst av olika undertyper

Bland de 37 proverna kan 10 undertyper identifieras. Fem av dessa undertyper har även återfunnits bland humanfallen under tidsperioden 1995-1997. I teckenförklaringen till figur 15 samt i kartbilden i figur 16 betecknas dessa undertyper med "HUM_" framför typbeteckningen. De geografiska platserna för de undertyper som förekommer såväl hos djur och humanfall återfinns på snarlika geografiska platser, jämför tidigare kartor.

De undertyper som betecknas med "T_" följt av siffror har förekommit hos flera djur men ej hos människa. Den återstående undertypningsgruppen "INGEN_MATCH" innefattar unika VTEC O157-genom där varje enskilt prov inte matchar något av de övriga, det vill säga i denna undersökning vare sig isolat från djur eller människa.



Figur 15 - Stapeldiagram över djurundertyper. Stapeldiagrammet illustrerar hur många och vilka undertyper som förekommer bland djurproverna.



Figur 16 - Djurundertyper i Sverige. Undertyperna hos djurproverna domineras av unika undertyper – "ingen_match" vilka illustreras med röda cirkelar.

6 Diskussion

Det finns olika kartläggningar och studier gjorda vad beträffar förekomsten av VTEC. Men det är svårt att jämföra enskilda studier sinsemellan, eftersom olika tekniker och analysmetoder använts i olika undersökningar. Till synes är denna studie som presenteras här, med kartläggning på undertypningsnivå, något som inte tidigare genomförts. Det finns därför inga andra resultat att jämföra mot. Eftersom kartläggningen i denna studie utgår från undertyper så ger den en bättre epidemiologisk information än studier som inte tar hänsyn till bakteriers DNA. För att säkert fastställa smittvägar ska det helst finnas en koppling dels via kontakt eller intag av den misstänkta smittkällan samt att de två isolaten ska vara av samma undertyp. Kombinationen av att antalet observationer är relativt få på såväl human- som djursidan med att det är en ny typ av studie, kan detta examensarbete ses lite som en pilotstudie på området. Trots att denna studie är av "pilotstudiekaraktär" kan man ur resultatet få en antydning om vilka undertyper som förekommit bland humanproverna och huruvida dessa återfunnits hos svenska nötkreatur som undersöktes i slaktprevalensstudien 1996-1997.

6.1 Djur- och humanundertyper

Kartläggningen visar att det finns gemensamma undertyper för human- och djurstammarna. Av djurstammarna förekom 10 undertyper, av dessa har 5st H, H14, HvarU, F och O återfunnits på humanstammarna under perioden 1995-1997. Huruvida djurundertyperna har förändrats från olika år går inte att fastställa från resultaten i denna studie då de medtagna djurstammarna härstammar från tidsperioden april 1996-augusti 1997.

1995 var det år VTEC O157 uppmärksammades mycket i det epidemiologiska arbetsfältet på "humansidan" i Sverige. Det var då den stora ökningen av rapporterade fall kom. Från att tidigare ha varit ett fåtal fall per år ökade de snabbt till ett hundratal per år. Kartläggningen visar att 1995 domineras av undertyperna RD (37st) följt av RE (19st). Ingen av dessa undertyper förekommer på de undersökta djurstammarna. Den här kartläggningen visar att smittkällan till humanfall med undertyperna RD och RE inte kan härledas till svenska gårdar med nötkreatur eller till svenskt nötkött. Istället torde dessa undertyper ha haft sitt ursprung i importerade livsmedel. Det är bara undertypen H (6st) som förekommer 1995 som även återfinns i slaktprevalensstudien, följaktligen domineras 1995 av undertyper som inte återfinns hos djurproverna.

1996 karaktäriseras av en fortsatt dominans av RD och RE. Enligt epidemiologiska undersökningar från perioden 1995 och 1996 skedde ett stort utbrott från hösten 1995 till början av 1996. Det borde vara förklaringen till den fortsatta dominansen av RD och RE även för 1996. Under 1996 uppträder även andra undertyper kopplade till djurproverna, nämligen F (1st) och O (9st). Dessa är de enda undertyper som återfinns hos djurstammarna och som inte är H eller varianter av H det aktuella året.

Bland de 13 undertyperna som förekom det sista undersökningsåret bland humanproverna, 1997, förekommer fler varianter av H; totalt nio. Undertypen H var vanligast bland dessa (25st) och därefter H14 (14st). Detta innebär att 1997 är det år som har flest undertyper som återfinns bland djurproverna. RD har helt försvunnit 1997 och det finns bara ett fall med undertypen RE. F och O återfinns inte heller detta år. Huruvida de återkommer påföljande år återstår att undersöka. Det är fullt möjligt att det tvärtom varit en kortlivad undertyp som inte återkommer. RD- och RE-fallen är endast

påtagligt många under åren 1995 och 1996, för att sedan abrupt försvinna 1997. Detta fenomen att en undertyp förekommer i ett utbrott för att sedan försvinna helt är något som bland annat konstaterats tidigare i USA.

Det är flera undertyper som förekommit ett år och inte det påföljande. Dessa undertyper är troligen sporadiska fall som inte kan härledas till svenska nötkreatur, utan förmodligen härstammar från en importerad smitta. Det verkar som om H-undertyperna däremot har kommit för att stanna. H och varianter av H började etablera sig 1995 på "humansidan" och har allt sedan dess ökat både i antal och varianter. Senare studier och epidemiologiska utredningar visar att H och varianter av H har varit vanliga undertyper i utbrott även under senare år.

6.2 Geografisk utbredning av undertypade djur- och humanstammar

De positiva djurproverna kommer från gårdar vars geografiska läge indikerar att djurgårdar i södra delarna av Sverige i högre grad har djurbesättningar som är bärare av VTEC O157. En bidragande faktor till detta kan vara att antalet gårdar generellt är fler i södra Sverige. Slaktprevalensstudiens syfte var att undersöka förekomsten av VTEC O157 i Sverige som helhet och inte i några speciella regioner. Detta innebär att det inte finns statistiska belägg angående variation av VTEC O157 förekomsten i olika län i Sverige. Trots avsaknaden av statistiskt stöd så ger resultatet en bild av att det är djur belägna i södra Sverige som är bärare av VTEC O157. Även prevalensstudier som gjorts senare visar att det är flest positiva gårdar i södra Sverige. Förklaringarna till detta kan vara flera. En anledning kan till exempel vara att det i Halland förekommer "utbyten" mellan gårdarna i form av maskiner och djur. Försäljning av ungdjur mellan gårdarna är också vanligt, vilket kan spela stor roll för smittspridningen på besättningsnivå. Dessutom är detta ett område där det finns många åar och vattendrag. Vattnet kan sprida bakterien över stora områden och om vattnet används vid bevattning kan även grödor kontamineras med bakterien. VTEC kan på dessa sätt spridas i Hallandsområdet och få fäste. Över tiden finns möjligheter till att en fortsatt utveckling av bakterien och att nya undertyper på så vis tillkommer.

Inga fall av VTEC O157 hittades i norra Sverige i denna studie, varken bland djur- eller humanstammar. Möjligheten att VTEC skulle få fäste även norrut kan vara trolig om omständigheterna är gynnsamma, liknande de i Hallandsområdet. Fortsatta studier krävs dock för att se om spridningsmönstret har förändrats.

Förekomsten av undertyper hos såväl djur som människa manifesteras av några varianter av H-undertyperna samt F och O. Resultaten visar en geografisk närhet av de gemensamma undertyperna hos människa och djur. Bäst korrelation har H och varianter av H, medan F och O har större geografiska avstånd mellan funna undertyper hos djur och människa. Detta resultat visar att svenska nötkreatur kan vara reservoar för de humanfall där undertyperna är gemensamma för djur och människa. Således kan smittspridningen för de humanfall vars undertyper inte återfinns bland svenska djur troligtvis härledas till utlandet.

7 Sammanfattning och slutsatser

Det förekommer 40 humanundertyper mellan åren 1995-1997. Av dessa finns 4 undertyper representerade varje år, varav en undertyp av dessa är samlad grupp för unika stammar. Humanundertyperna domineras till en början av varianter av R, sedan blir det H och varianter av H. Vissa undertyper finns därmed bara en kort period. För att påvisa om dessa återfunnits igen krävs vidare kartläggning av prover från senare år.

Fem undertyper, H, H14, HvarU, F och O förekommer bland såväl human som djurproverna. En viss geografisk korrelation mellan dessa "gemensamma" undertyper kan urskiljas. De undertyper som bara återfinns bland humanfallen och inte bland djurproverna, torde vara importerad smitta.

Majoriteten av fallen med VTEC O157 återfinns i södra delarna av Sverige. Något entydigt svar på varför den geografiska fördelningen är av sådan karaktär har inte hittats. Trots att examensarbetet är en pilotstudie på området påvisar resultatet att mer detaljerad kunskap uppnås i det epidemiologiska arbetet när kartläggningen sker på undertypningsnivå.

8 Referenser

8.1 Tryckta källor

Albihn A., Eriksson E., Wallen C., Aspán A., (2003) "*Verotoxinogenic Escherichia coli (VTEC) O157:H7 – A Nationwide Swedish Survey of Bovine Faeces*" Acta vet. Scand. 44 43-52.

Berggren I. (2006) "*Gödsel en smittorisk för livsmedel*" SVA-vet från Statens Veterinärmedicinska anstalt Nr 1&2 2006 22-23

Boqvist S. (2006) "*VTEC/EHEC – förekomst, smittvägar och åtgärder*" Veterinärmötet 2006 – Sveriges veterinärförbund 67-70

Boqvist S. Andersson Y. Eriksson E. (2006) "*200 personer drabbas årligen av EHEC – smittvägarna är flera*" SVA-vet från Statens Veterinärmedicinska anstalt Nr 1&2 2006 8-10

Boqvist S. Vågsholm I. Andersson Y. (2006) "*Är EHEC ett stort problem?*" SVA-vet från Statens Veterinärmedicinska anstalt Nr 1&2 2006 4-5

Cambell A. N., Reece, B. J., (2002) "*Biology, 6th edition*" 382-386

Danielsson-Tham, M-L. (1999) "*Ny sjukdom från gammal bakterie*" Forskning och Framsteg 1999 NR 2

Duffy G, Garvey P., Thomson-Carter F.M, McDowell D.A., Sheridan J.J., Blair I.S., Wasteson Y and Coia J. (1999)
"*1. Methods for Verocytotoxigenic E. coli 1999*"

Eriksson E. Aspán A. (2006) "*Så hittar SVA olika VTEC-bakterier*" SVA-vet från Statens Veterinärmedicinska anstalt Nr 1&2 2006 20-21

Gautom R. K.(1997) "*Rapid Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocol for Typing of Escherichia coli O157:H7 and Other Gram-Negative Organism in 1 Day*" Journal of Clinical Microbiology, Nov 1997. 2977-2980

Jonsson M. Eriksson E. Aspán A. Engvall A. (1999). "*Study of Occurrence of VTEC. coli O157 in the Enviroment in Two Swedish Dairy Farms*" National Veterinary Institute Concerted Action CT98-3935 Verocytotoxigenic *E. Coli* in Europé 2. Survival and Growth of Verocytotoxigenic *E. coli* 6-8 May 1999

Kisterman T., Zimmer S., Vågsholm I., Andersson Y., (2004). "*GIS-supported investigation of human EHEC and cattle VTEC O157 infections in Sweden: Geographical distribution, spatial variation and possible risk factors.*" Epidemiol. Infect.(2004), 132, 495-505

Lindberg L., (2006). "*Escherichia coli och verotoxigena Enterobacteriaceae- PCR*", Reg nr ver:SMI914-1 2006-11-29

Plym Forsell L., (2003) *"Riskprofil över kallrökta, icke värmebehandlade, fermenterande produkter som smittkälla för EHEC"* Veterinärmötet 2003- Sveriges veterinärförbund 67-71

Smittsamma sjukdomar i Sverige 1996, SMI Epidemiologiska enhetens årsrapport

SVA, LMV, JBV, SMI, (2002) *"Zoonoser -smitta mellan djur och människor"*
Broschyr framtagen av Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA), Livsmedelsverket (LMV), Jordbruksverket (JBV) Smittskyddsinstitutet (SMI) 2002

SVA, LMV, JBV, SMI, (2005) *"Svensk zoonosrapport 2005, Förekomst av zoonoser och zoonotiska agens hos människor, livsmedel, foder och djur"* 15-18

8.2 Muntliga källor

Andersson Y., (2006) sektionschef Zoonoser SMI, (handledare för examensarbetet). 2006-11-22

Aspån A., (2006) avdelningen för bakteriologi SVA. 2006-12-23

Ramberg M., (2006) bakteriologen KCB SMI. 2006-12-04

8.3 Internet

Arbetsmiljöverket, (2006)
<http://www.av.se/temasidor/mikrobiologiska/skyddsklassificering.shtm> (2006-11-29)

SMI, (2006) Fakta sjukdomar
(http://www.smittskyddsinstitutet.se/SMItemplates/Article_2242.aspx) (2006-10-10)

SMI, (2007) Fakta sjukdomar
<http://www.smittskyddsinstitutet.se/sjukdomar/enterohemorragisk-e-coli-infektion/>
(2007-01-17)

Smittskyddsinstitutet (2007)
<http://www.smittskyddsinstitutet.se/statistik/enterohemorragisk-e-coli-infektion-ehec/?t=com&p=6831> (2007-12-05)

Länsstyrelsen, (2006)
<http://www.lst.se/karta1.htm> (2006-11-28)

Nationalencyklopedin (2006) sökord: län
http://www.ne.se/jsp/search/article.jsp?i_art_id=247038 (2006-11-28)

Tärnberg M., (2006)
<http://www.medtek.ki.se/projects/xjobb/tarnbergm/PFGE>. (2006-12-04)

Sartz L. Karpman D (2007) *"EHEC och hemolytisk uremiskt syndrom (HUS)"*

http://www.skane.se/upload/Webbplatser/USIL/Dokument/Division5/VOKlinMikrobiolmmuno/mikronytt/0510/EHEC_HUS.pdf 2007-01-05 (2007-01-05)

SVA, (2006) Vad är bakteriologi?
<http://www.sva.se/dokument/stdmall.html?id=50> (2006-12-08)

SLV, (2007)
<http://www.slv.se/upload/dokument/Rapporter/Mikroorganismer/RiskprofilEHEC.pdf>
(2007-01-05)

8.4 Figurer och tabeller

Figur1
E. coli Scanning E.M. Shirley Owens. Center for Electron Optics. Michigan State University
www.ogm-info.com/E.coli.jpg (2006-11-15)

Figur 2
Egen omarbetning, ursprungsbild
<http://www.slv.se/upload/dokument/Rapporter/Mikroorganismer/RiskprofilEHEC.pdf>
(2007-01-05)

Figur 3
Svensk zoonosrapport 2005 s15
www.smittskyddsinstitutet.se/upload/EPI-aktuellt-ny/zoonosrapport-svensk-2005.pdf
(2006-11-15)

Figur 4
Svenska jordbruksverket (SJV)
www.sjv.se/download/18.7502f6100lea08a0c7fff102731/utvecklingen99.PDF
(2006-12-04)

Figur 5 & 6
Tärnberg M, Magisterkurs I medicinsk teknik Karolinska Institutet
<http://www.medtek.ki.se/projects/xjobb/tarnbergm/PFGE> (2006-12-04)

Tabell I
Smittskyddsinstitutet, (2007)
<http://www.smittskyddsinstitutet.se/statistik/enterohemorragisk-e-coli-infektion-ehec/>
(2007-01-11)

Tabell II
Smittskyddsinstitutet, (2007)
<http://www.smittskyddsinstitutet.se/statistik/enterohemorragisk-e-coli-infektion-ehec/>
(2007-01-11)

Tabell III

SVA-vet Tema EHEC/VTEC, (2006)

[http://sva.se/upload/pdf/Tjänster%20och%20produkter/Trycksaker/SVA-vet1_2_06webb.pdf](http://sva.se/upload/pdf/Tjanster%20och%20produkter/Trycksaker/SVA-vet1_2_06webb.pdf) (2006-12-12)