

Varför *E. coli* orsakar infektion i tarmen

Lina Najmaldin

Självständigt arbete i biologi H 2017

Sammandrag

Escherichia coli (*E. coli*) är en fakultativ anaerob gram-negativ bakterie som förekommer normalt i tarmfloran och bidrar till matsmältningsprocessen. Bakterien finns i rikliga mängder i tarmkanalen hos människor och djur, därför används *E. coli* som indikator-bakterie för fekalförurening. Det finns flera undergrupper av *E. coli* som är patogena, det vill säga kan orsaka sjukdom i en värdorganism. Den vanligaste undergruppen är enterohemoragisk *E. coli* (EHEC). Infektion av EHEC hos människor kan leda till diarré, hemorragisk kolit och hemolytiskt uremetiskt syndrom (HUS). HUS kan orsaka allvarlig blod- och njursjukdom, vilket i sin tur kan leda till dödsfall. EHEC är en zoonotisk bakterie, vilket betyder att den kan överföras mellan djur och människor. Spridningen av EHEC är oftast fekal-oral. Djur kan vanligtvis bära på smittan utan att uppvisa symptom. Bakterien kan överföras till människor via direkt eller indirekt kontakt med smittade djur eller människor. De mest utsatta grupperna för infektion är barn, äldre och grupper med nedsatt immunförsvar. De flesta kliniska symptom uppstår som en följd av att EHEC producerar verocytotoxin. Andra viktiga virulensfaktorer hos EHEC är hemolysin och intimin, som hjälper bakterien att fästa till epitelcellerna i värdorganismen. För att kunna kontrollera sjukdomar orsakade av EHEC, och för att begränsa omfattningen av utbrott, krävs snabb diagnostisering, och identifiering av infektionskällan. För att hindra spridning av bakterien måste åtgärder ske på alla nivåer från gård till konsument. De viktigaste reservoarerna av EHEC är nötkreatur, livsmedelsprodukter och mejeriprodukter. Det finns fortfarande inget fungerande läkemedel mot sjukdomen vid utveckling av HUS, vilket sker i 2–15% av EHEC-infektioner. Det pågår mycket forskning världen över för att hitta behandlingsmetoder som förhindrar utveckling av HUS hos EHEC-smittade patienter. En strategi är att utveckla vacciner som innehåller antikroppar för att utveckla immunförsvaret. En annan behandlingsstrategi som undersöks är möjligheten att använda bakteriofager, virus som infekterar och dödar bakterier. EHEC-specifika bakteriofager testas för att hämma tillväxten av bakterien, som ny kontrollmetod i konserveringsmedel. I vissa områden i landet förekommer bakterien i större utsträckning. För att hindra spridning och minska antal sjukdomsfall är det nödvändigt att inrikta kontrollprogram mot just de områdena.

Introduktion

Escherichia coli eller *E. coli* tillhör familjen Enterobacteriaceae (entero=tarm) och släktet *Escherichia*. *E. coli* bakterien hittades av den tysk-österrikiska barnläkaren Theodor Escherich år 1885 och han fick bakterien uppkallad efter sig (Lessard 2013). Entero-bakterierna förekommer normalt i tarmkanalen, och karaktäriseras av att de är katalas-positiva, vilket betyder att bakterien producerar enzymet katalas som ingår i ett enzymssystem för avgiftning av väteperoxid H_2O_2 . Karaktäristiskt för entero-bakterier är att de även är oxidas-negativa, det vill säga saknar enzymet cytokrom-c oxidas, som reducerar syre till vatten i bakteriernas elektrontransportkedja. Dessutom tål de gallsalter och kan bryta ner glukos. De flesta entero-bakterier har flageller, trådliknande utskott av proteiner som gör att bakterierna kan röra sig i en specifik riktning. Entero-bakterier har även egenskapen att kunna reducera nitrat till nitrit.

E. coli är en fakultativt anaerob mikroorganism. Det betyder att de kan växa både med och utan fritt syre. *E. coli* finns i den normala tarmfloran hos varmblodiga djur och hos människor, framförallt i tjock-tarmen. Vissa typer av *E. coli* kan överleva endast en kort tid utanför tarmkanalen. Vanligtvis är *E. coli* en apatogen (harmlös) bakterie som hjälper till med värdorganismens matsmältningsprocess. Eftersom det finns ett stort antal *E. coli* bakterier i människors och djurs avföring, används bakterien som indikator för fekal förorening. Kvaliteten på vatten, till exempel badvatten eller dricksvatten, bedöms utifrån förekomsten av *E. coli*. Att bakterien används som indikator för fekal förorening beror inte på själva bakterien som vanligen är apatogen, utan de risker som finns för överföring av patogena bakterier och virus, som till exempel *Salmonella* eller *Calicivirus*. Dessutom kan *E. coli* förstöra livsmedelsproduktion, till exempel vid ostproduktion som kan orsaka jäsningsprocesser med gasbildning. *E. coli* kan bryta ner sorbitol, under syrebildning (Kossow *et al.* 2016). Bakteriens optimala tillväxttemperatur är 37° C, eftersom bakterien lever i människokroppen eller i liknande miljöer. Bakterien kan även anpassa sig i mycket extrema förhållanden och växa i näringsfattiga miljöer, till exempel där endast en sockerart finns att tillgå (Allocati *et al.* 2013).

Det yttre cellmembranet hos *E. coli* består av två lager, det inre lagret består av fosfolipider och lipoproteinernas hydrofoba del och det yttersta lagret av lipopolysackarider (LPS). LPS innersta lager har långa fettsyror som binder till en glukos-amin-disackarid molekyll och på utsidan finns en kärna som består av kolhydrater, aminer och fettsyror. Utanför kärnan finns en kedja av identiska sackaridenheter som är artspecifika och utgör huvuddelen av O-antigenet. LPS som även kallas för endotoxin är mycket toxiskt då den är en del av cellväggen och frigörs när bakterien löses upp (Stenutz *et al.* 2006).

Även om många *E. coli*-varianter är harmlösa, finns det vissa undergrupper som är patogena och framkallar sjukdom hos människa. Exempel på dessa är enterohemorragiska (EHEC) - enteroinvasiva (EIEC); enteropatogena (EPEC); enterotoxigena (ETEC). De olika undergrupperna av *E. coli* som är humanpatogena, kan orsaka både extra-intestinala och intra-intestinala infektioner. Exempel på de olika extra-intestinala infektionerna är urinvägsinfektion, neonatal meningit och sårinfektion. De patogena undergrupper av *E. coli* som orsakar intra-intestinala infektioner, infekterar tarmkanalen och framkallar diarréer.

Syfte och frågeställning

Denna uppsats kommer att fokusera på enterohemorragisk *E. coli* (EHEC), serotyp O157:H7. Serotypen *E. coli* O157:H7 är den *E. coli* som idag orsakar flest fall av EHEC i världen. Bakterien är vida spridd, och detta gör att EHEC finns med på WHO:s lista över de allvarligaste sjukdomarna i utvecklingsländer. Syftet med denna uppsats har varit att besvara hur EHEC infekterar tarmen hos värdorganismen, och mekanismerna bakom infekterings processen. Syftet har varit att undersöka närmare evolutionärt utvecklingen av EHEC, samt virulensfaktorer som finns hos bakterien. Dessutom vill jag titta på spridningsvägar i samhället och undersöka åtgärder för att förhindra infektioner.

EHEC O157:H7 den vanligaste serotypen av *E. coli* som framkallar sjukdom hos människor

Definitioner: EHEC, VTEC

I Sverige benämns bakterien antingen som verocytotoxin-producerande *E. coli* (VTEC) eller enterohemorragisk *E. coli* (EHEC). Bakterien benämns som VTEC när den finns hos

smittbärande djur som inte uppvisar symptom, och EHEC när bakterien förekommer hos människor.

Karaktäristiska egenskaper hos EHEC

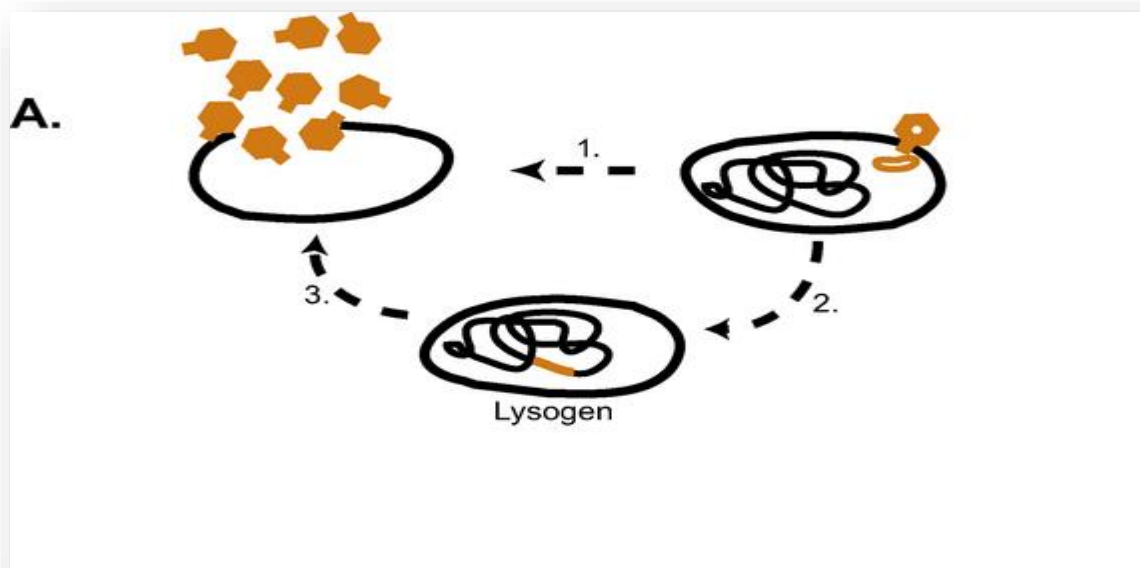
EHEC O157:H7 är en av de vanligaste patogena serotyperna som orsakar infektion i tarmkanalen hos människa. Morfologin hos undergruppen O157:H7 består av den somatiska antigenen (O) som finns i LPS i bakteriens cellvägg (Lundborg *et al.* 2010). Nummer 157 står för den specifika antigenen, och H7 är genotypen av flagellerna. Infektionen av EHEC O157:H7 leder till diarré och oftast blodig diarré (hemoragisk kolit) hos människor. Bakterien kan orsaka hemolytiskt uremetiskt syndrom (HUS) som är en allvarlig blod och njursjukdom, som kan orsaka dödsfall (Tarr 1995). Till skillnad från andra *E. coli* typer så överlever bakterien i sura miljöer och kan kontaminera livsmedel som annars ansetts säkra, till exempel juicer, salami och opastöriserade mejeriprodukter. EHEC O157:H7 skiljer sig dessutom från de andra *E. coli* undertyperna genom oförmågan att fermentera sorbitol. Denna egenskap används vid odling, för identifiering av *E. coli* O157:H7 (Aspán & Eriksson 2010).

Transduktion hos EHEC

De flesta bakterier har egenskapen att kunna utbyta gener mellan varandra. Överföring av DNA mellan bakterieceller sker på tre olika sätt: transformation, transduktion och konjugation. Transformation sker genom att en bakteriecell tar upp fritt DNA från omgivningen. Det upptagna DNA:t, som kan komma antingen från kromosomer eller plasmider, inkorporeras sedan i bakteriens arvs massa. Transduktion sker genom överföring av DNA med hjälp av bakteriofager som inkorporeras i bakteriecellens kromosom och då kallas profag. I konjugations-processen sker överföringen genom en direkt cell-cell kontakt. Hos de humanpatogena entero-toxinbildande *E. coli* sker överföring av genetiska element, till exempel gener som kodar för toxiner och andra virulensfaktorer, via transduktion (James *et al.* 2001). En av bakteriens mest patogena egenskaper är att producera verotoxiner. Denna egenskap förstärkas genom transduktion.

I transduktions-processen binder lambda-bakteriofager till bakteriens cellvägg. För att denna bindning ska ske måste fagen passa till bakterien utsida, vilket innebär att bara ett speciellt virus kan binda till en viss typ av bakterie. Lambda-fagen sprutar in nukleinsyra i bakteriecellen. Nukleinsyra börjar dirigera bakteriens metabolism så att cellen börjar producera kopior av fagens nukleinsyra, istället för sin normala cellfunktion. Detta gör att det bildas så många lambda-fager, att cellen brister och fagerna kommer ut ur cellen och färdiga att angripa nya bakterieceller. När bakteriofagerna släpps ut ur bakteriecellen kan de i vissa fall, av misstag, ta med sig en del av bakteriecellens arvs massa. Denna DNA-bit kan överföras till en annan bakteriecell, och integreras i den nya cellens arvs massa. På så vis kan de alltså föra över verotoxin-generna, vilket resulterar i bildning av nya verotoxin-producerande bakterier (Nyambe *et al.* 2017).

I lysogeni-processen inkorporeras fager i bakteriens genom som profag, utan att skada bakteriecellen. Bakterien har då blivit lysogen för den aktuella fagen, och kan inte infekteras av nya fager av samma sort (Figur 1). Profagen replikeras samtidigt som bakterien förökar sin arvs massa och förs vidare till nästa bakteriegeneration (James *et al.* 2001).



Figur 1. Lambda fagens livscykel. (1) Den invaderande fagen kan antingen integreras i värdgenomet som profag eller (2) replikeras och lysera värdcellen (3) (Efter *Chen Y, et al*) av (CC BY).

Virulensfaktor

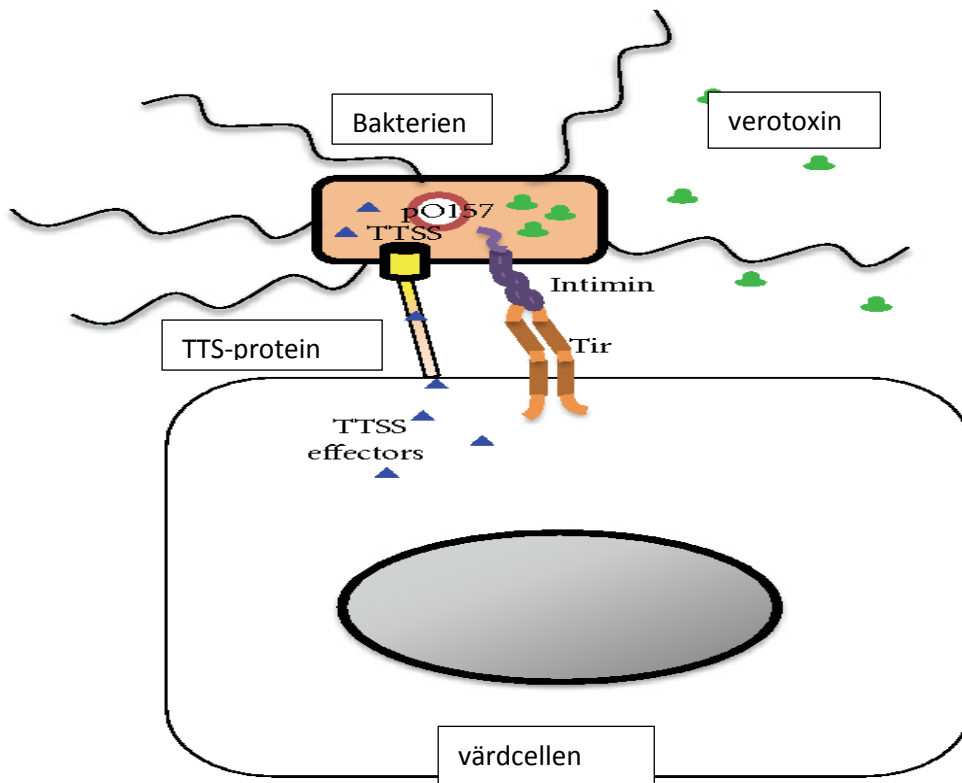
EHEC O157:H7 har fyra olika yt-antigena system som bidrar till bakteriens förmåga att orsaka sjukdom. Dessa är O-antigen, k-antigen, H-antigen och F-antigen (*Hufnagel et al.* 2015). O-antigenen är en del av LPS, och är ett värmestabilt yt-antigen, vilken behåller sin struktur och funktion även vid kokning. Eftersom O-antigenet är en del av LPS så går den under beteckningen endotoxiner, som i sin tur också betecknas som pyrogena, vilket innebär att de orsakar inflammation och feber hos djur och människor om de kommer ut i blodbanan (*Stenutz et al.* 2006). H-antigen eller flagell-antigenet är bakteriens flageller, som bidrar till rörelse med hjälp av långa, hårlika proteintrådar. K-antigen är ett kapselbildande lager av polysackarider. Kapsel-antigenet bidrar till att öka bakteriens försvarsmekanismer, till exempel vid torka eller mot fagocytcellerna i immunförsvaret. F-antigen, eller fimbrie-antigen består av små proteinutskott som bidrar till bakteriens förmåga att fastna på slemhinnor, som i sin tur bidrar till virulensen hos bakterien som orsakar urinvägsinfektion (*Nataro & Kaper* 1998b).

De viktigaste virulensfaktorerna hos bakterien som orsakar sjukdom hos människor, är dels verotoxinerna och dels patogenitetsön och plasmiden (*Johnson & Nolan* 2009). De primära virulensdeterminanterna, eller avgörande faktorerna hos EHEC serotyperna, är kromosomt kodade. Patogenicitetsön innehåller många gener som bland annat kodar för adhesiner, som binder till tarmceller och andra proteiner som är kopplade till serotyper som framkallar sjukdom. Ett exempel är genen *eae* som kodar för proteinet Intimin som förknippas med serotyper som framkallar sjukdom (*Kenny* 2001). Plasmiden 157 (P157) är en annan virulensfaktor som spelar en viktig roll hos O157 som associeras med sjukdom. Plasmiden finns i 99 - 100% av kliniska O157 isolat från människor. Plasmiden 157 kodar för ett typ II sekretionssystem. Denna plasmid kodar även för ett enterohemolysin. Detta hemolysin lyserar röda blodkroppar som släpps ut i tarmen, vilket hjälper bakterien att använda järn som näringsämne (*Rahal et al.* 2012). Den främsta virulensfaktorn hos VTEC O157:H7 är deras förmåga att producera verocytotoxin

(VTEC). Det finns två olika typer av toxinet som kallas VT1 och VT2. Bakterien kan antingen producera båda typerna, eller ett av toxinerna. Tempererade bakteriofager, som är bärare av verotoxin-generna, är bakterievirus som invaderar *E. coli*, och därigenom integrerar och replikerar i den bakteriella kromosomen genom lysogeni. Verocytotoxin-generna finns inkorporerade i lambda-profager i bakteriens DNA i olika kombinationer, till exempel VT1+VT2 eller två gener av VT2. Under ogynnsamma miljöförhållanden, går profagerna in i lytisk cykel, som innebär att de replikeras i och spränger bakteriecellen, och invaderar andra värdceller genom transduktion (James *et al.* 2001). Verotoxin-kodande fager invaderar framförallt *E. coli*, och förekommer i olika miljöer. Detta gör de till den främsta reservoaren för verotoxin-generna, som vid rätt förutsättning invaderar andra bakterier och ökar sin virulens (Chekabab *et al.* 2013).

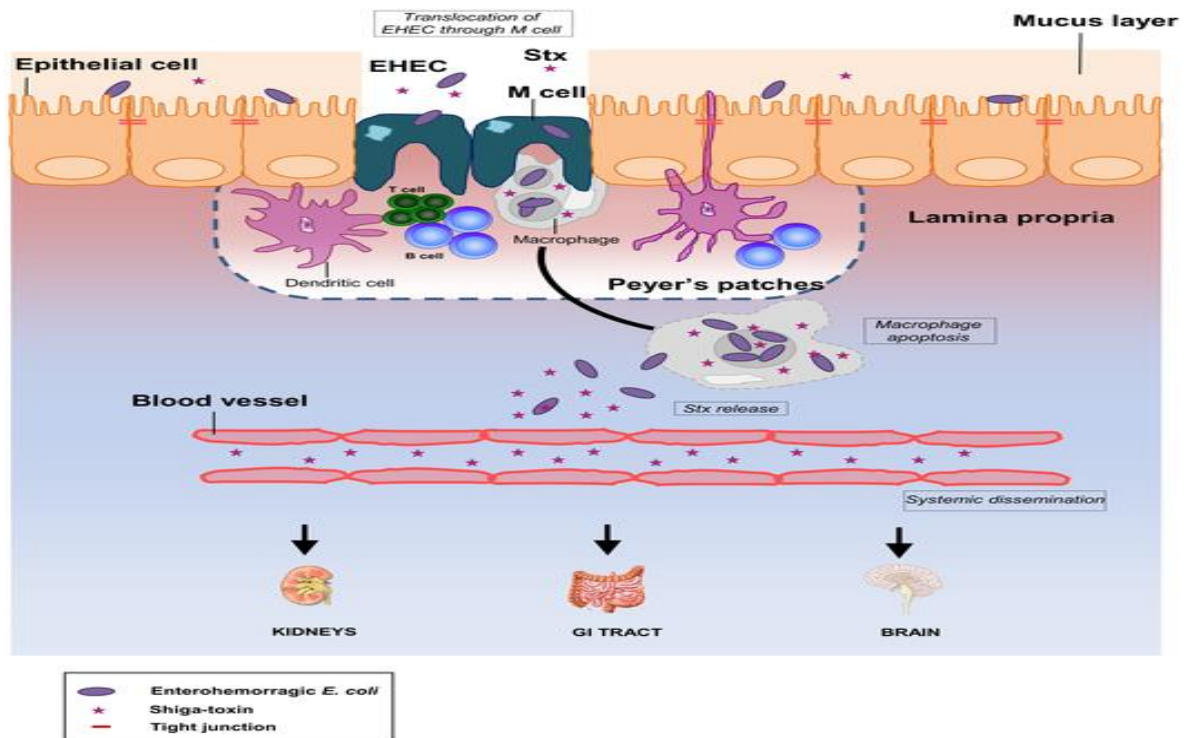
Mekanismer för etablering av sjukdom

En människa blir smittad då bakterien kommer in i munnen. Smitt dosen som krävs är mycket låg, det räcker med mindre än 100 bakterier. EHEC passerar genom magsäckens sura miljö tills den når tarmen, vilket inte påverkar bakteriens överlevnad för EHEC O157:H7 har hög syra tolerans. Bakterien når tarmen med bibehållna virulenta egenskaper, för att fästa sig och infektera epitelcellerna (Nataro & Kaper 1998b). För att framkalla infektion måste EHEC fästa sig intimt i enterocyten – ett tarmepitel som ofta är klätt av mikrovilli – vilka är små utskott uppbyggda av aktin-filament, som finns på ytan av enterocyten. EHEC O157:H7 plattar ut mikrovilli och fäster sig intimt vid den nakna cytoplasmatiske membranet av enterocyterna. (Kenny, 2001). Det finns många gener som är inblandade i en bakteriell vidhäftning (adhesion). Proteiner som behövs för att skapa A/E-lesioner kodas av patogenitetsögen, bland annat *eae-genen*. Denna kodar för ett typIII sekretionssystem TTSS, en transmembran intimin-receptor, Tir, och proteinet intimin. Med hjälp av TTSS kan bakterien translokera intimin-receptor Tir i värdens enterocyt membran. Detta resulterar i att bakterien kan fästa sig i Tir-receptorn med hjälp av intimin. Därefter förstörs mikrovilli och framkallar skada i tarmepitelet. Bakterien sprutar in sina egna virulensfaktorer in i enterocyten, genom att TTSS fungerar som en nål, det vill säga den translokerar sin Tir-receptor in i enterocyten, med hjälp av intimin (Figur 2).



Figur 2. *E. coli O157*: H7-virulensfaktoruttryck och interaktion med värdceller. *E. coli O157*: H7 har en stor plasmid (pO157), (utsöndrar proteinet intimin) och producerar VTEC-toxiner. TTSS-effektor-protein. Pumpar intimin och fungerar som ett transportsystem. Tir, tjänar som receptorn för det huvudsakliga adhesinet, intiminet och möjliggör sålunda vidhäftning av bakterien till värdceller (Efter Krystle L. Mohawk and Alison D. O'Brien) av (CC BY).

Lesionerna eller skadorna som uppstår i samband med detta kallas ”attaching and effacing lesions”. EHEC orsakar mikrovillig omläggning och bildar pedestaler under ytan av infästade bakterier. Pedestalbildningen av aktinfilamentet bidrar till skador på tarmepitelvävnaden (Cepeda-Molero *et al.* 2017). Interaktionen mellan intimin och Tir leder till aktinpolymerisationer, vilket innebär att bakterien bildar ett speciellt aktin-nätverk inuti värdcellerna. Mekanismen leder till ett antal skador hos värdcellerna som cytotoxicitet som inducerar apoptos eller nekros, cell- och vävnadsdöd i en organism, samt vävnadsskador som leder till infektioner och diarréer. Toxinerna bidrar till obalans i jon- och vattentransporten, som leder till diarréer och därmed ökar risken för spridning av EHEC till nya värdar (Caron *et al.* 2006).



Figur 3. Figuren visar ett monoskikt av tarmepitelceller med EHEC-infektion i lumen. VTEC-produktion sker i tarmarna. Bakterierna korsar tarmbarriären genom M-celler. I lamina propria går bakterier in, överlever och producerar VTEC i makrofag cellerna. Efter replikering av bakterier i makrofager induceras, omfattande VTEC-produktion värdcellsdöd. Därefter kan frisläpande VTEC toxinerna passera nedströms blodkärl för att nå njurarna, tarmarna och hjärnan. Skador på dessa organ leder till allvarliga livshotande komplikationer hos människor (Efter Etienne-Mesmin L, et al) av (CC BY).

Produktionen av verocytotoxiner, och deras verkningsmekanism är den främsta virulenta egenskapen hos EHEC O157:H7 (Tesh *et al.* 1993). Verocyto-toxinerna bildas av en gemensam polypeptidsubenhet-struktur som består av två subenheter: en enzymatiskt aktiv A-subenhet som är kopplad till en B-subenhet. A-subenheten i vtx-genen translokeras in i cytoplasman, och binder till N-glykosidas. Vtx-toxintes så kallade B-subenhet passerar in i blodbanan och binder till glykolipid-receptor (GB3), som finns i tarmens och njurens endotelceller (Ogura *et al.* 2015). Ett fragment av A-subenhet med N-glykosidas frisätts i cytoplasman där, en adeningrupp avlägsnas, från 28S-rRNA i ribosomerna. Det vill säga att enzymet katalyserar nedbrytning av 28S-rRNA. Detta resulterar i inhibering av proteinsyntesen (celldöd). Det finns betydligt fler endotelceller med Gb3 receptorer i njurarna än i tarmen, därför drabbas njurarna hårdare av toxinet. Toxinet inducerar syntes av cytokiner i tarmendotelceller, och leder till celldöd (Figur 3). Det är i njurarna som toxinet utvecklar HUS, som kan leda till njursvikt (Nataro & Kaper 1998c).

Evolutionär utveckling av *E. coli* O157:H7

Det har visat sig genom många studier att den evolutionära utvecklingen av *E. coli* O157:H7 har skett stegvis. Från den icke toxinproducerande *E. coli* bakterien som fermenterar sorbitol till O55:H7 som är en patogen klon. Serotypen O55:H7 associeras oftast med utbrott av spädbarnsdiarré världen över. Det har funnits gener i patogenetitsön hos bakteriens föregångare, som orsakar den intima bindningen av bakterien till tarmepitelet. Det första steget i utvecklingen var att förvärva verotoxinet VT2 genom transduktion. Andra steget i utvecklingen var en omkoppling av den somatiska antigenen från O55 till O157, och förvärvet av en stor toxisk plasmid, P O157. Därefter förlorade bakterien egenskapen att fermentera

sorbitol, och erhöill ytterligare en annan VT toxin, kallad VT1, som är den viktigaste virulensfaktorn hos bakterien (Pennington 2010).

Symptom vid EHEC-infektion

Verocytotoxin-producerande EHEC skadar vävnader och blodkärl i tjocktarmen, och leder till hemoragisk kolit. Toxinets verkningsmekanism på vaskulära endotelceller, som täcker insidan av blodkärl, framkallar hemolytisk-uremeisk syndrom, HUS, som är en allvarlig blod- och njursjukdom. I HUS-relaterade sjukdomar svullnar endotelcellerna, som separeras från kärllmembranet. Skador i endotelcellerna orsakar att trombofili utvecklas, det vill säga en avsmalning av kapillärerna (Chart *et al.* 1991). HUS uppger olika symptom, beroende på skador i njurarna, som hemolytisk anemi, vilket ökar nedbrytningen av röda blodkroppar. Ett annat symptom i samband med HUS är trombocytopeni som innebär brist på trombocyter, vilka har som uppgift att stoppa blödningar i kroppens blodkärl, det vill säga koagulering. EHEC symptomen varierar starkt från en mild diarré, till en livshotande sådan.

Det är 2–15 % av patienterna som utvecklar HUS, men vid utbrott har siffran överstigit 20%. Patienter har från början en mild diarré som inom 1–2 dagar övergår till blodig diarré. Magkramp och kraftig buksmärta förekommer. Diarréerna kan leda till uttorkning och patienten behöver intravenös vätskeersättning (Bielaszewska *et al.* 2014). I 70% av fallen övergår vattnig diarré till blodig diarré. De brukar pågå i 1–7 dagar, sedan tillfrisknar patienterna, och tarminflammationen övergår av sig själv. Det kan uppstå komplikationer en vecka efter de första symptomen, och barn och äldre hör till de mest utsatta grupperna. Den mest allvarliga komplikationen är just HUS. HUS kan vara livshotande och patienter som utvecklar detta syndrom behöver intensivvård, inklusive dialysbehandling. Det finns ingen fungerande läkemedelsbehandling. Symptomlindring sker genom blodtransfusion, vätskeersättning, och dialysbehandling vid njursvikt. Patienter med HUS kan även utveckla neurologiska symptom (Berin *et al.* 2002). Det finns även andra orsaker eller riskfaktorer som bidrar till HUS-utveckling, såsom andra sjukdomar. Exempel på sjukdomar är hjärtrytmrubbning (takykardi), kraftigt uttorkning, och nedsatt tarmmotorik. Även behandling med antibiotika kan leda till utveckling av HUS, eftersom bakterierna frisätter mer toxin vid celledöd.

Spridningsvägar

Det är främst bland nötkreatur som man finner de stora reservoarerna för VTEC. Det finns även andra idisslare som är bärare till bakterien, utan att uppvisa symptom av sjukdom. Detta leder ofta till mindre försiktighet vad gäller förebyggande åtgärder för att hindra smittningsspridandet världen över. Djuren från slakterier, gårdar och djurparker är på grund av nära kontakt med människor också källor för spridning (Franz *et al.* 2014). Korskontaminering är en annan faktor som människor bidrar till genom föroreningar i utsatta miljöer. Nötkreatur kallas superutsöndrare eftersom de är de främsta bärarna, och utsöndrar höga koncentrationer av VTEC. Ett litet antal superutsöndrare kan förorena i stor utsträckning (Gunn *et al.* 2007). Bakteriens smittvägar är fekal-oral; smittans främsta källa är från djur till djur via avföring, smittat foder och kontaminerat vatten. Enligt undersökningar finns det några faktorer som påverkar utsöndringen av VTEC hos nötkreatur. Det har visat sig att exempelvis stress ökar utsöndringen. Den beror på att tarmfloras normala miljö ändras, och djur kan bli stressade vid olika tillfällen, till exempel vid foderbyte, transport- och slakthantering. En annan faktor som stör den normala tarmfloran är antibiotikabehandling som leder till ökad utsöndring (Potter *et al.* 2004).

Människa som spridningskälla

Vi människor kan vara bärare av sjukdomen, och vi kan även överföra den genom olika vägar. Spridningen kan exempelvis överföras genom amning från mor till barn, eller om en person i hemmet är smittad. På daghem och äldreboenden finns större risk för spridning. Dessa miljöer är mer benägna att drabbas än andra, exempelvis genom matsalar där dålig hygien och dålig kontroll av maten kan leda till korskontaminering. Den främsta orsaken till barns utsatthet som grupp, är deras beteendemönster. Yngre barn har svårt att använda toaletten ordentligt, att tvätta händerna vid behov, samt vanan att stoppa fingrarna i munnen (Baker *et al.* 2016).

Mat som spridningskälla

Spridning av EHEC via livsmedel har bidragit till stora utbrott; ett berömt fall i modern tid inträffade 1982 i USA, där källan till smittan var en icke-genomstekt hamburgare. Det kan bero på bristande kunskaper om livsmedelssäkerhet, men spridning kan även uppstå vid transport, frakt, slakt och lagring. Bakterien dör vid 71°C. Grönsaker kan vara smittade när de vattnas med kontaminerat vatten. Vid slakt, kan kropparna förorenas med gödsel om slakten inte sker hygieniskt. Det finns strikta regler vid slakt och även vid gårdsbesök. Djuren hålls rena och är rena vid leverans till slakt. Det görs även stickprovskontroller för att kontrollera om VTEC förekommer (Baker *et al.* 2016). VTEC finns även i matprodukter som konserverats eller förädlats. Detta beror på att vid miljöförändring, eller en drastisk förändring av pH-värde eller värmeexponering, går patogena gram-negativa bakterier i överlevnadsläge. Då man tar en odling innebär det att skadade och stressade celler inte går att identifiera, men de kan sedan återupplivas och markera sig. Det leder till att man riskerar att underskatta det verkliga antalet mikroorganismer (Díaz *et al.* 2010).

Mikroorganismer har förmågan att anpassa sig och överleva i olika miljöer, vilket gör det svårt att helt förhindra föroreningar och sjukdomar. Därför kan, trots närvaro av kvalitetssäkring och kontrollförfarande, utbrott av sjukdomar inträffa. Enligt undersökningar som gjorts på nötkött och nötprodukter visade att inympade O157:H7 VTEC överlevde i produkterna i -20°C, 0°C, 5°C i tre dagar, och i 7°C och 15°C i fem dagar. Dessutom undersöktes stammar av O157 VTEC i köttbiffar efter frysning vid -20°C i 24 timmar, och efter upptining genom olika metoder. Det visade sig att O157 VTEC stammarna hade överlevt, men var olika känsliga beroende på upptiningsmetod. Slutsatsen av undersökningarna var att temperaturer vid 4°C eller lägre kan begränsa tillväxten av VTEC O157, men har liten effekt på överlevnaden (Duffy *et al.* 2014). Opastöriserade mejeriprodukter, till exempel mjölk som har ett neutralt pH och är en skonsam miljö för bakteriens överlevnad och tillväxt, har identifierats som en källa till VTEC-bakterier. 2010 drabbades 3% av befolkningen i USA genom mjölkprodukter, som förorenats genom kontaminering med avföring från nötkreatur, under eller efter mjölkkningsprocessen (Hussein & Sakuma 2005).

Diagnostisering

Polymerskedjareaktion (PCR)

Denna metod handlar om att hitta verocytotoxin-producerande EHEC-stammar med PCR - teknik. PCR identifierar en specifik DNA-sekvens som bara ingår i den organism man letar efter. PCR skapar ett stort antal kopior av DNA-sekvensen för att lätt påvisa gener, till exempel de som kodar för VT1 och VT2 (Ellingson *et al.* 2005).

Laboratoriediagnostik

Vid laboratoriediagnostik av EHEC-infektion tas avföringsprover från patienten för odling. Det medium som används kallas sorbitol MacConkey-agar (SMAC). Som tidigare nämnts

kan inte *E. coli* O157:H7, till skillnad från andra *E. coli* stammar, fermentera sorbitol alltså sorbitol negativa och då tyder det på att det är O157:H7 (Tarr 1995).

Typningsmetoder

Typning och undertypningsmetoder är ett värdefullt hjälpmedel för att identifiera och upptäcka utbrott i ett tidigt stadium. Det bidrar till att spåra källor och specificera falldefinitionen. Metoder som används är puls-fält-gelelektrofores (PFGE) och multi locus variable number tandem repeat analysis (MLVA). PFGE bestämmer olika bakteriestammar, genom att dela DNA i stora fragment. De olika DNA-delarna dras till olika sidor av det elektriska fältet, beroende på laddningen. Till slut bildas en mall för varje bakteriestam som kan jämföras (Garofolo 2015). Med MLVA analyseras fragment för DNA-baserad undertypning. I bakteriens DNA upprepas genetiska koder flera gånger i olika antal hos olika bakterier. Detta visar en genetisk variation hos olika stammar (Dalmasso & Jordan 2014).

Serologimetod

Den här metoden används som komplettering till screeningmetod och odling. Detta innebär att vtx-generna är påvisade men inte identifiering av serotypen. En serologisk diagnos innebär att blodprover tas från värdorganismen. Om antikroppar som försvarar mot LPS O157 visar sig, då associeras infektion med *E. coli* O157:H7. Antikropparna associeras med en ny infektion av O157:H7 (Chart *et al.* 1991).

Åtgärder på gårdsnivå

Kontrollering av VTEC på gårdsnivå är ett bra steg för att minska risken för spridning och få ökad kontroll av bakterier. Det leder till minskning av slaktkroppars förorening, samt minskning av människors sjukdom i samband med djurkontakt. Det hjälper till att minska förorening av miljön, och vatten som används för bevattning, eller som drickskälla. Studier har visat att användandet av *E. coli* O157:H7 på gårdsnivå har lett till en bättre kontroll och identifiering av smittohärdar. En annan fördel är att det kan leda till minskning av fekal till oral överföring (Duffy *et al.* 2014). Ett annat sätt för att kontrollera *E. coli* O157 hos nötkreatur är exempelvis genom matning med probiotika som är kommensala bakterier i tarmfloran. Ökningen av probiotika leder till konkurrens med de patogena bakterierna i tarmen, och har hämmande effekt på de patogena bakterierna (Karmali *et al.* 2010). Det görs framsteg för att förstå biologin hos VTEC-kolonisering i nötkreaturs tarmkanal, genom att framställa EHEC-vaccin genom andra EHEC-serotyper, det vill säga korsskydd. Inom immunologin utvecklas vacciner mot det genetiska elementet som kodar för kolonisering av tarmen. LEE är ansvariga för VTEC O157:H7:s kolonisering i tarmen. Vaccinet är LEE-kodade mot *E. coli* O157:H7:s kolonisering av tarmen. Resultat av olika försök har visat att användning av vaccinet har haft stor effekt på minskning av fekal överföring, när vaccinet administrerades tre gånger. Dessutom minskade *E. coli* O157:H7 prevalensen med 98% efter den andra vaccineringen. En övervägande punkt för utvecklingen av vaccin är graden av korsskydd, vilket innebär att tillhandahålla EHEC-vaccin genom andra EHEC-serotyper (Potter *et al.* 2004). Det finns produkter av antimikrobiella grupper som kan påverka bakteriens population i tarmkanalen. Exempelvis Neomycinsulfat som bidrar till att minska mängden avföring hos *E. coli* O157:H7 i nötkreatur. Användningen av antibiotika är ett omdiskuterat ämne eftersom det kan framkalla antibiotikaresistens (Mora *et al.* 2005). Bakteriofager är en specifik metod vid användning mot *E. coli* O157:H7, men resultaten har varit varierande och det behövs mer forskning för att utveckla en bra interventionsstrategi (Morita *et al.* 2002).

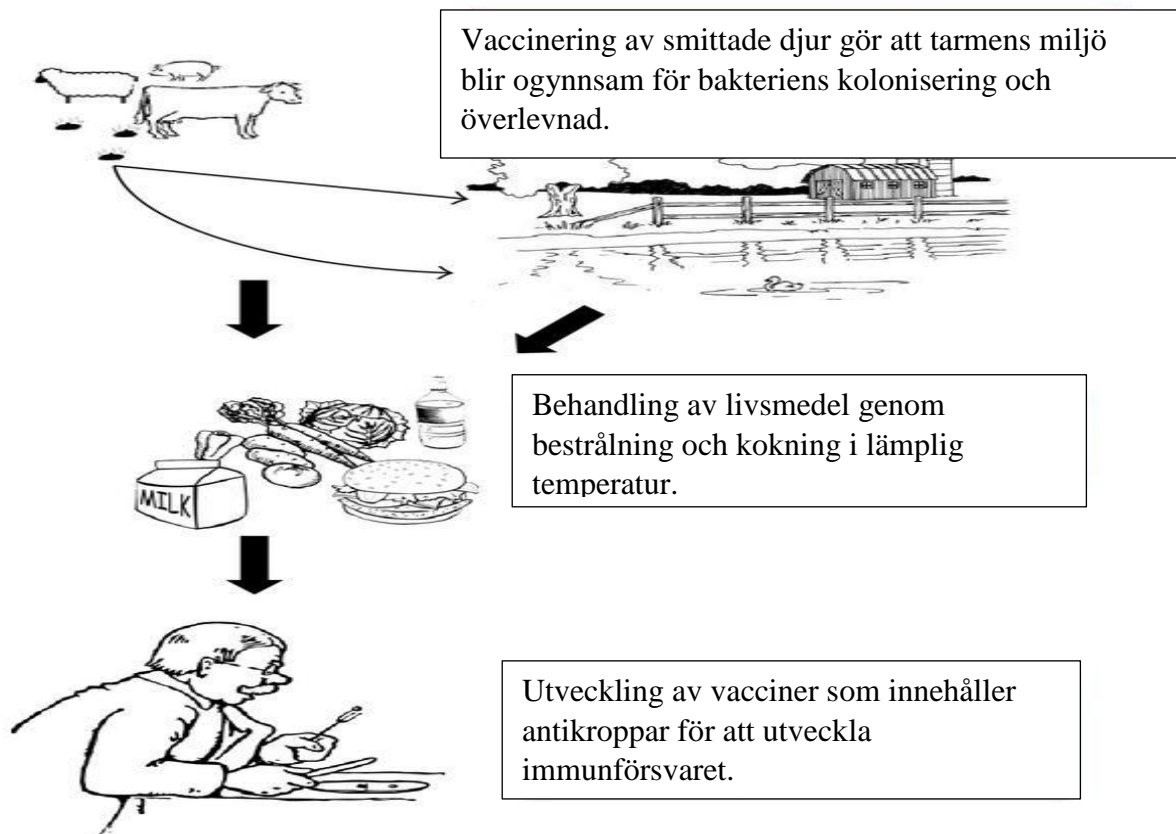
Åtgärder på slaktnivå

Inom förädlingssektorn finns livsmedelssäkerhet som benämns riskanalys och kritisk kontrollpunkt HACCP-program. Det är ett tillvägagångssätt som används för fysiska, kemiska, och biologiska faror, och är inte specifik för VTEC. HACCP-program innefattar mikrobiell testning för indikator av bakterier och specifikt för O157:H7. Det finns olika metoder som används inom förädlingssektorn, som ska uppfylla HACCP-krav. Det finns olika interventions strategier för analys och kontroll, som vid användning av kemikalier, antimikrobiella tester och gammastrålning. Vid slakt förekommer föroreningar när tarminnehållet eller avföring kommer i kontakt med köttets ytor. Det kan även uppstå korsföroreningar under bearbetningsprocessen mellan slaktkropparna. Det finns strategier som används för att kontrollera VTEC i köttprodukterna. Exempelvis mikrobiell testning av produkter för specifik *E. coli* O157:H7. Det har rapporterats slutsatser från analyser som gjorts tidigare, att interventionsstrategier kan minska förekomsten av bakterien (Cassin *et al.* 1998)

Åtgärder på konsumentnivå

Det finns rekommendationer i många länder inom hälsoorganisationer, för att minimera risken för EHEC-spridning. De vanligaste åtgärderna är god hygien i restauranger och i kommersiella livsmedelsföretag (Pennington 2010) I hemmet är okunnighet om livsmedelshandling och matförberedelser också är riskfaktorer för spridning. Det behövs kunnskap inom livsmedelshygien, exempelvis att regelbundet tvätta händerna och ytor som kommit i kontakt med livsmedel, och att använda lämpliga matlagningstemperaturer, snabbt frysa matvaror och matrester. Det har visat sig att genom ett systematiskt granskningsprogram för livsmedel, ett gemenskaps baserat utbildningsprogram, bidrar till minskning av patogena livsmedel. För att minska spridningen av EHEC måste man tillämpa dessa kontrollåtgärder (Baker *et al.* 2016).

Det är svårt att påverka de olika nivåerna i livsmedelsproduktionen (Figur 4). Det finns olika gradsvårigheter för att kontrollera produkten, från gård till konsument. Svårigheterna kan ligga i att spåra och identifiera smittkällan, från den tid det tar mellan föroreningen och utbrottet. Dessvärre är utbrott av EHEC inte anmälningspliktigt, eller ens en namngiven sjukdom, jordbruksbestämmelser världen över. I framtiden kan detta ändras eftersom kontrollprogram för gårdsnivåer i större utsträckning kommer att implementeras i USA. Orsaken till detta kan bero på att antingen är interventionsstrategierna inte vetenskapligt bekräftade, eller att de begränsande effekterna inte har godkänts (Saeedi *et al.* 2017). Det finns fortfarande betydande hinder för framgångsrik behandling av HUS-associerade sjukdomar, som innebär en störning av homeostas i kroppen. Det krävs en mångfaldig strategi för att åstadkomma en tillräckligt framgångsrik behandlingsmetod. Det pågår mycket forskning för att utforma behandlingar som förhindrar de allvarligaste komplikationerna i samband med EHEC-infektion, det vill säga njursvikt och centrala nervkomplikationer. De olika testerna som görs på VTEC visar endast närvaro av bakterien, och är inte kvantitativa (Koochmarai *et al.* 2005). Detta betyder att interventionsprogram kan minska men inte slå ut bakterierna. Dessa detektionsmetoder är inte tillräckligt effektiva för att ges som incidensdata. Det behövs utvecklas en giltig testmetod för att kvantitativt bestämma koncentrationen av *E. coli* O157:H7, i fekalprover som bidrar till utvärdering av kontrollstrategier på gårdar (Potter *et al.* 2004).



Figur 4. Modeller av *E. coli* O157:H7-överföring till människor från gård till konsument med tonvikt på strategier för förebyggande / intervention. (Efter Krystle L. Mohawk and Alison D. O'Brien) av (CC BY).

Diskussion

E. coli O157:H7 är en patogen serotyp som framkallar sjukdom hos människor. Virulensfaktorer som finns hos bakterien påverkar värdcellers proteinsyntes, jonsekretion, och celledelning. Bakteriens förmåga att producera verocytotoxiner VT1 och VT2, av en eller båda typerna, är den främsta virulenta faktorn. Andra virulenta faktorer hos bakterien är plasmiden och patogenitetsöen (Mainil 2013). Dessa faktorer leder till bakteriens förmåga att adhaera till tarmens celler genom genen *eae*, som kodas från patogenicitetsöen, och entero-hemolysin produktion som kodas från plasmiden. Nötkreatur är den främsta reservoaren för EHEC O157:7 (Kenny 2001). Bakterien klarar sig i sura miljöer och kan finnas i livsmedel som tidigare har ansetts säkra. Smittvägen är fekal till oral, den smittas genom opastöriserade mejeriprodukter, charkprodukter, grönsaker och frukter. Kontaminerat vatten som dricksvatten eller badvatten kan orsaka infektion. Det förekommer även person till person smitta, speciellt i familjen eftersom bakterien har låg infektionsdos. Smittspridning sker även genom direkt kontakt med djur. För att kunna kontrollera och förhindra spridning av VTEC måste optimala åtgärder utföras, som ska inkludera alla nivåer av livsmedelsproduktion.

Framtidsutsikter

Det pågår vida forskning kring hur man ska förhindra spridning av bakterien. Forskningsresultat från Korea (Lee *et al.* 2016), har visat att bakteriofag HY01 har en specifik förmåga att hämma O157:H7 i livsmedel. De menar att HY01 skulle kunna användas i

konserveringsmedel. Bakteriofagen har godkänts för matapplikationer av Food and Drug Administration (FDA) i USA och har föreslagits som konserveringsmedel för kontroll av patogena bakterier (Lee *et al.* 2016).

Vid Lunds universitets sjukhus pågår också forskning för att hitta nya behandlingsmetoder mot EHEC-infektion. I ett försök att utveckla nya metoder för att spåra EHEC-serotyper har forskaren Zivila Bekassy utvecklat en ny metod för att ställa diagnos, oberoende av bakteriens serotyp. Det hjälper till snabbare spårning av smittkällan vid epidemiutbrott av EHEC. Det pågår även forskning för att utveckla ett vaccin som innehåller antikroppar för att utveckla immunförsvaret. Studier vid Sveriges veterinärmedicinska anstalt (SVA) har visat att EHEC-bakterierna som orsakar infektion, främst påträffas i vissa områden i Sverige, och då längs Sydskusten och i Västergötland. SVA menar att åtgärder borde riktas mot de områdena för att kontrollera spridning, och minska antalet sjukdomsfall.

Det finns fortfarande hinder för framgångsrik behandling av HUS-associerade sjukdomar. Det krävs exempelvis olika förebyggande strateginivåer, samt behandlingar vid de allvarligaste komplikationerna i samband med EHEC-infektion, det vill säga njursvikt och centrala nervkomplikationer.

Sammanfattningsvis kan jag konstatera att det är motiverat att rikta kontrollprogram mot just de områden i landet som är mest utsatta. Det är även viktigt att kunna utveckla specifika behandlingsmetoder, som kan hämma bakteriens överlevnad i livsmedel, genom exempelvis användning av bakteriofager som ett naturligt konserveringsmedel. Med en bättre förståelse för VTEC, och ny teknologi, kommer det att bli lättare att förebygga utbrott, och även finnas bättre behandlingsmetoder.

Tack

Tack till handledaren och återkopplar gruppen.

Referenser

- Allocati N, Masulli M, Alexeyev MF, Di Ilio C. 2013. Escherichia coli in Europe: An International Journal of Environmental Research and Public Health **10**: 6235–6254.
- Aspán A, Eriksson E. 2010. Verotoxigenic Escherichia coli O157:H7 from Swedish cattle; study. BMC Veterinary Research **6**: 7
- Berin MC, Darfeuille-Michaud A, Egan LJ, Miyamoto Y, Kagnoff MF. 2002. Role of EHEC O157:H7 virulence factors in the activation of intestinal epithelial cell NF- κ B and MA kinase pathways and the upregulated expression of interleukin 8. Cellular Microbiology **4**: 635–648.
- Beumer RR, de Vries J, Rombouts FM. 1992. Campylobacter jejuni non-culturable coccoid cells. International Journal of Food Microbiology **15**: 153–163.
- Bielaszewska M, Aldick T, Bauwens A, Karch H. 2014. Hemolysin of enterohemorrhagic Escherichia coli: Structure, transport, biological activity and putative role in virulence. International Journal of Medical Microbiology **304**: 521–529.
- Cassin MH, Lammerding AM, Todd ECD, Ross W, McColl RS. 1998. Quantitative risk assessment for Escherichia coli O157:H7 in ground beef hamburgers. International Journal of Food Microbiology **41**: 21–44
- Cepeda-Molero M, Berger CN, Walsham ADS, Ellis SJ, Wemyss-Holden S, Schüller S, Frankel G, Fernández LÁ. 2017. Attaching and effacing (A/E) lesion formation by enteropathogenic

- E. coli* on human intestinal mucosa is dependent on non-LEE effectors. *PLOS Pathogens* **13**: e1006706.
- Dalmasso M, Jordan K. 2014. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis of *Listeria monocytogenes*. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, NJ) **1157**: 63–72.
- Donelli G, Matarrese P, Fiorentini C, Dainelli B, Taraborelli T, Di Campli E, Di Bartolomeo S, Cellini L. 1998. The effect of oxygen on the growth and cell morphology of *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiology Letters* **168**: 9–15.
- Duffy G, Burgess CM, Bolton DJ. 2014. A review of factors that affect transmission and survival of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in the European farm to fork beef chain. *Meat Science* **97**: 375–38
- Duffy G, Burgess CM, Bolton DJ. 2014. A review of factors that affect transmission and survival of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in the European farm to fork beef chain. *Meat Science* **97**: 375–383.
- Ellingson JLE, Koziczkowski JJ, Anderson JL, Carlson SA, Sharma VK. 2005. Rapid PCR detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) in bovine food products and feces. *Molecular and Cellular Probes* **19**: 213–217.
- Garofolo G. 2015. Multiple-locus variable-number tandem repeat (VNTR) analysis (MLVA) using multiplex PCR and multicolor capillary electrophoresis: application to the genotyping of *Brucella* species. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, NJ) **1247**: 335–347.
- Gunn GJ, McKendrick IJ, Ternent HE, Thomson-Carter F, Foster G, Synge BA. 2007. An investigation of factors associated with the prevalence of verocytotoxin producing *Escherichia coli* O157 shedding in Scottish beef cattle. *The Veterinary Journal* **174**: 554–564.
- Hufnagel DA, Depas WH, Chapman MR. 2015. The Biology of the *Escherichia coli* Extracellular Matrix. *Microbiology Spectrum*, doi 10.1128/microbiolspec.MB-00142014
- Hussein HS, Sakuma T. 2005. Invited Review: Prevalence of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Dairy Cattle and Their Products. *Journal of Dairy Science* **88**: 450–465.
- James CE, Stanley KN, Allison HE, Flint HJ, Stewart CS, Sharp RJ, Saunders JR, McCarthy AJ. 2001. Lytic and Lysogenic Infection of Diverse *Escherichia coli* and *Shigella* Strains with a Verocytotoxigenic Bacteriophage. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 4335–4337.
- Johnson TJ, Nolan LK. 2009. Pathogenomics of the Virulence Plasmids of *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **73**: 750–774.
- Karmali MA, Gannon V, Sargeant JM. 2010. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Veterinary Microbiology* **140**: 360–370.
- Koohmaraie M, Arthur TM, Bosilevac JM, Guerini M, Shackelford SD, Wheeler TL. 2005. Post-harvest interventions to reduce/eliminate pathogens in beef. *Meat Science* **71**: 79–91.
- Kossow A, Zhang W, Bielaszewska M, Rhode S, Hansen K, Fruth A, Rüter C, Karch H, Mellmann A. 2016. Molecular Characterization of Human Atypical Sorbitol-Fermenting Enteropathogenic *Escherichia coli* O157 Reveals High Diversity. *Journal of Clinical Microbiology* **54**: 1357–1363.
- Lee H, Ku H-J, Lee D-H, Kim Y-T, Shin H, Ryu S, Lee J-H. 2016. Characterization and Genomic Study of the Novel Bacteriophage HY01 Infecting Both *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella flexneri*: Potential as a Biocontrol Agent in Food. *ONE* **11**: e0168985.
- Lessard JC. 2013. Chapter Eleven - Growth Media for *E. coli*. I: Lorsch J (red.). *Methods in Enzymology*, s. 181–189. Academic Press,
- Lundborg M, Modhukur V, Widmalm G. 2010. Glycosyltransferase functions of *E. coli* O-antigens. *Glycobiology* **20**: 366–368.
- Mainil J. 2013. *Escherichia coli* virulence factors. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **152**: 2–12.
- Mora A, Blanco JE, Blanco M, Alonso MP, Dhahi G, Echeita A, González EA, Bernárdez MI, Blanco J. 2005. Antimicrobial resistance of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia*

- coli O157:H7 and non-O157 strains isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain. *Research in Microbiology* **156**: 793–806.
- Morita M, Tanji Y, Mizoguchi K, Akitsu T, Kijima N, Unno H. 2002. Characterization of a virulent bacteriophage specific for *Escherichia coli* O157:H7 and analysis of its cellular receptor and two tail fiber genes. *FEMS Microbiology Letters* **211**: 77–83.
- Nataro JP, Kaper JB. 1998b. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* **11**: 142–201.
- Nyambe S, Burgess C, Whyte P, Bolton D. 2017. An investigation of vtx2 bacteriophage transduction to different *Escherichia coli* patho-groups in food matrices and nutrient broth. *Food Microbiology* **68**: 1–6.
- Pennington H. 2010. *Escherichia coli* O157. *The Lancet* **376**: 1428–1435.
- Potter AA, Klashinsky S, Li Y, Frey E, Townsend H, Rogan D, Erickson G, Hinkley S, Klopfenstein T, Moxley RA, Smith DR, Finlay BB. 2004. Decreased shedding of *Escherichia coli* O157:H7 by cattle following vaccination with type III secreted proteins. *Vaccine* **22**: 362–369.
- Rasooly R, Do PM. 2010. Shiga toxin Stx2 is heat-stable and not inactivated by pasteurization. *International Journal of Food Microbiology* **136**: 290–294.
- Rahal EA, Kazzi N, Nassar FJ, Matar GM. 2012. *Escherichia coli* O157:H7—Clinical aspects and novel treatment approaches. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, doi 10.3389/fcimb.2012.00138.
- Saeedi P, Yazdanparast M, Behzadi E, Salmanian AH, Mousavi SL, Nazarian S, Amani J. 2017. A review on strategies for decreasing *E. coli* O157:H7 risk in animals. *Microbial Pathogenesis* **103**: 186–195.
- Stentz R, Weintraub A, Widmalm G. 2006. The structures of *Escherichia coli* polysaccharide antigens. *FEMS Microbiology Reviews* **30**: 382–403.
- Tarr PI. 1995. *Escherichia coli* O157:H7: Clinical, Diagnostic, and Epidemiological Aspects of Human Infection. *Clinical Infectious Diseases* **20**: 1–8.
- Tesh VL, Burris JA, Owens JW, Gordon VM, Wadolowski EA, O'Brien AD, Samuel JE. 1993. Comparison of the relative toxicities of Shiga-like toxins type I and type II for mice. *Infection and Immunity* **61**: 3392–3402.
- Tyler JS, Beeri K, Reynolds JL, Alteri CJ, Skinner KG, Friedman JH, Eaton KA, Friedman DI. 2013. Prophage Induction Is Enhanced and Required for Renal Disease and Lethality in an EHEC Mouse Model. *PLOS Pathogens* **9**: e1003236.
- Läkartidningen. WWW-dokument:
<http://www.lakartidningen.se/Functions/OldArticleView.aspx?articleId=16614>. Hammad 2017-a-11-1
- Doctor24 |. WWW-dokument: <http://www.doctor24.se/>. Hämtad 2017-c-11-24.