



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap**
Institutionen för kliniska vetenskaper

Riskfaktorer som påverkar förekomsten av VTEC O157:H7 i svenska mjölkbesättningar

Antonia Skog Candemo

*Uppsala
2018*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2018:39*

Riskfaktorer som påverkar förekomsten av VTEC O157:H7 i svenska mjölkbesättningar

Risk factors for presence of VTEC O157:H7 in Swedish dairy herds

Antonia Skog Candemo

Handledare: Ulf Emanuelson, Institutionen för kliniska vetenskaper

Biträdande handledare: Lena-Mari Tamminen, Institutionen för kliniska vetenskaper

Examinator: Karin Alvåsen, Institutionen för kliniska vetenskaper

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0830

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2018

Delnummer i serie: Examensarbete 2018:39

ISSN: 1652-8697

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: VTEC O157:H7, Mjölkbesättningar, Riskfaktorer, Gödsel

Key words: VTEC O157:H7, Dairy Herds, Risk Factors, Manure

Sveriges lantbruksuniversitet

Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Institutionen för kliniska vetenskaper

SAMMANFATTNING

Verotoxinproducerande *Esherichia coli* (VTEC) O157:H7 uppmärksammades första gången 1982 i samband med ett stort utbrott av matförgiftning orsakat av otillräckligt upphettad nötfärs. Även andra råvaror har orsakat utbrott men i dessa fall misstänks det ha skett korskontamination med nötkött eller kontamination av gödsel från nötkreatur. Det har även förekommit att människor har smittats via direktkontakt med nötkreatur. Symtom på infektion med VTEC O157:H7 på människa inkluderar buksmärta, diarré, blodig diarré, illamående, kräkningar och feber samt kan orsaka hemolytic-uremic syndrome (HUS). Till skillnad från hos människor kan bakterien finnas i tarmfloran på nötkreatur utan att individen visar några sjukdomstecken och även uppförökas och utsöndras med friska individers avföring. Att kontrollera VTEC O157:H7 redan på besättningsnivå kan därför ge stora fördelar för folkhälsan utan alltför stora kostnader. För att detta ska vara möjligt måste riskfaktorer först identifieras och utvärderas.

I den här studien sammanställdes och analyserades miljö- och gödselprover från 29 mjölkgårdar på Öland tagna 2014–2016 gällande VTEC O157:H7 med syftet att undersöka riskfaktorer på besättningsnivå. Miljöprover samlades in från kalvar (0-4 månader) och ungdjur (4-12 månader) separat. Endast två av gårdarna var negativa vid samtliga provtagningar. Tretton gårdar hade enstaka positiva resultat och resterande 14 gårdar klassades som återkommande positiva. Flera tänkbara riskfaktorer undersöktes. Inga signifikanta samband hittades mellan besättningsstatus och besättningsstorlek eller närhet till andra gårdar. Utifrån svaren på en enkät som skickats ut hösten 2014 kunde fler riskfaktorer undersökas, men inte heller här framkom några statistiskt signifikanta samband. De mest intressanta resultaten var delade djurtransporter och häst på gården som hade odds ratio (OR) 6,0 för att vara en gård som klassats som återkommande positiv, men sambandet var inte statistiskt signifikant ($P=0,33$). Att ha katt på gården var den riskfaktor som hade lägst P-värde med OR 3,89, dock ej statistiskt signifikant ($P=0,23$). Problem med skadedjur hade också ett relativt lågt P-värde med OR 3,2, men denna association var inte heller statistiskt signifikant ($P=0,39$).

Resultaten från gödselproverna visade en tydlig årstidsvariation gällande oddsen att vara positiv på gödselprover för en gård som testats positivt för VTEC O157:H7 i miljön. Under höst och vinter var OR 263,8 (P -värde $<0,001$) och under sommar och vår var OR 2,5 (P -värde $>0,999$). De två strata jämfördes med Mantel-Haenszel chi square test och visade att det föreligger en faktisk skillnad i odds ratio mellan olika tider på året (P -värde $<0,001$). Däremot hittades ingen skillnad gällande risken att vara positiv på gödselproverna beroende på vilken ålderskategori som var positiv på miljöproverna.

SUMMARY

The first major outbreak of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) O157:H7 occurred in 1982 and was caused by undercooked ground beef. Food items of non-bovine origin also have caused outbreaks of human infection, but in those cases contamination of beef or bovine feces is believed to have occurred. Symptoms of human infection is abdominal pain, diarrhea, bloody diarrhea, nausea, vomiting, fever and hemolytic-uremic syndrome (HUS). The bacteria can exist in the gastro-intestinal tract of cattle without causing disease and healthy cattle can shed the bacteria in their feces. To control VTEC O157:H7 on farm level therefore can be beneficial for public health, but possible risk factors must first be identified and evaluated.

Several environmental and manure samples was taken from 29 dairy farms on Öland during 2014-2016 and tested for VTEC O157:H7, were studied with the aim to evaluate risk factors on farm level. The environmental samples were gathered for calves (0-4 months old) and young animals (4-12 months old) separately. Two of the farms had only negative samples. Thirteen of the farms had occasional positive samples and fourteen farms had multiple positive results. Several possible risk factors were analyzed. There were no statistically significant results when herd size and other farms within 1 kilometer was investigated. A questionnaire was sent to the farmers during the fall 2014 and the answers was used to evaluate other risk factors. Of the risk factors evaluated shared animal transports and having horses on the farm had an odds ratio 6 for being a farm being recurrently positive, but the results were not statistically significant ($P=0,33$). The risk factor that showed the lowest P-value was having a cat on the farm and the odds ratio was 3.89 ($P=0,23$), to have problems with pests on the farm also showed a relatively low P-value with odds ratio 3.2, but none of these results were statistically significant ($P=0,39$).

The results from the manure samples show a difference between the seasons on the risk of having manure tested positive for VTEC O157:H7 if the farm was tested positive in the environment. During fall and winter the odds ratio were 263.8 ($P\text{-value} < 0,001$) and during spring and summer the odds ratio were 2.5 ($P\text{-value} > 0,999$). The result of Mantel-Haenszel chi square test showed that there is a significant difference in odds ratio between the different seasons ($P\text{-value} < 0,001$). No difference was found on the risk of being positive on manure samples depending on which age category was positive on the environmental samples.

INNEHÅLL

Inledning.....	1
Litteraturoversikt.....	2
Riskfaktorer på besättningsnivå.....	2
Smittspridning	2
Utfodringens betydelse.....	3
Årstidsvariation.....	3
Utsöndringsmönster och sjukdomstecken	3
Individuell utsöndring	4
Avvänjning och utfodring av kalvar	4
VTEC O157:H7 i Sverige	5
Provtagning av besättningar.....	6
Gödsel	6
Överlevnadstid	6
Gödsel som smittkälla	7
Material och metoder.....	8
Provinsamling.....	8
Mikrobiologisk analys.....	8
Datahantering	8
Statistisk analys	8
Resultat.....	10
Miljöprovtagning	10
Riskfaktorer	11
Gödselprovtagning.....	14
Diskussion	15
Gödsel	15
Riskfaktorer	15
Svagheter och utveckling av framtida studier.....	16
Referenser.....	19

INLEDNING

Verotoxinproducerande *Esherichia coli* (VTEC) O157:H7 uppmärksammades första gången i samband med ett stort utbrott av matförgiftning 1982 och har sedan dess hittats i samband med flera stora utbrott (Armstrong *et al.*, 1996). Symtom på infektion med VTEC O157:H7 på människa inkluderar buksmärta, diarré, blodig diarré, illamående, kräkningar och feber samt kan orsaka hemolytic-uremic syndrome (HUS) (Ackers *et al.*, 1998) vilket innebär hemolytisk anemi, trombocytopeni och njursvikt (Karmali, 1989).

Det första stora utbrottet 1982 samt flera andra utbrott har orsakats av otillräckligt upphettad nötfärs (Armstrong *et al.*, 1996; Tuttle *et al.*, 1999). Även andra råvaror har orsakat utbrott som exempelvis sallad (Armstrong *et al.*, 1996; Ackers *et al.*, 1998), salami, potatis, äppelcidar, majonnäs, nätmelon, opastöriserad mjölk och vatten. I dessa fall misstänks det ha skett korskontamination med nötkött eller kontamination av gödsel från nötkreatur. Det har även förekommit att människor har smittats via direktkontakt med nötkreatur (Armstrong *et al.*, 1996).

Till skillnad från hos människor kan bakterien finnas i tarmfloran på nötkreatur utan att individen visar några sjukdomstecken (Armstrong *et al.*, 1996; Mechie *et al.*, 1997; Hancock *et al.*, 2001) och även uppföras och utsöndras med friska individers avföring (Cray Jr. & Moon 1995). Grödor kan kontamineras med VTEC O157:H7 vid användning av kontaminerat gödsel eller vatten (Solomon *et al.*, 2002). Att kontrollera VTEC O157:H7 redan på besättningsnivå kan därför ge stora fördelar för folkhälsan utan alltför stora kostnader. För att detta ska vara möjligt måste riskfaktorer först identifieras och utvärderas (Herriott *et al.*, 1998).

I den här studien sammanställdes och analyserades prover från Öland tagna 2014–2016 gällande VTEC O157:H7 med syftet att undersöka riskfaktorer på besättningsnivå. De riskfaktorer som analyserades är besättningsstorlek, närhet till andra gårdar samt andra djur och rutiner på gården. Studien syftar även att undersöka risken att vara positiv på gödselprover för testpositiva gårdar samt undersöka riskfaktorer för detta som årstid och ålder på testpositiva djur.

LITTERATURÖVERSIKT

Risikfaktorer på besättningsnivå

Smittspridning

Nötkreatur är den huvudsakliga reservoaren för VTEC O157:H7 men även andra djur kan vara bärare och exempelvis får kan utsöndra bakterien i samma utsträckning som nötkreatur. Därför är det troligt att vilda djur och produktionsdjur annat än nöt kan spela en roll i smittöverföringen till en nötkreatursbesättning (Chase-Topping *et al.*, 2008). Wetzel & Le Juene (2006) hittade genetiskt lika isolat av bakterien i avföringen från vilda fåglar jämfört de isolat som hittats på nötkreaturen. Deras resultat visar att även vilda fåglar kan bidra till smittöverföring mellan besättningar. Även människor, fordon och vilda djur tros kunna sprida smittan mellan gårdar. Att ha geografiskt närliggande gårdar har identifierats som riskfaktor för VTEC O157:H7 (Wetzel & LeJuene, 2006). Detta bekräftas av Widgren *et al.* (2015) vars resultat som visar att en positiv grannbesättning ökar oddsen att testa positivt för en gård som tidigare varit negativ, i båda dessa studier var bakterierna som hittats på närliggande gårdar genetiskt oskiljaktiga med de analyser som användes (MLWA-analys och PFGE-analys) (Widgren *et al.*, 2015; Wetzel & LeJuene, 2006).

Bakterien har hittats på människa, nötkreatur, får, hjort, hund, fågel, häst, flugor m.fl. (Hancock *et al.*, 2001). I studien av Schouten *et al.* (2005) togs prover från andra djur på en gård varit positiv vid flera tillfällen för att undersöka risken för smittöverföring mellan nötkreatur och andra arter. Två positiva prover togs från hund och hönsfåglar samt ett positivt från häst. Alla prover från får, getter, kaniner, flugor/maskar, råttor, möss, katt, igelkott och människa (bonden) var negativa. Samma sak gjordes i en studie av Rhan *et al.* (1997), då togs prover från katter, gnagare, vilda fåglar och flugor på en positiv gård, samtliga negativa för VTEC O157:H7.

Återkommande smitta i en besättning skulle alltså kunna bero på att bakterien finns persisterande hos nötkreatur alternativt att det sker nyintroduktion eller återsmitta av bakterien från mellanvärdar eller miljön (Schouten *et al.*, 2005). Bakterien kan överleva i dyggt 6 månader i vattenkoppar och sedan infektera nötkreatur vilket betyder att även vattenkoppar kan fungera som en reservoar i stallmiljön (Le Jeune *et al.*, 2001). Även om VTEC O157:H7 kan överleva länge i miljön (Kudva *et al.*, 1998) är nötkreatur en bättre reservoar varför det föreslagits att interventioner bör fokuseras på nötkreaturen (Rhan *et al.* 1997). I en studie av Schouten *et al.* (2005) hittades samma isolat av bakterien under båda sommarsäsongerna, med negativa provtagningar mellan, vilket indikerar att VTEC O157:H7 kan finnas kvar i besättningen mellan säsonger. Författarna diskuterar att eftersom det isolatet i större utsträckning hittades i miljöprover kan det ha en ökad förmåga att överleva i miljön jämfört med andra isolat.

För att hitta förebyggande åtgärder på besättningsnivå måste först rutiner som är associerade med en ökad risk hittas (Herriott *et al.*, 1998). Att enbart rikta in sig på testpositiva individer är troligtvis inte tillräckligt på grund av det intermittenta utsöndringsmönstret (Smith *et al.*, 2010). Det går att minska smittrycket av VTEC O157:H7 på gruppnivå genom olika skötsel faktorer som exempelvis att undvika omgrupperingar, hålla djuren rena, torrt underlag och desinficerande stövelbad (Ellis-Iversen *et al.*, 2008). Nielsen *et al.* (2002) såg däremot inga samband med mellan typ av inhysningssystem eller strömmaterial och förekomst av VTEC O157:H7 i deras studie.

I testpositiva besättningar ökade inte introduktion av nya djur risken att testa positivt även i efterföljande provtagning. Om besättningen däremot tidigare testat negativt sågs en signifikant ökad risk att hitta VTEC O157:H7 vid introduktion av nya djur. (Widgren *et al.*, 2015). Även Nielsen *et al.* (2002) identifierade inköp av djur som en riskfaktor. Detta innebär att besättningar utan rekrytering av djur har större sannolikhet att förbli testnegativa vilket även gynnar andra besättningar i området. I stället för att varje besättning jobbar enskilt bör kontrollåtgärder därför gälla alla besättningar inom ett område (Widgren *et al.*, 2015).

För besättningar som inte tog in några nya djur var ett tidigare positivt testresultat det som i störst utsträckning påverkade oddsen att åter testa positivt. Även besättningsstorlek identifierades som riskfaktor (Widgren *et al.*, 2015), detta resultat skiljer sig från Nielsen *et al.* (2002) studie där storlek på besättning inte var en riskfaktor för VTEC O157:H7.

Utfodringens betydelse

Flera olika utfodringsrutiner har setts vara associerade med ökad förekomst av VTEC O157:H7 hos nötkreatur. Baserat på detta samt utfodringens effekt på tarmfloran bedöms det möjligt att utfodringen kan påverka förekomsten av VTEC O157:H7, men publicerade studier är inte samstämmiga i sina resultat gällande vilka faktorer i fodret som påverkar. För att säkert veta krävs ordentligt designade studier där endast specifika faktorer i utfodringen skiljer grupperna åt (Herriott *et al.*, 1998; Dargatz *et al.*, 1997; Garber *et al.*, 1995; Hanckock *et al.*, 1994). Mechie *et al.* (1997) såg ökad utsöndring hos mjölkorna i samband med kalvning samt 7 månader efter kalvning, båda dessa tillfällen sammanföll med förändringar i utfodringen vilket skulle kunna vara orsaken.

Mjölkkobesättningar tenderar att vara positiva för VTEC O157:H7 under en längre period än dikobesättningar vilket innebär att olika åtgärder kan vara nödvändiga i olika typer av produktion (Widgren *et al.*, 2015). Smittade mjölkkor hade en högre daglig mjölkproduktion innan de testades positivt än kor som testades negativt. Detta tyder på att kor med en hög produktion antingen är mer mottagliga för smitta av VTEC O157:H7 eller på att det ökade foder- och vattenintaget hos höglakterande kor ger en ökad risk för intag av bakterien (Schouten *et al.* 2005) eftersom att bakterien kan finnas både i dricksvattnet (Armstrong *et al.*, 1996; Hancock *et al.*, 2001) och i fodret (Hancock *et al.*, 2001).

Årstidsvariation

Det förekommer en tydlig säsongsvariation i påvisandet av *E. coli* med en topp sommar och tidig höst (Hancock *et al.*, 2001). Detta bekräftar av Widgren *et al.* (2015) svenska studie där ett ökat odds sågs för att hitta VTEC O157:H7 i besättningen under årets tredje och fjärde kvartal jämfört med årets första kvartal. Även Mechie *et al.* (1997) hade positiva provresultat endast mellan maj och november.

Schouten *et al.* (2005) studerade en besättning i Nederländerna från juli 1999 till november 2000. I den studien hittade man positiva prover enbart under perioden maj-oktober. Inga kor var positiva under båda utsöndringssäsongerna vilket författarna tolkar som att korna kan utveckla någon form av immunitet mot smittämnet. Detta talar emot Cray Jr. & Moon (1995) resultat som visat att individer som blivit testnegativa kan återsmittas med samma isolat av VTEC O157:H7.

Utsöndringsmönster och sjukdomstecken

Förekomsten av VTEC O157:H7 går i skov (Rhan *et al.*, 1997) och individer kan ha intermittent utsöndring (Smith *et al.*, 2010). Det är också visat att individer som blivit testnegativa kan återsmittas med samma isolat av VTEC O157:H7 (Cray Jr. & Moon, 1995).

Det är stor variation i proportionen utsöndrande individer, både mellan besättningar men även inom samma besättning över tid (Smith *et al.*, 2010). Det är även stor skillnad i mängden utsöndrade bakterier och i duration av utsöndringen mellan infekterade individer, även inom samma ålderskategori (Cray Jr. & Moon 1995). Hos persistent infekterade individer återfinns bakterien i rectoanal junction (RAJ) men inte övriga gastrointestinalkanalen (Lim *et al.*, 2007). Superutsöndrare kallas individer som har hög utsöndring och hos dessa individer har kolonisation av distala rektum skett. Dessa individer kan utsöndra bakterien i veckor till månader. Detta skiljer dem från det som

kallas passiva utsöndrare, som endast utsöndrar bakterien under några dagar, och där ingen kolonisation verkar ske (Lim, *et al.*, 2007; Chase-Topping *et al.*, 2008). Vid kolonisation uppförökas smittämnet vilket ger fler bakterier i avföringen (Chase-Topping *et al.*, 2008).

Nötkreatur kan vara testpositiva för VTEC O157:H7 utan att visa några kliniska sjukdomstecken (Mechie *et al.*, 1997). Vid obduktion av persistent infekterade individer hittades inte bakterien i lever, galla, mjälte, njure eller jejunum vilket bekräftar bilden av att VTEC O157:H7 inte orsakar sjukdom hos nötkreatur (Cray Jr. & Moon 1995).

Individuell utsöndring

Prevalensen av VTEC O157:H7 är högre hos unga individer (Hancock *et al.*, 2001; Nielsen *et al.*, 2002) och kalvar utsöndrar större mängd bakterier än vuxna nötkreatur trots den större mängden träck som produceras hos vuxna individer (Cray Jr. & Moon 1995).

Hull, dehydreringsgrad och avföringens konsistens hade inte ett signifikant samband med VTEC O157:H7 utsöndring på kalvar. Detta gör att isolering av sjuka djur inte kan användas som strategi för att motverka smittöverföring mellan kalvar (Garber *et al.*, 1995). Inte heller kalvarnas ras, kön eller viktuppgång har visats ha något signifikant samband med utsöndringen (Mir *et al.*, 2016).

Cray Jr. & Moon (1995) inokulerade 17 stycken kalvar med VTEC O157:H7, av dessa fick 4 stycken diarré men orsaken till detta undersöktes inte. Samtliga djur var positiva för VTEC O157:H7 vid provtagningen efter inokulation. Kang *et al.* (2004) jämförde i sin studie kalvar med och utan diarré. I gruppen med diarré testade 9,8% positivt för VTEC O157:H7 medan i gruppen utan diarré var endast 2,8% positiva. Hos kalvar yngre än två veckor hittades inte bakterien hos individer utan diarré, medan hos äldre kalvar hittades bakterien i lika stor utsträckning oavsett om kalvarna hade diarré eller inte. Åldern på kalvarna tycks även påverka graden av sjukdom, hos kalvar äldre än 8 veckor syntes endast milda symtom medan tre av de yngre kalvarna hade dysenteri-liknande symtombild. Inga kalvar negativa för VTEC O157:H7 visade dysenterisymtom (Kang *et al.*, 2014)

Avvänjning och utfodring av kalvar

Avvänjning av kalvar var associerat med ökad utsöndring av VTEC O157:H7 i avföringen (Garber *et al.*, 1995). I Herriott *et al.* (1998) studie var prevalensen av VTEC O157:H7 högre hos kalvar som avvänjdes abrupt jämfört med kalvar som avvänjdes gradvis, vilket skulle kunna bero på en störning av tarmfloran i samband med foderbytet som underlättar kolonisation av exempelvis VTEC O157:H7 (Herriott *et al.*, 1998). Äldre klavar har en mer varierad mikroflora i tarmen vilket var associerat med minskad förekomst av VTEC O157:H7 (Mir *et al.*, 2016).

Kalvarna i en studie av Garber *et al.* (1995) hade tre gånger så stor sannolikhet att vara positiva för VTEC O157:H7 efter avvänjning än innan. Samma sak sågs i en studie av Fröhlich *et al.* (2009) där andelen kalvar som utsöndrade bakterien var lägre innan avvänjning, med en konstant ökande andel positiva kalvar fram till avvänjning (vecka 12). Andelen positiva kalvar var fortsatt hög efter avvänjning. I Mir *et al.* (2016) studie sågs däremot ingen signifikant ökad utsöndring av VTEC O157:H7 i samband med avvänjning hos köttkalvar som avvandes vid 6-8 månaders ålder och i samband med detta flyttades till bete. Detta tros bero på minskat smittryck av den utspädningseffekt som blir av minskad djurtäthet på betet, men skulle även kunna bero på ökad mängd egna antikroppar mot VTEC O157:H7 efter att mängden maternella antikroppar minskat (Mir *et al.*, 2016).

Kalvar serokonverterar mot verotoxin-1 (vtx1) långt efter att det maternella skyddet har försvunnit vilket ger en period med avsaknad av vtx1-specifika antikroppar. Infektion med VTEC har setts sammanfalla med denna period (Fröhlich *et al.*, 2009). Alla kor hade vtx1-antikroppar i serum och kolostrum, men saknade sedan vtx1-antikroppar i mjölken, vilket tyder på att det är råmjölken som ger

kalvarna skydd mot verotoxin. Kalvarna hade detekterbara nivåer vtx1-antikroppar i serum efter första råmjölksgivan. Tidpunkten för maximalt antal antikroppar varierade mellan individer men var hos de flesta som högst efter 24 timmar. Endast kalvar med höga antikroppstitrar initialt hade mätbara nivåer av vtx1-antikroppar efter 4 månader. Kalvarna fick mjölkersättning efter första veckan (Fröhlich *et al.*, 2009).

Skötsel faktorer som påverkar besättningens VTEC O157:H7 status var tidpunkt för gruppering av kalvar i förhållande till avvänjning, hur kalvarna hölls innan avvänjning samt hur utfodringsmaterial (spenar och hinkar) delades och rengjordes mellan kalvar innan avvänjning. Förekomsten av VTEC O157:H7 var större i besättningar där kalvar grupperas innan avvänjning jämfört med besättningar där kalvar grupperas i samband med eller efter avvänjning, oavsett ålder för avvänjning (Garber *et al.*, 1995).

Garber *et al.* (1995) hittade associationer mellan utsöndring av VTEC O157:H7 och utfodringsstrategi. Fler kalvar utsöndrade VTEC O157:H7 i de besättningar där kalvarna fick kraftfoder innan 5 dagars ålder än i besättningar där kraftfoder gavs först efter 5 dagars ålder. Besättningar som gav klöver och bomullsfrö till kvigor eller utfodrade sina kalvar med klöver var i större utsträckning negativa för VTEC O157:H7. Herriot *et al.* (1998) hittade högre prevalens hos kalvar som fick ett proteinrikt foder jämfört de kalvar som fick ett foder med mindre mängd protein.

VTEC O157:H7 i Sverige

Termen enterohemorragisk *E. coli* (EHEC) kan användas för att beskriva alla typer av *E. coli* som ger liknande kliniska symtom på människa samt har liknande epidemiologi och patologi (Karmali, 1989). EHEC är en anmälningspliktig sjukdom i Sverige och under 2016 skickades 376 isolat till Folkhälsomyndigheten för epidemiologisk typning. Av dessa tillhörde 53 serotypen O157:H7. Under första halvan av 2017 har 43 fall av infektion med VTEC O157:H7 rapporterats (Folkhälsomyndigheten, 2017). Undersökningar på slakterier har visat att drygt 3% av de nötkreatur som slaktas i Sverige är bärare av VTEC O157:H7 (SVA, 2016).

Genom att jämföra material från olika prevalensstudier kan man se ett dynamiskt förlopp hos VTEC O157:H7 på nötkreatur över tid. Senaste årtiondet har exempelvis en snabb spridning av den lågpatogena LII klonen skett (Söderlund *et al.*, 2014), men det har även skett en spridning av ett mer virulent och högpätagent isolat av VTEC O157:H7 inom Sverige. Detta isolat hittades tidigare endast i Halland men finns nu i hela södra och mellersta Sverige. Inga positiva prover har hittats i norra Sverige (Aspan & Eriksson 2010).

De isolat av VTEC O157:H7 som är kopplade till humanfall tillhör närbesläktade kluster, till skillnad från de som hittats i prevalensstudier på slakterier och i besättningar (Aspan & Eriksson 2010; Eriksson *et al.*, 2010), vilket betyder att om prevalensen är densamma kan en spridning av mindre patogena subtyper bland produktionsdjur, på bekostnad av mer patogena subtyper, ge en minskad sjukdomsborða i humanpopulationen. Prevalensen av vissa virulenta stammar är alltså viktigare än den totala prevalensen av VTEC O157:H7 (Söderlund *et al.*, 2014).

VTEC O157:H7 kan delas upp i nio olika klader beroende på fylogenetiskt släktskap (Manning *et al.*, 2008). I en svensk studie hittades VTEC O157:H7 klad 8 på 18 av 67 positiva besättningar. Majoriteten av dessa gårdar var belägna i Halland och Falköping. Den höga nivån av klad 8 i dessa områden är problematisk ur ett folkhälsoperspektiv (Widgren *et al.*, 2015) eftersom att klad 8 är överrepresenterat i humana sjukdomsfall och orsakar HUS i större utsträckning än andra typer av VTEC O157:H7 (Manning *et al.*, 2008; Söderlund *et al.*, 2014). Svenska fall av HUS kan ofta kopplas till samma genotyp av klad 8 som finns hos svenska idisslare. Alla humana sjukdomsfall orsakade av

VTEC O157:H7 i Sverige kan dock inte kopplas till svenska besättningar utan risk att smittas finns även vid utlandsvistelse (Söderlund *et al.*, 2014).

Provtagning av besättningar

Besättningsstatus kan inte bestämmas utifrån stickprov från några få individer (Garber *et al.*, 1995) eftersom ett djur som bär på, men inte utsöndrar, bakterien kan få ett negativt testresultat (Schouten *et al.*, 2005). Miljöprovtagning är däremot tillräckligt för att identifiera besättningar smittade med VTEC O157:H7 (Cobbaut *et al.*, 2008; Widgren *et al.*, 2013). Sockprov (miljöprov) hittade 20 av 24 positiva besättningar, vilket bekräftar att det är ett användbart verktyg för att identifiera besättningar smittade med VTEC O157:H7 (Widgren *et al.*, 2013). I en studie av Cobbaut *et al.*, (2008) hade fler sockprov ett positivt resultat än träckprover från djur i samma box (Cobbaut *et al.*, 2008). Kudva *et al.*, (1998) hittade inga positiva prover från det torra ytskiktet på gödselhögarna även när proverna från den fuktiga mitten av gödselhögen var positiva, vilket tyder på att provtagningsstrategin kan vara av betydelse för att hitta bakterien (Kudva *et al.*, 1998).

Trots att individer under 12 månaders ålder utsöndrar bakterien i större utsträckning än vuxna individer har besättningar hittats där endast vuxna kor varit positiva vid provtagning. Alla ålderskategorier bör därför provtas oavsett val provtagningsmetod (Widgren *et al.*, 2013). Upprepad provtagning kan användas för att identifiera kroniskt eller återkommande infekterade djur som bidrar till att infektionen kvarstår i vissa besättningar (Rhan *et al.*, 1997).

Gödsel

Överlevnadstid

Flera faktorer påverkar bakteriernas överlevnadstid i gödsel. Exempelvis temperatur, pH och gödselns komposition, som påverkas av utfodringsstrategin (Franz *et al.*, 2005). Kudva *et al.* (1998) såg i deras studie att VTEC O157:H7 överlevde bättre i gödsel från naturligt infekterade djur i gårdsmiljö jämfört gödsel som blivit inokulerad med VTEC O157:H7 och förvarats i laboratoriemiljö. Författarna har olika teorier kring vad detta bero kan på. Det kan vara så att de bakterier som passerat genom gastrointestinkanalen på nötkreatur är selekterade för överlevnad och anpassade till den miljön de befinner sig i, till skillnad från de isolat som används på laboratorium. Det kan också vara så att trots försök att efterlikna de naturliga förutsättningarna så är laboratoriemiljön inte optimal för bakterierna (Kudva *et al.*, 1998).

Kudva *et al.* (1998) visade att VTEC O157:H7 kan överleva i mer än ett år i fårgödsel under förutsättningar som liknar de på en fårgård. Bakterien överlevde 47 dagar i nötgödsel (Kudva *et al.*, 1998). Nicholson *et al.* (2005) studie visade att VTEC O157:H7 kan överleva i flytgödsel och smutsigt vatten i upp till tre månader. Överlevnadstiden i gödselstackar där temperaturen uppgår till över 55°C var däremot överlevnadstiden betydligt kortare (Nicholson *et al.*, 2005).

VTEC O157:H7 har hittats i jorden ca en månad efter att gödseln spridits på åkrar och betesmarker (Nicholson *et al.*, 2005). VTEC O157:H7 har också isolerats från gödselspridare vilket kan innebära att bakterien sprids till åkrar och betesmarker och därmed finns kvar på gården eller sprids till andra närliggande gårdar (Schouten *et al.* 2005).

Mängden VTEC O157:H7 sjönk snabbare i gödsel från en fiberrik utfodring (högre pH och högre fiberandel) än från en mer lättsmält diet (lägre pH och lägre fiberandel). Mjölkkor utfodras ofta med kraftfoder för att täcka deras höga energibehov men en utfodringsstrategi med mer fibrer och mindre

stärkelse kan ge kortare överlevnadstid och därmed lägre risk för spridning av VTEC O157:H7 till människa via odlade livsmedel (Franz *et al.*, 2005).

Gödsel som smittkälla

Infektionsdosen för VTEC O157:H7 för människa är lägre än 700 organismer (Tuttle *et al.*, 1999), kanske till och med lägre än 50 organismer (Armstrong *et al.*, 1996). På grund av den låga infektionsdosen kan även låga nivåer av kontamination innebära en hälsorisk för människor (Solomon *et al.*, 2002). E. coli bakterier kan förflytta sig från växtens rötter till de ätbara bladen. Direktkontakt med kontamineringskällan är alltså inte nödvändig. Detta innebär också att bakterien finns under ytan och därför inte är känslig för ytreningsåtgärder (Solomon *et al.*, 2002). Franz *et al.* (2005) undersökte detta under förhållanden som liknar de vid konventionell och ekologisk grönsaksodling och hittade då inga E. coli bakterier i salladsbladen som var odlade i jord gödslad med gödsel som var positiv för E. coli. Författarna tror att detta kan bero på de lägre koncentrationerna av bakterier som blir i jorden jämfört med i laboratoriemiljön i Solomon *et al.* (2002) studie.

MATERIAL OCH METODER

Provinsamling

Gård och Djurhälsan utförde under 2014–2016 ett flertal provtagningar av 29 nötkreatursbesättningar på Öland gällande VTEC O157:H7 i ett område där det i tidigare studier har varit en mycket hög prevalens jämfört med andra delar av ön. I det här området ligger många gårdar väldigt nära varandra. Deltagarna har rekryterats genom VÄXA Sverige och utgörs av ett urval av lantbrukare som ställt upp för provtagning. Provtagningen utfördes av personal från VÄXA Sverige i samband med besök på gården. Miljöprover samlades in från kalvar (upp till 4 månader) och ungdjur (4–12 månader) separat.

Miljöprover samlades i enlighet med beskrivningen av Widgren et al. (2013). Sockprov tas genom att gasbinda fuktad med fosfatbuffrad koksaltlösning lindas runt stövelskydden på vardera foten. Personen som bär stövlarna går sedan runt där djuren hålls och vrider under tiden på gasbindan så att hela ytan används. Gasbindorna placeras därefter i en plastpåse som försluts. Plockprov tas genom att färsk avföring plockas från 10-15 olika platser där djuren hålls och samlas i en plastburk. Minst ett sockprov och ett plockprov samlades från respektive ålderskategori. Vid gödselprovtagning har 3-15 prover tagits från olika gödselbrunnar på gården för att få så representativa prover som möjligt.

Mikrobiologisk analys

Proverna har sedan skickats med post till SVA där den bakteriologiska analysen utförts i enlighet med vad Widgren et al. (2013) beskriver. Ett prov, bestående av antingen 2 gasbindor för sockprov eller ca 25g avföring för plockprov, berikades i modifierad sojabuljong med tillsats av novobiocin (derivat med antibiotisk verkan) i $41.5^{\circ} \pm 5.5^{\circ}\text{C}$ i 18-24 timmar. Sedan utfördes automatisk immunomagnetisk separation (IMS) antingen direkt efter berikningen eller efter kylförvaring av buljongen i upp till 48 timmar. Paramagnetiska kulor täckta med VTEC O157:H7-antikroppar fångades upp med en automatisk uppsamlare. Kulorna spreds sedan över en MacConkey sorbitol-platta med tillsats av cefixime (antibiotika) och kaliumtellulit (selektivt medium). Plattorna inkuberades sedan i 18-24 timmar i $37^{\circ} \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ innan de lästes av med avseende på VTEC O157:H7. Fem misstänkta kolonier valdes ut för latex-agglutinationstest, vid positivt resultat på detta utfördes fler biokemiska tester för att konfirmera resultatet. Polymeraskedjereaktion (PCR) användes för att bekräfta närvaron av gener för verotoxin 1 och 2, intimin, EHEC-enterohemolysin och H7 (Widgren et al., 2013).

Datahantering

Proverna har sammanställts i Excel och gårdarna har utifrån resultaten delats in i tre grupper: helt negativa gårdar, gårdar med enstaka positiva prover och gårdar med återkommande positiva prover. Gårdar i den negativa gruppen hade enbart negativa resultat på samtliga miljö- och gödselprover. Gårdar i gruppen ”enstaka positiva” var positiva vid maximalt tre på varandra följande provtagningstillfällen, resterande prover från gården var negativa. De gårdar med fler positiva resultat placerades i gruppen ”återkommande positiva”. Även andelen positiva prover har sammanställts för respektive årstid, både uppdelat efter ålderskategori och totalt.

Information om besättningarna har sammanställts från en enkät som skickades ut till djurägarna via post under hösten 2014 och som besvarats av 23 av gårdarna. Informationen från enkäten handlade om andra djur på gården (hund, katt, häst, gris, fjäderfä eller får som separata frågor i enkäten), tillgång till vatten på bete, om seminör används, om maskiner, djurtransporter eller gödselspridare delas med annan gård samt om de upplever problem med skadedjur (vilt, fåglar, gnagare eller övrigt som separata frågor i enkäten). Uppgifter om antal nöt på gården och antal gårdar inom 1km har tagits fram för samtliga gårdar med hjälp av enkäten, VÄXA Sverige och Jordbruksverkets register över djurhållare.

Statistisk analys

Grupperna enstaka positiva och återkommande positiva har jämförts med hjälp av 2x2-tabeller. Odds ratios har sedan räknats ut för de olika exponeringarna (andra djur på gården, tillgång till vatten på bete, om seminör används, om maskiner, djurtransporter eller gödselspridare delas med annan gård samt skadedjur på gården) undantaget gris då inga av de besättningar som svarat på enkäten hade grisar på gården. Fischer's Exact test har använts för att undersöka statistisk signifikans (www.openepi.com). För numeriska värden (besättningsstorlek och antal gårdar inom 1km) har Kruskal-Wallis test (www.mathcracker.com) använts för att jämföra alla tre grupper samt Mann-Whitney U test (www.socscistatistics.com) för att jämföra grupperna enstaka positiva och återkommande positiva.

Resultaten från gödselproverna har sammanställts och delats in i positiva eller negativa gårdar (vid minst ett positivt miljöprov eller gödselprov klassas gården som positiv under gällande årstid) samt stratifierats utifrån vilken årstid provtagningen har skett (vår: mar-maj, sommar: jun-aug, höst: sep-nov och vinter: dec-feb). Resultat från ofullständiga provtagningstillfällena har uteslutits, med fullständig provtagning menas i detta fall miljöprover från både kalvar och ungdjur samt gödselprover. 2x2-tabeller för respektive årstid användes för att räkna ut odds ratio för risken att vara positiv på gödselprover för en gård som provtagits positivt i miljön. En "fudge factor" på 0,1 adderades för de strata där resultatet i någon cell var 0. För att få större grupper har två strata med halvårsvisa resultat (vår och sommar samt höst och vinter) analyserats med Fischer's Exact test (www.openepi.com) och de två strata har jämförts statistiskt med Mantel-Haenszels test (www.openepi.com).

RESULTAT

Miljöprovtagning

Resultatet från miljöprovtagningarna presenteras i figur 1; kalv och ungdjur redovisas separat för respektive årstid, men resultaten från gödselproverna visas ej i figuren. Endast två av gårdarna var negativa vid samtliga provtagningar. Tretton gårdar uppfyllde kriterierna för gruppen enstaka positiva och resterande 14 gårdar placerades i gruppen återkommande positiva (gård 16 testade vid två tillfällen positivt på gödsel trots negativa miljöprovtagningar, vilket gör att gården ej uppfyller kraven för gruppen enstaka positiva). Andelen positiva prover under respektive årstid, både uppdelat efter ålderskategori och totalt, redovisas i tabell 1.

	2014 Vår		Sommar		Höst		Vinter		Vår		Sommar		Höst		Vinter		Vår		Sommar		Höst			
	Kalv	Ung	Kalv	Ung	Kalv	Ung	Kalv	Ung	Kalv	Ung	Kalv	Ung	Kalv	Ung	Kalv	Ung	Kalv	Ung	Kalv	Ung	Kalv	Ung		
Negativa gårdar																								
Gård 1	N	N	E	N	E	N	N	N	N	N	N	E	N	N	E	E	E	E	E	E	E	E		
Gård 2	N	N	E	N	E	E	N	N	N	N	N	N	N	N	E	E	N	N	E	E	E	E		
Enstaka positiva																								
Gård 3	N	N	E	N	E	N	N	P	P	P	P	N	N	N	E	E	N	N	E	E	N	N		
Gård 4	E	N	E	P	E	P	E	E	E	E	E	E	N	N	E	E	N	N	E	E	E	E		
Gård 5	N	N	E	N	E	N	N	N	N	N	N	E	E	N	P	E	E	N	N	E	E	E	E	
Gård 6	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	E	E	N	N	E	E	E	E	E	
Gård 7	N	N	E	P	N	P	N	N	N	N	N	N	E	N	N	E	E	N	N	E	E	E	E	
Gård 8	P	N	E	N	E	P	N	N	N	N	N	E	E	N	N	E	E	N	N	E	E	E	E	
Gård 9	N	P	N	N	E	N	N	N	N	N	N	E	E	N	N	E	E	N	N	E	E	E	E	
Gård 10	N	N	E	N	E	N	P	P	P	P	N	N	N	N	E	E	N	N	E	E	E	E	E	
Gård 11	N	N	E	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	E	E	N	N	E	E	E	E	E	
Gård 12	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	E	N	E	E	E	E	E	E	E	E	E	
Gård 13	N	N	E	N	E	N	N	N	N	N	N	N	N	P	E	E	N	N	E	E	E	E	E	
Gård 14	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	E	E	N	N	E	E	E	E	E	
Gård 15	N	N	N	N	E	N	N	N	N	N	N	N	N	N	E	E	P	N	E	E	E	E	E	
Återkommande positiva																								
Gård 16	N	N	E	N	E	E	E	E	N	N	N	N	P	P	E	E	N	N	E	N	N	N	N	
Gård 17	N	N	N	P	P	P	P	P	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	
Gård 18	P	P	P	P	E	N	N	N	P	P	N	N	N	P	N	N	N	N	E	E	N	N	N	
Gård 19	N	P	E	N	E	P	P	P	P	P	E	E	E	P	E	E	P	P	E	E	E	E	E	
Gård 20	P	N	E	P	E	N	P	P	P	P	P	P	P	N	N	N	N	N	E	E	N	N	N	
Gård 21	N	N	E	N	P	P	N	P	N	E	N	P	N	N	N	P	N	N	E	E	N	N	N	
Gård 22	N	N	E	N	N	N	P	N	N	P	N	P	N	P	N	P	P	P	N	N	E	E	E	E
Gård 23	N	P	N	P	E	P	P	N	N	N	E	E	N	N	E	E	N	N	E	E	E	E	E	
Gård 24	N	P	N	N	E	N	N	P	N	N	E	E	N	N	E	E	N	E	E	E	E	E	E	
Gård 25	N	P	E	P	E	N	P	P	N	P	E	E	N	N	E	E	N	N	E	E	E	E	E	
Gård 26	P	N	E	P	P	P	N	P	N	P	P	N	P	P	E	E	N	P	E	E	N	N	N	
Gård 27	P	N	N	P	E	P	N	N	P	P	N	N	N	N	E	E	N	N	E	E	E	E	E	
Gård 28	P	N	E	N	E	N	P	P	P	P	P	N	P	P	E	E	P	N	E	E	N	N	N	
Gård 29	N	N	N	N	E	N	P	P	N	N	N	N	N	P	E	E	N	N	E	E	E	E	E	

Figur 1. Deskriptiv sammanställning av miljöprovtagningar för VTEC O157:H7 från 29 besättningar från år 2014–2016. P betyder minst ett positivt provresultat för gällande ålderskategori och årstid och N betyder att samtliga prover var negativa. E betyder ej provtaget.

Tabell 1. Antal och andel prover positiva för VTEC O157:H7 från 29 besättningar från år 2014–2016, uppdelat efter årstid samt ålderskategori.

Årstid	Vår		Sommar		Höst		Vinter	
Åldersgrupp	Kalv	Ung	Kalv	Ung	Kalv	Ung	Kalv	Ung
	16/81	18/80	5/31	15/48	7/42	18/62	10/31	14/31
	20%	23%	16%	31%	17%	29%	32%	45%
Totalt	34/161		20/79		25/104		24/62	
	21%		25%		24%		39%	

Risikfaktorer

Flera tänkbara riskfaktorer undersöktes. Inga signifikanta samband hittades mellan besättningsstatus och besättningsstorlek eller närhet till andra gårdar med Kruskal-Wallis test. Eftersom den negativa gruppen endast bestod av två gårdar exkluderades den gruppen och de två riskfaktorerna undersöktes istället med Mann-Whitney U test men inte heller det visade på något signifikant statistiskt samband. Medelvärde och standardavvikelse för respektive grupp gällande besättningsstorlek och antal gårdar inom 1km redovisas i tabell 2.

Tabell 2. Antal vuxna nötkreatur på gården och närhet till andra gårdar för de 29 gårdarna i studien redovisat för de tre grupperna separat. Grupperna är skapade utifrån besättningsstatus gällande VTEC O157:H7 under år 2014-2016. Å står för gruppen återkommande positiva, E för enstaka positiva och N för negativa.

	Grupp	Medelvärde	Standardavvikelse
Besättningsstorlek, vuxna nötkreatur	N	389	363
	E	311	186
	Å	362	144
Gårdar inom 1km	N	0	0
	E	1,23	1,48
	Å	0,64	0,74

Tabell 3. Riskfaktorer på besättningsnivå gällande att vara återkommande positiv för VTEC O157:H7. Odds att vara en gård i gruppen återkommande positiva istället för enstaka positiva för olika exponeringar.

	Odds ratio	Fischer's Exact p-värde
Hund	0,64	1,00
Katt	3,89	0,23
Får	3,43	0,72
Häst	6,00	0,33
Fjäderfä	0,28	0,59
Tillgång till vatten på bete	2,19	0,74
Seminör	2,33	0,61
Delade maskiner	1,56	1,00
Delade djurtransporter	6,00	0,33
Delade gödselspridare	3,56	0,59
Problem med skadedjur	3,20	0,39

Odds ratio och P-värde för resterande riskfaktorer redovisas i tabell 3. Av dessa visade delade djurtransporter och häst på gården intressanta resultat gällande att vara associerade med ökad risk för upprepade förekomst av VTEC O157:H7. Båda dessa faktorer hade OR 6, det var alltså 6 gånger större odds att tillhöra gruppen återkommande positiv än att tillhöra gruppen enstaka positiv om man hade häst på gården eller om man delade djurtransporter med annan gård, men sambandet var inte statistiskt signifikant. Att ha katt på gården var den riskfaktor som hade lägst P-värde med OR 3,89. Problem med skadedjur hade också ett relativt lågt P-värde med OR 3,2.

Tabell 4. Risken att vara positiv för VTEC O157:H7 på gödselprover för en besättning som testats positivt i miljön, redovisat halvårsvis. P betyder minst ett positivt resultat vid ett och samma provtagningsstillfälle. N betyder att samtliga prov vid det tillfället var negativa.

Höst vinter				Vår sommar			
Strata 1	Gödsel			Strata 2	Gödsel		
Miljö	P	N		Miljö	P	N	
P	12	16	28	P	1	11	12
N	0	35	35	N	1	27	28
	12	51	126		2	38	80

Odds ratio 263,8	Odds ratio 2,5
P-värde <0.001	P-värde >0.999

Gödselprovtagning

I tabell 4 presenteras resultaten från gödselprovtagningarna i 2x2 tabeller stratifierat halvårsvis. Odds ratio visas för båda strata separat tillsammans med P-värde uträknat med Fischer's Exact test, en "fudge factor" på 0,1 adderades för de strata där resultatet i någon cell var 0. Här ser man en tydlig årstidsvariation gällande oddsen att vara positiv på gödselprover för en gård som testats positivt för VTEC O157:H7 i miljön. Under höst och vinter var OR 263,8 (P-värde <0,001) och under sommar och vår var OR 2,5 (P-värde >0,999). Resultatet för Mantel-Haenszel chi square test var 19,54 (P-värde <0,001) vilket innebär att det finns en faktisk skillnad i odds ratio mellan olika tider på året. Däremot hittades ingen skillnad gällande risken att vara positiv på gödselprover beroende på vilken ålderskategori som var positiv på miljöproverna, detta skedde endast vid fyra tillfällen för respektive ålderskategori.

DISKUSSION

Risikfaktorer

Flera tänkbara riskfaktorer har undersökts i den här studien men inga statistiskt signifikanta samband har identifierats. Tidigare studier har identifierat närhet till andra gårdar som en riskfaktor. Widgren *et al.* (2015) använde avståndet 5 km som definition för närliggande gård. De gårdar som provtagits i den här studien ligger i princip alla inom 5 km radie varför det inte var ett lämpligt avstånd. Istället analyserades avståndet 1 km för att se om det är någon ökad risk att ha en gård väldigt nära sin egen. I den här studien identifierades inte andra gårdar inom avstånd på 1 km som en riskfaktor, men eftersom alla gårdar i den här studien ligger nära varandra kan det vara så att alla gårdar har en ökad risk att vara positiva för VTEC O157:H7. Det kan vara en av orsakerna till att många gårdar också var positiva vid något tillfälle under studien. Noterbart är dock att ingen av de två negativa gårdarna hade andra gårdar inom 1 km. Olika studier har haft olika resultat gällande besättningsstorlek som riskfaktor. I den här studien bestod den negativa gruppen endast av två gårdar, varav en väldigt stor och en väldigt liten. I de andra två grupperna var medelvärdet något högre för gruppen enstaka positiva, men det var ingen signifikant skillnad mellan grupperna.

Att ha häst på gården hade ett högt odds ratio för att vara en gård med återkommande positiva prover för VTEC O157:H7. Schouten *et al.* (2005) isolerade i sin studie VTEC O157:H7 från en häst på gården. I teorin innebär detta att hästar kan bidra till smittspridning både på gården men även mellan gårdar om hästen exempelvis rids i naturen och på betesmarker. Att ha får på gården identifierades däremot inte som en riskfaktor för att vara en gård som är återkommande positiv för VTEC O157:H7. Detta trots att får har visats kunna utsöndra bakterien i samma utsträckning som nötkreatur och därmed bör utgöra en riskfaktor. Bakterien har visats kunna överleva i över ett år i färgödsel vilket bör innebära att både sambete och växelbete kan utgöra en risk för smitta mellan arterna och därmed kvarstå i besättningen. I enkäten ställdes endast frågan om det fanns får på gården eller inte. Det kan finnas skillnad mellan gårdarna i studien som hur stor fårbesättning man har, hur fåren hålls samt vilka hygienbarriärer som finns när man förflyttar sig mellan de olika arterna.

Den riskfaktor som hade lägst P-värde, med odds ratio 3,89, var att ha katt på gården. Katter hålls ofta på ett sådant sätt att de får gå ute helt fritt vilket gör att de passivt skulle kunna sprida smitta mellan olika ålderskategorier av nötkreatur på gården. Även skadedjur hade ett lågt P-värde med OR 3,2. De skadedjur som efterfrågades i enkäten var vilt, fåglar, gnagare eller övrigt. Tidigare studier har visat att vilda fåglar kan sprida smitta mellan gårdar och resultaten i den här studien tyder alltså på samma sak även om resultaten ej är statistiskt signifikanta. Även andra skadedjur, exempelvis gnagare, kan precis som katter röra sig mellan olika ålderskategorier på gården och därmed sprida bakterien inom besättningen. Ligger det andra gårdar så pass nära som i den här studien finns en risk att även dessa djur kan sprida smittan mellan gårdar.

Att ha delade djurtransporter hade ett högt odds ratio för att vara en gård återkommande positiv för VTEC O157:H7. Det är tänkbart att transportbilen i sig kan föra över smitta mellan gårdar men det är även tänkbart att de som delar djurtransporter även delar andra maskiner och annan utrustning eller har ett generellt ökat riskbeteende. Att ha delade gödselspridare hade i den här studien också ett högt odds ratio, men även ett högt P-värde vilket gör att betydelsen som riskfaktor inte går att uttala sig om utifrån dessa resultat. Bakterien har i tidigare studier isolerats från gödselspridare vilket innebär att delade maskiner kan vara en orsak till smittspridning mellan gårdar. Därför bör detta undersökas i större studier för att öka chansen att få statistiskt signifikanta resultat.

Analysen av riskfaktorer har utgått från svaren i en enkät som skickades ut 2014, vilket var i början av provtagningsperioden. Alla gårdar i studien har inte svarat på enkäten vilket ger ett litet urval och därmed svårt att få statistiskt signifikanta resultat. Det ger dessutom upphov till flera tänkbara felkällor

som exempelvis selektionsbias där de gårdar som svarat kan vara de gårdar som också är mest motiverade till att blir fria från VTEC O157:H7 samt att mycket kan ha ändrats sedan 2014. På vissa frågor har antagits att samma sak gällde även för 2015 och 2016, exempelvis tillgång till vatten på bete, andra djur på gården och om man har delade transporter eller maskiner. Ett exempel på riskfaktor som exkluderades på grund av detta är inköp av djur. Frågan ställdes i enkäten om gården hade köpt in några nya djur under 2014, men information saknades om inköp av djur under de två efterföljande åren, inköp av djur har sedan tidigare visats vara en riskfaktor för VTEC O157:H7.

I den här studien har gårdar med enstaka positiva testresultat jämförts med återkommande positiva gårdar för att se om det finns någon skillnad mellan de gårdar som lyckas bli av med bakterien och de som är persistent infekterade. Det är troligt att det är färre skillnader mellan dessa två grupper gällande riskfaktorer jämfört en negativ grupp, vilket också kan ha bidragit till svårigheten att få statistiskt signifikanta resultat. Det hade dock varit av intresse att ta reda på om de gårdar som är persistent infekterade skiljer sig från de gårdar som lyckas bli av med bakterien.

Gödsel

I den här studien var det många gårdar som testade negativt på gödselprover trots att de testat positivt i miljön. En tänkbar orsak till detta är att miljöprovtagningarna varit inriktade på djur under 12 månaders ålder. De provtagna gårdarna är mjölkproducerande besättningar vilket innebär att det finns många vuxna kor på gården som alltså inte har provtagits. Korna bidrar med en stor del av gödselmängden och om de inte utsöndrar bakterien skulle detta kunna resultera i en utspädningseffekt som gör att bakteriekoncentrationen hamnar under detektionsnivå. Ungdjur producerar större mängd träck än kalvar varför det skulle kunna vara en riskfaktor att bara ungdjuren utsöndrar bakterien jämfört om bakterien bara finns hos kalvarna. I den här studien hade dock ålder på de testpositiva djuren (0–4 månader eller 4–12 månader) ingen effekt på gödselproverna.

Det är visat att *E. coli* bakterier kan ta sig upp i de ätbara delarna av salladsblad. Kontamination av gödsel eller smutsigt vatten är också en risk men kan elimineras av att grönsakerna sköljs ordentligt innan förtäring. Franz *et al.* (2005) resultat tyder på att risken för spridning av bakterien från jorden till de ätbara bladen kan vara koncentrationsberoende. Det är visat att koncentrationen av VTEC O157:H7 i gödsel minskar med tiden. En viloperiod mellan gödselspridning och odling bör därför kunna minska risken för detta. Det är inte heller undersökt om risken är densamma oavsett typ av växt som odlas, det hade varit intressant att veta hur det ser ut för andra typer av grönsaker, spannmål eller vallodling. Det skulle i så fall vara rimligt att anpassa vilka grödor som odlas utifrån smittläget på gården. Flera faktorer påverkar vilka grödor som odlas och det finns andra patogener att ta hänsyn till vilket gör det svårt att genomföra en sådan anpassning i praktiken.

I den här studien var det stor skillnad mellan årstiderna gällande risken att vara positiv även på gödselproverna för gårdar som testats positivt för VTEC O157:H7 i miljön. Risken var betydligt högre under vinter och höst jämfört vår och sommar. Det kan i teorin innebära att det är fördelaktigt ur smittskyddssynpunkt att endast sprida gödsel på åkrarna under vår och sommar. Det finns andra faktorer än smittspridning som styr när gödselspridning är lämpligt, som exempelvis miljöpåverkan, i dagsläget sker gödselspridning framförallt under just vår och sommar men även under hösten inför höstsådd. Gödselspridning sker alltså i dagsläget i enlighet med vad den här studien identifierat som lämpligt ur smittskyddssynpunkt.

Svagheter och utveckling av framtida studier

Alla gårdar har inte provtagits vid alla provtagningsstillfällen, framförallt saknas många prover från 2016. En del gårdar är väldigt sparsamt provtagna vilken kan ha lett till en missklassificering av dessa som kan ha påverkat vid analys av riskfaktorer. Eftersom endast 29 gårdar är med i studien är det extra viktigt att alla gårdar hamnar i den kategori de hör hemma för att inte resultaten gällande enskilda riskfaktorer ska feltolkas.

Endast kalvar och ungdjur har provtagits vilket i teorin kan göra att man missar positiva gårdar eftersom det är visat att gårdar kan vara positiva endast hos vuxna kor. Det kan misstänkas att så var fallet för gård 16 när den gården vid två tillfällen var positiv på gödselprov men ej på miljöprov. Detta var dock endast en gård samt endast vid två tillfällen vilket tyder på att det i vilket fall som helst inte är vanligt förekommande. Utifrån vad som är syftet med studien kan det vara lämpligt att resonera kring om det är praktiskt genomförbart att alltid provta alla ålderskategorier och om det är motiverat ur kostnadssynpunkt. För en prevalensstudie där många gårdar ingår är det troligare bättre att så många gårdar som möjligt är med än att alla ålderskategorier på alla gårdar undersöks. Miljöprovtagning av endast kalvar och ungdjur identifierade de allra flesta positiva gårdarna korrekt. För att kunna säga säkert att en specifik gård är fri från VTEC O157:H7 bör dock alla ålderskategorier ha provtagits.

Bortsett från två tillfällen för gård 16 var gödselprover endast positiva när även miljöproverna var positiva. Det var även många tillfällen när gödselproverna från positiva gårdar var negativa trots att ett stort antal gödselprover togs. Miljöprover verkar alltså vara bättre än gödselprover för att identifiera positiva besättningar. Cobbaut *et al.*, (2008) hade betydligt fler positiva resultat på sockprov än plockprov. Detta skiljer sig från Widgren *et al.* (2013) där de båda metoderna var mer likvärdiga gällande att fånga upp positiva resultat. När data sammanställdes i den här studien sågs ingen uppenbar skillnad i resultaten mellan sockprov och plockprov (ej redovisade resultat). Vid vissa provtagningsstillfällen hittades positiva resultat endast med sockprov och vid andra tillfällen endast med plockprov. Detta bekräftar Widgren *et al.* (2013) resultat som visade att man får högre sensitivitet om man kombinerar två olika provtagningsmetoder.

Till skillnad från tidigare studier där man sett en tydlig säsongsvariation med fler positiva prover under sommarhalvåret sågs i den här studien flest positiva resultat på vintern. Flera av de andra studierna är dock gjorda i andra länder med annat klimat och annan typ av djurhållning. En annan tänkbar orsak är att det är svårare att hitta positiva besättningar medan djuren är på bete på grund av utspädningseffekt, många av de prov som togs i den här studien togs ute på bete både under sommar och höst. Det skulle kunna vara så att djuren är positiva hela säsongen men lättare att hitta bakterien inne på stall, men det skulle också kunna vara så att de blir smittade ute på betet. När djuren är utomhus är risken större att smittas från vilda djur och fåglar. Betesmarkerna för gårdarna i studien ligger väldigt nära varandra och i vissa fall finns möjlighet till nos mot nos kontakt, vilket medför en risk att de smittar varandra. Öland är relativt litet och gårdarna ligger väldigt tätt jämfört med resten av landet. Därför kan man fråga sig hur representativt resultaten på den deskriptiva delen av studien är för gårdar i Sverige generellt.

Många prevalensstudier har gjorts på slakterier vilket är relevant med tanke på risken för matförgiftningsutbrott som tidigare ofta orsakats av köttfärs, men det är inte nödvändigtvis ett bra mått på hur mycket VTEC O157:H7 som finns i landet. Prevalensen är högre hos individer under 12 månaders ålder och det är i stor utsträckning äldre djur som slaktas vilket gör att landets totala prevalens kan underskattas om endast slaktprevalensstudier utförs.

Det har föreslagits att det kan vara fördelaktigt ur folkhälsosynpunkt att fokusera interventioner på mer patogena subtyper som tenderar att ge hög sjukdomsbörda i humanpopulationen (Söderlund *et al.*, 2014). Detta innebär dock att alla prover som tas också måste genotypas vilket innebär extra arbete och därmed också en ökad kostnad. Det skulle dock även kunna ge ökad förståelse för hur bakterien sprids mellan besättningar och även för att veta om en besättning är persistent infekterad eller om det rör sig om återkommande nyintroduktion av bakterien.

REFERENSER

- Ackers, M.L., Mahon, B.E., Leahy, E., Goode, B., Damrow, T., Hayes, P.S., Bibb, W.F., Rice, D.H., Barret, T.J., Hutwagner, L., Griffin, P.M. & Slutsker, L. (1998). An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with leaf lettuce consumption. *The Journal of Infectious Diseases*, 177:1588-1593
- Armstrong, G.L., Hollingsworth, J. & Morris Jr, J.G. (1996). Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. *Epidemiologiv Reviews* 18:29-51
- Aspán, A. & Eriksson, E. (2010). Verotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7 from Swedish cattle; isolates from prevalence studies versus strains linked to human infections – A retrospective study. *BMC Veterinary Research*, 6:7.
- Chase-Topping, M., Gally, D., Low, C., Matthews, L. & Woolhouse, M. (2008). Super-shedding and the link between human infection and livestock carriage of *Escherichia coli* O157. *Nature Reviews Microbiology*. 6:904-912
- Cobbaut, K., Houf, K., Doudah, L., Van Hende, J. & De Zutter, L. (2008). Alternative sampling to establish the *Escherichia coli* O157:H7 status on beef cattle farms. *Veterinary Microbiology*, 132:205-210
- Cray Jr., W.C. & Moon, H.W. (1995). Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Enviromental Microbiology*, 61:1586-1590
- Dargatz, D.A., Wells, S.J., Thomas, L.A., Hancock, D.D. & Garber, L. P. (1997). Factors associated with the presence of *Esherichia coli* O157:H7 in feces of feedlot cattle. *Journal of Food Protection*, 60:466-470
- Ellis-Iversen, J., Smith, R. P., Van Winden, S., Paiba, G. A., Watson, E., Snow, L. C. & Cook, A. J. C. (2008). Farm practices to control *E. coli* O157 in young cattle – A randomized controlled trial. *Veterinary Research*, 39:03.
- Eriksson, E., Söderlund, R., Boqvist, S. & Aspan, A. (2010). Genotypic characterization to identify markers associated with putative hypervirulence in Swedish *Escherichia coli* O157:H7 cattle strains. *Journal of Applied Microbiologi*, 110:323-332
- Folkhälsomyndigheten (2017-05-31). *Mikrobiologisk övervakning av ehec (Enterohemorragisk E. coli)*. [https://www.folkhalsomyndigheten.se/mikrobiologi-laboratorieanalyser/mikrobiella-och-immunologiska-overvakningsprogram/overvakning-av-ehec/\[2017-09-28\]](https://www.folkhalsomyndigheten.se/mikrobiologi-laboratorieanalyser/mikrobiella-och-immunologiska-overvakningsprogram/overvakning-av-ehec/[2017-09-28])
- Franz, E., van Diepeningen, A. D., de Vos, O. J. & van Bruggen, A. H. C. (2005). Effects of cattle feeding regimen and soil management type on the fate of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in manure, manure-amended soil, and lettuce. *Applied and Enviromental Microbiology*, 71:6165-6174
- Fröhlich, J., Baljer, G & Menge, C. (2009). Maternally and naturally acquired antibodies to shiga toxins in a cohort of calves shedding shiga-toxigenic *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, 75:3695-3704
- Garber, L.P., Wells, S.J, Hancock, D.D., Doyle, M.P., Tuttle, J., Shere, J.A. & Zhao, T. (1995). Risk factors for fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 207:46-49
- Hancock, D.D., Besser, T.E., Kinsel., M.L., Tarr, P.I., Rice, D.H. & Paros., M.G. (1994). The prevalence of *Esherichia coli* O157:H7 in diary and beef cattle in Washington state. *Epidemiology & Infection*, 113:199-207

- Hancock, D., Besser, T., Le Jeune, J., Davis, M. & Rice, D. (2001). The control of VTEC in the animal reservoir. *International Journal of Food Microbiology*, 66:71-78
- Herriott, D.E., Hancock, D.D., Ebel, E.D., Carpenter, L.V., Rice, D.H. & Besser, T.E. (1998). Association of herd management factors with colonization of dairy cattle by shiga toxin-positive *Escherichia coli* O157. *Journal of Food Production*, 61:802-807
- Kang, S.J., Ryu, S.J., Chae, J.S., Eo, S.K., Woo, G.J. & Lee, J.H. (2004). Occurrence and characteristics of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in calves associated with diarrhea. *Veterinary Microbiology*, 98:323-328
- Karmali, M.A. (1989). Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 2:15-38
- Kudva, I.T., Blanch, K. & Hovde, C.J. (1998). Analysis of *Escherichia coli* O157:H7 survival in ovine or bovine manure and manure slurry. *Applied and Environmental Microbiology*, 64:3166-3174
- Le Jeune, J.T., Besser, T.E. & Hancock, D.D. (2001). Cattle water troughs as reservoirs of *Escherichia coli* O157. *Applied and Environmental Microbiology*, 67:3053-3057
- Lim, J.Y., Li, J., Sheng, H., Besser, T.E., Potter, K. & Hovde, C.J. (2007). *Escherichia coli* O157:H7 colonization at the rectoanal junction of long-duration culture-positive cattle. *Applied and Environmental Microbiology*. 73:1380-1382
- Manning, S.D., Motiwala, A.S., Springman, A.C., Qi, W., Lacher, D.W., Ouellette, L.M., Mladonicky, J.M., Somsel, P., Rudrik, J.T., Dietrich, S. E., Zhang, W., Swaminathan, B., Alland, D. & Whittam, T.S. (2008). Variation in virulence among clades of *Escherichia coli* O157:H7 associated with disease outbreaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105:4868-4873
- Mechie, S.C., Chapman, P.A. & Siddons, C.A. (1997). A fifteen month study of *Escherichia coli* O157:H7 in a dairy herd. *Epidemiology & Infection*, 118:17-25
- Mir, R.A., Weppelmann, T.A., Elzo, M., Ahn, S., Driver, J.D. & Jeong, K.C. (2016). Colonization of beef cattle by shiga toxin-producing *Escherichia coli* during the first year of life: a cohort study. *PLoS ONE* 11(2):e0148518
- Nicholson, F.A., Groves, S.J. & Chambers, B.J. (2005). Pathogen survival during livestock manure storage and following land application. *Bioresource Technology*, 96:135-143
- Nielsen, E.M., Tegtmeier, C., Jörgen Andersen, H., Grønbaek, C. & Andersen, J.S. (2002). Influence of age, sex and herd characteristics on the occurrence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in Danish dairy farms. *Veterinary Microbiology*, 88:245-257
- Rahn, K., Renwick, S.A., Johnson, R.P., Wilson, J.B., Clarke, R.C., Alves, D., McEwen, S., Lior, H. & Spika, J. (1997). Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy cattle and the dairy farm environment. *Epidemiology & Infection*, 119:251-259
- Schouten, J.M., Graat, E.A.M., Frankena, K., van de Giessen, A.W., van der Zwaluw, W.K. & de Jong, M.C.M. (2005). A longitudinal study of *Escherichia coli* O157 in cattle of a Dutch dairy farm in the farm environment. *Veterinary Microbiology*, 107:193-204
- Smith, R.P., Paiba, G.A. & Ellis-Iversen, J. (2010). Longitudinal study to investigate VTEC O157 shedding patterns in young cattle. *Research in Veterinary Science*, 88:411-414
- Solomon, E.B., Yaron, S. & Matthews, K.R. (2002). Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:397-400
- Statens Veterinärmedicinska Anstalt (2016-10-13). *Escherichia coli* som zoonos. <http://www.sva.se/djurhalsa/zoonoser/enterohemorragisk--ecoli-ehec> [2017-09-28]

- Söderlund, R., Jernberg, C., Ivarsson, S., Hedenström, I., Eriksson, E., Bongcam-Rudloff, E. & Aspán, A. (2014). Molecular typing of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from Swedish cattle and human cases: population dynamics and virulence. *Journal of Clinical Microbiology*, 52:3906-3912
- Tuttle, J., Gomez, T., Doyle, M.P., Wells, J.G., Zhao, T., Tauxe, R.V. & Griffin, P.M. (1999). Lessons from a large outbreak of *Escherichia coli* O157:h7 infections: insights into the infectious dose and method of widespread contamination of hamburger patties. *Epidemiology & Infection*, 122:185-192
- Wetzel, A.N. & LeJuene, J.T. (2006). Clonal Dissemination of *Escherichia coli* O157:H7 subtypes among dairy farms in northeast Ohio. *Applied and Environmental Microbiology*. 72:2621-2626
- Widgren, S., Eriksson, E., Aspan, A., Emanuelson, U., Alenius, S. & Lindberg, A. (2013). Environmental sampling for evaluating verotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7 status in dairy cattle herds. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 25:189-198
- Widgren, S., Söderlund, R., Eriksson, E., Fasth, C., Aspan, A., Emanuelson, U., Alenius, S. & Lindberg, A. (2015). Longitudinal observational study over 38 months of verotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7 status in 126 cattle herds (2015). *Preventative Veterinary Medicine*, 121:343-352