Patogena bakterier i livsmedel och vatten.

Lindberg A-M, Stenström I-M & Ternström A.
Lund 2012

Aeromonas

— *Tsunamibakterierna* —

ÖVERSIKT

Att kallblodiga djur har all anledning att passa sig för aeromonas har veterinärerna vetat länge. Aeromonas etablerar sig gärna i skinnet hos fiskar, grodor, sköldpaddor och alligatorer. Där producerar de kopiösa mängder enzymer som bryter ned vävnaden och leder till djupa, böldrika infektioner som inte sällan är dödliga. Mindre känt är att aeromonas också kan utgöra ett hot mot varmblodiga djur. I ett fall slogs till exempel en kaninfarm ut fullständigt och på senare tid har det visats att diarré hos hästar och hundar samt abortering hos grisar kan vara orsakat av aeromonas.

Hos människan förknippas aeromonas mest med sårinfektioner. Särskilt djupare sårskador blir gärna infekterade och det finns gott om beskrivningar där människor drabbats av aeromonasinfektioner efter bett från hundar, katter, ormar och till och med efter björn-, tiger- och hajattacker. Vid tsunamin julen 2004 drabbades hundratusentals överlevande av svåra mjukdelsinfektioner och hos ungefär en fjärdedel orsakades infektionerna av aeromonas. Aeromonas kan också ge svår blodförgiftning och allmäninfektion särskilt hos människor med nedsatt immunförsvar. Blodförgiftningen påminner om den som orsakas av *Vibrio vulnificus*.

Som enteritorsak är aeromonas av färskare datum. Det är fortfarande mycket som är oklart med aeromonasenterit, men framför allt verkar sjukdomen vara ett problem bland undernärda barn i utvecklingsländer. I västvärlden bedöms aeromonasenterit däremot vara förhållandevis sällsynt. Fisk, skaldjur och vatten bedöms vara de mest riskabla livsmedlen.

Aeromonas kan tillväxa i kyltemperatur, faktiskt ända ned till fryspunkten, vilket gör dem svåra att kontrollera. Aeromonas konkurrerar bra med andra bakterier och är en mycket vanlig orsak till förskämning av fisk, och kan undantagsvis också förskämma kött och pastöriserad mjölk. Lyckligtvis förefaller nästan alla matförskämmande stammar vara ofarliga och även i övrigt är det bara en bråkdel av aeromonasstammarna som orsakar enterit. Här finns också problemet för livsmedelsbakteriologerna: det finns i dagsläget inget sätt att skilja ut dessa patogener från den myriad av harmlösa aeromonader som finns i nästan alla miljöer.

BAKTERIERNA

Aeromonas består av gramnegativa, rörliga stavar som har såväl respirativ som fermentativ metabolism. De är katalas- och oxidaspositiva. De flesta arterna kan växa i ett mycket brett temperaturintervall, från strax över noll till över 40°C. Namnet betyder ungefär "de gasbildande stavarna" vilket syftar på att de flesta aeromonader bildar stora mängder gas när de växer anaerobt, något som tidigare var skiljelinjen gentemot bakterier i släktet *Vibrio*. Numera ryms dock även icke-gasbildare inom *Aeromonas*. Utvecklingsmässigt hör *Aeromonas* hemma i proteobakteriernas gammalinje där de, tillsammans med de toluenbildande bakterierna *Tolumonas*, bildar en egen familj: Aeromonadaceae. De är faktiskt betydligt närmare släkt med familjen Enterobacteriaceae än med familjen Vibrionaceae som de tidigare tillhörde. Aeromonader är oerhört vanliga i sjöar och hav där de ofta lever i nära association med djur. Att de är så allestädes närvarande i vatten utnyttjas faktiskt sedan ett par år tillbaka av japanska obducenter som använder pcr-teknik mot aeromonas för att fastställa om en människa har drunknat. Många djur och människor har ofarliga miljöstammar av aeromonas i tarmen.

Tabell 1.1. Släktet *Aeromonas*: arter, fenogrupper, och DNA-hybridiseringsgrupper (HG).

Art	Fenogrupp	HG
A. hydrophila	*A. hydrophila*	1
A. bestiarum	*A. hydrophila*	2
A. popoffii	*A. hydrophila*	–[a]
A. salmonicida biovar Hydrophila	*A. hydrophila*	3[b]
A. salmonicida biovar Salmonicida	Orörliga aeromonas	3[b]
A. caviae	*A. caviae*	4
A. media	*A. caviae*	5
A. eucrenophila	*A. caviae*	6
A. sobria	*A. veronii*	7
A. veronii biovar Veronii	*A. veronii*	8/10[c]
A. veronii biovar Sobria	*A.veronii*	8/10[c]
A. jandei	*A.veronii*	9
A. encheleia	*A.veronii*-liknande	11
A. schubertii	*A.veronii*	12
A. diversa		13[d]
A. enteropelogenes (A. trota)		14

[a] Denna art fanns inte upptagen bland de "ursprungliga" 14 DNA-hybridiseringsgrupperna.

[b] DNA-grupp 3 (*A. salmonicida*) omfattar en grupp med orörliga stammar, en med rörliga stammar, den senare är biokemiskt mycket lik *A. hydrophila*.

[c] DNA-hybriseringsgrupperna 8 och 10 visade sig senare vara identiska (däremot kan man urskilja två biokemiska undergrupper).

[d] Arten *A. diversa* innehåller enligt beskrivningen dessvärre också stammar som inte tillhör HG 13 och *A. diversa* betraktas därför som en tveksam konstruktion.

Indelningen av släktet har vållat mycket huvudbry genom åren. 1994 togs till sist ett radikalt grepp där flera forskargrupper samarbetade för att indela släktet i 14 DNA-grupper som skulle motsvara 14 arter. Tyvärr har det visat sig nästan omöjligt att identifiera arterna med standarduppsättningar av biokemiska tester och begreppet ”fenogrupper” har därför införts för att åtminstone kunna indela aeromonas i tre huvudgrupper. Någon större praktisk mening med fenogrupperna är dock svår att finna. Tabell 1.1 sammanfattar situationen.
DNA-grupperna går, till skillnad från de biokemiskt definierade arterna, däremot att lita på. Visserligen visade sig två av DNA-grupperna, HG 8 och HG 10, vid en närmare kontroll vara identiska men det ändrar ingenting i sak.

Efter det att DNA-grupperna togs fram har ytterligare 15 aeromonas-arter beskrivits, sex så sent som 2010-2011. Tyvärr är det sällan några gedigna arbeten. Många aeromonas-forskare gör sina studier på ett alldeles för litet material. Fyra eller fem av arterna har redan hunnit bli ogiltiga därför att de visats vara synonymer till tidigare beskrivna arter. Och en art visade sig inte ens tillhöra släktet! Att de egentligen är ogiltiga hindrar inte att namnen ändå kan förekomma i helt nypublicerade studier, alla bakteriologer är inte taxonomer. Särskilt *A. trota* är mycket vanligt förekommande, faktiskt vanligare än *A. enteropelogenes* som arten rätteligen ska heta. Tabell 1.2 sammanfattar de 15 ”nya”arterna som alltså inte har något HG-nummer.

Tabell 1.2. *Aeromonas*-arter som beskrivits på senare tid.

Art	Status	Beskriven
A. allosaccharophila	Synonym till *A. veronii*	– (Ogiltig)
A. aquariorum	Synonym till *A. hydrophila* ssp *dhakensis*	– (Ogiltig)
A.bivalvium	Isolerad från musslor	2007
A. culicicola	Synonym till *A. veronii* biovar Sobria	– (Ogiltig)
A. fluvialis	Isolerad från flodvatten	2010
A. ichthiosmia	Troligen synonym till *A. veronii*	– (Ogiltig?)
A. molluscorum	Isolerad från musslor	2004
A. piscicola	Isolerad från fisk	2010
A. rivuli	Isolerad från flodvatten	2011
A. sanarelli	Isolerad från kliniskt material	2010
A. sharmana	Är inte ens medlem av *Aeromonas*!	2006
A. simiae	Isolerad från apor	2004
A. taiwanensis	Isolerad från kliniskt material	2010
A. tecta	Isolerad från kliniskt material	2010
A.trota	Synonym till *A. enteropelogenes*	– (Ogiltig)

Aeromonas-arter och enterit

Eftersom man inte vet vilka mekanismer som är viktigast vid enteriterna kan egentligen ingen aeromonasart som tillväxer vid 37°C helt uteslutas som patogen. Men det är heller ingen tvekan om att det är tre arter som dominerar i det kliniska materialet: HG 1 (*A. hydrophila*), HG 4 (*A. caviae*) och HG 8/10 (*A. veronii* biovar Sobria).

1. *Aeromonas hydrophila* fenogrupp

Det är alltså framför allt HG 1, "äkta" *A. hydrophila*, som isoleras från kliniskt material och som anses patogen. Upp till 80-90 % av stammarna i HG 1 anses producera enterotoxin, vilket dock inte ska tolkas som att alla dessa är patogena för människan, i dagsläget vet man inte om det krävs ytterligare virulensfaktorer för att orsaka sjukdom. HG 1 delas upp i två biokemiska underarter: underart *hydrophila* och underart *dhakensis*. Båda innehåller stammar som kan ge upphov till enteriter hos människan. HG 2 och *A. popoffii* förekommer också i kliniskt material men i mycket lägre frekvens än HG 1. Den märkliga mesofila och rörliga varianten av HG 3 verkar vara mycket ovanlig. Den är ofarlig för människor.

2. *Aeromonas caviae* fenogrupp

Av de tre arterna i denna grupp är det nästan uteslutande HG 4, "äkta" *A. caviae*, som isoleras från kliniskt material, trots att det även hos de andra arterna finns stammar som kan producera enterotoxiner. En del stammar av *A. caviae* är dessutom invasiva.

3. *Aeromonas veronii* fenogrupp

Här är det lite si och så med vilka HG-grupper som ska räknas till fenogruppen. HG 7-10 inkluderas alltid, HG 11 är ett gränsfall och kallas *A. veronii*-liknande, och HG 12 hamnar ibland helt utanför gruppen. Ur patogen synpunkt kan det kvitta, den enda riktigt intressanta arten är HG 8/10, *A. veronii*, som påfallande ofta är invasiv och vanlig i kliniskt material. Som framgår av tabell 1.1 innehåller HG 8/10 två "biovarianter" (undergrupper som kan skiljas åt med biokemiska tester). En är den typiska för *A. veronii* medan den andra faktiskt påminner om *A. sobria* och därför kallas "biovar Sobria". Det är just denna som påträffas i kliniskt material och som då ofta felaktigt identifieras som *A. sobria*. Däremot hittas praktiskt taget aldrig den "äkta" *A. sobria* (HG 7) i kliniskt material.

Av de övriga arterna i denna fenogrupp är det egentligen bara *A. jandei* (HG 9) som då och då påträffas i kliniskt material. Men i alla arterna finns stammar som kan producera enterotoxin.

4. Övriga arter

Bland de övriga arterna finns det starka misstankar om att *A. enteropelogenes* kan vara enteropatogen. Att många stammar inom arten kan bilda enterotoxin är belagt (observera att i flertalet rapporter kallas arten *A. trota* i stället).

HG 3, *A. salmonicida*, skiljer sig från övriga aeromonasarter genom att den är orörlig och att den bara tillväxer vid temperaturer under 30°C. Genom att den inte växer vid 30-37°C anses den helt ofarlig för människan. Som namnet antyder ("laxdräparen") är den däremot ett dödligt hot mot laxfiskar och ställer till stora bekymmer för laxodlare.

SJUKDOMEN

Aeromonas kan finnas i höga halter i tarmkanalen hos friska människor och djur. Därför har aeromonasenterit betraktats med misstänksamhet av många. Men skeptikernas antal har minskat i takt med att ny information kommit fram. Flera nationella smittskyddslaboratorier, bl a i USA, har genomfört studier som visar att man numera tar aeromonas på fullt allvar. Aeromonas-enteriter kan drabba alla, men det verkar vara barn under 3 års ålder och åldringar som är mest utsatta. Några studier på nittiotalet kopplade aeromonasenterit till 1-3 % av turistdiarréerna, men slutsatserna har inte kunnat verifieras i senare undersökningar även om en genomgång av det samlade materialet 2009 indikerade att 3 % av turistdiarréerna kopplades till aeromonas. Grundproblemet är dock att det inte finns något sätt att skilja patogena aeromonas från harmlösa.

Det förefaller däremot mera sannolikt att ca 5 % av barndiarréerna i utvecklingsländerna orsakas av aeromonas. På Kreta har en nyligen (2011) genomförd studie indikerat att 0.4 % av enteritfallen hos barn under 14 års ålder *kan* vara orsakade av aeromonas. Problemet är dock det vanliga: även om aeromonas varit den enda misstänkta patogen som isolerats från barnens avföring är det givetvis inget bevis för att bakterierna verkligen orsakat enteriten eftersom även friska barn kan bära på bakterien. En stor kubansk studie publicerad 2012 på barn under 5 år påvisade att 7 % av barnen med diarré hade aeromonas i tarmen mot ca 2 % av de friska barnen.

Infektionsdos

I ett ofta återberättat försök insjuknade bara två av ett femtiotal försökspersoner trots att de matades med extremt höga doser, upp till 50 miljarder bakterier, av en aeromonasstam isolerad från ett diarréfall. Så höga infektionsdoser är orealistiska och experimentet gav länge skeptikerna vatten på kvarnen. Senare data tyder dock på att bakterierna försvagats vid labodlingen och att försöket inte gav en rättvisande bild. Ändå står det klart att infektionsdosen för en frisk individ är mycket hög, förmodligen över 100 miljoner bakterier.

Inkubationstid och symptom

Inkubationstiden är ett till två dygn. Det finns tre symptombilder, av vilka man kan anta att de två första orsakas av ett eller flera enterotoxin och det tredje av invasiva stammar.

De absolut vanligaste symptomen omfattar buksmärtor, uppkastningar och en lindrig, vattnig

diarré utan feber. Enteriten är kortvarig med en varaktighet på ett till två dygn. En annan sjukdomsbild, som drabbar en minoritet av barnen, kännetecknas av en långvarig diarré på ett par veckor med inslag av feber. I en del fall är diarrén även voluminös. Den tredje symptombilden, som är mycket ovanlig, omfattar blodiga diarréer vilka kan pågå i många veckor och även följas av blodförgiftning och HUS (*hemolytic uremic syndrome*), vilket i sin tur kan leda till njursvikt.

Incidens

Det saknas tillförlitliga data för aeromonasenteriter, förmodligen till stor del därför att de misstänkta fallen i västvärlden nästan uteslutande är sporadiska och alltså bara drabbar enstaka individer. I västvärlden spekuleras mest i om aeromonasenteriter utgör en (ytterst liten) del av turistdiarréerna. En brittisk uppgift gör gällande att aeromonas upptäcks vid mer än 500 enteritfall per år i England och Wales.

Frågan om aeromonas betydelse för diarréer bland barnen i utvecklingsländer har varit omdiskuterad ett par decennier. Men alltfler forskare verkar numera anse att aeromonas troligen är skuld till ungefär 5 % av barndiarré-fallen i länder som Bangladesh, Nepal, Iran, Kuba, Libyen och Indien.

Aeromonasenterit på cellnivå

Eftersom man inte med någon säkerhet känner till mekanismerna kan aeromonasenterit på cellnivån bara grovt skissas. För att enterit ska bli följden av ett aeromonasintag krävs i alla fall att aeromonaderna adherar till tarmcellerna vilket de förmodligen gör med hjälp av fimbrier. En tänkbar kandidat är "bundle-forming pili", alltså knippeliknande trådar som bildas på bakterierna och som fäster in i värdcellerna. Därefter produceras ett enterotoxin, förmodligen ett hemolysin, som frigör karbonatjoner och sätter igång den vattniga diarrén. Enstaka stammar tycks vara invasiva, men vilka virulensfaktorer dessa stammar använder är inte känt.

LIVSMEDEL: TILLVÄXT

Temperatur

Aeromonas är en av de få patogener som växer bra vid kyltemperatur, inte ens nollgradigt hindrar bakterierna från att växa. I andra änden är bakterien en typisk mesofil som ofta växer snabbt även vid drygt 40°C. Bakterierna är som de flesta gramnegativer känsliga för värmebehandling och dör snabbt vid pastörisering.

Syre

Aeromonas kan tillväxa både i luft och i syrefri atmosfär. Den hämmas inte nämnvärt i sin tillväxthastighet av vakuumförpackning och verkar därför vara mera resistenta mot koldioxid

än merparten av de gramnegativa bakterierna.

pH

Aeromonas kan under i övrigt optimala förhållanden tillväxa i ett brett pH-intervall, 4.5-10. I kyllagrade produkter upphör dock växten redan då pH-värdet kommer ned mot 5.5.

Saltning och rökning

För att vara en gramnegativ bakterie tål aeromonas förvånansvärt mycket salt, vissa stammar klarar av att växa i 6 % NaCl. Visserligen är saltresistensen betydligt lägre vid kyltemperatur, men lättsaltade och lättrökta produkter som falukorv och liknande ger inget skydd mot aeromonas.

Mikrobiologisk konkurrensförmåga

Aeromonas växer bra i kyltemperatur och är de redan från starten en dominerande del av mikrofloran kan de till och med förskämma livsmedlet, det vill säga uppnå halter överstigande tio miljoner bakterier per gram livsmedel.

LIVSMEDEL: PRODUKTER

Kött

Aeromonas förekommer frekvent i låga halter på allt färskt kött och växer sedan till under kyllagringen. Förskämt, luftlagrat kött luktar dock gräsligt illa av pseudomonasbakterier långt innan aeromonas uppnått riskabla halter, men i vakuumförpackat kött kan aeromonas i vissa fall tillväxa så kraftigt att de dominerar bakteriefloran när "bäst-före"-datumet går ut. Trots detta har kött sällan misstänkts vid aeromonas-enteriter. Även ägg kan innehålla aeromonas men inte heller ägg verkar utgöra någon risk för aeromonas-enterit.

Fisk och skaldjur

Aeromonas lever normalt i vatten och nylandade fiskar innehåller betydande halter. Aeromonas får därför en flygande start vid kyllagring och det är inte ovanligt att aeromonas dominerar förskämningsfloran på isad fisk. Av det tiotal publicerade utbrott som misstänks vara orsakade av aeromonas har nästan alla kopplats till konsumtion av fisk eller skaldjur. Ostron har varit inblandade i påfallande många fall vilket naturligtvis hänger samman med att de äts råa. Men även räkor har varit orsaken till flera utbrott och i dessa fall måste det bero på att räkorna återkontaminerats av aeromonas efter kokningen. I flera fall har personer med nedsatt immunförsvar drabbats av svår blodförgiftning efter att ha ätit rå fisk eller råa skaldjur fångade i varma vatten. Det kan också nämnas att i den miljötveksamma odlingen av jätteräkor används stora kvantiteter antibiotika just för att hindra aeromonasangrepp.

Det svenska smorgasbordet

Ett utbrott som refererats flitigt är det svenska fall där 24 av 27 personer drabbades av enterit efter att ha ätit "smorgasbord". Flera rätter, bl a rökt korv, kokt skinka, leverpastej och räkor, uppvisade mycket höga halter aeromonas (mer än 10 miljoner per gram). Även om det aldrig blev klarlagt att aeromonas verkligen orsakade utbrottet så förefaller misstanken välgrundad.

För en livsmedelsbakteriolog verkar det något besynnerligt att fyra helt orelaterade rätter på ett smörgåsbord skulle vara infekterade med vad som närmast kan beskrivas som en renkultur av aeromonas. Och så var inte heller fallet, "smorgasbord" är en språkförbistring på vad som borde ha kallats en "mixed sandwich"; det rörde sig om landgångar. Landgångarna som köpts i butik var inte alltför färska och bakterierna från den bakteriologiskt sett sämsta produkten, antagligen räkorna, hade hunnit sprida sig rejält. (Lustigt nog har missförståndet senare returnerats till Sverige, Livsmedelsverket uppger på sin hemsida uppdaterad juni 2012 att utbrottet berodde på ett smörgåsbord med kalla rätter…).

Mejeriprodukter

Ungefär 1 % av en svenska konsumtionsmjölken innehåller aeromonas i sådana halter att de till sist förskämmer mjölken. Aeromonas överlever visserligen inte pastöriseringen, men de etableras i mejeriet och återkontaminerar mjölken när den förpackas. Med tanke på hur mycket mjölk som dricks i Sverige borde rimligtvis massor av människor drabbas av aeromonas-enterit från mjölk. Men inget utbrott av mjölkrelaterad aeromonas-enterit har förekommit, vilket tyder på att aeromonas-stammarna i mjölk är harmlösa.

Inte heller ost har varit misstänkt som orsak till aeromonasenterit. I och för sig kan aeromonas tillväxa under den första tillverkningsfasen och därför kan färskost mycket väl innehålla höga aeromonashalter. Särskilt ricottaost, med sin mycket speciella tillverkningsprocess, verkar vara känslig. Däremot klarar inte aeromonas den sura miljön under lagringen så lagrad ost är riskfritt att äta.

Vegetabilier

Aeromonas kan kolonisera och växa till på vegetabilier. Några misstänkta fall av aeromonas-enterit från grönsaker, frukt eller rotsaker har vi dock inte stött på och det förefaller inte troligt att de skulle kunna växa till riskabla halter på den typen av livsmedel.

Vin

För den vinintresserade kan vi bistå med ett kuriosum: aeromonas är faktiskt en betydande anledning till den gräsliga defekten ”korksmak”, som i mer eller mindre omfattning lär drabba 1 % av alla vinflaskor som försluts med naturkork. Det är aeromonas fantastiska förmåga att producera enzymer som medför att de lyckas göra hål i naturkorkar och därmed utsätta vinet för den skadliga syrgasen. Det är dock bara smaken som tar skada, någon fara för att bli

infekterad av vinet är det inte.

Vatten

Dykare och badare har drabbats av aeromonas-enterit efter ofrivilliga kallsupar. Inte sällan är det den svårare varianten med blodig diarré och blodförgiftning som då rapporterats. Men eftersom det nästan enbart är de svårast drabbade som söker läkare ska man nog inte fästa alltför stor vikt vid detta. Vad det däremot visar är att orenat vatten är en riskfaktor, vilket är rimligt då aeromonas är en vattenlevande bakterie. En grupp svenska scouter drabbades exempelvis av aeromonas-enterit då de drack av vattnet från en bäck. Klorering av dricksvatten ger dock ett säkert skydd.

Hälsofarligt gyttjebad

I februari 2002 sökte 26 vuxna män akuthjälp på ett litet sjukhus i Collie, Australien. Alla hade småskavanker i form av rispor och småsår och alla hade ådragit sig infektioner med varbölder. Alla 26 hade infekterats med *Aeromonas hydrophila*. Läkarna blev lite förvånade av anhopningen infekterade som dock snart fick sin förklaring. Männen hade, tillsammans med ytterligare ett femtiotal andra, deltagit i ”gyttjefotboll” några dagar tidigare. Som fotbollsplan användes en paddock som vattnades i en månad före matchen så att gyttjan var flera decimeter tjock. Vattnet togs från en närbelägen å och i denna hittades samma stam av aeromonas som hos de infekterade. Gyttjefotboll tycks vara begränsat till Australien och tur är kanske det.

VIRULENSFAKTORER

Aeromonas-enterit har inte någon klarlagd orsak. En del pekar mot att aerolysinet är viktigast, men det är fortfarande en öppen fråga. Det enda man kan vara tämligen säker på är att det i alla fall knappast rör sig om ett toxin som bildas i livsmedlet, alltså någon klassisk matförgiftning. För att man ska bli sjuk krävs att man får i sig levande bakterier i stor mängd.

En del stammar producerar kapslar som möjligen kan ge ett visst skydd mot immunförsvaret och det har spekulerats i att sådana stammar kanske kan ge enterit vid lägre infektionsdoser. Förmågan att bilda kapslar tycks vara knuten till vissa serotyper, bl a är serotyp 11 och 34 påfallande ofta kapselbildande.

Adhesionsmekanismer

Flageller

Aeromonas är rörliga med hjälp av polära flageller, men 60 % av stammarna kan även producera laterala flageller. Båda flagelltyperna är viktiga för adhesionen till epitelceller.

Bfp = Bundle forming pili

Liksom många andra bakterier kan aeromonas bilda Bfp, alltså knippeliknande fimbrier med vilka bakterien fäster in och förankrar sig till tarmcellerna. Om generna för Bfp tas bort minskar adhesionsförmågan kraftigt men den upphör inte. Det är högst troligt att aeromonas utöver Bfp också kan bilda andra typer av fimbrier.

OMP = Outer Membrane proteins

Produktion av yttre membranproteiner, som skapar en fysiskt mycket stark kontakt mellan bakterier och värdcell, är en vanlig strategi hos adhesiva bakterier och sådana adhesiner bildas även av aeromonas, men de är ännu så länge dåligt kartlagda. En del yttre membranproteiner deltar också i uppbyggnaden av ett typ tre sekretionsssystem (T3SS) som är nödvändigt för virulensen. Aeromonas kan för övrigt producera såväl ett T2SS (se Act nedan) som ett T6SS vilket åtminstone av upptäckarna anses viktigt för virulensen.

Enterotoxiner

De flesta aeromonas-stammar producerar ett eller flera enterotoxiner. Ändå förefaller det bara vara en bråkdel av stammarna som verkligen är patogena. Troligen är det så att det krävs andra virulensfaktorer än enbart enterotoxiner. Möjligen är produktionen också temperaturberoende, en studie visade att medan 74 % av stammarna från fisk och skaldjur producerade cytotoxiner vid 28°C, så var det bara 18 % som gjorde det vid 37°C. Kanske är virulensfaktorerna hos aeromonas lika temperaturberoende som de är hos en annan köldälskande bakterie, *Yersinia enterocolitica*.

1. Aerolysin = värmestabilt hemolysin

De flesta aeromonader producerar hemolysiner som förstör röda blodkroppar. Det mest välstuderade är aerolysinet som även är ett värmestabilt enterotoxin. Det tål en värmebehandling på 63°C under 10 minuter. Aerolysinet utsöndras som ett inaktivt proaerolysin, ett protein på 52 kDa. Sedan modifieras det till aktivt aerolysin genom att 40 aminosyror klipps bort av proteolytiska enzym från värdcellen. Aerolysinet fäster in till en speciell receptor i mottagliga celler och bildar sedan kanaler på ca 1 nanometers tjocklek. Porbildningen resulterar i att tarmcellerna kollapsar och dör. Troligtvis kan aerolysinet också fungera på distans, utan att döda cellerna, genom att påverka tarmcellernas sekretion av klorid- och karbonatjoner. Hur viktigt aerolysinet är för patogeniteten kan diskuteras, majoriteten av miljöstammarna – som alltså är ofarliga - bär faktiskt på *aerA*, genen för aerolysinproduktion.

2. Värmestabilt cytotoxiskt enterotoxin = Act

Det värmestabila cytotoxiska enterotoxinet Act (*Aeromonas CytoToxin*) har på senare tid undersökts ganska intensivt under just beteckningen Act vilket får motivera att det ges en egen rubrik. Men annars är Act påfallande likt aerolysin: ett 52 kDa värmestabilt och cytotoxiskt enterotoxin som bildar porer i mottagliga celler, t ex röda blodkroppar eller epitelceller. Även

aminosyrasekvensen är påfallande lika mellan Act och aerolysinet och eftersom aerolysin varierar en del i sin sammansättning från art till art borde Act nog kunna betraktas som ytterligare en variant av aerolysin. Act kan binda till flera proteiner på värdceller hos vilka det inducerar programmerad celldöd, apoptosis. *Act*-genen kodar också för ett typ 2 sekretionsystem (T2SS) med vilket enterotoxinet kan överföras till värdcellen.

Forskargrupperna bakom Act brukar framhålla att enterotoxinet är en mycket viktig virulensfaktor, men enligt en amerikansk studie bar 70 % av miljöstammarna på *act*-genen medan en indisk studie endast påvisade genen hos 20 % av de kliniska stammarna.

3. Värmestabilt cytotoniskt enterotoxin = Ast

Ast (*Aeromonas Stable Toxin*) är ett värmestabilt enterotoxin på 44 kDa. Att det är cytotoniskt betyder att det förändrar en angripen cells form, men att det inte dödar cellen som de cytotoxiska toxinerna gör. Förekomsten av Ast varierar mellan olika undersökningar, men genen förefaller vara vanligare hos miljöstammar än hos kliniska stammar.

4. Värmelabilt cytotoniskt enterotoxin = alt

Det värmelabila enterotoxinet Alt (*Aeromonas Labile Toxin*) inaktiveras av en värmebehandling vid 56°C under 20 minuter. Alt har liksom Ast en molvikt på 44 kDa, men det finns troligen även andra cytotoniska värmelabila enterotoxiner eftersom molvikterna uppges variera mellan 15 och 44 kDa. De tros vara funktionellt likartade och ingen av dem har någon strukturell likhet med det mest berömda av alla cytotoniska toxiner, koleratoxinet. Till skillnad från Act och Ast så är Alt mera frekvent förekommande hos kliniska stammar än hos miljöstammar. Det hindrar inte att Alt ändå förekommer hos nästan hälften av miljöstammarna, så Alt är nog inte heller svaret på vilken virulensfaktor som är viktigast vid aeromonas-enterit.

5. Koleraliknande toxin?

Ett värmelabilt, cytotoniskt enterotoxin som immunologiskt reagerade med koleratoxinet rapporterades av flera forskare under åttiotalet. Sedan hände ingenting på ett decennium varefter man i en stam påvisade ett 40 kDa värmekänsligt enterotoxin som korsreagerade med kolera-antitoxin. Det är givetvis frestande att tro att detta enterotoxin skulle kunna förklara de ibland mycket voluminösa diarréerna vid aeromonas-enterit, men i stort sett ingenting är känt om toxinet.

6. Shiga-liknande toxin?

Ett Shigatoxin av typ 1 (Stx 1) har rapporterats från enstaka miljöstammar och i en spansk undersökning från 2010 från ca 25 % av kliniska stammar. Stx 1 är ett cytotoxiskt toxin vars toxicitet mot Vero-celler kan neutraliseras av antiserum mot *E. coli* Stx 1. Stx-gener har hittats i en rad arter inom Enterobacteriaceae och att de också skulle kunna spridas till de ganska nära släktingarna i aeromonas är egentligen inget förvånande. Enstaka kliniska isolat av aeromonas

kodar för såväl Stx 1 som Stx 2. Men det är ändå knappast Stx som förklarar den vanliga aeromonasenteriten.

7. Övriga enterotoxin

Hos *A. veronii* biovar Veronii har en gen med 99 % likhet med genen för TRH1-toxinet hos *Vibrio parahaemolyticus* hittats, men något toxin verkar inte bildas hos aeromonas. Men det visar om inte annat att gensonder mot THR1-genen kanske inte kan betraktas som ett säkert sätt att fastställa om patogena *V. parahaemolyticus* finns i provet.

PÅVISNING

Ampicillinbaserade medier

Blodagar med tillsats av 10-30 mg/L ampicillin är standardmediet för isolering av aeromonas från feces. De flesta, men långtifrån alla arterna, ger en kraftig betahämolys. Aeromonasarterna är, med undantag för *A. enteropelogenes* (*A. trota*) som framför allt finns i fisk och skaldjur, resistenta mot ampicillin. Ampicillinbaserade medier är därför ovärderliga i de fall då bakgrundsväxten är kraftig. De flesta av de stärkelsebaserade medier som idag används för livsmedelsanalys har därför även de en tillsats av 10 mg ampicillin per liter substrat.

Stärkelse-ampicillin-agar (SAA) är det substrat som använts flitigaste för livsmedelsanalys. SAA innehåller (gram/liter): pepton 10, köttextrakt 1, NaCl 5, löslig stärkelse 10, fenolrött 0.025, ampicillin 0.01 och agar 12. SAA ytodlas aerobt och inkuberas 37°C 24 timmar. Aeromonas bildar syra från stärkelse vilket ger gula eller honungsfärgade 2-3 mm stora kolonier som oftast är omgivna av en ljus zon. För att testa amylasproduktion (första steget i stärkelse-nedbrytningen) kan plattorna flödas med Lugols lösning. Amylasproducerande kolonier (presumtiva aeromonas) kommer att omges av en klar zon av hydrolyserad stärkelse mot en mörk bakgrund.

För vattenprover används oftast ampicillin-dextrin-vancomycinagar (ADA-V). ADA-V innehåller (gram/liter): tryptos 5, jästextrakt 2, NaCl 3, dextrin 11.4, KCl 2, Na-deoxikolat 0.1, $MgSO_4$ x $7H_2O$ 0.1, $FeCl_3$ x 6 H_2O 0.06, bromtymolblått 0.08, ampicillin 0.01, vancomycin 0.002 och agar 13. Ett membranfilter ytodlas aerobt på ADA-V 35°C i 24 h. Gula kolonier betraktas som presumtiva aeromonas. ADA utan vancomycin är samma medium som Havelaars aeromonasmedium som finns kommersiellt tillgängligt hos Biolife.

Kromogena medier har också börjat användas och i en studie publicerad 2012 rekommenderas ett sådant, ChromoCen AGN-agar, för isolering av aeromonas.

En lägre inkubationstemperatur än de ovan rekommenderade 35-37°C är egentligen att föredra

och i många undersökningar av livsmedel används därför i stället 30°C. Ytodlade aeromonaskolonier kan i vissa fall svärma kraftigt och störa avläsning och konfirmationsarbete. Svärmningen beror på att aeromonas vid växt på ytor ibland bildar laterala flageller med vilka de "skruvar" sig fram längs agarytan.

Identifiering

Presumtiva kolonier testas för oxidas (aeromonas är kraftigt positiva inom 10 sekunder) och för 150 μg av det vibriostatiska ämnet 2,4-diamino-6,7-di-isopropylpteridinfosfat (0129) mot vilket aeromonas är resistent.

Artidentifiering

Vi berörde redan i inledningen svårigheterna med att på ett enkelt sätt biokemiskt identifiera arterna. Det finns flera testkits på marknaden som ska kunna användas för ändamålet som API, BBL Crystal, Biolog, MicroScan och Vitek, men de klarar bara av att identifiera de tre fenogrupperna. Inte ens Biolog, som har det mest omfattande testbatteriet, räcker till. Det behöver utökas med nyckeltester som sockerfermentation, aminosyradekarboxylas och Voges-Proskauer och blir egentligen fullt användbart först då själva identifieringen utförs med numerisk analys där typstammarna ingår.

Så omfattande kan givetvis inte en rutinmässig identifiering vara, men att den rutinmässiga identifieringen inte fungerar står klart: i en undersökning på nästan 200 stammar visades att 96 % av stammarna identifierades som olika arter med biokemiska tester jämfört med RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)-identifiering! Nu ska det sägas att detta inte nödvändigtvis betyder att de biokemiska testerna gav felaktig identifiering i 96 % av fallen. Även RFLP har nämligen kritiserats som identifieringsmetod för aeromonas. Det har visats att en stam kan producera upp till sex *olika* kopior av rRNA med en inbördes sekvensskillnad på 1.5 %, vilket i sammanhanget är en närmast astronomisk skillnad.

PCR-metoder för att identifiera åtminstone en del av arterna har beskrivits. Även dessa riktas som regel mot signaturer i rRNA-sekvenserna, så den som är tveksam till RFLP-identifieringen kanske inte heller fullt ut kan lita på att signaturerna är stabila. Klassisk DNA-hybridisering är givetvis ett säkert alternativ, men är knappast en metodik för rutinanalyser.

Annan påvisning

Aeromonas som helhet kan naturligtvis påvisas med PCR-teknik, men eftersom det är lätt att kvantifiera bakterierna med selektiva medier, så har PCR-bestämning av aeromonas i livsmedel inte varit särskilt aktuell. PCR-metoder som kan påvisa 1 CFU per gram livsmedel finns dock beskrivna.

Däremot är PCR-teknik idag standard för att påvisa generna för enterotoxinproduktion och det

finns en stor mängd protokoll att tillgå för detta. Eftersom det inte råder någon enighet om vilka virulensfaktorer som är avgörande vid aeromonas-enterit har man dock inte kommit mycket längre än att konstatera att även till synes helt ofarliga miljöstammar som regel bär på en eller flera av de gener som kodar för enterotoxinproduktion.

Enstaka stammar är invasiva och dessa testas då på cell-linjer, framför allt Caco 2- och Veroceller. Adekvat PCR-teknik saknas eftersom man inte känner till vilka virulensfaktorer de invasiva stammarna använder sig av.

Epidemiologi

Det finns inga epidemiologiska metoder för aeromonas på marknaden. En del laboratorier har länge typat aeromonas med serologiska metoder, men några serotyper som skulle vara speciellt virulenta har inte hittats. Molekylärgenetisk typning har hittills använts i förvånansvärt få fall, och lär komma först när man väl lärt sig att skilja på patogena och apatogena stammar.

Arcobacter

– *Den okända campylobactern* –

ÖVERSIKT

"Aerotoleranta campylobacter" isolerades då och då under åttiotalet från diarrépatienter trots att de använda isoleringsmetoderna egentligen var helt olämpliga. Amerikanska Centers for Disease Control and Prevention (CDC) undersökte 1991 ett antal av dessa stammar och fann att de utgjordes av *A. butzleri* och *A. cryaerophilus.* Ungefär samtidigt konstaterades i en undersökning av thailändska barn med diarré att den näst vanligaste campylobacterarten som isolerades var *A. cryaerophilus*. Dessa undersökningar föranledde en kontroll på ett gammalt material i Italien, där 10 barn 1983 hade drabbats av återkommande magsmärtor utan diarré, och där "okända" campylobacter ansetts ligga bakom. Bakterierna hade sparats och kunde nu identifieras som *A. butzleri*.

I tjugo år har man alltså känt till att arcobacter orsakar diarré hos människor. Ändå har bakterierna förblivit en nästan vit fläck på kartan, de har på något vis försvunnit i kölvattnet efter campylobacter. Men genom specialanpassade odlingsmedier och molekylärgenetiska metoder har man de senaste åren fått klart för sig att arcobacter är mycket vanliga i kött och vatten, faktiskt väl så vanliga som campylobacter. Så genombrottet kanske är på väg.

BAKTERIERNA

Arcobacter betyder, liksom campylobacter, "den böjda staven". De arter som först beskrevs togs in i *Campylobacter* där de hörde hemma tills 1991. Då bildades släktet *Arcobacter* på basis av molekylärgenetiska skillnader gentemot *Campylobacter*.Morfologiskt och biokemiskt är det annars inte mycket som skiljer släktena åt. Både *Arcobacter* och *Campylobacter* omfattar gramnegativa, kraftigt böjda eller spiralformade tunna stavar som är rörliga med en polär flagell och som har en strikt respirativ metabolism baserad på aminosyror medan kolhydrater inte utnyttjas. Oxidasreaktionen är positiv liksom (oftast) katalasreaktionen.

Den mest påtagliga skillnaden mellan släkterna är att arcobacter kan växa aerobt medan campylobacter behöver en mikroaerofil miljö. En annan väsentlig skillnad för de enteritframkallande arterna är att arcobacter växer vid 15°C men inte (eller endast långsamt) vid 42°C. De fem "termofila" campylobacter-arterna växer däremot inte vid 15°C men väl vid 42°C. Tretton arter, av vilka minst tre är enteropatogena, räknas till släktet *Arcobacter.*

Arcobacter hör utvecklingsmässigt hemma i proteobakteriernas epsilonlinje, som är en isolerad utvecklingsgren bland de gramnegativa bakterierna. Formellt hör släktet tillsammans med *Campylobacter* och *Sulfurospirillum* till familjen Campylobacteraceae men nyare data visar att *Arcobacter* inte hör hemma där. De närmaste släktingarna är i stället *Sulfurimonas denitrificans*, en svaveloxiderande och denitrifierande frilevande bakterie. De apatogena arcobacter-arterna är även de jord och vattenassocierade, *A. nitrofigilis* är till exempel en kvävefixerande bakterie som lever symbiont i rötterna hos det amerikanska marskgräset (*Spartina alterniflora*).

Reservoaren för spridning av patogena arcobacter är sannolikt tarmkanalen hos fåglar och däggdjur. De patogena arterna kan infektera nötkreatur, får och grisar och orsaka abortering men många djur är friska bärare, d v s de härbärgerar stammarna utan att bli sjuka. Anmärkningsvärt är att bakterierna är mycket vanliga i slam från kommunala reningsverk. Mesofil rötning, som är en vanlig åtgärd för att mikrobiellt stabilisera slammet, dödar inte arcobacter: genomsnittshalten på rötat slam uppges till ca 10 000 arcobacter per gram.

Människan kan förmodligen också smittas via husdjur, såväl hundar som katter är ganska ofta bärare av arcobacter i tarmen.

Tabell 2.1. Arter av *Arcobacter* 2012, deras förekomst och betydelse.

Art	Känd förekomst	Patogen för människan
A. bivalviorum	Musslor	?
A. butzleri	Djur, vatten	Ja
A. cibarius	Kyckling	?
A. cryaerophilus	Djur, vatten	Ja
A. defluvii	Avloppsvatten	?
A. ellisii	Musslor	?
A.halophilus	Havsvatten	Nej
A. marinus	Havsvatten	Nej
A. molluscorum	Musslor	?
A. mytili	Musslor	?
A. nitrofigilis	Jord, växter	Nej
A. skirrowii	Djur, vatten	Ja
A. thereius	Gris, anka	?
A. trophiarium	Gris	?
A. valdiviensis	Kyckling	?
A. venerupis	Musslor	?

SJUKDOMEN

Det finns endast fragment av data om sjukdomsbilden och då främst gällande *A. butzleri*.

Infektionsdos, inkubationstid, symptom och incidens

Vare sig infektionsdos eller inkubationstid är känd. Det vanligaste symptomet är magsmärtor som varierar från diffusa till svåra, närmast som vid blindtarmsinflammation. Flera av de tidiga kliniska fynden gjordes hos patienter hos vilka man först misstänkte blindtarmsinflammation. En vattnig diarré förekommer hos 70 % av de insjuknade och i de fall då den drabbade har svåra buksmärtor kan diarrén vara långvarig. Andra rapporterade symptom är feber, frossa och kräkning. Återfall i sjukdomen förekommer hos ungefär 1 av 15 drabbade.

Komplikationer som blodförgiftning förekommer, särskilt i samband med infektioner orsakade av *A. cryaerophilus*. Det finns också uppgifter som tyder på att åtminstone *A. butzleri* kan orsaka allmäninfektioner.

Incidensen är okänd, men enligt en undersökning från Nya Zeeland publicerad 2012 angavs att ca 1 % av människor med enterit hade arcobacter i tarmen.

LIVSMEDEL

Tillväxt

Temperaturintervallet för tillväxt är 15-39°C. Även om arcobacter alltså kan tillväxa vid lägre temperaturer än campylobacter, förefaller det osannolikt att de förökar sig i livsmedel. De verkar lika känsliga för värmebehandling och kyllagring/infrysning som campylobacter: de avdödas snabbt redan vid 55°C och förekomsten i livsmedel är avsevärt lägre i frysta produkter än i helt färska.

Patogena arcobacter är syra- och saltkänsliga och klarar inte av att växa vid pH under 6 och vid salthalter över 3 %.

Kött

Rått kött är sannolikt den största riskfaktorn. Efter 1996, sedan att man fått möjlighet att påvisa arcobacter i livsmedel med någorlunda effektiva metoder, har förekomsten i nyslaktad kyckling såväl i Europa som USA noterats till mellan 60 % och 100 % i ett tjugotal undersökningar. Notabelt är att man genomgående hittat arcobacter betydligt oftare i köttet än i tarmen. Om detta sedan beror på faktiska förhållanden eller att det är svårare att påvisa arcobacter i feces återstår att visa. Flera undersökningar av slakthygien har visat att arcobacter ofta sprids från djur till djur vid hanteringen och via redskap. Att arcobacter är mycket vanliga visas också av att slaktdjur ofta härbärgerar flera stammar eller till och med flera arter av arcobacter samtidigt.

Frekvensen i kalkon, ankor och gäss är också mycket hög. Visserligen mäts hela arcobactersläktet i många av de nyare PCR-undersökningarna, men det verkar som att den patogena *A. butzleri* helt dominerar bland arterna så även dessa mera breddade undersökningar är användbara för att bedöma frekvensen patogener. Hönsägg verkar däremot vara fria från arcobacter.

Arcobacter är också mycket vanliga i magen och tarmen hos suggor och smågrisar, något mera ovanliga hos slaktdjur. Olika studier visar på en frekvens på 10-50 % av patogena arcobacter på svinslaktkroppar, medan halten är betydligt lägre för kylda styckningsdetaljer. Ungefär 2-4 % av fläskfärsen innehåller arcobacter.

Även hos nötkreatur är arcobacter vanlig, undersökningar i Europa och USA har pekat på att mellan 10 % och 70 % av boskapen har bakterierna i tarmen. I nötfärs har i regel 2-3 % av de undersökta proverna innehållit arcobacter, en belgisk undersökning visade dock 10 %.

Fisk

Skaldjur som råa ostron och musslor är de enda som undersökts och i dessa kan man betrakta arcobacter som vanlig. Som framgår av tabell 2.1 är det dock ofta värdspecifika arter som förekommer och deras eventuella betydelse som humanpatogener är inte känd. Eftersom arcobacter verkar vara vanliga i åtminstone sötvatten finns det skäl att tro att även fiskar härbärgerar bakterierna.

Mejeriprodukter

Opastöriserad mjölk har undersökts i Turkiet och Nordirland och där hittades arcobacter i 6 % respektive 50 % av proverna. Deras värmeresistens är dock mycket låg så de dödas effektivt av pastörisering. Lagrad ost som görs av opastöriserad mjölk är ofarlig att äta, syrabildningen och den mikrobiologiska konkurrensen gör att arcobacter dukar under.

Vegetabilier

Det finns bara några få undersökningar utförda och i den största från Spanien konstaterades att 20 % av grönsallaten i affärerna innehöll arcobacter. Här finns det nog stora skillnader mellan länderna, i Medelhavsländerna vattnas sallat inte sällan med ”renat” avloppsvatten och det är sannolikt därifrån som sallaten kontamineras. Det är ju inte helt ovanligt att spansk sallat kan innehålla en rad andra enteropatogener också.

Vatten

Råvatten, särskilt ytvatten, innehåller ofta arcobacter men bakterierna är mycket känsliga för klorering så klorerat dricksvatten innebär knappast någon risk.

VIRULENSFAKTORER

De patogena arterna av arcobacter invaderar flera olika typer av cell-linjer och orsakar bland annat programmerad celldöd (apoptosis) vilket kan förklara den vattniga diarrén. Men virulensfaktorerna är dåligt kända. Genomet hos *A. butzleri* är kartlagt och det finns flera gener som kodar för proteiner som man vet hör till virulensfaktorerna hos campylobacter, bland annat det fibronektinbindande CadF. Om generna verkligen uttrycks hos arcobacter är dock fortfarande oklart. Det för campylobacter så viktiga CDT (*cytolethal distending toxin*) verkar däremot inte finnas.

PÅVISNING

Selektiv isolering

Eftersom arcobacter inte växer vid 42°C, kan de vanligtvis inte isoleras från selektiv odling av campylobacter. Äldre campylobactermedier undertrycker dessutom arcobacter, endast CAT och – i viss mån – modiferad CCDA (se kapitlet om *Campylobacter*) tillåter växt. Arcobacter växer för övrigt dåligt även i många icke-selektiva medier, det verkar behövas speciella peptoner för att få dem att trivas. Oxoid har tagit fram ett basmedium, arcobacter anrikningsmedium (CM 965) som använts med gott resultat, samtliga tre patogena arter av arcobacter växer i denna buljong.

En metod som gett bra resultat för undersökning av arcobacter i livsmedel är anrikning aerobt vid 25-30°C 24 h i Oxoids arcobacterbuljong med tillsats av cefoperazon 8 mg/L, amfotericin 10 mg/L och teicoplanin 4 mg/L (CAT-supplement, Oxoid SR 174). Utodling kan sedan ske på samma medium kompletterat med agar eller på traditionell CAT-agar för odling av campylobacter. Utodling utförs aerobt vid 25-30°C.

Bra resultat uppges också med en anrikning i arcobacterbuljong kompletterat med cefoperazin 16 mg/L, amfotericin 10 mg/L, 5-fluorouracil 100 mg/L, novobiocin 32 mg/L och trimetoprim (64 mg/L).

Biokemisk identifiering

I princip används campylobactertestning för identifiering av arcobacter. Även inkuberingsförhållanden är i regel desamma som för campylobacter, d v s mikroaerofilt vid 37°C. Kommersiella testkits avsedda för campylobacter fungerar dock än så länge inte särskilt bra för arcobacter.

Annan identifiering

Det finns en uppsjö av PCR-metoder beskrivna och många av dagens undersökningar baseras helt på dessa. PCR-metoder finns för hela släktet samt för praktiskt taget alla arter.

Epidemiologi

Ett begränsat serologiskt typningsschema baserat på värmelabila antigen har använts för *A. butzleri* och proteinmönstret har använts för isolat associerade med abortering hos grisar.

PFGE-studier har visat att arcobacter är extremt diversifierade vilket naturligtvis underlättar epidemiologiska studier. PFGE-analys har använts för att spåra hur griskultingar infekteras från suggorna men några epidemiologiska studier vid sjukdomsfall hos människor har inte utförts

Bacillus cereus

– En klassisk matförgiftare –

ÖVERSIKT

På sätt och vis är *B. cereus* den lömskaste matförgiftare som finns. Äter man sin köttgryta med ris och har varit slarvig med tillagningen, kan man få sona det två gånger. Först spyr man av riset. I timmar. Sedan, när det äntligen är avklarat, får man diarré av köttet.

Det ska för all del tilläggas att då har man riktig otur, för det mesta drabbas man av antingen det ena eller det andra. Men att en och samma stam av en bakterie kan orsaka två skilda matförgiftningar gör *B. cereus* unik.

Bakterien, eller kanske bättre, bakterierna – eftersom det faktiskt rör sig om fem arter – sattes i samband med diarrésjukdom redan för hundra år sedan. Detta efter ett utbrott på ett sjukhus där 300 patienter blev sjuka av köttbullar. På fyrtiotalet menade Stockholms Medicinalstyrelse att cereusenterit var den troliga orsaken till ett hundratal undersökta utbrott men det dröjde till 1950 innan sambandet definitivt klarlades efter ett stort sjukhusutbrott i Oslo. En modig – eller möjligen något annat – epidemiolog drack en renkultur av den misstänkta stammen och blev mycket riktigt magsjuk 13 timmar senare. Den emetiska formen, alltså den som gör att man spyr, klarlades i sin tur efter ett utbrott i London på sjuttiotalet.

B. cereus bildar värmeresistenta sporer som överlever kokning. Om livsmedlet sedan förvaras i rumstemperatur, gror sporerna ut till vegetativa celler som snabbt förökar sig. Det emetiska toxinet bildas då bakterierna växer i livsmedlet och kan sedan inte förstöras hur man än bär sig åt, det klarar till och med autoklavering. Överblivet kokt ris som stekts dagen därpå, en variant av pytt-i-panna på kinesiska restauranger – och helt riskfri om man förvarar det kokta i riset i kylen – har gett den emetiska förgiftningen epitetet "kinamatssjukan".

Diarrén orsakas däremot av att höga halter bakterier, ofta i sporform, kommer in med födan och börjar växa och bilda enterotoxiner i tarmen. Diarréformen, cereusenterit, associeras med helt andra livsmedel än ris, ofta handlar det om kött. Cereusenterit har alltid betraktats som en lindrig, komplikationsfri sjukdom men med upptäckten av det nekrotiserande enterotoxinet K1 har bilden förändrats: vissa stammar kan utgöra en livsfara.

BAKTERIEN

Släktet *Bacillus* omfattar stavformiga bakterier som bildar värmeresistenta sporer. I släktet finns en livsfarlig patogen, *B. anthracis*, som orsakar mjältbrand. Tillsammans med ytterligare fem bacillus-arter bildar denna en grupp genetiskt mycket närbesläktade bakterier, *B. cereus*-gruppen. Fem av arterna producerar en eller flera av de enterotoxiner som ger cereusenterit. Även vissa stammar i arter utanför cereus-gruppen kan undantagsvis producera emetiskt toxin och/eller enterotoxin.

Utvecklingsmässigt hör *B. cereus*-gruppens medlemmar hemma i en utvecklingsgren av grampositiva bakterier som omfattar såväl "äkta" *Bacillus* (*B. subtilis*) som många stafylokocker.

Tabell 3.1. De sex arterna i *Bacillus cereus*-gruppen (2012).

Art	Betydelse för människan
B. anthracis	Orsakar mjältbrand men inte cereusenterit eller matförgiftning
B. cereus	Orsakar cereusenterit och matförgiftning
B. mycoides	Orsakar cereusenterit och matförgiftning
B. pseudomycoides	Orsakar cereusenterit och matförgiftning
B. thuringiensis	Orsakar cereusenterit och matförgiftning
B. weihenstephanensis	Orsakar cereusenterit och matförgiftning

B. cereus-gruppens bakterier är vanliga i jord där de kan överleva nästan obegränsad tid genom sina sporer. Vilken deras huvudsakliga ekologiska nisch är kan diskuteras, men en del tyder på att bakterierna lever i symbios med många insekter hos vilka de finns i tarmkanalen. Det skulle i så fall också förklara hur det kommer sig att en av arterna (*B. thuringiensis*) är en så specialiserad insektspatogen.

Fem arter som ger cereusenterit och matförgiftning

Flertalet stammar av *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis* och *B. weihenstephanensis* har förmåga att bilda en eller flera enterotoxiner. Andelen stammar som kan bilda det emetiska toxinet är lägre, troligen rör det sig bara om några få procent. Genetiskt sett bildar *B. cereus* och *B. thuringiensis* en gemensam undergrupp (och dessa båda utgör i praktiken en enda art) medan *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* och *B. weihenstephanensis* bildar en andra undergrupp.

B. cereus

Det krävs molekylärgenetiska metoder för att skilja arterna åt och det har laboratorierna tidigare inte haft tillgång till. Därför har nästan alla matförgiftande och diarréframkallande stammar historiskt sett identifierats som *B. cereus*. Vilket alltså inte nödvändigtvis är korrekt.

B. mycoides

B. mycoides bildar rhizoida kolonier (kolonier från vilka det utgår hår- eller rotliknande utväxter) medan kolonierna hos *B. cereus* är mera släta och jämna. Det är den enda direkt synliga skillnaden mellan arterna.

B. pseudomycoides

B. pseudomycoides kan inte skiljas från *B. mycoides* med klassiska biokemiska tester, däremot skiljer sig fettsyrasammansättningen mellan arterna. Det finns än så länge dåligt med uppgifter om arten: man vet att den kan producera enterotoxiner men hos en del stammar är produktionen så låg att den inte kunnat upptäckas vid celltoxicitetsmätningar.

B. thuringiensis

Som nämndes ovan är *B. thuringiensis* och *B. cereus* egentligen samma art. Till *B. thuringiensis* räknas bara de stammar som bildar det så kallade cry-proteinet (eller delta-endotoxinet) som dödar insekter. En del sådana stammar odlas kommersiellt för biologisk krigföring mot vissa skadeinsekter och det har spekulerats i att man därmed riskerar att sprida enterotoxinbildande stammar i stora mängder till grönsaker. Hos många stammar finns cry-proteinet på en plasmid. Men plasmiden förloras vid höga temperaturer och därför kan en *B. thuringiensis* i råvaran hastigt och lustigt övergå till att bli en *B. cereus* efter värmebehandling!

B. weihenstephanensis

Det senaste tillskottet i *B. cereus*-gruppen är *B. weihenstephanensis* som kort uttryckt består av de köldtåliga stammarna, alltså de som kan växa vid 7°C eller lägre. Undersökningen som ligger till grund för den nya arten är lite förvånande eftersom man inte anger några DNA-hybridiseringsresultat vilket annars är praxis. Den genetiska grunden för den nya arten är i stället skillnader i rRNA-sekvensen vilket oftast (men inte alltid!) också betyder signifikanta skillnader i DNA-homologi. Köldtåliga *B. cereus*-stammar är naturligtvis välkända inom livsmedelsbakteriologin och är ofta enterotoxin- och ibland även cereulid-producenter. Det ska tilläggas att även köldtåliga *B. mycoides*-stammar numera anses höra till *B. weihenstephanensis*.

Det förefaller vara så att den stora majoriteten av *B. weihenstephanensis* utgör en speciell genetisk undergrup, men så enkelt som att *alla* köldtåliga stammar skulle vara *B. weihenstephanensis* är det tyvärr inte: även enstaka stammar som genetiskt sett är *B. cereus* kan tillväxa ned till 4°C. Så det är väl tveksamt hur mycket livsmedelsbakteriologerna är hjälpta av den nya artindelningen.

Ser vi på fördelningen av arterna i vår nordiska miljö så förefaller de köldtåliga stammarna dominera stort i jorden, i en undersökning var exempelvis 96 % av jordisolaten i Danmark köldtåliga.

B. anthracis

Som framgår av tabell 3.1 är *B. anthracis* den ende av arterna i gruppen som inte producerar "cereustoxiner". Men det kan nämnas att den ofta dödliga sjukdomen mjältbrand i vissa fall faktiskt kan smitta genom livsmedel. Så kallad gastrointestinal mjältbrand efter konsumtion av smittat kött är en ovanlig men obehaglig realitet i de länder där mjältbrand grasserar bland idisslarna, som i Turkiet, Pakistan, Iran och Sudan. Evolutionsmässigt ser *B. anthracis* ut att vara en ganska sentida utveckling ur *B. cereus*. Det finns för övrigt stammar av *B. cereus* som producerar ett mjältbrandsliknande toxin, kallat certhrax.

En sjätte och en sjunde art?

Från östkinesiska sjön har en forskargrupp specialiserat sig på att isolera cereus-liknande bakterier från gyttjeprover. Två av dessa, *B. gaemokensis* (isolerad 2010) och *B. manliponensis* (2011), har av forskargruppen ansetts tillhöra cereus-gruppen men ingen av arterna är när detta skrivs (juni 2012) formellt upptagen i ”Approved List of Bacterial Names”som reglerar taxonomin. Inget är känt om arternas eventuella patogenitet och eftersom de redovisade molekylärgenetiska data snarare pekar på att arterna utgör en satellitgrupp till cereus, lämnar vi dem därhän.

Arter utanför cereusgruppen

Också enstaka stammar inom arterna *B. alvei*, *B. circulans*, *B. firmus*, *B. fusiformis*, *B. lentus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mojavensis*, *B. pumilus*, *B. simplex*, *B. sphaericus* och *B. subtilis* har visats bära på gener för produktion av enterotoxiner eller värmestabila toxiner som liknar det emetiska. Sjukdomsutbrott orsakade av dessa bakterier är dock mycket ovanliga.

SJUKDOMEN

Den emetiska formen är en klassisk matförgiftning där toxinet bildats redan i livsmedlet medan diarréformen orsakas av bakterieväxt i tarmkanalen.

Infektionsdos

Man räknar med att det krävs minst 10 miljoner cereusbakterier för ge symptom, vilket betyder att det behövs runt 100 000 bakterier per gram livsmedel. Det finns dock enstaka undantag där man beräknat att en halt på ca 1000 bakterier per gram livsmedel varit tillräckligt för att orsaka diarrésjukdom. Om detta beror på att vissa stammar fäster in effektivare och bildar enterotoxiner direkt på målcellerna eller om de bildar speciella enterotoxiner, är inte klarlagt.

Inkubationstid och symptom

För den emetiska formen är inkubationstiden mycket kort, vanligtvis 30 minuter till 5 timmar (genomsnittet har av någon beräknats till 48 minuter…). Illamående och uppkastningar är

normalt de enda symptomen, men i en del utbrott drabbas många även av diarré. Om det sedan är en följd av det emetiska toxinet eller om de drabbade också fått i sig enterotoxin är inte klarlagt. Sjukdomen har som regel avklingat helt inom ett dygn.

För diarréformen är inkubationstiden oftast 8-16 timmar. Diarré efter mer än 24 timmars inkubationstid är ovanlig, men förekommer och ett långsammare förlopp anses av vissa forskare vara kopplad till en svårare enteritform. Förutom diarré är buksmärtor ett vanligt symptom. Diarrén är vattnig och brukar vara överstökad inom ett dygn, men långvarigare förlopp förekommer. Feber betraktas som ovanligt såväl vid den emetiska formen som vid diarré, men kan faktiskt uppträda ganska allmänt vid vissa utbrott. Komplikationer är sällsynta men kan förekomma, särskilt vid infektion med stammar som producerar K1-enterotoxin.

Incidens

B. cereus är en vanlig orsak till livsmedelburna utbrott i Asien och rankas där ofta som den tredje vanligaste matförgiftaren. Smittokällan i dessa länder är nästan alltid ris och den emetiska formen dominerar helt vid sjukdomsutbrotten. I Europa och USA är däremot diarréformen vanligast men det finns stora skillnader mellan länderna. I de flesta länder som t ex England och USA, intar *B. cereus* en ganska blygsam position i statistiken. Amerikanska Centers for Disease Control and Prevention (CDC) har beräknat att 0.7 % av de bakteriellt orsakade livsmedelburna infektionerna i USA orsakas av *B. cereus*. Det gör att *B. cereus* intar en niondeplats på listan över de femton bakteriearter som ingår i statistiken. Det kan låta försumbart men eftersom bakterier beräknas orsaka minst 20 miljoner livsmedelsburna infektioner årligen i USA så blir det ändå en hel del fall.

I västvärlden är det de nordiska länderna, Holland och Kanada som redovisar procentuellt flest antal fall. På Island toppar *B. cereus* till och med statistiken och i Norge kommer bakterien som god tvåa. Även i Sverige är cereusenterit en ganska vanlig orsak till livsmedelsburna utbrott, åtminstone ett halvdussin säkerställda utbrott rapporteras årligen. Eftersom sporadiska fall inte registreras – cereusenterit faller inte under smittskyddslagstiftningen som campylobacter och salmonella – kan man bara spekulera i det verkliga antalet fall.

Cereusförgiftning på cellnivå

Det emetiska toxinet cereulid produceras av aktivt växande bakterier i livsmedel. Hos människan – och andra primater – binder toxinet till vagusnervens receptorer vilket skapar nervimpulser som stimulerar kräkningscentrum i förlängda ryggmärgen. Toxinet är kraftigt lipofilt och absorberas lätt i magen varifrån det kommer ut i blodbanorna och ansamlas i levern. Om dosen är extremt hög kan levern slås ut genom att cereulid orsakar jonläckage i leverns mitokondrier. Det hände bl a 2011 då en tjugoårig belgare dog efter att ha ätit spaghetti med en mycket hög cereulidhalt, 15 mg/kg pasta. Dödsfall är dock mycket ovanliga.

Cereusenterit på cellnivå

I sporform klarar cereusbakterierna utan problem magsyran. Efter att ha passerat magsäcken gror de ut och växer till i tarmen. Förmodligen adherar cereus till tarmcellerna, men mekanismen är inte närmare studerad. Väl i position frigörs något av de enterotoxiner; HBL, NHE eller CytK1, som man vet varit orsak till diarréfall. Alla tre toxinerna skadar tarmcellernas membraner genom att bilda porer i membranerna så att tarmcellerna kollapsar.

Andra sjukdomar

B. cereus är den främsta orsaken till en mycket aggressiv ögonsjukdom, endophtalmitis. Denna uppkommer efter en stickskada eller liknande på ögonen varvid infekterande cereus från t ex jord (ibland via kontaktlinser) växer till och bildar stora mängder proteaser som bryter ned vävnaden. Följden kan bli total blindhet efter bara något dygns infektion. *B. cereus* kan också infektera hudskador hos i övrigt friska individer. Det drabbade 2004 ett hundratal amerikanska rekryter som – på amerikanskt vis – fick håret snaggat vid inryckningen. Rekryterna ådrog sig besvärliga cereus-infektioner i skalpen och militären fick en åthutelse av Georgias sjukvårdsstyrelse som hade synpunkter både på såväl klippning som hygien. Man får hoppas att de numera anställt en lite försiktigare frisör.

LIVSMEDEL: TILLVÄXT

Temperatur

B. cereus har normalt ett tillväxtintervall på 8-48°C. En del köldtoleranta stammar, som numera alltså kanske hellre ska kallas *B. weihenstephanensis*, klarar av att växa vid 7°C och i undantagsfall ända ned till 4°C och dessa stammar har naturligtvis tilldragit sig intresse från livsmedelsindustrin. I pastöriserad svensk och norsk mjölk har omfattande studier av Anne-Marie Lindberg visat att det finns en mycket stor skillnad mellan kyllagring vid 5°C – där bakterierna aldrig dominerade – och 7°C där bakterierna till synes obehindrat växte fram. För merparten av stammarna som producerar cereulid tycks 10°C vara den lägsta tillväxttemperaturen. Enstaka köldtåliga stammar finns dock också bland cereulidproducenterna.

Eftersom *B. cereus* bildar sporer klarar de naturligtvis lätt av pastörisering. Sporernas värmeresistens varierar kraftigt mellan olika stammar. Vid 95°C kan D-värdet (alltså den tid det tar att avdöda 90 % av populationen) variera från 30 sekunder till över 30 minuter. Särskilt värmeresistenta verkar stammarna i den serologiska H1-gruppen vara.

Syre

Bacillus är ju aeroba sporbildare, men många arter, och däribland cereus-gruppens medlemmar,

har såväl respirativ som fermentativ metabolism. Bakterierna kan alltså mycket väl växa även i syrefri miljö men samtidigt är de så pass känsliga för koldioxid att förpackningar med modifierad gasatmosfär eller vakuumförpackning hämmar tillväxten. Det verkar också som att anaerob tillväxt hämmas vid temperaturer under 12°C.

pH

B. cereus har, under i övrigt optimala förhållanden, ett tillväxtområde inom pH-intervallet 4.5-9.3. Det betyder att bakterierna får betraktas som syrakänsliga och de växer inte till i livsmedel med pH-värden under 5.

Saltning och rökning

Som nästan alla grampositiva bakterier är *B. cereus* relativt resistent mot saltning och andra sätt att sänka vattenaktiviteten. Torkade produkter som kryddor och mjöl är en viktig spridningsväg för *B. cereus*, inte genom att de kan växa där men genom att sporerna överlever praktiskt taget obegränsad tid i sådana produkter.

Mikrobiell konkurrensförmåga

I råa produkter har *B. cereus* knappast någon konkurrensförmåga alls. Det krävs att den konkurrerande mikrofloran slås ut genom värmebehandling för att *B. cereus* ska kunna tillväxa. Men om en sådan produkt sedan lagras i rumstemperatur kan *B. cereus* snabbt växa till, under optimala förhållanden (30-37 °C) kan bakterierna föröka sig tre gånger i timmen. Pastöriserad mjölk som inte återinfekteras av gramnegativa bakterier förskäms nästan alltid av *B.cereus* (*B. weihenstephanensis*) om mjölken lagras vid 7°C eller högre.

Kött

B. cereus är ganska vanligt förekommande på kött och kan ställa till med problem om köttet efter tillagning förvaras i rumstemperatur. Av elva utbrott som rapporterades under en tvåårsperiod i Sverige orsakades två av köttprodukter; fläskfilé respektive ankpaté. Färskt kött som tillagas och äts direkt är däremot helt riskfritt.

Cateringkycklingar och barbequegrisar

Åtminstone i USA står cateringfirmor för en stor del av cereus-utbrotten. Stora beställningar och små kylresurser är då det genomgående temat. I kaliforniska Napa fick ett brudpar in den ovälkomna bröllopsgästen med kycklingen vilket fick till följd att deras 140 inbjudna bröllopsgäster hastigt bröt upp.

Andra cateringkycklingar gav 160 sjukhusanställda diarré, mer än hälften av de drabbade kände sig så pass dåliga att de uppsökte sjukhusets akutavdelning. Om det berodde på att de så

att säga redan var på plats eller om utbrottet var ovanligt häftigt framgår inte av undersökningsrapporten som däremot noterar att den genomsnittliga inkubationstiden var 13 timmar och den likaledes genomsnittliga varaktigheten 24 timmar.

Att helstekt barbequegris som fått svalna 18 timmar i rumstemperatur inte är att rekommendera fick 140 besökare på en öppethus-dag för ett amerikanskt universitet bistert erfara. I det fallet var det många som drabbades sent, mer än en tredjedel fick diarré efter mer än 24 timmars inkubationstid.

Fisk och skaldjur

Precis som kött innehåller fisk och skaldjur ofta små mängder *B. cereus* men alla vet ju hur bortglömda skaldjursrester luktar efter en natt i rumstemperatur. En temperaturmisshandel tillräcklig för att få *B. cereus* att nå riskabla halter verkar därför osannolik. Men inte omöjlig. Tre svenskar fick cereusenterit vid ett utbrott som orsakades av "bristande avsvalning" av friterade räkor. Och varje år förekommer det faktiskt i Sverige enstaka cereus-liknande utbrott från kokta räkor och kräftor som förvarats vid rumstemperatur uppåt ett dygn. Men ovanligt är det.

Mejeriprodukter

Pastöriserad mjölk förskäms ofta av *B. cereus* om lagringstemperaturen är 7°C eller högre. Det innebär att halten av bakterierna då är minst 10 miljoner per mL. Med all mjölk som konsumeras borde vi ha en formlig epidemi av cereusenterit men nästan ingen verkar bli sjuk. Varför det är så finns det inget bra svar på.

Mejeriprodukter som helhet är däremot en klar riskfaktor. En vanlig orsak till cereusutbrott i Sverige är t ex gräddsåser. Då rör det sig antingen om en sås som återanvänts många gånger under dagen i ett restaurangkök eller om dålig rengöring av såskastrullerna. Även vispad grädde har orsakat flera utbrott. Och varm kakaomjölk i automater med dålig varmhållning har lett till flera utbrott i USA så det verkar inte vara mjölken i sig som minskar bakteriens virulens. Det har spekulerats i att syresatta produkter, med vispad grädde som typexempel, skulle öka toxinproduktionen men åtminstone för cereulid tycks det faktiskt vara tvärtom, produktionen minskade kraftigt vid luftning enligt en studie.
Ost är i alla fall helt riskfritt.

Gräddbakelser och prinsesstårtor

På de handikappades sportdag i Thailand insjuknade 500 personer efter en inkubationstid på tre timmar i den emetiska formen. Riset visade sig, för ovanlighetens skull i Asien, vara oskyldigt och i stället var det gräddbakelser som var orsaken. Bakelserna har tillverkats dagen innan och lämnats åt sitt öde 12 timmar i "rumstemperatur". Det behövs dock ingen thailändsk rumstemperatur för att vispad grädde ska innebära en risk. Dålig kylhållning av det svenskaste av alla bakverk, prinsesstårtan, gav efter en inkubationstid på 24 timmar 30 personer en svår

cereusenterit där flera av de drabbade inte bara hade diarré utan också uppkastningar, feber och huvudvärk.

Vegetabilier

Torra vegetariska produkter innehåller praktiskt taget alltid *B. cereus*, inte sällan i höga halter. Kokt ris, pasta och nudlar som förvaras vid rumstemperatur och som dagen efter återanvänds i matlagningen, är den överlägset viktigaste anledningen till utbrott av den emetiska cereusformen. Och anledningen är alltså att det inte går att koka eller steka bort det emetiska toxin som redan bildats. Bröd brukar ju vara något av det säkraste man kan äta i alla delar av världen, men det har faktiskt förekommit fall där *B. cereus* växt till och bildat emetiskt toxin under jäsningen och detta har sedan orsakat förgiftning efter bakningen.

Färska grönsaker och liknande är i stort sett riskfria, även om groddar faktiskt har orsakat ett emetiskt utbrott efter att *B. cereus* vuxit till i en hobbyodling. Stekta grönsaker som förvarats vid rumstemperatur har däremot lett till flera utbrott, varav ett par i Sverige. Och ett av de största utbrotten i Sverige, med över 100 insjuknade, orsakades av blomkålssoppa som svalnats av vid alldeles för hög temperatur.

Även om ris och pasta blivit allt vanligare som orsak till utbrott av den emetiska formen även i Sverige, så är vi fortfarande ett potatisätande land. Återanvänt potatismos för t ex gratinering är därför en vanlig orsak till emetiska utbrott i vårt land.

Hälsoskyddspolisen på plats

Ett nära nog polisiärt ingripande kunde Maines hälsoskyddsnämnd klara av vid ett utbrott på en japansk restaurang. När myndigheten kontaktades pågick utbrottet nämligen för fullt. Inkubationstiden var så kort som en timme och de stackars spyende gästerna hade inte hunnit lämna restaurangen när hälsoskyddet anlände. Elva personer insjuknade och stekt ris var huvudmisstänkt. Normalt är symptomen på den emetiska formen enbart uppkastning och illamående, men i just det här fallet visade det sig så småningom att nio dessutom fick diarré. Två av dem så långvarigt att de två veckor senare fick läggas in på sjukhus på grund av uttorkning. Vilket visar att även den så "milda" cereusförgiftningen ibland kan ställa till med ordentliga bekymmer.

Den farliga alkoholen

På Taiwan drabbades 15 sjukhuspatienter av *B. cereus* i blodet. Efter ett omfattande detektivarbete lyckades man spåra den osannolika smittkällan: 70 %-ig sprit som användes för sårdesinfektion. Det visade sig att en stam av *B. cereus* etablerats på spritfabriken och att all sprit som producerades där var kontaminerad med sporer. Vad man som konsument möjligen kan

lära sig av fallet är att det inte alltid behöver vara alkoholen i whiskyn som får oss att må illa.

Vatten

B. cereus är inte vattenburen.

VIRULENSFAKTORER

Toxinproduktion

Åtminstone fem olika enterotoxiner, av vilka tre med säkerhet har varit inblandade vid diarréer, kan bildas av olika stammar inom cereusgruppen. Enterotoxinproduktion är mycket vanligt, de flesta stammar producerar ett eller flera toxiner. Däremot finns det stora skillnader i *mängden* enterotoxin som produceras mellan olika stammar, det kan skilja nästan tusenfalt i produktionen. Om en stam är farlig eller inte är därför förmodligen mera en kvantitativ än en kvalitativ fråga. Utöver enterotoxin bildar en del stammar även det emetiska toxinet.

1. Emetiskt toxin = cereulid

Det emetiska toxinet är en ringformad peptid som består av endast 12 aminosyror. Molvikten är så låg, 1.2 kDa, att peptiden inte ger någon immunologisk reaktion. Liksom många andra lågmolekylära peptider som bildas av bacillusarter har cereulid en antimikrobiell effekt. Cereulid bildas under bakteriernas tillväxtfas och vid sjukdomsutbrott finns det redan färdigbildat i livsmedlet. Toxinet är extremt motståndskraftigt och klarar exempelvis autoklavering under ett par timmar. Inte heller syror eller proteaser rår på toxinet. Det är med andra ord nästan omöjligt att avlägsna om det redan bildats.

Cereulid binder till en serotininreceptor i tarmväggen, den så kallade 5HT3-receptorn (5-hydroxitryptamin) vilket överstimulerar vagusnerven med en våldsam kräkningsreflex som följd. Men cereulid är dessutom en jonofor (alltså ett ämne som bildar lipidlösliga komplex med katjoner, i cereulidins fall kalcium) som kan penetrera cellmembran och orsaka jonläckage. Särskilt mitokondrier är känsliga och massiva doser av cereulid kan vara direkt livsfarligt genom att leverns mitokondrier slås ut. Även en del av kroppens försvarsceller verkar vara känsliga för cereulid. De så kallade naturliga mördarcellerna – ett slags vita blodkroppar som har betydelse för oskadliggörandet av tumörceller och förhindrande av autoimmuna sjukdomar – skadas och undertrycks även vid mycket låga doser cereulid.

Medan alla proteiner produceras i ribosomerna så sätts vissa korta peptider ihop utan att ribsomerna är inblandade. Det gäller även cereulid som produceras av ett icke-ribosomalt peptidsyntetas vars genetiska kontroll är beläget på en megaplasmid på 208 kb.

Det är bara några få procent av *B. cereus*-stammarna som producerar cereulid. Dessa stammar utgör två speciella undergrupper, en tillhörande serogrupp H1, medan den andra är spridd i

serogrupperna H3 och H12.

2. Hemolytiskt enterotoxin = HBL

Det hemolytiska enterotoxinet består av tre proteiner (kallade B, L1, L2; därav beteckningen HBL) som alla behövs för maximal aktivitet. Proteinernas molvikter varierar något mellan olika stammar men alla tre ligger runt 40 kDa. B-proteinet antas ansvara för inbindningen till mottagliga celler. Ungefär hälften av stammarna inom cereus-gruppen producerar HBL, som är den dominerande orsaken till cereusenterit. Toxinet ger skador på epitelcellernas membran. HBL är värmelabilt och förstörs snabbt vid 60°C. Det är också syrakänsligt och passerar inte i någon större utsträckning genom magsäcken. Enterotoxin som bildats redan i livsmedlet är därför sällan orsak till cereusenterit som i stället är en följd av tillväxt av bakterier i tarmkanalen. Att en stam är hemolytisk är inte liktydigt med att den producerar HBL, flera andra hemolysiner som inte är enterotoxiner har beskrivits från cereus-gruppen.

3. Icke hemolytiskt enterotoxin = NHE (Non Hemolytic Enterotoxin)

NHE är liksom HBL ett trekomponenttoxin. De tre proteinerna har molvikter på 45, 39 respektive 105 kDa. Alla tre proteinerna behövs för maximal toxicitet. Det största proteinet antas ansvara för inbindningen till mottagliga celler och är dessutom ett kollagenas. NHE verkar produceras av åtminstone 80 % stammarna men är ändå betydligt mera ovanligt än HBL som orsak till cereusenterit. I likhet med HBL är NHE värmelabilt, syrakänsligt och ger skador på epitelcellernas membran. Genom att NHE normalt inte kan passera genom magsäckens sura miljö orsakas även NHE-cereusenterit av bakterier som tillväxer i tarmkanalen.

4. Enterotoxin K1 = Cytotoxin K1 = CytK1

Efter en svår matförgiftning där tre personer dog isolerades det hemolytiska enterotoxinet K1 från den diarréframkallande stammen. Enterotoxin K1 har ingen genetisk likhet med övriga cereusenterotoxiner. Det bildar kanaler (porer) i mottagliga celler och är kraftigt celltoxiskt (nekrotiserande). Det är ett enkelt protein med en molvikt på 34 kDa. Generna för produktion av toxinet är ganska vanligt förekommande hos stammarna. Trots det är CytK-enterit sällsynt, om det sedan beror på att de flesta stammar är lågproducerande eller om det finns någon mekanism som hindrar toxinet från att produceras är inte känt. Ett CytK2 är också känt, men dess giftighet är lägre, ca 20 % av det hos CytK1.

5. Enterotoxin FM = EntFM = EntFM/S

FM-enterotoxinet är ett protein på 45 kDa. Det har ännu inte kunnat verifieras som orsak till något utbrott av cereusenterit. Det produceras troligen bara av ett fåtal stammar.

6. Enterotoxin T = EntT

Produktion av enterotoxin T är mycket vanligt förekommande hos stammarna. Enterotoxin T har än så länge inte kunnat bindas till något utbrott av cereusenterit och trots namnet förefaller det tveksamt ens om det har någon egentlig enterotoxinaktivitet. Det är ett enkelt protein på 41

kDa.

7. Hemolysin II = HlyII

Hemolysin II är ett porbildande toxin med ganska bred cytotoxisk effekt. Det har likheter med stafylokockernas alfa-toxin. Om det är inblandat vid enteriter orsakade av *B. cereus* är inte känt.

PÅVISNING

Bakterierna

Mannitol Egg Yolk Polymyxin (MYP) och Polymyxin Egg Yolk Mannitol Bromthymol blue Agar (PEMBA) är sedan länge vanliga referensmedier för kvantifiering av *B. cereus* från livsmedel.

Båda bygger på samma principer men PEMBA är lite lättare att avläsa. Basmediet för PEMBA innehåller pepton 1 g, mannitol 10 g, Na-pyruvat 10 g, NaCl 2 g, $MgSO_4$ 0.2 g, Na_2HPO_4 2.5 g, KH_2PO_4 0.25 g, bromtymolblått 0.12 g och agar 14 g. Detta löses i 950 mL vatten varefter 50 mL ägg-gulelösning och 100 000 IU polymyxin B-sulfat tillsätts. PEMBA ytodlas varvid inkubering sker vid 30°C 24 h. PEMBA finns kommersiellt tillgängligt hos Oxoid som *Bacillus cereus* selective medium.

Blåaktiga kolonier (cereus bildar inte syra från mannitol) som är omgivna av en blå utfällningszon bedöms preliminärt som *B. cereus*. Här finns en felkälla eftersom inte alla cereus bildar lecitinas. En del laboratorier kompletterar därför cereus-bestämningen med att också använda blodagar med polymyxin. Enterotoxinproducerande *B. cereus* är nästan alltid hemolytiska men att helt ersätta PEMBA med blodagar är ändå inte att rekommendera eftersom såväl *B. mycoides* som de emetiska stammarna av *B. cereus* inte ger någon eller endast svag hemolys.

Oavsett vilken metod som används bör man undvika att fästa för stor vikt vid koloniernas utseende; alltså om de är släta, rhizoida eller liknande. Det är ju inte enbart *B. cereus* som bildar toxinerna!

Biokemisk identifiering

PEMBA-positiva kolonier brukar testas för åtminstone hemolys och sporbildning. Det är en ganska praktisk åtgärd eftersom båda testerna kan utföras på blodagar. Som ovan nämndes är enterotoxiska *B. cereus* (men inte *B. mycoides* och inte cereulidproducenterna!) nästan alltid hemolytiska och bakterierna sporulerar villigt efter ett par dygn på blodagar. Sporerna ligger centralt eller subterminalt och sväller inte cellen. I övrigt kan man gott notera om kolonierna är rhizoida eller inte, men att försöka dela in *B. cereus*-gruppens medlemmar enbart med hjälp av

biokemiska tester är ganska meningslöst. Det krävs molekylärgenetiska metoder för att göra den indelningen.

Ett test som har en viss betydelse i sammanhanget är stärkelsehydrolys. De allra flesta cereusbakterier bildar syra från stärkelse, undantagen är de stammar som producerar det emetiska toxinet och frånvaro av stärkelsenedbrytning har därför använts som en biokemisk screeningmetod för cereulidproducenter. Som vanligt när det gäller biokemiska tester är metoden dock långtifrån hundraprocentig.

Övrig identifiering

Det finns ganska gott om väldokumenterade PCR-baserade metoder för att påvisa arterna.

Toxinerna

Immunologisk teknik

För HBL och NHE finns kommersiellt tillhandahållna immunokits. HBL kan detekteras med en RPLA-metod från Oxoid och NHE med en ELISA-teknik från Tecra. För såväl HBL som NHE är den immunologiska reaktionen specifikt riktat mot ett av de tre ingående proteinerna i enterotoxinerna, alltså inte mot det kompletta toxinet. En stor fördel med de immunologiska metoderna är att de kan användas för kvantitativa analyser.

PCR

Samtliga enterotoxiner kan påvisas med PCR-teknik. Genom att främst HBL- men även NHE-generna kan variera en del mellan olika stammar kan falskt negativa resultat ibland fås för dessa enterotoxiner. Det finns numera även PCR-metodik för att separera CytK1 och CytK2. Flera PCR-metoder som påvisar gener associerade med cereulidproduktion finns numera också.

Cytotoxisk effekt

Såväl enterotoxinerna som det emetiska toxinet skadar olika typer av celler och celltoxicitetstester har i regel visats sig vara den känsligaste metoden för att spåra toxinerna. För enterotoxinerna har framför allt CHO- och Vero-celler använts, medan det emetiska toxinet främst testats på Hep-2-celler. En snabbare test för enterotoxinerna, där svaret fås på 1 timme i stället för de gängse 72 timmarna, baseras på Ped-2E9-celler.

För att skilja mellan effekten av enterotoxiner och det emetiska toxinet autoklaverar man provet: de värmekänsliga enterotoxinerna inaktiveras då medan det värmestabila emetiska toxinet inte påverkas. För det emetiska toxinet kan även två andra tester användas. Cereulidin inhiberar spermiers rörlighet och spermietester har därför används i 15 år för att påvisa toxinet.

Metodiken kan användas som en semikvantitativ analys men kvantitativa analyser kanske bättre utförs med mitokondrier (som sväller upp då de utsätts för toxinet). Även HPLC-MS har använts, mest för att detektera toxinet. Även en LC-MS-metod (vätskekromatografi-mass-spektrometri) för att kvantifiera cereulidin i livsmedel har publicerats.

Epidemiologi

Serologi

Ett serologiskt schema baserat huvudsakligen på flagellära antigen (H-antigen) hos *B. cereus* används av flera laboratorier. De mest värmeresistenta sporerna tillhör för det mesta stammar i den serologiska H1-gruppen och det är ofta också denna grupp som är inblandad vid emetiska utbrott. Att många stammar hamnar i samma grupp begränsar naturligtvis samtidigt den serologiska metodens användbarhet för typningsarbetet.

Fagtypning

Flera olika fagtypningsscheman har beskrivits, bl a från Finland, men det som använts mest är ett kanadensiskt som uppges kunna typa 97 % av stammarna. Problemet med fagtypningen är detsamma som med serologin: en alltför stor del av stammarna hamnar i samma grupper. Fyrtio procent av de stammar som varit inblandade i utbrott hamnar exempelvis i fagtyp 1.

Molekylärgenetik

PCR-baserade metoder har mestadels används för att spåra stammar inom livsmedelsproduktionen, mera sällan till egentliga epidemiologiska undersökningar. Av de molekylärgenetiska metoderna har RAPD använts flitigast, men denna metod har ju kanske sin styrka mer som screeningmetod än för egentligt epidemiologiskt arbete. I Sverige har SIK med viss framgång använt en automatiserad from av ribotypning för att screena livsmedelsstammar, men även ribotypningen har lite för dålig upplösningsförmåga för att vara riktigt lämplig för epidemiologi. Å andra sidan är såväl RAPD som ribotypning i flera avseenden bättre lämpade än de nuvarande serologiska teknikerna och fagtypningen. Mer potenta metoder som PFGE har hittills bara använts vid några få tillfällen och då med gott resultat

Brucella

– Getostens malaria –

ÖVERSIKT

Maltafeber… Kretafeber… Brucellos… Medelhavsfeber… Bangs sjukdom… Undulantfeber… Gibraltarklippsfeber… County fever of Constantinople…

Kärt barn och fruktad sjukdom har många namn. Mer än en halv miljon fall av brucellos upptäcks varje år. Mörkertalet är stort eftersom brucellos är vanlig mest i fattiga länder med dåliga medicinska resurser. I Sverige var det länge sedan brucella skapade rubriker, vi utrotade bakterien 1957 från nötboskap och svin och har sedan dess sluppit ifrån den. Bara någon enstaka utlandsresenär insjuknar, under den senaste tjugoårsperioden redovisar Smittskydds–institutet 1-6 importerade fall per år. Brucellos är sällan dödlig, inte ens i äldre tider översteg dödligheten 3 % och idag kan infektionen botas med antibiotika. På artonhundratalet var sjukdomen fruktad eftersom den gav återkommande feberattacker som på malariavis kunde pågå i flera år och som gjorde den drabbade fullständigt orkeslös och oförmögen att klara av några sysslor.

Malta var en av de platser som var särskilt hemsökt för hundra år sedan. Att lokalbefolkningen insjuknade kunde väl de brittiska myndigheterna stå ut med, men att imperiets utkommende–rade garnisoner slogs ut av Maltafebern gav anledning till mycket bekymmer. Så det var ganska självklart att det skulle bli en garnisonsläkare på Malta som lyckades isolera bakterien. Skotten David Bruce köpte, inspirerad av Kochs arbete med mjältbrandsbacillen, ett mikroskop 1887 och undersökte mjälten hos en soldat som avlidit av Maltafebern. Han fann där i det närmaste en renkultur av den bakterie som skulle få sitt namn efter honom, *Brucella melitensis*, och lyckades få den att växa på en agarplatta. Den enda omedelbara praktiska konsekvensen var att Bruce adlades, det skulle däremot dröja en bra bit in på nästa sekel innan man fick klart för sig att det var öns getter som var smittkällan. För brucellos är en utpräglad zoonos, alltså en sjukdom som överförs från djur till människa. Sjukdomen sprids för det mesta genom direktkontakt med smittade djur, framför allt får och getter, men kan också drabba konsumenterna. Opastöriserad getost i länder med brucellos kan exportera sjukdomen över hela världen.

BAKTERIEN

Släktet *Brucella* består av gramnegativa, orörliga, ovala, mycket små stavar. De är katalaspositiva och som regel också oxidaspositiva. Bakterierna har en strikt respirativ metabolism och växer inte anaerobt. En del stammar fordrar en förhöjd koldioxidhalt och vid isolering av brucella brukar man därför använda en gasblandning som innehåller 5-7 % CO_2. Bakterierna har ett absolut behov av niacin och thiamin och ibland också andra B-vitaminer. De odlas lättast på rika medier som t ex blodagar, men de är egentligen inte särskilt kräsna: får de bara sina B-vitaminer kan de odlas på ganska enkla näringsmedier. Brucella är utpräglat mesofila och växer bara inom temperaturintervallet 20-40°C.

Brucella är parasitära organismer vars reservoar är animala celler. Utanför sina värddjur förökas bakterierna knappast och de har som regel ganska kort överlevnad, i bästa fall – som i jord – några månader.

Arter

Det finns egentligen bara en brucella-art, *B. melitensis*. Arten är genetiskt extremt homogen, nästan alla undersökta stammar har mer än 95 % DNA-homologi med varandra (att jämföra med andra bakterier där gränsen för vad som ryms inom en art dras vid 70 %). Att taxonomerna ändå accepterat en indelning i flera arter, tabell 4.1, beror på att systemet är inarbetat och bedöms som praktiskt eftersom de olika "arterna" hör hemma i olika värddjur och har mycket varierande förmåga att orsaka sjukdom hos människan. Förmodligen kommer fler ”arter” att beskrivas inom den närmaste framtiden eftersom man hittat nya former, inte minst hos marina däggdjur men även hos rävar.

Tabell 4.1. Arter av *Brucella* och deras förekomst (2012).

Art	Primär värd	Patogenitet för människa
B. abortus	Nötboskap	Ja, i en ganska mild form
B. canis	Hundar	Ja, i en ganska mild form
B. ceti	Marina däggdjur	Ja, troligen
B. inopinata	Okänt (isolerad från implantat)	Okänt
B. melitensis	Får och getter	Ja, i en svår form
B. microti	Sork	Okänt
B. neotomae	Gnagare	Nej
B. ovis	Får och getter	Nej
B. pinnipediae	Marina däggdjur	Ja, troligen
B. suis	Gris, nötkreatur, ren	Ja, i en svår form

Brucella i utvecklingsträdet

Brucella hör liksom nästan alla andra patogena gramnegativer hemma bland proteobakterierna, närmare bestämt i den utvecklingsgren som kallas alfa. Den enda riktigt nära släktingen där är den opportunt patogena bakterien *Ochrobactrum intermedium*. Mera avlägsna släktingar i alfa-grenen är de växtassocierade släktena *Rhizobium* och *Agrobacterium*. Vid en första anblick kan släktskapet verka förbryllande, men det finns analogier: både brucella och de växtassocierade bakterierna lever i ett mycket nära och komplicerat förhållande till sina respektive värdar, och bakteriernas DNA finns uppdelat på två kromosomer mot den sedvanliga enda kromosomen för de flesta andra bakterier.

Global förekomst

Brucella förekommer hos kött- och mjölkproducerande djur i nästan hela världen. Helt fria från brucella bland tamboskapen är man endast i Norden, Storbritannien, Holland, Österrike, Schweiz, Filippinerna och Japan. I Alperna finns en utbredd smitta av *B. suis* bland vildsvinen och det har lett till farhågor att även frigående tamgrisar riskerar att smittas.

Värst utsatta är Mellanamerika, Mellersta Östern samt Central- och Sydafrika. I Europa är det i synnerhet i Ryssland, Italien, Spanien och Portugal som sjukdomen grasserar hos djuren och i dessa länder drabbas också årligen tusentals människor av brucellos. I Turkiet, som tidigare haft sjukdomen under någorlunda kontroll, har brucella återkommit de senaste åren. Epidemier slår till då och då även i länder med låg brucellaförekomst. De senaste decennierna har epidemier noterats i bland annat Israel och på Malta. Vaccinationsprogram har drastiskt minskat förekomsten av *B. abortus* hos nötboskap medan vaccination mot *B. melitensis* hos får och getter inte har varit lika framgångsrik. Brucella kan överleva några månader i jord vilket har stor betydelse för bakteriens spridning.

Brucella hos djur

Praktiskt taget alla däggdjur kan infekteras av brucella. Abortering är den vanligaste följden, men i övrigt kan symptomen vara mycket varierande. Många djur är symptomlösa bärare av bakterierna men t o m rovdjur, som annars inte verkar vara naturliga värdar för bakterien, kan insjukna av de brucellabakterier de får i sig från bytesdjuren.

För människan är det, i olika delar av världen, får, getter, nötboskap, kameler, vattenbuffel, ren, och svin som är de viktigaste smittkällorna. Decenniers nedgång i brucellaförekomst (*B. abortus*) hos nötboskap kanske är på väg att brytas sedan *B. melitensis* på senare tid lyckats ta språnget över från getterna och nu snabbt ökar i en del länders nötboskapshjordar, bl a i medelhavsområdet. Just *B. melitensis* är den mest fruktade av brucella-arterna eftersom den orsakar den svåraste formen av brucellos hos människan.

Den annars vanligaste arten hos djur är *B. suis*. Denna indelas i fem biovarianter (bv) av vilka

tre (bv 1-3) hör hemma hos svin, bv 2 finns dessutom ofta hos harar. Bv 4 förekommer hos en imponerande lång rad djur, varav det främst är renar i Ryssland och Nordamerika som utgör ett hot mot människan. Bv 5 slutligen, finns mest hos gnagare och det enda fall av bv 5-brucellos som drabbat människor har inrapporterats från Ryssland där en huskatt, som förmodligen ätit möss, smittade sex personer.

Av de övriga, inte livsmedelsburna arterna, finns *B. canis* främst hos hundar och rävar, men det är ganska sällan som människor smittas. I Sverige har vi länge klarat oss ifrån hundbrucellos men efter den mikrobiologiskt vansinniga ändringen av karantärsbestämmelserna inom EU 2004 var det bara en tidsfråga innan oseriösa/okunniga importörer skulle ändra på det. I december 2010 konstaterades också att en polskimporterad tik på en kennel hade sjukdomen. Tiken avlivades 2011 men enligt uppgift i undersökningsrapporten som publicerades 2012 finns numera den hanhund som smittade tiken i i Sverige. Varför kan man bara fråga sig.

B. neotomae har bara påträffats hos en sorts gnagare i sydvästra USA och har vad man vet aldrig smittat människor.

B. ovis är mycket vanlig hos får och getter, men tycks vara ofarlig för människor. De arter som hittats hos marina däggdjur tycks däremot vara överförbara till människa, vilket ett fall av laboratoriesmitta och tre fall av livsmedelsinfektioner visar.

SJUKDOMEN

Brucellos är en typisk zoonos och den ojämförligt vanligaste smittovägen är direktkontakt med djur, särskilt får och getter. Spridningsvägen är oftast aerosoler som andas in. En särskild risk för bakteriologer är att brucella är mycket virulent även i laboratoriet och det finns massor av kända fall med laboratoriesmitta. Brucella klassas därför som en högriskbakterie (typ 3-organism) vid laboratoriearbete.

Infektionsdos

Infektionsdosen för spridning genom magtarm-kanalen är inte känd. Mjölk från infekterade djur innehåller dock så rikligt med brucellabakterier att smittorisken är mycket stor.

Inkubationstid

Det tar minst en vecka från smittotillfället till att de första symptomen visar sig. Oftast är inkubationstiden ungefär tre veckor och den kan vara så lång som tre månader.

Symptom

Brucellos kan manifesteras på så många sätt att sjukdomen även i industriländerna ofta blir feldiagnosticerad. Feber är nästan den enda gemensamma nämnaren och den kan bli hög, 40-

41°C. Återkommande febertoppar under flera månader är vanligt, men sjukdomen kan också gå in i en mild, nästan symptomlös fas efter den första febertoppen. Andra vanliga symptom är kallsvettning, huvudvärk, trötthet, muskelsvaghet, led- och ryggsmärtor, och viktminskning. Vid infektion med *B. melitensis* och *B. suis* påverkas ofta lymfkörtlar, lever och mjälte, som alla tenderar att förstoras, samt benmärgen. Svåra komplikationer som hjärtmuskel-, hjärn- och hjärnhinneinflammation förekommer också. Dödsfall är sällsynta om behandling sätts in, annars räknar man med att upp till 2 % av de insjuknade avlider. Sjukdomens varaktighet är mycket varierande, alltifrån några dagar till flera år.

Incidens

Brucellos är globalt sett mycket vanlig, troligen insjuknar flera miljoner människor varje år. Antalet diagnosticerade fall uppgår till ungefär en halv miljon. Bara en mindre del smittas genom livsmedel, men brucellos räknas ändå som den elfte vanligaste livsmedelsburna bakterieinfektionen i USA där man beräknar att uppåt tusen amerikaner årligen insjuknar efter att ha ätit opastöriserad mexikansk getost. Just i Mexiko är incidensen mycket hög. I Norden har vi inte haft några inhemska fall sedan sextiotalet. Däremot rapporteras ett halvdussin fall årligen hos svenskar som blivit smittade utomlands.

Brucellos på cellnivå

Förmodligen tar sig brucella in i värdcellerna genom att förändra cellmembranernas aktin, en vanlig strategi hos invasiva bakterier (jämför t ex enteroinvasiva kolibakterier). Det är ett typ fyra sekretionssystem (som även finns hos växtpatogena bakterier) som styr aktinförändringen och transfern av proteiner in i värdcellerna. Vita blodkroppar (monocyter och makrofager), alltså värddjurets egna försvarsceller mot inkräktare, är målet för brucella. Väl inne i cellerna för brucella en så anonym tillvaro som möjligt för att undvika fagocyternas angrepp. Anonymiteten upprätthålls såväl passivt som aktivt. Passivt genom att cellväggens lipopolysackarider är av en sådan typ att de inte tilldrar sig något större intresse från immunförsvaret, aktivt genom att brucella utsöndrar en rad proteiner som på ett ännu okänt sätt hämmar fagocyternas aktivitet. De bildar också en luftblåsa (*brucella-containing vacuole, BCV*) inuti vilken brucella skyddas mot fagocyternas kemiska arsenal. En följd av infektionen är att brucella hindrar den ”programmerade celldöden” hos fagocyterna. (Om detta sedan skulle kunna tolkas som det första steget till evigt liv är en annan historia.)

Brucella når så småningom det endoplasmatiska nätverket, det kanalsystem som har till uppgift att transportera ämnen till olika ställen i cellen. Här reproduceras bakterierna. De symptom den drabbade får har att göra med kroppens egna försök att göra sig kvitt bakterierna, inte på några toxiner som bakterierna utsöndrar.

LIVSMEDEL: TILLVÄXT

Temperatur

Brucella kan inte tillväxa vid temperaturer under 20°C och tillväxt i livsmedel förekommer knappast. Bakterierna är känsliga för höga temperaturer och dödas både av pastörisering och vid normal tillagning av kött.

pH

Brucella är syrakänsliga och dör av under lagringen av ett fermenterat livsmedel. Nytillverkade fermenterade livsmedel som korv och ost kan däremot innehålla tillräckliga mängder virulenta brucella för att orsaka sjukdom.

Torkning och rökning

Brucella är ganska resistenta mot torkning och rökning vilket betyder att enbart dessa åtgärder inte är tillräckliga för att förhindra brucellos.

LIVSMEDEL: PRODUKTER

Det är enbart kött, mjölk och ost som innebär en reell risk för brucellos. Alla andra livsmedel är i princip riskfria.

Kött

Kött och inälvsmat från får, getter, nötboskap och svin är den näst vanligaste orsaken till livsmedelsburen brucellos. I länder med andra typer av djuruppfödning kan kött från andra djur vara den viktigaste smittokällan. Det gäller t ex renskötsel i norra Ryssland, Alaska och Kanada. Lokalt äts renkött ofta torkad eller rökt och eftersom brucella är ganska motståndskraftig mot dessa urgamla former för konservering, är smittorisken betydande. De skandinaviska renarna är smittfria. I de flesta arabstater är brucellos mycket vanlig och där är det inte sällan kameler som är orsaken till sjukdomsutbrotten. Såväl *B. abortus* som *B. melitensis* och *B. suis* är vanliga hos kamelerna. Bjuds du på kamelkött, se då till att åtminstone få det genomstekt! I USA finns *B. abortus* endemiskt hos älg i Klippiga Bergen.

Mjölk och ost

Den vanligaste orsaken till livsmedelsburen brucellos i länder med inhemsk smitta är opastöriserad mjölk, i Jordanien beräknas exempelvis 60 % av de insjuknade barnen smittas på detta sätt. Det är framför allt opastöriserad getmjölk som orsakar sjukdom.

Av exportprodukterna är opastöriserad, färsk getost den stora riskfaktorn och i Kalifornien betraktas importerad getost till och med som den vanligaste orsaken till brucellos. I Spanien,

framför allt Andalusien, är det ganska vanligt med smärre utbrott av brucellos efter konsumtion av färsk getost gjord av opastöriserad mjölk. Men man bör undvika okontrollerade färska getostar från hela medelhavsområdet, södra Frankrike och flertalet östländer eftersom *B. melitensis* där förekommer, ibland mycket allmänt, hos getterna. I Turkiet förekommer brucella i uppåt 10 % av de färskostar från getmjölk som saluförs på marknader.

Även många fårhjordar är smittade med bakterien: år 2000 räknade man inom EU med att 20 % av de spanska fårhjordarna var infekterade, medan siffran för övriga medelhavsländer låg runt 5 % och i Frankrike 0.5 %. Men fårost är mera sällan orsak till brucellos i Europa eftersom den oftast lagras en tid och då dör brucellabakterierna. Det är således helt riskfritt att äta opastöriserad italiensk *Pecorino* och när det gäller den spanska motsvarigheten *Manchego* så är denna dessutom pastöriserad.

Risken att drabbas av brucellos från opastöriserad komjölk är ganska liten i Europa eftersom korna i industriländer mera sällan bär på bakterierna. Dessutom var det åtminstone fram tills helt nyligen bara den förhållandevis beskedliga *B. abortus* man behövde oroa sig för. För opastöriserade hårda komjölksostar gäller att de är lagrade, och lagrade ostar är som nämnts ofarliga.

Mopedburen queso blanco

I Houston, Texas, fick ett sjukhus in sex patienter som alla uppvisade symptom på brucellos. De serologiska testerna gav positivt utslag och en utredning sattes igång. Samtliga insjuknade var mexikaner och vid uppföljningen kunde man konstatera att ytterligare 26 mexikaner smittats (vilket visar att mörkertalet kan vara stort även vid utbrott i industriländer). Av de totalt 32 insjuknade, vars ålder hade en spännvidd från 2 till 81 år, hade 19 brucella i blodet och en hade dessutom fått in bakterien i benmärgen.

Man lyckades aldrig isolera brucella från något livsmedel, men från intervjuerna kunde man dra en klar slutsats: praktiskt taget allihop hade köpt *queso blanco* (färsk getost) av gatuförsäljare som körde omkring med moped. Osten var gjord på opastöriserad mjölk i en liten stad i Mexiko och olagligt importerad och såld. När massmedia gick ut med nyheten försvann såväl gatuförsäljare som brucella.

Thassos, Grekland

I Grekland, liksom i övriga Medelhavsområdet, är brucellos endemisk. För Greklands del är det framför allt de inre delarna av fastlandet som smittan finns medan flera av öarna, däribland Thassos, anses brucellosfria. Därför blev det lite uppståndelse när en person på ön diagnosticerades med brucellos den 1 april 2008. Ön har bara drygt 13 000 invånare, men gott

om får och getter (ca 60 000). Fram till och med augusti tickade nya fall in regelbundet och när utbrottet var över konstaterades att 98 människor insjuknat av *Brucella melitensis* biovar 3. Nio av tio hade ätit opastöriserad ost tillverkad av får och getmjölk från en lokal producent. Resten hade varit i kontakt med djuren, det var fåraherdar, slaktare och en veterinär. Av de insjuknade drabbades 80 % av illamående, 60 % av feber och nattsvettningar, hälften klagade på huvudvärk och ledvärk och var tredje hade svåra ryggsmärtor.

Fisk och skaldjur

De två marina arterna kan infektera människor och ge en lättare form av brucellos, men det är mycket ovanligt. Tre fall finns registrerade, två från Sydamerika efter konsumtion av råa ostron och ett tredje från USA där en fritidsfiskare åt rå röd snapper.

VIRULENSFAKTORER

Trots att hela genomet hos flera brucellastammar kartlagts, har man inte kunnat påvisa några av de klassiska virulensfaktorerna som toxiner eller gener som kodar för kända invasionsstrategier. De tre system som man vet har betydelse för virulensen är aktinmodifiering, LPS och exporterade proteiner.

Aktin är ett trådformigt membranprotein och modifiering av aktin är ett för patogena bakterier vanligt sätt att ta sig in i en värdcell. Hos brucella vet man att aktinmodifiering sker vid kontakt med värdcellen.

LPS, alltså det skikt av lipopolysackarider som finns i cellväggen hos gramnegativa bakterier, har ofta betydelse för patogeners virulens. Normalt är det speciella strukturer som ökar virulensen, men hos brucella är det snarare fråga om att ha så få speciella strukturer som möjligt: allt i syfte att undgå angrepp av fagocyterna. LPS verkar också ha betydelse för brucellas förmåga att klara av de kväveoxider som värdcellerna använder för att försöka bekämpa inkräktare.

Det är känt att brucella tillverkar och exporterar en rad speciella proteiner vid intracellulär växt. De har uppenbarligen betydelse för att hindra fagocyterna att göra sitt jobb (att döda parasiterna) men proteinerna är inte toxiska för fagocyterna, snarare tvärtom eftersom de bland annat hindrar fagocyternas normala åldrande. Proteinerna exporteras in i värdcellerna genom ett typ fyra sekretionssystem (T4SS), alltså samma typ av sekretionssystem som bland annat flera växtpatogena bakterier samt magsårsbakterien *Helicobacter*, kikhostebakterien *Bordetella* och legionärssjukans *Legionella* använder sig av.

PÅVISNING

Rutinmässig bakteriologisk odling för att testa livsmedel förekommer inte: dels är det ofta svårt att isolera bakterierna ens från livsmedel som man vet orsakat sjukdomsutbrott, dels är brucella högriskbakterier som ska överlåtas till speciallaboratorier. I en spansk utredning av drygt 600 bakteriologer och assistenter som arbetat med brucella visades att inte mindre än 75 (12 %) smittats av bakterierna vid laboratoriearbetet.

Selektiv isolering

Selektiva medier för brucella bygger på blodagar kompletterat med en kombination av olika antibiotika. Vanliga kombinationer är (per liter:) nystatin 100 000 IU, bacitracin 25 000 IU, polymyxin B-sulfat 5 000 IU, aktidion 100 mg, vancomycin 20 mg och nalidixinsyra 5 mg; eller bacitracin 25 000 IU, polymyxin B-sulfat 6 000 IU och cykloheximid 100 mg.

Även om de flesta stammar av brucella växer fram inom ett par dygn bör plattorna inkuberas 2 veckor (vid blododling 6 veckor) vid 35°C i en atmosfär med 5-7% koldioxid, det finns nämligen långsamväxande stammar. Efter gramfärgning och mikroskopering kan brucella typas till arter och biovarianter med en kombination av biokemiska och serologiska tester och fagtypning.

Annan påvisning

Påvisning av brucella sker oftast med serologisk teknik. Särskilt ELISA-metodik för påvisning av bakterierna fungerar mycket bra, såväl för identifiering av kolonier som för detektion av antikroppar i blod och mjölk. Korsreaktioner med en del enterobakterier kan förekomma med gruppspecifika brucellaantigen, det gäller bland annat *Yersinia enterocolitica* (serogrupp O:9) och en del kolibakterier (som EHEC-bakterierna i O:157).

De immunologiska metoderna är väl beprövade och har länge ansetts som ”*the golden standard*” vid påvisning av brucella. De har uppfattats som betydligt mera pålitliga än odling eller PCR-teknik. PCR-tekniken har hämmats av att brucella i praktiken utgör en enda och extremt homogen art. Dessutom har den närbesläktade bakterien *Ochrobactrum* ofta gett falskt positivt resultat.

Molekylärgenetiska metoder, inklusive PCR-teknik, förfinas dock ständigt och det finns flera nya protokoll som förmodligen på sikt kommer att konkurrera ut många immunologiska tekniker. De kan påvisa brucella som helhet, alternativt arter eller biotyper.

Epidemiologi

De traditionella biokemiska och – framför allt – immunologiska metoderna har tidigare ansetts tillräckliga för att spåra stammar. På senare tid har dock molekylärgenetiska metoder i allt högre grad börjat användas för att typa stammarna.

Burkholderia pseudomallei

– Gyttjebakterien som sover med fienden –

ÖVERSIKT

Om melioidos varit en västerländsk sjukdom så hade den stått högt, mycket högt, på smittskyddets prioriteringslista. Men eftersom sjukdomen är begränsad till det tropiska området mellan 25°N och 25°S samt koncentrerad till Sydostasien, för den en närmast anonym tillvaro i det västerländska medvetandet. Med ett exceptionellt undantag: Australien där ett dricksvattenutbrott 1997 ledde till ett brutalt uppvaknande. Melioidos betraktas nu som en ganska vanlig sjukdom i Australien, framför allt i de norra territorierna. Efter ett smärre utbrott 2003 som följts av andra utbrott har nu också Brasilien kommit med bland de drabbade länderna.

Efter 11 september 2001 har åtminstone militärteoretikerna i USA vaknat, där handlar det om rädslan för att terrorister skulle kunna använda *Burkholderia pseudomallei* för biologisk krigföring. Den som kan sin Sherlock Holmes vet att det inte är någon nyhet, i ”*The Dying Dectective*” från 1913 får Holmes tillsänt sig ett paket som innehåller smittämnet för ”Tapanuli-feber” som är – melioidos.

Efter tsunamin 2004 har också Europa visat ett nymornat intresse för *B. pseudomallei*. Risken för att de svårast skadade europeiska turisterna i Thailand skulle infekteras med bakterien och utveckla melioidos ansågs som betydande. Så har också skett i några dokumenterade fall som bland annat omfattat flera finländare. Antalet insjuknade asiater efter tsunamikatastrofen är givetvis betydligt högre, men här är mörkertalet större.

B. pseudomallei är en jord- och vattenlevande bakterie som trivs bäst med varma gyttjebad där den lätt förökar sig eftersom den är en tusenkonstnär som kan sätta i sig en otrolig massa olika organiska ämnen. Hos människor och djur är den en parasit som växer inuti epitelceller och makrofager. Symptomen på melioidos är vitt skilda, men sjukdomen sätter sig gärna i lungorna och kan påminna om legionärssjukan, skillnaden är att melioidos är mångdubbelt farligare och dödligheten när bakterierna når blodbanan kan uppgå till 70 % även då intensivbehandling sätts in. De flesta som infekteras blir inte sjuka, men bakterierna kan länge finnas kvar latent i kroppen, de sover sig fram genom åren och först när den smittade utvecklar en underliggande sjukdom, inte sällan diabetes, blossar sjukdomen upp. I ett fall insjuknade en person 62 år efter exponeringen! Smittkällorna är jord, aerosoler och dricksvatten. Aerosolbildning efter

våldsamma skyfall där bakterierna slungas upp från jorden är förmodligen den vanligaste spridningsvägen i Asien.

BAKTERIEN

Släktet *Burkholderia* bildades 1993 som en utbrytning av ett dussintal arter från *Pseudomonas*. Släktet omfattar gramnegativa, aeroba, katalaspositiva stavar som är rörliga med polära flageller och som har sin primära nisch i växternas rotzoner. Utvecklingsmässigt hör de hemma i proteobakteriernas beta-linje tillsammans med en lång rad andra växtassocierade bakterier. Idag innehåller släktet närmare 50 arter, de allra flesta är växtpatogener av vilka flera orsakar skador för miljardbelopp för jordbruksnäringen över hela världen.

Växtpatogenerna är sällan farliga för människan, men enstaka arter som *B. cepacia* är opportuna patogener som kan vara besvärliga att behandla eftersom de har utbredd antibiotikaresistens. En udda art i församlingen är *B. mallei* som är fruktad bland hästuppfödare över stora delar av världen eftersom den orsakar en dödlig och smittsam hästsjukdom, rots. I Sverige har rots inte förekommit sedan andra världskriget bland hästarna. Sjukdomen kan överföras till människa och kallas då glanders.

B. pseudomallei hör liksom de växtpatogena arterna hemma i jord och den isoleras flitigast från den gyttja där risplantor växer. Att den kunde vara livsfarlig för människan upptäcktes redan 1911 då den isolerades från asiatiska opiummissbrukare. Liksom legionella kan bakterien förökas i amöbor och möjligen finns ett samband mellan amöbaförekomst och dess överlevnad i makrofager. Det finns, i olika regioner, tre mycket nära besläktade och harmlösa arter som åtminstone tidigare kunde förväxlas med *B. pseudomallei*: *B. thailandensis*, *B. vietnamensis* och *B. uboniae*.

SJUKDOMEN

Smittspridning

Melioidos anses smitta huvudsakligen genom att sår förorenas med jord eller infekterat vatten. Hur pass säkert detta nu är kan diskuteras, en undersökning gör gällande att endast 6 % av fallen kan förklaras på detta sätt. Att bakterierna även kan smitta genom aerosoler är känt, inte minst av flera fall av laboratoriesmitta. Vidare är kopplingen mellan melioidos och monsuner, slagregn och översvämningar tydlig, troligen förs bakterierna aerosolbundna upp ur gyttjan vid extrema väderlekssituationer.

Kontaktsmitta från människa till människa är ytterst ovanligt, men bakterierna kan undantagsvis överföras från moder till barn genom bröstmjölken. Däremot är det inte ovanligt

att bakterien överförs med kontaktsmitta från djur till människa. Minst två dödsfall i Frankrike på 1970-talet orsakades exempelvis av djur som importerats till Paris zoologiska trädgård. *B. pseudomallei* betraktas i likhet med *Brucella* som en klass 3-bakterie, alltså den högsta skyddsklass som gäller vid laboratoriearbete med bakterier.

Att bakterierna kan spridas genom infekterat dricksvatten är också klarlagt men däremot inte hur ofta detta sker. Smittvägarna kan rent generellt vara svåra att belägga eftersom bakterien kan bäras symptomlöst i flera år innan sjukdomen bryter ut.

Riskgrupper

I likhet med till exempel legionellos gäller att helt friska individer brukar klara av en smitta med *B. pseudomallei* utan att få några symptom. Det är främst diabetiker, alkoholister och människor med njurproblem eller immunbristsjukdomar som är i farozonen.

Inkubationstid

Enligt en australisk tioårsstudie var den genomsnittliga inkubationstiden 9 dygn, väsentligt längre än de 2-3 dygn som annars oftast uppges. Spridningen i inkubationstid varierade mellan 1 och 21 dygn. Men hos människor som klarar av smittan utan att utveckla symptom kan bakterien överleva i decennier och slå till först när allmäntillståndet försämrats. En amerikansk soldat som togs som krigsfånge i Japan på 1940-talet utvecklade melioidos 62 år efter exponeringen!

Symptom

Akut melioidos innebär mycket hög feber men i övrigt skulle symptomen lika väl kunna gälla tyfoidfeber som malaria och tuberkulos. Sjukdomen kan bita sig fast i snart sagt vilket organ som helst, men den vanligaste bilden är svår lunginflammation. Blodförgiftning tillstöter ofta och det är en livsfarlig komplikation, upp till 70 % dör trots moderna behandlingsmetoder. I Thailand, där man har störst erfarenhet av bakterien, har man med tidig diagnostik och intensiv antibiotikabehandling lyckats få ned dödligheten till 40-50 %, men även det är ju ett skrämmande högt tal. I Australien, där många fall anses orsakade av dricksvatten, är dödligheten 20 %. Möjligen är smitta genom munnen något mindre farligt än smitta genom lungor eller sår. Bakterierna kan behandlas med antibiotika men det krävs långa behandlingsperioder, återfall är vanligt om antibiotikakuren avbryts för tidigt. Hos några procent förekommer också en kronisk form av melioidos där symptomen inte ger med sig på flera månader.

Den största gruppen smittade förblir symptomfria livet ut. Men bakterien verkar finnas kvar latent hos många och hos vuxna insjuknade rör det sig ofta om en reaktivering av en tidigare smitta när den vuxne drabbats av till exempel diabetes.

Incidens

En vanlig uppgift är att melioidos är endemisk i det tropiska området mellan de tjugonde breddgraderna. Senare utbrott har flyttat fram gränserna till åtminstone 25°N och 25°S. Särskilt vanlig är sjukdomen i Sydostasien. I Thailand räknas den som den vanligaste orsaken till sjukhusbehandlad lunginflammation och ungefär 80 % av de thailändska barnen har vid fyra års ålder utvecklat antikroppar mot *B. pseudomallei*. De har då väl att märka sällan insjuknat, och möjligheten finns också att en del av dem utvecklat antikroppar mot den närbesläktade och ofarliga arten *B. thailandensis* som åtminstone med tidigare serologiska metoder inte gick att skilja från *B. pseudomallei*.

Data för vattenburen melioidos saknas. I delar av norra Australien där sjukdomen också är vanlig räknar man med en incidens på 165 diagnosticerade fall årligen per miljon invånare och vissa år, kan incidensen nå 400 fall per år, vilket är i nivå med Thailand som har världens högsta incidens.

I Sverige finns inga nyare uppgifter på att någon svensk turist dragit på sig sjukdomen utomlands, å andra sidan är den livsfarliga sjukdomen märkligt nog inte heller anmälningspliktig enligt svensk smittskyddslag.

Melioidos på cellnivå

B. pseudomallei verkar använda sig av exakt samma strategi som shigella när de invaderar epitelceller eller andra mottagliga celler. Burkholderia ombildar aktinet i cellernas membranskelett så att bakterierna upptas genom endocytos. Inuti värdcellen finns bakterierna först i membranförsedda vakuoler som egentligen är avsedda för destruktion men burkholderia spränger membranet och tar sig ut i cellvätskan där de förökar sig. Och precis som shigella utnyttjar de lösligt aktin för att polymerisera en aktinsvans i ena änden av bakterien. Den successivt påbyggda aktinsvansen knuffar ut bakterien mot cellmembranet vilket buktas ut varpå den angränsande cellens membran i sin tur buktar in. Bakterien avsnörps sedan inne i den nya cellen och burkholderia kan på detta sätt spridas från cell till cell utan att attackeras av immunförsvaret utanför cellerna.

B. pseudomallei kan även förökas inuti makrofager och monocyter där de använder samma strategi för att undgå att dödas samt sätter igång kaspas 1-systemet (cellernas domedags–proteaser som används vid den programmerade celldöden) vilket dödar makrofagerna.

Burkholderia har dessutom ytterligare en strategi som påminner om mykobakteriernas. Efter en genomgången infektion kan bakterierna ibland göra sig osynliga för immunförsvaret under decennier för att sedan reaktiveras då individen drar på sig en svår sjukdom. Då blossar melioidosen upp igen.

LIVSMEDEL

Även om melioidos betraktas som en zoonos och bakterien kan finnas hos praktiskt taget alla köttdjur (nötkreatur, vattenbufflar och fåglar är dock påfallande resistenta) finns det inga misstankar om att sjukdomen överförs via kött. Med tanke på att bakterien är växtassocierad och därtill vanligast i risodlingsländer skulle man kunna misstänka att ris och kanske även andra asiatiska vegetabilier utgör en smittkälla. Ris verkar dock inte härbärgera bakterien, däremot finns en uppgift om att bakterien kan etablera sig på tomatplantor. Försöket gällde dock en medveten inokulation och det var *B. thailandensis* som användes, så författarnas slutsats att *B. pseudomallei* eventuellt har en nisch i tomatplantor och andra växter förefaller något spekulativ.

Däremot kan bakterien alltså vara vattenburen. I vatten kan bakterien överleva i åratal och till och med föröka sig om det finns tillräckligt med näringsämnen. De vanliga desinficerings–metoderna, d v s klorering, ozonering eller UV-behandling dödar dock effektivt bakterierna.

B. pseudomallei förekommer i dricksvatten i Turkiet, Indien, hela Sydostasien, Kina, Libyen, tropiska Afrika, Sydamerika, Centralamerika, Australien och har även rapporterats – i lägre frekvenser– från Italien, Frankrike och Spanien.

Västra Australien 1997

Melioidos är endemisk i tropiska Australien men när fem fall av melioidos upptäcktes 1997 i en by på 300 invånare i Västra territorierna slog nyheten ned som en bomb. Samtliga fem var diabetiker eller hade njurproblem. Tre av de drabbade avled. Dricksvattnet misstänktes tidigt och efter en undersökning med PFGE-typning stod det klart att den stam som orsakat utbrottet fanns i ytvattnet.

Två olyckliga omständigheter bidrog till att bakterierna kunde spridas från vattenverket. Den ena var att kloreringen inte varit i bruk just denna dag, den andra var att ett luftningsaggregat gett bakterierna exceptionellt bra grogrund för att spridas. Luftare i dricksvattensystem förekommer allmänt både i Australien och Asien för att minska koldioxidhalten i vatten med sura pH-värden. De är inte särskilt effektiva på att höja pH men desto mer effektiva på att ge aeroba bakterier som *B. pseudomallei* goda livsbetingelser.

Utöver de fem akut drabbade, insjuknade en man ett halvår senare av samma bakteriestam. Vid det laget var smittokällan sedan länge desinficerad och slutsatsen var att mannen hade gått omkring ett halvår med en latent infektion som till sist bröt ut.

VIRULENSFAKTORER

Adhesiner

Burkholderia kan fästa till praktiskt taget alla typer av celler vilket pekar mot någon form av ospecifik men ändå effektiv adhesion. Hittills har väldigt lite forskning utförts på detta område, men korta så kallade typ 4-pili (en grupp som finns hos många patogener) har betydelse för inbindningen till åtminstone vissa typer av celler.

BimA = Burkholderia Intracellular motility A

BimA har identifierats som det protein som inducerar den aktinpolymerisering som möjliggör för *B. pseudomallei* att röra sig inuti värdcellerna. Den aktinmotor som då används är förutsättningen för att bakterierna ska kunna sprida sig mellan cellerna utan att immun–försvaret reagerar. BimA är en del av Bsa-systemet.

Bsa = Burkholderia secretion apparatus

Bsa är den benämning som används för burkholderias T3SS (typ tre sekretionssystem) vilken formar en injektionsnål som överför en stor mängd virulensfaktorer direkt från bakterien till värdcellen. Generna för det tjog proteiner som injiceras är till stor del kända, men frånsett BimA är själva proteinerna okända. Det mesta tyder på att burkholderias proteiner liknar de Ipa-proteiner som bildas av shigella. Proteinerna används för att förändra värdcellens aktin så att bakterierna villigt tas upp även av epitelceller samt för att ändra cellens metabolism så att burkholderia kan överleva och föröka sig. Spridningen från cell till cell genom ”raketmotorer” av aktin styrs av BimA.

Bsa är också involverat vid dödandet av makrofager som sker dels genom porbildning, dels genom att burkholderia sätter igång kaspas 1-systemet, alltså makrofagernas förprogramme–rade celldöd.

Kapslar

Under vissa betingelser producerar burkholderia kapslar som tros ha betydelse för bakteriernas förmåga att undvika immunförsvaret, både under akut infektion och under den latenta period på många år då burkholderia överlever utan att väcka immunförsvarets uppmärksamhet. En av mekanismerna tycks vara att kapslarna undertrycker serumkomplementreaktionen som annars är ett effektivt sätt för kroppen att slå ut inkräktare.

PÅVISNING

Selektiv isolering

Referensteknik saknas i USA och Europa. I Australien och Asien isoleras bakterien från vatten

vanligtvis i Ashdowns anrikningsbuljong som består av (g/L): trypton 15, kristallviolett 0.005 och colimycin 0.0025. Anrikningsbuljongen inkuberas aerobt 35°C 1-2 dygn och ytodlas sedan 35° C 1-2 dygn på Ashdowns agar som innehåller: trypton 15 g/L, agar 12 g/L, glycerol 40 mL/L samt neutralrött, kristallviolett och gentamycin i koncentrationer på 5, 2.5 respektive 4 mg/L. Medierna finns kommersiellt tillhandahållna av det australiska företaget Medvet Science.

B. pseudomallei bildar skära "skrynkliga" kolonier på detta medium. Biokemisk identifiering enbart med de standardkits som finns kommersiellt tillgängliga är inte att rekommendera eftersom dessa har för dålig träffsäkerhet. Efter en biokemisk screentest bör misstänkta isolat testas med antisera baserade på monoklonala antikroppar och dessutom följas av en fettsyraanalys på GC-FAME. Eftersom det rör sig om en klass 3-bakterie bör identifieringsarbetet i vilket fall som helst överlåtas till speciallaboratorier.

De tre harmlösa men biokemiskt och immunologiskt likartade arterna *B. thailandensis*, *B. uboniae* och *B. vietnamensis* respirerar alla L-arabinos vilket inte *B. pseudomallei* gör.

Annan identifiering

Kommersiellt tillhandahållna immunologiska tester har länge funnits för att påvisa antikroppar i blod. Deras dåliga känslighet och reproducerbarhet har dock ofta varit ett problem. För att identifiera bakterien från en agarkoloni används idag monoklonala antikroppar, men inte ens dessa är alltid pålitliga och därför används som ovan nämnts GC-FAME för att säkerställa identiteten. Sammantaget blir detta en mycket tungarbetad metodik och PCR-teknik är definitivt att föredra. Flera protokoll som anses kunna skilja mellan *B. pseudomallei* och *B. thailandensis* har beskrivits.

Epidemiologi

Vid sidan av PFGE har ribotypning använts i stor utsträckning för att spåra isolat. Att ribotypning har lägre upplösning står dock klart, vid till exempel uppspårningen av de brasilianska melioidosfallen 2003 och senare visades att det inte alltid gick att skilja ut orelaterade miljöstammar från kliniska stammar med hjälp av ribotypning. Andra typningsmetoder som också använts är hybridisering av DNA-fragment och multiplex PCR-teknik.

Campylobacter

– Inte bara kycklingsjuka –

ÖVERSIKT

Campylobacter är nästan osannolikt dåligt anpassade till livsmedel. De kan absolut inte föröka sig där. De har faktiskt till och med problem med att överleva. Ändå är campylobacter-enterit den vanligaste livsmedelsburna enteriten i praktiskt taget hela den industrialiserade världen. Att ekvationen går ihop förklaras dels av att campylobacter är mycket vanlig i köttråvaror och dels av att infektionsdosen (alltså den mängd bakterier det behövs för att orsaka sjukdom) är anmärkningsvärt låg.

Campylobakterier, och då särskilt arten *C. fetus*, har länge varit välkända för veterinärerna som en orsak till abortering hos djur, men även om det fanns uppgifter så tidigt som 1946 vilka pekade på att campylobacter kunde orsaka enterit hos människan, så dröjde det långt in på sjuttiotalet innan larmklockan ringde. Den som larmade mest var den engelske mikrobiologen M. B. Skirrow som 1977 gav sina kollegor det instrument som behövdes för att påvisa enteritbakterierna: ett effektivt selektivt odlingssubstrat.

I början av åttiotalet fann man att praktiskt taget all världens kycklingar knallade omkring med *C. jejuni*, som enteritbakterien kallades, i sina tarmar. Man fann att otillräckligt stekt kycklingkött var den viktigaste smittkällan och massmedierna, som sällan bekymrar sig om nyanser, lanserade campylobacter-enterit som "kycklingsjukan". Den nära kopplingen till kyckling gäller för all del fortfarande, men i dag vet vi att också många andra livsmedel kan vara inblandade vid campylobacter-enterit: i princip allt kött och dessutom mjölk och – inte minst! – dricksvatten. Och *C. jejuni* är heller inte ensam om att ge campylobacter-enterit, fyra-fem andra arter kan vara skyldiga.

BAKTERIERNA

Campylobacter betyder "den böjda staven" och de gramnegativa, mycket tunna stavarna är mycket riktigt kraftigt böjda eller till och med spiralformade. De har en flagell i ena eller båda ändarna. Flagellen och spiralformen underlättar rörligheten i trögflytande miljöer som tarmslemhinnans mukuslager, vilket antas ha betydelse för deras förmåga att orsaka sjukdom. I ogästvänliga miljöer krymper campylobacter ihop till en liten kockoid cell som inte är odlingsbar och därför inte kan påvisas annat än med molekylärgenetiska metoder. Dessa så kallade

VNC-celler (*Viable Not Culturable*) kan återta sin normala form efter passage genom ett djur. Campylobacter har en strikt respirativ metabolism men är samtidigt känsliga för syrets oxidationsprodukter vilket leder till att de inaktiveras (bildar VNC-celler) eller dör i luft. De är mikroaerofiler som trivs bäst med en syrgashalt på 5-10 % och en koldioxidhalt på 3-10 %. Metabolismen är inriktad på aminosyror. Kolhydrater utnyttjas inte. Campylobacter är som regel kraftigt oxidaspositiva med ett färgomslag inom 10 sekunder. De flesta arterna är katalaspositiva, men reaktionen är ibland svag. Många tidigare campylobacter-arter har numera överflyttats till *Arcobacter* och *Helicobacter*, för närvarande (2012) räknas 24 arter till släktet, tabell 6.1.

Tabell 6.1. Arter av *Campylobacter*, deras förekomst och betydelse (2012).

Art	Primär förekomst/isolerad från	Känd som humanpatogen?
C. avium	Kycklingar, kalkoner	Nej
C. canadensis	Isolerad från tranor	Nej
C. coli	Däggdjur (främst gris)	Ja, som en vanlig enteropatogen
C. concisus	Munhåla + feces hos människa	Ja, enteropatogen enligt nya data
C. cuniculorum	Isolerad från kaniner	Nej
C. curvus	Plack på tänder	Nej
C. fetus	Däggdjur (nötboskap, får)	Ja, allmäninfektioner
C. gracilis	Människa	Nej
C. helveticus	Däggdjur	Nej
C. hominis	Isolerad från slaktare	Nej
C. hyointestinalis	Däggdjur (nötboskap, gris)	Ja, som ovanlig enteropatogen
C. insulaenigrae	Sälar	Nej
C. jejuni	Fåglar (även nötboskap)	Ja, mycket vanlig enteropatogen
C. lanienae	Isolerad från slaktare	Nej
C. lari	Däggdjur, sjöfåglar, skaldjur	Ja, som ovanlig enteropatogen
C. mucosalis	Gris, nötboskap	Nej
C. rectus	Plack på tänder	Nej
C. showae	Plack på tänder	Nej
C. sputorum	Människa, nötboskap	Nej
C. subantarcticus	Isolerad från polarfåglar	Nej
C. troglodytis	Isolerad från schimpanser	Nej
C. upsaliensis	Köttdjur, fåglar, hund, katt	Ja, enteropatogen
C. ureolyticus	Isolerad från hästar	Nej
C. volucris	Isolerad från skrattmåsar	Nej

Campylobacter hör utvecklingsmässigt hemma i proteobakteriernas epsilonlinje, som är en isolerad utvecklingsgren bland de gramnegativa bakterierna. Här finns många bakterier som

morfologiskt liknar *Campylobacter* som *Arcobacter*, *Helicobacter*, *Sulfurospirillum* och *Wolinella*. I litteraturen stöter man mycket ofta på beteckningarna "termofila" eller "termotoleranta" campylobacter för de fem arter som orsakar campylobacter-enterit. Beteckningarna är lite vilseledande eftersom bakterierna vare sig är termofila eller värmetoleranta. Med beteckningarna menas egentligen att de tillväxer vid 42°C men inte vid 25°C vilket är en avgörande skillnad mot de enteritframkallande arter som finns inom släktet *Arcobacter*.

Fem arter som kan orsaka campylobacter-enterit

1. C. jejuni

I industrivärlden står *C. jejuni* för uppemot 90 % av campylobacter-enteriterna. Den viktigaste reservoaren för bakterien är fåglar. Normalt ses inga tecken på sjukdom hos fåglar som är koloniserade med *C. jejuni*. Kanske blir en del fåglar, likt många däggdjur, sjuka första gången de drabbas av bakterien, men de utvecklar i så fall en resistens som gör dem till friska bärare. *C. jejuni* förekommer även hos många däggdjur, t ex nötkreatur. Däggdjuren smittas ofta genom vatten som blivit infekterat av fågelträck. Förutom enterit kan *C. jejuni* orsaka juverinflammation hos nötkreatur och abortering hos får.

I princip alla stammar betraktas som patogena även om det också står klart att en del undergrupper, bland annat vissa serotyper, är betydligt mer involverade vid sjukdomsfall än andra. Molekylärgenetiska studier har dock inte kunnat påvisa några skillnader i virulensfaktorer mellan olika undergrupper.

2. C. coli

Den näst vanligaste orsaken till campylobacter-enterit är *C. coli* som genetiskt är mycket nära besläktad med *C. jejuni*. Man räknar med att 10 % av campylobacter-enteriterna i den industrialiserade världen och 40-50 % i utvecklingsländerna orsakas av denna art. *C. coli* är inte på samma sätt som *C. jejuni* specialiserad på fågel även om bakterien är ganska vanlig även där, i strutsfarmar har *C. coli* exempelvis visats kunna ge upphov till en dödlig leverinfektion hos fåglarna. För smittspridning till människa förefaller gris vara den vanligaste reservoaren.

3. C. upsaliensis

De så kallade CNW- campylobacterna (*Catalase Negative or Weak*), med ett biokemiskt testmönster liknande *C. coli,* visades av svenska forskare utgöra en alldeles egen art som fått namnet *C. upsaliensis*. Arten har numera hittats i hela världen och anses orsaka 2-4 % av campylobacter-enteriterna. Att den tidigare sällan isolerades berodde på att *C. upsaliensis* växer dåligt eller inte alls på många av de medier som utvecklats för *C. jejuni*. Den viktigaste smittkällan är sannolikt kött i vilket *C. upsaliensis* på senare tid, med effektivare odlingsmedier, hittats ganska frekvent. Annars har bakterien en alldeles speciell förkärlek för hund och katt.

Särskilt smittsamma verkar hundvalpar med diarré vara, men även symptomfria husdjur kan smitta sina hussar och mattar. Smittan i dessa fall sker i regel genom kontakt med hundarnas avföring.

4. C. lari

Bland de arter som orsakar campylobacter-enterit går *C. lari*, eller "*C. laridis*" som den tidigare kallades, i litteraturen även under den kryptiska beteckningen NARTC som står för "*NAlidixin Resistant Thermophilic Campylobacters*". Benämningen har sina brister, visserligen är de tre tidigare nämnda arterna nalidixinkänsliga men *C. hyointestinalis* nedan är det inte. Mindre än 1 % av campylobakter-enteriterna beräknas orsakas av *C. lari*.

C. lari har annars det kanske bredaste värdspektrumet bland campylobacterna och är den art som oftast isoleras från musslor och skaldjur, hos vilka den p.g.a. sina temperaturkrav knappast kan föröka sig. En möjlighet är att den sprids från varmblodiga havsdäggdjur, bakterien har bl. a. isolerats från sälar. En annan är att den sprids från sjöfåglar, bakterien påträffas t ex ofta i tarmkanalen hos fiskmåsar.

5. C. hyointestinalis

C. hyointestinalis är liksom *C. lari* resistent mot nalidixinsyra. Bakterien har betraktats som en mycket mindre vanlig orsak till campylobacter-enterit än de fyra tidigare nämnda. Men det kan bero på att den växer dåligt på många av campylobactermedierna. Nyare uppgifter tyder på att *C. hyointestinalis* står för en större andel av fallen än *C. lari*, kanske uppemot 1 %. Bakterien har framför allt hittats hos gris och nötkreatur. Med för *C. hyointestinalis* bättre anpassade selektiva medier har den hittats i upp till 30 % av nötkreatursbesättningar vilket gör den till den förmodligaste vanligaste arten hos nötboskap.

C. concisus?

Det har länge funnits enstaka uppgifter om att *C. concisus* associerats med enteriter hos barn men det var först med en större dansk undersökning publicerad 2012 som bakterien på allvar uppmärksammades. Danskarna undersökte 8000 diarrefall och fann att *C. concisus* återfanns i avföringen nästan lika ofta som *C. jejuni*/*C. coli*. Särskilt hos barn under ett års ålder var *C. concisus* mycket vanligt förekommande. Problemet är att bakterien även har isolerats från friska människors avföring så den danska undersökningen kan inte anses bevisa att *C. concisus* verkligen är enteropatogen. Ett ytterligare problem är att bakterien omfattar två genetiska arter med samma biokemiska profil, så det kan mycket väl vara så att en variant är patogen och en annan ofarlig. *C. consisus* växer dåligt eller inte alls vid 42°C, alltså den temperatur som används för att selektivt odla fram campylobacter.

Även andra arter?

C. fetus brukar inte betraktas som någon enteritorsak, åtminstone inte i samband med

livsmedel. Det finns dock ett rapporterat fall där en grupp på 18 amerikaner drabbades av diarré av bakterien efter att ha ätit hemslaktat kött och druckit opastöriserad mjölk. Vidare har *C. curvus* har associerats med fall av blodiga diarréer. Arten har dock inte säkert kunnat knytas till dessa fall.

SJUKDOMEN

Det är framför allt campylobacter-enterit orsakad av *C. jejuni so*m det finns data för. Många forskare anser att campylobacter-enterit orsakad av de övriga arterna oftast har ett lindrigare förlopp. Stora utbrott med många drabbade har under alla omständigheter orsakats inte bara av *C. jejuni* utan också av *C. coli*, *C. upsaliensis* och *C. lari*.

Infektionsdos

Infektionsdosen för campylobacter-enterit är mycket låg och beräknas i normalfallet till ungefär 500 bakterier. Men vad som är ”normalt” beror både på bakteriestam och på offrets individuella förutsättningar, det är troligt att enstaka bakterier i vissa fall kan orsaka sjukdom. Ett kärt tvistefrö bland campylobacterforskarna är i vilken utsträckning den kockoida, icke odlingsbara viloformen (VNC) är virulent. De flesta har uppfattningen att VNC-stammarna är försumbara då det gäller smittspridning från kött. Men eftersom viloformen kan fås att växa ut till normala campylobacter efter passage i ett djur, får man nog räkna med att även den har en viss virulens och att den kanske kan vara av betydelse framför allt vid vattenburna utbrott.

Inkubationstid och symptom

Inkubationstiden är vanligtvis 1-5 dygn, men variationerna är stora, mellan 1 och 11 dygn betraktas som normalt. De första symptomen är feber och huvudvärk, som pågår under något dygn. Därefter kommer symptomen från magtarmkanalen med svåra buksmärtor och en diarré som kan vara antingen vattnig eller dysenteriliknande med blod i avföringen. Under diarrén kan campylobacter isoleras i höga halter (10^6–10^9/g) från avföringen. Kräkning anses inte tillhöra normalsymptomen, men i de flesta större utbrott kan man notera att runt en fjärdedel får detta symptom och i vissa utbrott kan faktiskt majoriteten drabbas. Ledvärk är heller inte ovanligt. För gravida kvinnor kan campylobacter-enterit i vissa fall vara livshotande både för fostret och för modern: bakterien går då ut i blodet där den kan vara svår att påvisa med odlingsteknik.

Sjukdomen pågår i de flesta fall 4-8 dygn och är självläkande. Hos ungefär var femte insjuknad har sjukdomen ett långvarigare förlopp med diarré i upp till 3 veckor. Återfallssymptom under ett par månader förekommer ibland: sjukdomen blir då i regel successivt lindrigare. Komplikationer är sällsynta, oftast kommer de drabbade inte ens i kontakt med en läkare. I vissa fall kan bakterien i efterhand ge övergående besvär på lite olika ställen i kroppen. Men det kostade möjligen Sverige ett avancemang i EM-kvalet i fotboll 2012 (när detta skrivs har

Sverige för ett par dagar sedan förlorat den inledande matchen mot Ukraina). Den naturlige centern John Guidetti, som öst in mål i holländska ligan, åt rosastekt kyckling och drabbades av campylobacterenterit och fick som komplikation en inflammerad nerv i foten.

Den typen av komplikation är trots allt ganska beskedlig och övergående. Andra är betydligt allvarligare: blodförgiftning – som i sin tur kan leda till hjärnhinneinflammation, gallblåseinflammation och HUS (*hemolytic uremic syndrome*) med njursvikt – samt reumatiska sjukdomar. De reumatiska sjukdomarna drabbar påfallande ofta personer med ett speciellt antigen, det så kallade HLA-B27 (*human lymphocyte antigen B27*).

En annan, mycket ovanlig, komplikation är den svåra neurologiska sjukdomen Guillain-Barré syndrom (GBS) som ger en förlamning som i värsta fall blir bestående. Ungefär 40 % av GBS-fallen har en historia där campylobacter-enterit varit den utlösande faktorn. GBS-incidensen totalt beräknas till 13 fall per miljon invånare och år och campylobacter-enterit ökar risken 80-faldigt att dra på sig sjukdomen. För de som insjuknat i campylobacter-enterit beräknas dock högst 2 av 10 000 att drabbas av GBS.

Till skillnad från djur, som kan vara livslånga symptomfria bärare, är friska bärare sällsynta hos människor, efter tre veckor är praktiskt taget alla smittfria. Undantaget är barn i utvecklingsländer som kan vara bärare av bakterierna mycket länge.

Incidens

Campylobacter-enterit är den vanligaste livsmedelsburna enteriten i större delen av industrivärlden. Uppskattningar från USA pekar mot att 4-8 miljoner amerikaner årligen drabbas av sjukdomen vilket skulle innebära 2-3 % av befolkningen. I England har siffran två miljoner nämnts, även det motsvarande ungefär 3 %.

Men siffrorna är i bästa fall kvalificerade gissningar. De officiella siffrorna från England (de som bygger på laboratorierapporter) visar att ungefär 50 000 drabbas årligen. Om uppskattningarna är riktiga skulle det betyda att bara ett av fyrtio fall kommer till myndigheternas kännedom.

De senaste tio åren har antalet smittade svenskar pendlat mellan 6 000 och 9 000 fall. En tredjedel smittas i Sverige. Thailand leder importfallen följt av Turkiet, Spanien och Indien. Någon bedömning på det verkliga antalet campylobacter-enteriter har inte gjorts, men använder vi de amerikanska respektive engelska underlagen får vi fram att ungefär 300 000 svenskar årligen skulle insjukna.

Campylobacter-enterit på cellnivå

Det finns fortfarande mycket outforskat när det gäller varför enteriten uppstår. Fyra faser kan

dock möjligen urskiljas. I första fasen tränger campylobacter genom det rörliga slemlager (mukuslagret) som finns utanför tarmcellerna. Bakteriernas spiralform och aktiva rörlighet underlättar passagen genom detta sega lager.

I fas två fäster campylobacter till tarmslemhinnan. Ett sätt är att binda till fibronektin, ett unikt ämne som har två slags receptorer: en som fäster till tarmcellernas yta och på andra sidan en som binder in vissa proteiner. Deras funktion i kroppen är att underlätta proteintransport. Campylobacter har i cellmembranet ett protein – kallat Cadf – som fäster specifikt till fibronektin och bakterierna kan därför använda tarmcellernas egen transportkedja för att binda in till cellytan. Troligen finns dock även andra mekanismer för campylobacters adhesion till tarmcellerna.

I tredje fasen invaderas epitelcellerna i tarmen genom en eller flera mekanismer som är dåligt kända. Det man vet är att campylobacter i vissa fall kan tränga in i själva cellen medan de i andra fall passerar tarmväggen via mellanrummen mellan cellerna. Möjligen kan förklaringen till att vissa drabbade får blodiga diarréer förklaras av hur invasionen går till.

I fjärde fasen tror man att något cytotoxin bildas som orsakar själva enteriten. Det bäst studerade kallas CDT (*cytolethal distending toxin*) men om detta är viktigast är ännu oklart.

LIVSMEDEL: TILLVÄXT

Campylobacter tillväxer inte i livsmedel. Här skulle man kunna sätta punkt för hela avsnittet, men trots allt överlever ju bakterierna i livsmedel och därför är det viktigt att klarlägga vilka faktorer som påverkar *överlevnaden* för campylobacter.

Temperatur

De flesta stammarna tillväxer i intervallet 28-47°C. Överlevnaden är bättre ju lägre temperaturen är och följaktligen överlever campylobacter bäst vid kyltemperatur. Under fuktiga, syrebegränsade förhållanden kan de överleva 2-4 veckor vid 4°C. Campylobacter har låg värmeresistens och dör omedelbart vid pastörisering som i Sverige innebär minst 74°C i 15 sekunder. Redan vid 60°C sker en snabb avdödning, man räknar med att 90 % av bakterierna är döda efter 6 sekunder. Så kallad termisering som innebär att man upphettar leverantörs-mjölken, vanligtvis till 63°C, vid ankomsten till mejeriet är därför fullt tillräckligt för att döda campylobacterna.

Syre

Ren luftmiljö är toxisk för campylobacter p.g.a. de oxidationsprodukter som bildas. Finns bakterierna på ytan av ett livsmedel som lagras i luft blir överlevnaden därför betydligt kortare än på ett livsmedel som förpackas i vacuum eller modifierad gasatmosfär. En undersökning gör

gällande att ju större aerob tolerans en stam har, desto större är risken att den orsakar sjukdom.

pH

Under i övrigt optimala förhållanden kan campylobacter tillväxa inom pH-intervallet 5.5–8.0. Syrade livsmedel orsakar knappast campylobacter-enterit, även om man kan sätta ett visst frågetecken för hemtillverkade färskostar på opastöriserad mjölk som äts direkt efter tillverkningen. Kommersiellt tillverkade färskostar är däremot inget problem, de är helt enkelt inte tillräckligt färska när de når konsumenten.

Saltning och rökning

All form av uttorkning slår hårt mot campylobacter och torkade, saltade och/eller rökta livsmedel är därför säkra.

Frysning och kyllagring

Patogena bakterier i livsmedel brukar inte påverkas nämnvärt av frysning och kyllagring, men campylobacter är ett undantag, de reduceras faktiskt ganska ordentligt. En undersökning av konsumentförpackad kyckling visade att medan mer än 90 % av kycklingarna var positiva för campylobacter under sommarhalvåret var mindre än en tredjedel positiva under december och januari. Skillnaden förklarades med att kycklingarna omsattes snabbare under sommarhalvåret med kortare kyllagringstid som följd.

LIVSMEDEL: PRODUKTER

Kött

Alla köttprodukter oavsett ursprung kan innehålla campylobacter från slaktkroppens egen tarmflora. Exakt hur många procent av köttstyckena som är infekterade med campylobacter beror på köttslaget, på hur färskt köttet är (ju färskare desto fler campylobacter) och på i vilket land man befinner sig. En genetisk undersökning gör visserligen gällande att köttassocierade stammar skiljer sig genetiskt från kliniska stammar vilket *skulle* kunna tolkas som att många köttstammar är mindre virulenta. En liknande undersökning påstår emellertid raka motsatsen, att köttstammar och kliniska stammar i stort sett sammanfaller. Det mesta, särskilt det faktum att nästan alla stammar tycks bära på alla kända virulensfaktorer, tyder på att alla köttisolat av *C. jejuni* bör betraktas som fullt virulenta.

Vanligast är campylobacter på fågelkött. Kyckling och andra fåglar som föds upp i stordrift är i många länder nästan undantagslöst infekterade. I länder som åtminstone försöker förhindra spridning är ändå 25-50 % smittade. I Sverige var förekomsten på kycklingar direkt efter slakt ca 40 % i början av åttiotalet enligt en undersökning vi själva utförde. Senare under åttiotalet gjordes en hel del för att minska frekvensen, men några positiva effekter av åtgärderna kan inte spåras i Smittskyddsinstitutets statistik.

Grundproblemet är att campylobacter tillhör normalfloran hos många fågelarter. Förekomsten i tarmen är därför svår att göra någonting åt, det bästa man kan hoppas på är att minska spridningen till slaktkroppen under slakten. Detta är dock inte heller så lätt eftersom det sannolikt är aerosoler som utgör den viktigaste smittvägen.

Stordriften vid uppfödningen är troligen av mindre betydelse, man får komma ihåg att även vildfåglar som gäss och ankor i stor utsträckning har campylobacter i tarmen. I sammanhanget kan man som kuriosum nämna att kråkfåglar verka toppa listan över campylobacterfrekvens. Den skånska traditionen med stekt ungråka kan därför ha utgjort den största campylobacter-risken i Skåne under 1800-talet (den höga kycklingkonsumtionen är ju av ganska sent datum).

Trots att de domesticerade hönsfåglarna praktiskt taget alltid har campylobacter i tarmfloran är det sällsynt att ägg orsakar campylobacter-enterit. En viktig anledning är naturligtvis campylobacters dåliga överlevnad, även om bakterien skulle finnas på skalet hos det nyvärpta ägget, inaktiveras bakterien snabbt av den torra, syremättade miljön. Inuti äggen finns campylobacter praktiskt taget aldrig.

Griskött är troligen underskattat som riskfaktor. *C. coli* antas i västvärlden stå för 10 % av campylobacter-enteriterna och åtskilliga av dessa härrör sannolikt från griskött där *C. coli* är den dominerande arten. Det är inte ovanligt att 90 % av grisarna har campylobacter i tarmfloran, men hur stor risken är att grisköttet innehåller campylobacter beror på slakt- och styckningshygienen, som varierar åtskilligt mellan olika länder.

Nötkött har generellt sett lägre frekvens av campylobacter, men även här gäller att kreaturen mycket väl kan ha bakterierna i tarmen, uppskattningar från USA och Japan visar på en frekvens uppåt 30 % medan skandinaviska bakteriologer uppger lägre frekvenser, med ganska få procent infekterade djur. Betande djur antas få i sig campylobacter genom infekterat vatten medan flugor tros fungera som vektor för att överföra bakterierna till stallade djur.

Smitta direkt från kött beror antingen på att köttet inte stekts tillräckligt eller på en del restaurangers arbetsordning att lägga köttbiten på en tallrik, därefter tillaga den för att sedan lägga tillbaks den på samma tallrik. Det är en dålig rutin! Indirekt kan smitta ske genom spridning från det råa köttet via knivar och skärbrädor till exempelvis grönsaker.

Kött är den allt överskuggande orsaken till *sporadiska fall* av campylobacter-enterit, alltså sådana fall som drabbar det enskilda hushållet och som myndigheterna nästan aldrig får kännedom om. Däremot är kött inte den vanligaste orsaken till *utbrott* av campylobacter-enterit. I Sverige brukar 3-4 utbrott från kyckling rapporteras årligen, men sällan med fler än 10 insjuknade. Övrigt kött är oftast inte ens med i den årliga statistiken. De största och flesta fallen orsakas av opastöriserad mjölk och infekterat dricksvatten.

Wokat kött riskfaktor?

Den globala woktrenden har antagligen lett till åtskilliga fall av campylobacter-enterit i hushållen, men det dröjde tills 1997 innan ett egentligt utbrott konstaterades. En stir-fry-restaurang i Cardiff, Wales, som erbjöd en "Hawaii-afton" med lättwokat kycklingkött, gav på köpet 12 av sina kunder campylobacter-enterit. I undersökningen av fallet konstaterades att den sannolika orsaken var otillräckligt stekt kycklingkött, till en del beroende på att kycklingbitarna var i största laget. Eftersom wokning ju innebär ett hastigt uppkok med måttlig värmebehandling är det viktigt att kycklingkött verkligen är finstrimlat, annars kan det förbli rått inuti och då är det verkligen fara på färde.

Dansk kycklingsallad

Sommaren 2005 informerades danska smittskyddsmyndigheter att en patient hos en privatläkare i Köpenhamn drabbats av campylobacter-enterit. Att privatläkaren överhuvudtaget förde saken vidare berodde på att patienten misstänkte att han blivit smittad på jobbet och att flera av hans arbetskamrater också blivit sjuka. Maten var tillverkad av ett cateringföretag som, visade det sig, levererade mat till åtta arbetsplatser. På sju av dessa arbetsplatser hade människor insjuknat, men den epidemiologiska undersökningen begränsades till att kontrollera tre av företagen, där ungefär 100 personer drabbats.

En kycklingsallad, som serverats på en enda veckodag, var epidemiologiskt den uppenbara orsaken och intervjuer med kökspersonalen indikerade att rå kyckling sannolikt hade kontaminerat grönsallaten genom användandet av gemensamma skärbrädor för kycklingen och grönsallaten. En tredjedel av dem som ätit kycklingsallaten insjuknade.

Undersökningen pekade på ett intressant fynd: det fanns två toppar i kurvan för inkubationstiden. Majoriteten av de smittade insjuknade efter 3 dygn med en spridning på 1-8 dygn, helt enligt normerna. Men dag 10 började kurvan stiga igen och avklingade först efter 17 dygn. Den kan givetvis inte uteslutas att dessa, som undersökningen beskriver det, ”sena fall” orsakades av en annan maträtt, men om uppgiften att kycklingsalladen ensam bar skulden var riktig, så insjuknade en av fyra efter en inkubationstid på 10-17 dygn. Nästan alla insjuknade i undersökningen hade diarré, 9 av 10 hade buksmärtor, ungefär hälften var illamående och lika många hade feber, 1 av 5 hade huvudvärk medan 1 av 10 upplevde en allmän värk i kroppen. Lika många hade uppkastningar och enstaka hade blod i avföringen.

Bröllop med efterräkningar

Vid en bröllopsmottagning i Northumberland, England, i juni 2010 drabbades 24 personer av campylobacter-enterit (det framgår inte om brudparet hörde till de insjuknade). Inkubationstiden var kort, i genomsnitt 2 dygn, med en spridning på 1-5 dygn (här ska påpekas

att det fanns deltagare som blev sjuka efter 10 dygn eller mer men de räknades inte in i utbrottet). Varaktigheten var 1-18 dygn.

Samtliga 24 drabbades av diarré, hos 5 insjuknade var den blodig, 23 hade buksmärtor och 22 feber medan 8 fick uppkastningar. Kycklingleverpaté var orsaken och efter en genomgång av tillverkningen konstaterades att patén sannolikt var dåligt värmebehandlad. Kycklingleverpaté är en förvånansvärt vanlig orsak till campylobacter-enterit i England och Skottland, det finns många fall redovisade. Med tanken på campylobacters låga värmeresistens borde det vara en nästan omöjlig smittkälla, patén måste vara närmast rå inuti för att den ska kunna orsaka smitta.

Säsongen 2009 av TV-programmet ”Halv åtta hos mig” serverade en strutsuppfödare ”honungsgravad strutsfilé”. Alltså rått strutskött som marinerades med bland annat honung och sherry och som serverades, fortfarande rått, i tunna skivor. Receptet finns (2012) fortfarande på nätet och varje livsmedelsbakteriolog tar sig för pannan. Det är ingen skillnad på struts och exempelvis kyckling, 20-40 % av strutsarna innehåller *C. jejuni* och *C. coli* oavsett var i västvärlden farmerna finns. Om de TV-ansvariga hade bytt rå strutsfilé mot rå kycklingfilé hade det blivit ett ramaskri i massmedia, men ingen verkar ha reflekterat över att strutsen faktiskt också är en – om än stor – fågel. Följ inte receptet och gör absolut ingen *carpaccio* av någon annan fågel heller! Risken för campylobacter-enterit är mycket stor!

Män vid grillen

I nästan alla länder är det fortfarande kvinnorna som står för den mesta matlagningen. Undantaget (i nästan alla länder!) är då grillen plockas fram, då förvandlas maken till en i det närmaste professionell *chef* och ska hantera elden. Är maken i övrigt en novis vid spisen så blir kycklingklubban i värsta fall kremerad på utsidan och rå inuti. Dessutom, vilket faktiskt visas av statistik från flera länder inklusive Sverige, har novisen sällan någon riktig koll på hygienen: det råa kycklingköttet samsas med grönsallaten före grillningen (detta är, kan det tilläggas, skrivet av karlen i författartrion…).

Fisk och skaldjur

Råa skaldjur har varit orsaken till utbrott av campylobacter-enterit. Undersökningar pekar mot att ungefär hälften av musslorna innehåller campylobacter och då särskilt *C. lari*. Eftersom musslorna kokas finns det ingen större risk att få i sig campylobacter den vägen, men liksom för kyckling finns det anledning att tänka på spridningsrisken om man hanterar råa musslor. Med skaldjur som äts råa, som ostron, är risken däremot uppenbar. Inte ens efter depurering (den behandling ostronen går igenom innan de är färdiga för konsumtion) är de ofarliga, 5-10 % av de depurerade ostronen innehåller campylobacter. I Sverige har dock fisk och skaldjur inte nått den officiella campylobacterstatistiken.

Mejeriprodukter

Hos nötkreatur som har campylobacter i tarmen kan bakterierna vandra ut i mjölken. Opastöriserad mjölk är därför en riskfaktor och står vid sidan av vatten för de flesta av de utbrott som drabbar många människor samtidigt. Även i Sverige har vi, trots förbudet mot försäljning av opastöriserad mjölk, nästan årligen utbrott med 15-30 drabbade som en följd av konsumtion av gårdsmjölk, inte sällan är det då skolklasser som besökt gården. Det hittills största utbrottet inträffade 1996 då 123 personer insjuknade.

Pastöriserad mjölk är, eller borde vara, riskfri. Det hindrar inte att åtskilliga människor faktiskt drabbats av campylobacter-enterit efter att ha druckit pastöriserad mjölk. Dåliga rutiner vid mejeriet kan vara en anledning, i USA orsakades ett utbrott av att värmebehandlingen misslyckades: mjölken hade bara upphettats till 57°C. Och i England fanns så sent som för ett par år sedan fortfarande områden där mjölkmannen kom på morgonen och ställde mjölkflaskorna på trappan. Det gav varje år åtskilliga tusen engelsmän campylobacter-enterit eftersom fåglarna lärt sig att picka sönder förseglingen och roffa åt sig av mjölken medan de samtidigt ympade den med campylobacter.

Ost är i alla fall helt riskfritt att äta.

Ko-leasing i Wisconsin

I många amerikanska stater finns, liksom i Sverige, ett förbud mot att sälja opastöriserad mjölk till konsumenter. Men ingen lag, vare sig i USA eller Sverige, hindrar bonden från att själv dricka gårdens opastöriserade mjölk. Genom att anordna besök på bondgårdar där deltagarna gratis får dricka gårdsmjölken kan man på många håll komma runt lagen.

Så icke i Wisconsin. Här har myndigheterna reagerat på att gårdsbesöken, som ofta inkluderar många barn, lett till stora campylobacterutbrott. Och täckt till luckan i lagen genom att förbjuda bönderna att ens gratis förse konsumenterna med opastöriserad mjölk. Inga campylobacterutbrott i Wisconsin, tack! I så fall får bonden skaka galler.

Ändå hände det som inte fick hända. På ett litet sjukhus i Sawyer County, Wisconsin, får man in 5 personer med tydliga tecken på campylobacter-enterit. De har druckit opastöriserad mjölk på en ekologisk bondgård, visar det sig. Utredningen går igång och så småningom får man fram att minst 75 personer insjuknat. I stort sett alla hade diarré (hos en av fyra var den blodig) och magsmärtor, tre av fyra hade feber och nästan hälften kände illamående. Ingen av de drabbade var dock så svårt sjuk att någon sjukhusvård behövdes. Fem av de insjuknade hade inte druckit av mjölken: fyra av dessa var mödrar till barn som hade druckit den och den femte var ett barn som vistades på ett dagis där andra barn druckit av mjölken och blivit sjuka. PFGE-mönstret var identiskt hos alla stammar som isolerades från de sjuka och samma PFGE-mönster

hittades i en stam från mjölken som kyllagrades i en stor tank. Saken var klar och gården tvingades att i fortsättningen skicka mjölken till pastörisering.

Vad som hände med bonden? – Ingenting. Alla drabbade hade nämligen hyrt en del av en ko på gården så allihop var – i lagens mening – ägare till kossorna och därmed själva bönder. Vad folk är påhittiga…

Vegetabilier

Grönsaker är fria från campylobacter om de inte blivit kontaminerade av djur, vatten eller kött. Vid odlingarna är det vanligtvis vatten som innehåller fekalier från nötkreatur som smittar grönsakerna. Men även vilda fåglar kan innebära en risk, i Nordamerika insjuknade åtskilliga människor sedan de ätit råa ärter som odlats i närheten av en häckningsplats för tranor. I köket kan grönsaker kontamineras genom att samma knivar eller skärbrädor använts för att först stycka kyckling och sedan för att skiva grönsaker.
Att risken med korskontamination verkligen är betydande visades av ett fall i Australien där en restaurang på ett gym under tre månader kontinuerligt lyckades smitta ned sina gäster. Det var framför allt den skivade gurkan i ”ta-själv”-avdelningen som smittades av campylobacter från rå kyckling när man använde samma skärbräda. När myndigheterna äntligen fick upp ögonen och såg till att matsalen använde sig av separata skärbrädor upphörde fallen. Att "redskap" också kan innebära annat än knivar och skärbrädor visades av fallet i Oklahoma.

Jackson, Oklahoma

Efter ett lunchbesök på en lokal restaurang togs två personer in på sjukhus med blodiga diarréer. Campylobacter-enterit p.g.a. *C. jejuni* konstaterades och en uppföljning klarlade att ytterligare tolv hade drabbats vid samma tillfälle. Av de totalt 14 insjuknade hade alla diarré, 13 hade feber och buksmärtor, 11 blev illamående varav 5 kräktes, medan 3 hade blod i avföringen.

Den gemensamma nämnaren var grönsallat och det kom inte som en direkt överraskning då det visade sig att kockan hade styckat kyckling innan hon skar sallaten. Men hon hade, helt enligt reglerna, desinficerat skärbrädan ordentligt så campylobactern borde rimligtvis ha strukit med. Boven i dramat visade sig vara den handduk som hon i likhet med all världens kockar bar om midjan. Kockhanddukar används ju inte bara till att torka händerna med utan kanske än mera till att snygga upp efter såsspill och – i det här fallet – torka upp efter kycklingen. Från kycklingen fick campylobactern gå via skärbrädan till handduken till kockans händer för att till sist hamna på sallaten. Myndigheternas krassa rekommendation till restaurangen var att införa pappershanddukar.

Den spanska isbergssallaten

1994 drabbades stora delar av Europa av ett gigantiskt utbrott av matförgiftning som härleddes till spansk isbergssallat. I Sverige drabbades åtminstone 500 personer, antagligen många fler, av diverse sjukdomar: campylobacter-enterit var en, men även salmonellos, shigellos, kolienterit och t o m parasitsmitta konstaterades. Isbergssallaten var kraftigt infekterad med en osannolikt lång rad sjukdomsframkallande organismer. Sallaten hade odlats i Spanien och sköljts med infekterat vatten under en lång period och det var inte bara ett, utan många av de exporterade partierna som ställde till med bekymmer. I Sverige noterades åtminstone 20 olika utbrott. (Under sommaren 1998 hände samma sak igen, men den gången klarade sig svenskarna någorlunda helskinnade, andra länder fick ta emot den spanska isbergssallaten.)

Att dricka oklorerat vatten söder om Alperna har de flesta svenskar lärt sig att låta bli. Däremot tänker man sällan på att det vatten man så nogsamt undvikit på semestern är detsamma som använts för att odla och skölja de importerade grönsaker man hittar hos sin lokala handlare i Tingsryd. Och om vattnet var infekterat kan man kallt räkna med att också sallaten är det. Men det är inte bara i sydligare nejder som risken finns. I Nordamerika hittades campylobacter på ungefär 3 % av de rotfrukter och grönsaker som gårdsförsåldes och som hade tvättats i oklorerat ytvatten. Däremot hittade man inte några campylobacter i lokalt producerade vegetabilier som såldes i affärerna. Antagligen var dessa otvättade eller så hade de sköljts i klorerat vatten.

Vatten

Med djurens avföring förs campylobacter ut i vattendragen och vatten är en viktig mellanstation vid överföringen av bakterierna från djur till djur. Campylobacters överlevnad i vatten beror på temperaturen, ju kallare vatten desto bättre överlevnad. Undersökningar i Norge har visat att ungefär hälften av alla ytvatten är infekterade och man kan anta att situationen är densamma här. Borrade brunnar är säkrare, men ingalunda helt säkra: i Sverige har vi varje år campylobacterfall där familjernas egna brunnar varit orsaken.

Vatten är den vanligaste orsaken till *utbrott* av campylobacter och de ojämförligt största utbrotten i Sverige har varit vattenburna. Vid Boden-utbrottet 1988 insjuknade 11 000 efter att kloreringen fallerat, i Kramfors 1994 drabbades 2 500, 1995 beräknades 10 000 skåningar ha insjuknat efter att vatten som stått stilla månadsvis i ledningar pumpats ut till konsumenterna och i Söderhamn 2003 drabbades 3 000 personer.

Campylobacter i Nord-Trøndelag

Under 1994 och 1995 inträffade två likartade utbrott av campylobacter-enterit på samma ort i Norge. Totalt 1 000 personer drabbades vilket var ungefär hälften av de som var i riskzonen.

Intervjuer visade att alla drabbade hade fått sitt vatten från två vattenverk som båda försåg sina kunder med oklorerat dricksvatten från ytvattentäkter. Däremot drabbades ingen av dem som var anslutna till ett tredje vattenverk som använde samma vattentäkter men som klorerade sitt dricksvatten.

Några definitiva bevis för vad som hänt fick man inte fram. Men vid det andra utbrottet lämnade några ornitologer en intressant uppgift: en flock på tusentals gäss hade övernattat på ytvattentäkten. Man beräknade att de under sin vila hade berikat vattnet med åtminstone 100 kg exkrementer, och eftersom halten campylobacter i gässens träck mycket väl kan uppgå till en miljon per gram ansågs att detta sannolikt var orsaken till utbrotten.

Mountainbike riskfaktor?

2010 rapporterades två märkliga fall där mountain bike-cyklister var inblandade. I båda fallen, ett från England och ett från Kanada, drabbades över 200 cyklister av campylobacter-enterit. Vid båda tävlingarna var det mycket regnigt väder och gyttjan sprutade omkring cyklisterna. Infektionerna orsakades av att cyklisterna svalde gyttja som hade förorenats av djur, i det engelska fallet säkerställt som avföring från får.

VIRULENSFAKTORER

Trots 25 års intensiv forskning har man fortfarande inte mycket på fötterna när det gäller att förklara varför man blir sjuk i campylobacter-enterit. Eftersom sjukdomsförloppet kan variera alltifrån en ganska okomplicerad vattnig diarré till långvariga och svåra blodiga diarréer, tycks olika virulensfaktorer spela in.

Lipopolysackarider

Hos en del gramnegativa bakterier är strukturer inne i cellväggens lipopolysackaridskikt en viktig virulensfaktor. Så verkar det också vara för de stammar av campylobacter (främst *C. jejuni* HS 19) som kopplas till Guillain-Barrés syndrom. Just dessa stammar av campylobacter har strukturer som är närmast identiska med en del glykolipider (gangliosider) i nervtrådarna och en tänkbar förklaring till den svåra förlamningssjukdomen kan vara att kroppens antikroppar tar fel och börjar se kroppens egna gangliosider som inkräktare. För själva campylobacter-enteriten verkar däremot lipopolysackariderna inte ha någon större betydelse, annat än möjligen som en adhesionsfaktor.

Kolonisation och adhesion

En bakterie kan mycket väl kolonisera tarmen utan att adhera till epitelcellerna. Det finns ett tjockt, segt och långsamrörligt mukuslager utanför tarmcellerna där bakterierna kan tillväxa. Campylobacter är med sin rörlighet och spiralform synnerligen väl lämpad att röra sig i

högviskösa vätskor av den typ som mukuslagret utgör. En möjlig variant av campylobacter-enterit kan tänkas där campylobacterna koloniserar enbart mukuslagret och frigör ett eller flera toxiner. Den mildare formen som karakteriseras av vattnig diarré skulle kunna förklaras av en sådan modell.

En mer accepterad modell för vattnig diarre är dock att campylobacter penetrerar mukuslagret och adherar till tarmens epitelceller men utan att invadera dem. De flesta campylobacter–stammar har nämligen en dokumenterad förmåga att adhera till celler. Flera adhesionsfaktorer, som Cadf (*Campylobacter adhesion to fibronectin*) och fimbrier har beskrivits. Cadf är ett 37 kDa yttre membranprotein hos campylobacter som fäster specifikt till fibronektin på värdcellerna.

Invasion och translokation

Campylobacter inte bara adherar till utan invaderar även många olika typer av vävnadsceller. Invasionen sker genom en process som förutsätter aktiv rörlighet (vilket är en anledning till att de orörliga VNC-cellerna anses avirulenta).

Campylobacter har också visat sig kunna translokera, d v s tränga genom skiktet av epitelceller ("tarmväggen"). Det kan naturligtvis ske genom invasion av cellerna som sedan lyseras, men även genom en rutt där de tränger mellan cellerna. När campylobacter infekterar svarar kroppen med en antiinflammatorisk reaktion med polynukleära leukocyter (PNL) och monocyter i tarmväggen. Bakterierna dödas snabbt av PNL men åtminstone vissa stammar tycks kunna överleva uppåt en vecka inne i monocyterna genom att gå över till VNC-formen som tycks ge skydd mot monocyternas kemiska krigföring. Teoretiskt skulle alltså campylobacterna kunna spridas via monocyterna i likhet med andra intracellulära överlevare som exempelvis listeria. Det måste dock påpekas att det inte finns några experimentella data som visat att överlevnad av VNC-celler betyder något för sjukdomsförloppet.

Toxinproduktion

Att campylobacter producerar toxiner står klart. Det finns flera beskrivna, men frånsett CDT (*cytolethal distending toxin*) är de inte särskilt välstuderade. CDT är ett cytotoxin som – i olika varianter – finns hos flera gramnegativa patogena bakterier. Hos åtminstone *C. jejuni* finns generna för CDT-produktion hos praktiskt taget alla stammar. CDT är toxiska för epitelceller, förmodligen genom att skada deras DNA, och de dödar immunceller genom att sätta igång immuncellernas programmerade celldöd. CDT består av tre enheter, där CdtB är den katalytiska delen som har DNas-aktivitet och skadar värdcellens DNA vilket sätter igång en kaskad av DNA-reparation som i sin tur leder till att den nödvändiga celldelningen upphör. Slutresultatet blir att värdcellen dör. De båda andra enheterna, CdtA och CdtC, är proteiner som binder in till cellerna och möjliggör att CtdB kan överföras från tarmen in i cellerna.

Ett koleraliknande enterotoxin som uppvisar immunologisk likhet med såväl koleratoxinet som

LT-toxinet hos *E. coli* har rapporterats av en del forskare, men satts i tvivelsmål av andra. Även ett shiga-liknande toxin har funnits men inget tyder på att det har någon större betydelse för campylobacter-enterit.

PÅVISNING

Selektiva medier

Alltsedan Skirrows klassiska medium introducerades 1977 har åtminstone ett nytt selektivt medium presenterats varje år av olika forskare. Mediernas effektivitet är högst varierande vilket gör det vanskligt att jämföra data mellan olika undersökningar. Det gäller i synnerhet om man är intresserad av andra arter än *C. jejuni* och *C. coli*, som de flesta medierna är konstruerade för. För campylobacter gäller dessutom att förbehandlingen av provet är viktigt. I en undersökning av kycklingkött fann man att 69 % av proverna var positiva efter anrikning medan samtliga prover var negativa vid direktodling på ett selektivt medium. Men för att riktigt röra till begreppen så finns det faktiskt undersökningar som visar på höga campylobacterfrekvenser vid direktodling medan campylobacterna däremot gått förlorade i anrikningssteget!

De elva vanligaste selektiva medierna finns listade nedan. Sex är baserade på blodagar, fem är blodfria. Eftersom de första medierna som användes för campylobacter innehöll blod påstås det ibland att campylobacter är väldigt näringskrävande och svårodlade bakterier. Så är det inte alls, bakterierna går att odla på ganska enkla medier. Campylobacter är däremot känsliga för oxidationsprodukter och blod är ett bra reduktionsmedel. När man väl upptäckte det kunde blod ersättas med andra reduktionsmedel som är lättare att hantera.

Tabell 6.2. Blodbaserade medier för *Campylobacter*.
Tillsatserna är per liter av rekommenderade blodagarbaser.

Skirrows medium	**Blasers medium**	**Blaser-Wangs medium**
Lyserat hästblod 50 mL	Fårblod 100 mL	Fårblod 100 mL
Vancomycin 10 mg	Vancomycin 10 mg	Vancomycin 10 mg
Trimetoprim 5 mg	Trimetoprim 5 mg	Trimetoprim 5 mg
Polymyxin B 2500 IU	Polymyxin B 2500 IU	Polymyxin B 2500 IU
Blodagarbas nr 2 *eller*	Amfotericin B 2 mg	Amfotericin B 2 mg
Columbia agarbas	Cefalotin 32 mg	Cefalotin 15 mg
	Brucella agarbas	Brucella agarbas
Butzlers medium	**Modifierad Butzlers**	**Prestons medium**
Fårblod 50-70 mL	Fårblod 50-70 mL	Lyserat hästblod 50 mL
Bacitracin 25000 IU	Amfotericin B 2 mg	Cykloheximid 100 mg
Cykloheximid 50 mg	Cefoperazon 30 mg	Polymyxin B 5000 IU
Colistinsulfat 10000 IU	Rifampicin 10 mg	Rifampicin 10 mg
Na-cefazolin 15 mg	Columbia agarbas	Trimetoprimlaktat 10 mg
Novobiocin 5 mg		Campylobacter agarbas
Columbia agarbas		

Tabell 6.3. Blodfria medier för *Campylobacter*.
Tillsatserna är per liter av rekommenderade agarbaser.

Karmalis medium	**Modifierad CCDA**	**Abeyta-Hunt-Bark agar**
Aktivt kol 4 g	Aktivt kol 4 g	FBP-lösning 4 mL[a]
Na-pyruvat 0.1 g	Kasein 3 g	Jästextrakt 2 g
Hematin 32 mg	Na-deoxikolat 1 g	Cefoperazon 32 mg
Vancomycin 20 mg	$FeSO_4$ x 7 H_2O 0.25 g	Rifampicin 10 mg
Cykloheximid 100 mg	Na-pyruvat 0.25 g	Amfotericin B 2 mg
Cefoperazon 32 mg	Cefoperazon 32 mg	Heart Infusion agar
Columbia agarbas	Campylobacter agarbas	

[a]FBP-lösning består av 6.25 g natriumpyruvat, 6.25 g järnsulfat och 6.25 g natriummetabisulfit i 100 mL destillerat vatten.

Tabell 6.3. Blodfria medier för *Campylobacter*, fortsättning.
Tillsatserna är per liter av rekommenderade agarbaser.

CAT	Boltons medium
Aktivt kol 4 g	Ketoglutaminsyra 1 g
Kasein 3 g	Hemin 10 mg
Na-deoxikolat 1 g	Na-karbonat 0.6 g
$FeSO_4$ x 7 H_2O 0.25 g	Trimetoprimlaktat 20 mg
Na-pyruvat 0.25 g	Na-metabisulfit 0.5 g
Cefoperazon 8 mg	Cefoperazon 20 mg
Amfotericin 10 mg	Na-pyruvat 0.5 g
Teicoplanin 4 mg	Vancomycin 20 mg
Campylobacter agarbas	Cykloheximid 20 mg
	Boltons anrikningsmedium

Samtliga medier är konstruerade för att isolera campylobacter från avföring, och alltså inte i första hand från livsmedel. Av de blodbaserade medierna innehåller två cefalotin vilket såväl *C. upsaliensis* som *C. hyointestinalis* är känsliga för. Dessa två medier är också de hårdaste mot andra arter av campylobacter och har knappast någon användning inom livsmedelssektorn. Undersökningar baserade på dessa medier ger alltför låga frekvenser positiva fynd även för *C. jejuni*. Av de övriga är Skirrows och Prestons medier de mildaste och kan förväntas ge de högsta positiva frekvenserna i livsmedel, framför allt av *C. jejuni*. Prestons medium undertrycker fler konkurrerande bakterier än Skirrows och är därför ett rimligt val om man vill undersöka campylobacter-frekvensen i ett livsmedel.

De blodfria medierna har visat sig ge bättre resultat. Det mest använda är modifierad CCDA (det ursprungliga CCDA innehöll ett annat antibiotikum i stället för cefoperazon) som dock på senare år alltmer ersatts av CAT som åtminstone i dagsläget får anses vara det bästa mediet för isolering av campylobacter. Det släpper dessutom fram alla fem arterna. Kromogena substrat (alltså sådana där campylobacter ger färgade, lättidentifierade kolonier) finns att tillgå, exempelvis Oxoids Brilliance CampyCount Agar där *C. jejuni* och *C. coli* bildar ettrigt röda kolonier.

En lite udda selektiv teknik är filtermetoden. Några droppar av provet placeras på ett 0.65 eller 0.45 μm membranfilter som placeras på ett substrat utan antibiotika, t ex blodagar, och inkuberas en halvtimme vid 42°C. Sedan tas filtret bort och mediet inkuberas vidare. Metoden bygger på att de mycket tunna och aktivt rörliga campylobacterna bokstavligt talat kan slingra sig igenom sterilfiltrens porer och söka sig till näringen på plattan. Filtertekniken har faktiskt använts ganska flitigt vid odling från feces där halten campylobacter kan förväntas vara mycket hög. Den är nog mindre användbar för livsmedelskontroll eftersom bara någon eller några

procent av campylobacterna lyckas ta sig genom filtret. Men som ett komplement till andra metoder kan den vara användbar.

Isolering av campylobacter från livsmedel

I Sverige har man under många år använt en referensmetod som innebär mikroaerofil anrikning i Prestonbuljong 42°C 24 timmar och därefter mikroaerofil utodling på selektiv agar 42°C 48 timmar. Anrikningssteget behöver inte ske i någon speciell gasatmosfär om FBP-lösning tillsätts. För utodlingen har två selektiva agar använts: Prestonagar och modifierad CCDA med en ytterligare tillsats av 10 mg/L amfoteracin.

I USA rekommenderas ett inledande mikroaerofilt "föranrikningssteg" i Boltonbuljong, 4-5 h vid 30-37°C (beroende på livsmedelsprodukt) för att få bakterierna att återhämta sig, därefter själva anrikningen, mikroaerofilt ca 20 h vid 42°C och slutligen utodling mikroaerofilt 24-48 h vid 42°C. För utodlingen kan tre medier användas: Boltons, Abeyta-Hunt-Bark och modifierad CCDA.

Som noterats ovan är det egentligen inte nödvändigt med någon speciell gasmiljö för anrikningssteget under förutsättning att buljongen är nygjord och flaskorna/rören välfyllda. För såväl buljongrör som agarplattor gäller i övrigt att de måste kyllagras anaerobt, även om syrgastärande kemikalier typ PBP finns närvarande. Annars mättas substraten med syre och halten av oxidationsprodukter ökar vilket förhindrar tillväxt av campylobacter. För att skapa en mikroaerofil miljö speciellt anpassad för campylobacter finns det gott om kommersiellt tillhandahållna gasgeneringskits.

VNC-celler kan förökas i befruktade hönsägg varefter de övergår till den odlingsbara formen.

Identifiering

Biokemisk identifiering

Kolonier från det selektiva medium som används kontrolleras först i mikroskop (det händer att campylobacter svärmar, särskilt på fuktiga agarytor, vilket kan göra isoleringen besvärlig). I våtpreparat har campylobacter ett ganska speciellt utseende: ofta sitter cellerna ihop två och två i S-form eller som tunna måsvingar; dessa celler rör sig i ett knyckigt rörelsemönster. Om flera celler hänger ihop bildas spiraler. I preparat från samma koloni kan man ibland också se små, kockoida former (VNC-celler). Gramfärgade preparat är bleka eftersom de tunna bakterierna är svåra att kontrastfärga med safranin och liknande. Tio minuters motfärgning ger ett något bättre resultat, bäst är att använda basisk fuchsin eller karbolfuchsin som kontrastfärg. Oxidastest är standard, men den bör inte utföras med material från medier som innehåller aktivt kol eftersom kolet kan ge ett falskt negativt resultat.

För att konfirmera att det rör sig om "termofila campylobacter" bör isolaten kontrollodlas mikroaerofilt vid 25°C och även testas för *aerob* växt vid 37-42°C. Isolaten ska vara negativa för båda testerna, undantaget är en del stammar av *C. hyointestinalis* som kan växa vid 25°C. Därefter kan isolaten oftast identifieras med ett ganska litet antal tester (Tabell 6.4) som visats fungera mycket väl när man jämfört med resultat från DNA-hybridisering. Gemensamt för alla fem arterna (frånsett *C. jejuni* ssp *doylei*, se nedan) är att de reducerar nitrat men inte nitrit samt att de har enzymet pyrazinamidas. Alla utom *C. upsaliensis* växer på MacConkey-agar.

Tabell 6.4. Biokemisk identifiering av enteropatogena campylobacterarter.

Test	*C. jejuni*	*C. coli*	*C. lari*	*C. upsaliensis*	*C.hyointestinalis*
Katalas	+	+	+	–/w	+
Hippurat	+	–	–	–	–
Indoxylacetat	+	+	–	+	–
H_2S från TSI	–	–/+	–	–	+
Nalidixinsyra	S	S	R	S	R
Cefalotin	R	R	R	S	S

w = svag reaktion, R = resistent mot en 30 µg disk, S = känslig för en 30 µg disk.

Förmågan att spjälka hippurat till benzoat och glycin har länge varit grundpelaren till identifiering av *C. jejuni*, och även om hippuratnegativa stammar existerar (vilket visats av DNA-hybridiseringar) så förefaller de vara mycket ovanliga. Det finns en underart till *C. jejuni* (*C. jejuni* ssp *doylei*) som är svår att identifiera med biokemiska tester. Den reducerar inte nitrat, är ofta katalasnegativ, kan vara hippuratnegativ och är känslig för cefalotin. *C. jejuni* ssp *doylei* bedöms vara sällsynt, men det kan å andra sidan ha att göra med att den växer svagt eller inte alls vid 42°C.

Den termotoleranta arten *C. lanienae*, som isolerats från slaktare, har samma biokemiska reaktionsmönster som *C. lari* men den skiljer sig från de fem arterna i tabell 6.4 genom att den reducerar såväl nitrat som nitrit. Det finns också särskilda campylobacterkits hos flera tillverkare som kan användas för identifiering.

Immunologisk identifiering

Immunologisk identifiering av campylobacter har på många håll ersatt biokemisk identifiering. Åtminstone ett dussintal kommersiellt tillhandahållna kits finns att välja på. Metoder för latexagglutinering finns att hämta hos bland annat Becton-Dickinson, Oxoid och Meridian Bioscience. Och vill man inte nöja sig med enkla objektglasagglutineringar så finns det gott om andra mera avancerade metoder. De spänner från automatisk avläsning (bioMerieux, Tecra) till högteknologiska produkter i vilka olika immunologiska tekniker kombineras med automation. Dessa kan köpas från bland annat Molecular Circuitry och danska Foss Electric. Oavsett metod

så bör man ha klart för sig att specificiteten varierar, en del reagens är inriktade på campylobacter generellt, andra på *C. jejuni* och *C. coli*.

Molekylärgenetisk identifiering

Genetiska DNA-sonder (”probes”) för identifiering av *C. jejuni* och *C. coli* har funnits på marknaden i över 20 år. De har nästan uteslutande använts för att identifiera renkulturer. Först ut var Gene-Trak (Gene Trak Systems) och Snap (Molecular Biosystems Inc.). Sedan 2002 har Accuprobe (GenProbe, Inc.) använts som referensmetod i Sverige. Accuprobe återförsäljs av flera leverantörer av diagnostika.

Publicerade protokoll för PCR-metoder finns det en hel uppsjö av. Kommersiellt tillgängliga PCR-kits finns också, i form av Probelia (Sanofi Diagnostics Pasteur) och den av jätten DuPont salufördа Bax (DuPont Qalicon). Vissa av PCR-metoderna har fördelen av att kunna användas också för att påvisa campylobacter i livsmedelsråvarorna utan något odlingssteg. Danpo Real Time PCR är en i Sverige validerad metod för termotoleranta arter.

Epidemiologi

Serologi

Någon referensmetod för att typa campylobacter finns inte, men sedan 1980 har många kliniska laboratorier använt serologi för att spåra campylobacterstammar. Det finns två system. Det vanligaste är Penners som bygger på värmestabila (HS) antigen och som omfattar ca 70 serotyper. Detta system finns kommersiellt tillgängligt. Liors system bygger på värmekänsliga antigen och omfattar ca 100 serotyper. Serotyperna inkluderar såväl *C. jejuni* som *C. coli*. Man räknar med att 85-95 % av stammarna inom dessa båda arter är typbara i Europa och Nordamerika men att betydligt färre stammar i Afrika och Asien är typbara med den uppsättning referensstammar som används. En stark begränsning med de serologiska metoderna är att campylobacter är så vanliga i miljön, man kan ofta isolera flera serotyper från samma källa.

Det förefaller som om alla serotyper kan orsaka sjukdom. Den enda egentliga korrelation man funnit gäller de svåra följdsjukdomarna Guillain-Barrés syndrom (GBS) och dess ovanligare variant Miller-Fishers syndrom (MFS). HS 19 är starkt överrepresenterad i alla världsdelar vid GBS och HS 2 verkar ha ett samband med MFS.

Fagtypning

Fagtypning används av en del laboratorier som ett komplement till serologin för att öka upplösningen.

Molekylärgenetik

Molekylärgenetiska typningsmetoder har inte helt kunnat lösa typningsproblemen. Visserligen har man på många håll goda erfarenheter av att spåra stammar med PFGE och AFLP men det händer att mönstren skiljer sig åt på isolat från samma klon. Det beror troligen på att campylobacter spontant arrangerar om sitt genetiska material och det med en sådan snabbhet och utsträckning att klyvningsbaserade analysmetoder kan bli osäkra. PCR-baserade fingeravtrycksmetoder ger i regel sämre reproducerbarhet än PFGE. PCR-metoder har däremot varit framgångsrika då det gällt att fånga upp de isolat som är inblandade vid Guillain-Barrés syndrom.

Clostridium botulinum

— *Vegetarisk korvförgiftning?* —

ÖVERSIKT

Det påstås att Julius Caesar var så bekymrad över att hans soldater dukade under av botulism att han förbjöd dem att äta blodkorv under fälttågen. Historien får förmodligen räknas till skrönorna – också mikrobiologer har sådana – men kanske är den ändå inte helt osannolik. Medicinhistoriker menar nämligen att de symptom som förknippas med botulism kunnat kopplas till korvätande i minst tusen år.

Tyskarna, som var grundliga redan på 1700-talet, gjorde en vetenskaplig studie över fenomenet och lanserade uttrycket *Wurstvergiftung* (korvförgiftning) som på latin blir just botulism. Det skulle sedan dröja till 1897 innan belgaren van Ermengem lyckades isolera bakterien. Och av historiska skäl kunde den knappast få något annat namn än (*Clostridium*) *botulinum* trots att van Ermengem faktiskt isolerade den från torkad skinka. Botulism är ett exempel på klassisk matförgiftning, d v s där man blir sjuk av ett gift som bildats av bakterier i livsmedlet. Giftet orsakar sjukdom redan vid halter på några nanogram, vilket förklarar de svåra följderna.

Korvar har alltsedan kylskåpet kom i bruk med få undantag försvunnit som orsak till botulism. Ett sådant undantag inträffade 2003 då halalkorvar av kyckling och nötkött från den Marseillebaserade charkfabrikanten Bouod & Cie satte skräck i fransmännen. Flera insjuknade och korvarna exporterades bland annat till Danmark men några botulismfall där upptäcktes aldrig. I stället för korv har vegetabilier, fisk och fermenterat kött i dag blivit de vanligaste orsakerna till botulism. Fram till för några år sedan var det nästan bara hemkonserverad mat som ledde till botulism. Men även här har det blivit ett trendbrott. Restauranger och industritillverkade produkter (dock mycket sällan värmesteriliserade helkonserver) står numera för en allt större del av botulismfallen.

Hos många djur sprids botulism i en infektiös form där bakterien tillväxer och bildar gift i tarmkanalen. Epidemier med miljontals djur döda djur är inte ovanliga men fram till 1976 trodde man att människan inte kunde drabbas av infektiös botulism från livsmedel. Då kom den första rapporten om infektiös spädbarnsbotulism och i USA är numera antalet fall av spädbarnsbotulism fler än av matförgiftning. Under nittiotalet rapporterades spädbarnsbotulism från samtliga kontinenter och även i Sverige har vi haft några fall.

Sjukdomen drabbar barn under 6 månaders ålder och i samband med spädbarnsbotulism har ett nytt livsmedel misstänkliggjorts: honung.

BAKTERIEN

C. botulinum är en strikt anaerob bakterie som bildar värmeresistenta sporer. Bakterierna indelas efter vilket toxin de bildar, det finns sju olika (A-G). En stam som bildar toxin F betecknas alltså som *C. botulinum* typ F, men eftersom det finns sinsemellan mycket olika stammar som kan producera typ F-toxin, kompletterar man med en indelning som baseras på bakteriernas biokemiska och fysiologiska egenskaper. Fyra sådana biokemiska grupper har varit kända sedan länge (grupp I-IV). Typ F-stammar brukar därför delas upp i proteolytiska (grupp I) eller icke-proteolytiska (grupp II) varianter, se Tabell 7.1.

Tabell 7.1 Indelning av stammar som producerar botulinumtoxin.
Grupp I - IV betecknas *C. botulinum*.

Grupp	Fenotyp	Psykrotolerant	Botulism hos:	Toxintyper
I	Proteolytisk	Nej	Människa	A, B, F
II	Icke-proteolytisk	Ja	Människa	B, E, F
III	Varierande	Nej	Djur	C, D
IV	Icke-sackarolytisk	Nej	Inga kända fall	G
–	*C. baratii*	Nej	Människa	F
–	*C. butyricum*	Nej	Människa	E

I tabellen kan vi se att toxinerna B och F kan bildas av stammar som hör hemma i såväl grupp I som grupp II. Men trots att exakt samma toxin produceras så är stammarna i grupp I och II genetiskt mycket olika varandra, så olika att de inte bara ska betraktas som helt skilda arter utan faktiskt också att de inte ens borde placeras inom samma släkte!

Men, om dessa inbördes så olika stammar av *C. botulinum* kan bilda samma toxin, kan då inte också andra klostridiearter göra det? Svaret är jovisst: åtminstone två "harmlösa" klostridier, *C. baratii* och *C. butyricum*, kan bilda botulinumtoxin.

Det förekommer att en stam kan producera mer än ett toxin, vanligast är kombinationerna A+B, A+F eller C+D. Det brukar man lösa genom att ange typen som exempelvis Ab eller Af med vilket då menas att stammen huvudsakligen producerar typ A-toxin samt en liten andel B- respektive F-toxin.

Sex grupper (arter) av botulinumbakterier

1. Grupp I: den mesofila humangruppen

Stammarna i grupp I brukar kallas proteolytiska eftersom de attackerar många proteiner. De är däremot inte särskilt begivna på kolhydrater, de enda socker som generellt används är glukos och fruktos. Fermentationsprodukterna domineras av ättiksyra och smörsyra. Stammarna är utpräglat mesofila med en optimumtemperatur på ca 37°C. Trots att tre olika toxintyper (A, B och F) kan produceras av olika stammar, utgör grupp I-stammarna en homogen art. Denna är närmast besläktad med *C. sporogenes*. Grupp I är patogen både för människa och många djur.

2. Grupp II: den psykrotoleranta humangruppen

Stammarna i grupp II kan producera antingen toxin B, E eller F. För att skilja B- och F-producerande stammar i grupp I och II, betecknas grupp II-stammarna oftast som "icke-proteolytiska". Det är en sanning med modifikation eftersom grupp II-stammar faktiskt kan attackera en del proteiner, bl a gelatin. En del föredrar därför att kalla grupp II-stammarna "sackarolytiska" eftersom de till skillnad från grupp I-stammarna bryter ned en lång rad kolhydrater. Fermentationsprodukterna domineras, liksom hos grupp I, av ättiksyra och smörsyra. Grupp II-stammarna är psykrotoleranta, en del av dem växer och bildar toxin ända ned till 3°C och optimumtemperaturen ligger runt 30°C. Gruppen förefaller vara homogen, de stammar som testats har >99.5 % inbördes likhet i sitt ribosomala RNA. Gruppen är patogen för människa och många djur.

3. Grupp III: den infektiösa djurgruppen

Stammarna i grupp III har ett biokemiskt mönster någonstans mittemellan grupp I och II. Det betyder att de är icke-proteolytiska eller endast svagt proteolytiska och att de utnyttjar en handfull kolhydrater. Fermentationsprodukterna domineras av propionsyra och smörsyra vilket skiljer dem från de andra grupperna. Men då grupp III-stammarna är de enda som bildar toxintyperna C och D, är fenotypisk indelning inte så viktig. Bakterierna är utpräglat mesofila med en optimumtemperatur uppåt 40°C. Grupp III utgör en ganska homogen art som närmast är besläktad med *C. novyi*. Gruppen är patogen för många djur. Människan är däremot ganska resistent och därför brukar gruppen betraktas som ofarlig för människan. Det finns dock två beskrivna fall, ett av typ C och ett av typ D, där människor drabbats av botulism från grupp III.

4. Grupp IV: *Clostridium argentinense*

Det finns bara sju beskrivna stammar av grupp IV så informationen är knapphändig. Den viktigaste egenskapen är att ett speciellt toxin, typ G, produceras. De undersökta stammarna är proteolytiska. De kan däremot inte utnyttja kolhydrater, inte ens glukos eller fruktos. Fermentationsprodukterna domineras av ättiksyra. Stammarna är mesofiler med optimum runt 37°C. Grupp IV-stammar har fått ett eget namn, *C. argentinense*, men beteckningen *C. botulinum* typ G är vanligast i litteraturen. Det finns uppgifter bland botulinumforskare om att toxin G

hittats hos människor som plötsligt dött, men uppgifterna är av anekdotisk karaktär och bakterierna har inte med säkerhet kunnat kopplas till botulism vare sig hos människor eller djur. Bakterierna har hittats i argentinska och schweiziska jordprover. Grupp IV-stammarna är närmast besläktade med *C. subterminale*.

5. *Clostridium baratii*: typ F-producenter

De första fynden av *C. baratii*-stammar som producerade toxin typ F gjordes 1985 och dessa uppgifter har senare verifierats. Det står också klart att det inte enbart rör sig om en tillfällig fenotypisk likhet med *C. baratii*, toxinproducerande stammar uppvisar nämligen 99.9 % rRNA-homologi med de vanliga harmlösa stammarna av denna art. *C. baratii* är en mesofil art som bryter ned många kolhydrater till framför allt ättiksyra, smörsyra och mjölksyra. Det är sannolikt endast en mycket liten andel av *C. baratii*-stammarna som producerar botulinumtoxin. Dessa stammar har varit orsak till en del fall av spädbarnsbotulism och 9 av de 13 fall av vuxen-botulism som orsakats av typ F i USA.

6. *Clostridium butyricum*: typ E-producenter

Att den välkända bakterien *C. butyricum*, vanlig inte minst inom mejeriindustrin där den ställer till med problem för osttillverkarna, kunde producera botulinumtoxin upptäcktes 1986. Och precis som i fallet med *C. baratii* har uppgifterna verifierats i senare studier. *C. butyricum* är ofta psykrotolerant och den är en utpräglat sackarolytisk art som bryter ned en lång rad kolhydrater till framför allt smörsyra och ättiksyra. Det är förmodligen bara en försvinnande liten del av *C. butyricum*-stammarna som producerar toxin, men de toxinbildande stammarna tillhör definitivt samma art som de ofarliga stammarna. *C. butyricum* har förekommit i flera fall av spädbarnsbotulism och i ett fall av typ E-förgiftning i Kina som drabbade sex personer som ätit fermenterade sojabönor.

Tystade eller sovande gener?

Med PCR-metodik har man funnit att *generna* för toxinproduktion kan finnas hos andra arter, bl.a. har de hittats hos *C. subterminale*, men *toxinproduktion* har däremot inte kunnat styrkas.

Ansiktslyftning på flaska

Under nittiotalets senare del ökade forskningen om botulism kraftigt och ändrade helt karaktär. Sedan dess publiceras varje dag ett par vetenskapliga uppsatser där 49 av 50 handlar om botulinumtoxinets (Botox) kommersiella användning. Det har nämligen visat sig att toxinet kan användas för att behandla neurologiska sjukdomar som har spastiska inslag. Botox används då för att minska den okontrollerade överproduktionen av nervimpulser. Särskilt strokepatienter har med framgång behandlats med injektioner av botox. Men även mindre livshotande men smärtsamma sjukdomar som whiplashskador, migrän och tennisarmbåge kan lindras med Botox. Under de år som botulinumtoxin använts för farmaceutiska ändamål har ca 40 dödsfall rapporterats.

Men mest pengar ligger det i kosmetikabranschen. Reaktionen från amerikanska myndigheten *Food and Drug Administration* (FDA) på den allra första ansökan från ett kosmetikaföretag är en rolig läsning. FDA avslår och kan inte låta bli att tillfoga kommentaren ”att använda botulinumtoxin för kosmetiska ändamål är det värsta exemplet på dåligt omdöme vi någonsin stött på”. Riktigt roligt blir det när FDA år 2002 ändå tvingas kapitulera för kosmetika-branschens lobbyverksamhet. Botox (samt Dysport och Myobloc/Neurobloc) är nu godkända över nästan hela världen för kosmetiska ändamål. Det är en guldgruva att ösa ur för kosmetikaindustrin: injektionerna är dokumenterat effektiva, rynkorna trollas bort och eftersom verkan avtar ganska snabbt så krävs ständiga injektioner vilket som bekant ger goda repetitiva intäkter. Några dödsfall har inte rapporterats från den kosmetiska användningen av toxinen.

Förekomst i naturen

Tarmkanalen

Den ekologiska nischen för *C. botulinum* kan vara tarmkanalen hos djur. Grupp I- och III-bakteriernas utpräglade mesofila karaktär pekar då mot en tillvaro hos varmblodiga djur, medan grupp II med sin mera psykrotoleranta natur kan ha hittat en hemvist hos fisk och kallblodiga djur. Men lever bakterierna i harmoni med vissa djurarter eller utgör den alltid ett hot mot sin värd? Om det vet vi inte mycket, ekologin för *C. botulinum* är dåligt utredd. Men det förefaller som om bakterien kan föröka sig hos vissa djur utan att orsaka skada, en undersökning på svin visade t ex att friska grisar ganska ofta härbärgerade typ C.

Jord och vatten

Sporer av *C. botulinum* är mycket vanligt förekommande i jord och vatten. I princip kan man räkna med att alla odlade jordar samt sjöar och kustnära hav innehåller låga halter av botulinumsporer (i storleksordningen en spor per gram). Om det finns rikligt med organiskt material, exempelvis djur- eller fiskkadaver, bildas en anaerob miljö där sporerna kan gro ut och bakterierna föröka sig. Tillväxt i djurkadaver är sannolikt betydelsefullt för bakteriernas spridning. Ruttnande växtsubstanser är en annan möjlig livsmiljö för bakterierna, åtminstone så länge pH-värdet inte sjunker under 5 till följd av att växternas kolhydrater bryts ned till organiska syror.

Geografisk spridning

Geografiskt finns stora skillnader mellan var man hittar de tre viktigaste toxintyperna A, B och E. Typ A har en utbredning som omfattar västra USA och delar av Sydamerika, medan typ B dominerar i östra USA, i Kina och på europeiska fastlandet. Typ E har en nordlig utbredning som omfattar norra Europa, norra Ryssland, Alaska, Kanada och norra Japan. De djurpatogena

typerna C och D tycks förekomma över hela jordklotet, medan det finns för få data för att säkerställa förekomsten av typerna F och G i olika regioner.

SJUKDOMEN

Inkubationstid

Symptomen vid botulism kan komma efter mycket varierande inkubationstider, allt mellan 2 timmar och 8 veckor har rapporterats. Inkubationstiden är beroende dels på hur mycket, dels på vilken typ av toxin man fått i sig. Ju mer toxin, desto kortare inkubationstid och svårare förlopp.

Sammanställer man de senaste 25 årens större utbrott av botulism får man för typ A en genomsnittlig inkubationstid på runt ett dygn, för typ B 2-3 dygn och för typ E ungefär 12 timmar. Variationen är normalt från några timmar till 5 dygn för typ A, 12 timmar till 7 dygn för typ B och 2-36 timmar (nästan alltid mindre än 24 timmar) för typ E. Från Kina anges betydligt längre inkubationstider, upp till 8 veckor för typ B. Det förefaller som om kineser i allmänhet är mer mottagliga för botulinumtoxin och då i synnerhet för typ B. Det betyder att även mycket låga toxindoser, sådana som ligger under förgiftningströskeln för andra etniska grupper, kan vara tillräckliga för att orsaka sjukdom hos kineser. Och eftersom inkubations–tiden blir allt längre ju lägre toxindoserna är, skulle detta kunna förklara de kinesiska erfarenheterna.

Symptom

De typiska symptomen på botulism börjar med ögonen: hängande ögonlock, utvidgade, ofta fixerade pupiller. Den drabbade ser suddigt och dubbelt. Muntorrhet, svårigheter att svälja och sluddrigt tal följer. Allt är en följd av muskelsvaghet som successivt drar sig nedåt för att till sist påverka hela kroppen. I de svåraste fallen blir musklerna helt förlamade vilket leder till kvävningsdöd.

Även i lättare fall kvarstår muskelsvagheten i veckor, och svårt drabbade kan behöva flera månaders intensivvård med mekanisk andningshjälp. Fullständigt tillfrisknande efter svåra fall av botulism kan ta flera år vilket har att göra med att de angripna nervcellerna förstörs.

Symptom från mag-tarmkanalen räknas inte som typiska för botulism (frånsett förstoppning som en följd av att tarmrörelserna hämmas). Ändå drabbas mer än hälften av uppkastningar eller diarré. I de större utbrotten kan man se tydliga skillnader, alltifrån nästan noll till nästan hundra procent av de insjuknade drabbas av uppkastning eller diarré. Feber förekommer inte vid botulism.

Det finns även en del andra ospecifika symptom, t ex huvudvärk och bröstsmärtor, som förekommer hos en del och sammantaget kan de ospecifika symptomen leda till att botulism feldiagnosticeras. Vanliga diagnoser är nervsjukdomar som vissa fästinginfektioner och Guillain-Barrés syndrom (se *Campylobacter*) men även stroke och psykiska sjukdomar finns ofta med bland feldiagnoserna vilket säger en del om att symptomen faktiskt kan vara ganska varierande. En olycklig kvinna remitterades av en ögonläkare till en optiker som förgäves försökte rätta till hennes synfel med glasögon. (Så småningom fick hon rätt diagnos tack vare att utbrottet också drabbade ett trettiotal andra. Hon klarade sig utan glasögon även i fortsättningen.)

I en uppföljning av över 200 botulismfall visades att 2 av 3 insjuknade fyra år senare uppfattade att de hade sämre hälsa än tidigare (jämfört med 1 av 4 i kontrollgruppen).

Dödlighet före 1960

Dödsprocenten var tidigare mycket hög. I länder med stort inslag av typ A-botulism som USA, Kanada, Ryssland och Storbritannien låg dödligheten snarare över än under 50 % under åren 1900-1960. I länder där typ E-botulism dominerade, som i Danmark, Sverige, Polen och Japan, låg dödligheten under samma period på 25 %, medan länder med huvudsakligen typ B-botulism som Tyskland, Norge och Frankrike hade förhållandevis låg dödlighet, mindre än 10 %. A, B och E stod nästan samtliga identifierade botulismfall under perioden, de enda undantagen utgjordes av två fall av typ F-botulism, ett i USA och ett i Danmark.

Dödlighet efter 1960

Idag är dödligheten i botulism mycket lägre i de industrialiserade länderna. Även för den svåraste formen, typ A-botulism, ligger den numera under 10 %. Delvis kan detta vara en följd av att fler milda fall av botulism numera upptäcks, särskilt i förbindelse med större utbrott. Men behandling med magpumpning (för att få bort eventuellt kvarvarande giftiga matrester), injektioner av antitoxin (för att neutralisera det cirkulerande toxin som ännu inte hunnit binda in till nervändarna) och mekanisk andningshjälp är de viktigaste orsakerna. Om tillförsel av antitoxin sätts i ett tidigt skede ger det ett gott skydd.

Incidens

Risken att drabbas av botulism i de industrialiserade länderna är inte stor. I Sverige kan man räkna med en årlig risk på ungefär en på trettio miljoner vilket innebär att en svensk drabbas ungefär vart tredje år. I USA är risken något högre, man räknar med att 30-40 amerikaner drabbas årligen vilket motsvarar ett fall per tio miljoner. I samband med större utbrott kan det vissa år bli det dubbla, men sällan fler. Och i övriga världen ser det ungefär likadant ut. Risken bedöms vara en på hundra miljoner i länder som saknar tradition för hemkonservering som t ex England, till en till två per miljon i länder som har en stark hemkonserveringstradition, som t ex Italien (50 fall per år) och Polen (70 fall per år).

Det finns ett anmärkningsvärt undantag. Alaskas och Kanadas urinvånare (aleuter, inuiter och indianer) löper en påtaglig risk för att drabbas av botulism, den årliga risken att hamna i den officiella statistiken är ungefär en på tiotusen, d v s tusen gånger högre än i världen i övrigt. Ca 8 % av de drabbade dör. Högst är risken för botulism bland de över 60 års ålder, en på fyratusen. Orsaken är matvanorna, och i viss mån ändrade matvanor, eftersom riskerna påtagligt har ökat med förenklade tillagningsmetoder.

Officiell statistik, ja. Hur mycket kan man lita på den? Vi vet att när det gäller andra, mildare matförgiftningar ger de officiella siffrorna i bästa fall bara en fingervisning om vilka sjukdomar som är vanligast. För varje registrerat fall kan det finnas hundratals som går spårlöst förbi eftersom den drabbade inte söker läkare, eller att läkaren ställer fel diagnos, eller att han ställer rätt diagnos men inte rapporterar sjukdomen (för flera av de livsmedelsburna sjukdomar som beskrivs i boken föreligger inte någon rapporteringsskyldighet).

För botulism har man länge trott att mörkertalet varit litet, men amerikanska undersökningar kring större sjukdomsutbrott visar att även många fall av botulism aldrig blir registrerade. Ett utbrott som drabbade 36 personer hade t ex aldrig kommit till myndigheternas kännedom om inte slumpen trätt in. Mildare fall av botulism missas helt enkelt därför att läkarna är ovana vid sjukdomen. Det förklarar också varför botulismfall som drabbar endast en person eller en familj förefaller vara allvarligare än de fall som registreras i samband med ett större utbrott. Vid de senare spårar man i efterhand upp också många mildare fall.

Botulism på cellnivå

Toxinet bildas när bakterierna förökas i livsmedlet. Toxinet behöver inte finnas inuti bakterierna för att skyddas mot magsäckens sura pH: när det frigörs från bakterierna (oftast i samband med att bakterien lyserar) ingår toxinet i ett stort proteinkomplex som är ganska stabilt mot lågt pH.

I tarmkanalen frigörs toxinet från proteinkomplexet och vandrar ut i blodbanorna varifrån det kan spridas i hela kroppen. När toxinet kommit så här långt går det snabbt: på bara ett par minuter fäster toxinet in till ett speciellt protein på nervändarna och förstör detta. Det livsviktiga signalämnet acetylkolin upphör då att förmedla elektriska impulser från nerverna till musklerna. Följden blir förlamning.

Spädbarnsbotulism och SIDS

Spädbarnsbotulism är en infektiv form av sjukdomen som drabbar barn mellan 4 och 26 veckors ålder. Barnen får med födan i sig botulinumsporer som gror ut i tarmen och bildar toxin där. Jämfört med vuxna tycks spädbarn sakna någon skyddsmekanism i tarmen som

hindrar botulinumbakterierna att tillväxa. Exakt vilken skyddsmekanism det rör sig om är inte känt.

Det mest framträdande symptomet hos barnet är en uttalad matthet: barnet rör sig knappt, kan inte kontrollera huvudrörelserna, har svag sugförmåga och sväljningsreflex och kan också få andningsproblem. Sådana symptom är ju inte särskilt specifika och många fall förblir troligen oupptäckta. Dödligheten är lägre än i matförgiftningsfallen trots att behandling med antitoxin inte har slagit väl ut vid spädbarnsbotulism. I USA, där den mesta statistiken finns, ligger dödligheten under 3 % trots att en betydande del av de mer än 2000 fall som där är kända sedan sjukdomen upptäcktes i Kalifornien 1976, orsakats av den speciellt giftiga typ A. I USA registreras sedan många år ungefär dubbelt så många fall av spädbarnsbotulism (incidensen är 20 fall per miljon födslar) som av matförgiftningsbotulism och även om siffrorna från andra länder är lägre har spädbarnsbotulism numera konstaterats i alla världsdelar och i ett 30-tal länder, däribland Sverige.

En del fall av plötslig spädbarnsdöd (*Sudden Infant Death Syndrome, SIDS*) kan möjligen också bero på *C. botulinum*. I USA har upp till 5 % av SIDS-fallen konstaterats ha botulinumtoxin i serum vilket är anmärkningsvärt eftersom botulinumtoxin i serum inte finns hos friska barn. Siffran kan dessutom i realiteten vara högre, eftersom toxinet bara kan påvisas i serum under den tidiga fasen av sjukdomen (när toxinet väl bundits till nervändarna går det inte att påvisa i blodet). Bland matförgiftningsfallen hittas det t ex i bästa fall hos var tredje drabbad. Hittills är det dock endast i USA som SIDS och botulism kopplats ihop, australiska och europeiska undersökningar har inte kunnat verifiera de amerikanska uppgifterna. Från europeiskt håll har de amerikanska uppgifterna därför ifrågasatts. Men, med tanke på att SIDS inte är en enhetlig sjukdom, utan snarare en samlingsbeteckning över flera sjukdomar, kan skillnaderna mellan undersökningarna kanske förklaras med att de avspeglar faktiska skillnader mellan de undersökta länderna.

Sårbotulism och infektiös vuxenbotulism

Sprutnarkomaner kan drabbas av en tillväxt av botulinumbakterier i djupa stick. Bakterierna bildar toxin inne i såret och symptomen är identiska med de som gäller för matförgiftning, frånsett att diarré och kräkning aldrig förekommer. Tidigare ansågs narkomanbotulism vara ovanligt, men med en utökad kontroll i England, där inga kända fall noterades före år 2000, konstateras numera minst 40 fall årligen.

Det finns också en del fall som faller under beteckningen "infektiös vuxenbotulism". Det rör sig om ett litet antal fall av botulism företrädelsevis hos människor som antingen nyligen behandlats kirurgiskt eller gått på bredspektrumantibiotika. Man har inte kunnat spåra någon orsak till dessa fall och misstanken finns att det rör sig om en infektiös form där

botulinumbakterierna tillväxer i tarmen hos vuxna som vid medicinsk behandling fått ett försämrat skydd mot bakterierna. Det finns också enstaka rapporter om infektiös botulism som drabbat friska vuxna, från Italien bl a två fall orsakade av toxin E-producerande *C. butyricum*.

Botulism hos djur

Nästan alla däggdjur och fåglar är mottagliga för botulism. Utbrott som når närmast epidemiska förlopp med hundratusentals döda djur är ganska vanliga i naturen. Särskilt känsliga tycks änder, minkar, hästar, nötboskap, får och getter vara medan däremot hundar och grisar är påtagligt resistenta. Botulism hos djur orsakas i regel av typerna C och D.

Toxiska kadaver av gnagare är en viktig orsak till botulism hos vilda djur. Även många gräsätare kan få i sig toxin från djurkadaver när de försöker tillfredsställa sitt kalcium- eller fosforbehov genom att äta benrester. Hos våra gräsätande husdjur är det dock framför allt toxiskt hö och dåligt ensilage som orsakar botulism. Larver som lever i toxiska kadaver kan innehålla mängder av toxin och sporer. Änder som äter av dem dör och fågelkadavren blir i sin tur utgångspunkten för nya toxiska larver. Det bildas en cykel av änder-larver-änder som kan döda miljontals fåglar.

På senare tid har man också uppmärksammat att de allätande måsfåglarna kan drabbas av liknande stora utbrott av botulism. I de fallen har man kopplat utbrotten till de soptippar som människorna anlägger och där förutsättningarna för tillväxt av botulinumbakterierna ofta är extremt goda. Asätare som kråkfåglar och gamar klarar sig i regel ganska bra mot botulism helt enkelt genom att de vuxna djuren har gott om antikroppar mot i princip alla toxintyperna A-F.

LIVSMEDEL: TILLVÄXT

Tabell 7.2. Fysiologiska egenskaper hos de två grupper av *C. botulinum* som orsakar matförgiftning hos människa.

Grupp	Toxintyp	Temperatur	Max. salthalt	Lägst pH	Sporresistens
I	A, B, F	11-50°C	10 %	4.7	D_{121} =0.2 min*
II	B, E, F	3-45°C	5 %	5.1	D_{80} =1-3 min*

* D-tid = den tid det tar att avdöda 90 % av sporerna.

Temperatur

Kylförvarade produkter är "nästan" säkra att äta. Detta trots att typ E och de icke-proteolytiska varianterna av typ B faktiskt kan tillväxa och bilda toxin ända ned till 3°C. Vid denna nedre temperaturgräns har man visat på toxinbildning efter 5 veckor, men förutsättningarna för bakterierna har då varit idealiska. I praktiken finns det inga säkra belägg för att botulism

någonsin inträffat för kylförvarade produkter där kylkedjan varit intakt.
Påtagliga risker kan anses uppstå då temperaturen når över 10°C för de icke-proteolytiska stammarna och över 15°C för de proteolytiska varianterna. Störst är naturligtvis risken vid optimumintervallet vilket för de proteolytiska stammarna kan sträcka sig uppåt 45°C. Mat som varmhålls vid 40°C kan bli giftig på några timmar.

Värmeresistens

Sporernas värmeresistens är som framgår av tabell 7.2 mycket varierande. Vid kokning avdödas sporer från grupp II mycket snabbt, på några sekunder, medan kokning knappast gör från eller till då det gäller de mest värmeresistenta sporerna från grupp I. För att bli av med dessa krävs i praktiken kokning vid övertryck (110-120°C).

Toxinet är däremot värmekänsligt. Det förstörs snabbt vid kokning och 6 minuter vid 80°C räknas som en helt säker värmebehandling. Typ A-toxinet är det mest resistenta, typ E det mest känsliga. Typ E-toxinet förstörs ganska snabbt redan vid 70°C.

pH

Botulinumbakterierna är ganska syrakänsliga och livsmedel med pH-värden under 4.7 är riskfria. Traditionellt fermenterade kolhydrathaltiga livsmedel som t ex filmjölk och mjölksyrajästa grönsaker är därför inte i riskzonen. Fermenterat kött och fisk, som inte innehåller några större mängder kolhydrater, får däremot inte ett naturligt pH-skydd om inte socker tillsätts. Vid ättiksinläggningar har vätskefasen ett mycket lågt pH, långt under gränsen för tillväxt. Problemet här ligger i att proteinrika livsmedel som fisk har en viss buffertkapacitet, särskilt om man använder hela filéer och låga ättikshalter. Ättiksinläggningar ska därför förvaras i kyltemperatur.

Saltning och rökning

Livsmedel måste hårdsaltas eller hårdrökas för att ge ett skydd mot botulism. Vattenaktiviteten måste ned till <0.94 för att hindra utväxt av grupp I, <0.97 för grupp II. I praktiken kan måttlig saltning och rökning faktiskt gynna konkurrensförmågan hos *C. botulinum*. Saltade och rökta produkter får lång hållbarhet vilket ger botulinumsporer en chans att gro ut och växa till om temperatur och pH tillåter det.

Syreförhållande

För att botulinumsporer ska kunna gro ut, tillväxa och bilda toxin krävs en strikt anaerob miljö. Detta är dock sällan något problem för bakterierna, det finns anaeroba skikt i praktiskt taget alla livsmedel och det oavsett förpackningstyp. Men vakuumförpackade produkter ger bakterierna en chans att också växa till på ytan av en produkt som exempelvis en rökt laxsida.

Mikrobiologisk konkurrensförmåga

Livsmedelsråvaror är säkrade för botulism. *C. botulinum* kan inte konkurrera med de normala livsmedelsförskämmande bakterierna som gör produkterna oätliga långt innan toxinbildning blir aktuell. Först då livsmedlen behandlats, antingen med värme eller med någon form av vattenaktivitetssänkande åtgärd (t ex rökning, svag saltning) kan botulinumbakterierna konkurrera.

LIVSMEDEL: PRODUKTER

Köttprodukter

Kött som produceras på moderna slakterier har mycket låg förekomst av botulinumsporer, runt 0.1 spor per kg. De flesta har väl någonstans i världen sett slaktkroppar som släpats i smutsen på väg till styckning och det är ingen vågad gissning att kött som produceras under sådana hygieniska förhållanden håller betydligt högre halter, men trots allt knappast högre än på t ex potatis och morötter.

Kött innehåller väldigt lite kolhydrater och den mjölksyra som bildas under lagring av saltad skinka eller korv är inte tillräcklig för att hämma botulinumbakterierna. Den ofta mycket långa lagringstiden ger *C. botulinum* chans att växa till även om skinkorna eller korvarna förvaras källarsvalt, alltså vid 10-12°C. På den europeiska kontinenten är hemtillverkad, torkad skinka den viktigaste orsaken till botulism. Andra hemtillverkade produkter som då och då förekommer i den europeiska statistiken är fermenterad korv samt bacon och leverpastej.

Att charkvarorna är hemtillverkade innebär inte alltid att förgiftningarna begränsas till familjen. Från sjuttiotalet och framåt har det i Frankrike förekommit ett tiotal fall som omfattat fler än 10 personer. Under samma period finns uppgifter från Schweiz, Spanien, Tjeckien och Tyskland om enstaka utbrott där 10-14 personer insjuknat. I samtliga fall har det rört sig om torkad eller rökt skinka.

Industriellt tillverkade charkprodukter är däremot mycket sällan orsak till botulism. Välkända industritillverkade torkade skinkor som *Parma, San Daniele, Serrano* eller *Pata Negra* har inte orsakat botulism, åtminstone inte i modern tid. Däremot har ett par fall orsakade av industritillverkad korv rapporterats från Tjeckoslovakien på sjuttiotalet och ett fall orsakat av värmekonserverad leverpastej beskrevs från Tyskland 1984. Inget av fallen omfattade mer än ett par personer och inga dödsfall inträffade. Och som inledningsvis nämndes, orsakade en sats fabrikstillverkad korv panik i Frankrike 2003.

I Europa är det typ B som förekommer i köttprodukter vilket inneburit att botulismfallen är förhållandevis milda och dödsfall sällsynta (färre än 1 %). I Nordamerika däremot förekommer

också många fall av den betydligt allvarligare typ A-förgiftningen och dödsfall är där vanliga. De nordamerikanska fallen rör sig nästan uteslutande om Alaskas och Kanadas urinvånare som traditionellt har grävt ned köttstycken av säl, val och bäver och låtit dem mogna under marken i ett par veckor. Det har alltid varit en riskabel hantering ur botulismsynpunkt, men den förenklade teknik som börjat praktiseras och som innebär att köttet i stället får mogna i plastpåsar som förvaras inomhus har inneburit en ytterligare ökning av en redan extremt hög botulismfrekvens.

Bussförarna i Argentina

1998 gjordes Argentinas Smittskyddsinstitut uppmärksamt på två fall av misstänkt botulism på ett sjukhus i Buenos Aires. Symtomen hos båda patienterna var hängande ögonlock, dubbelseende, svårighet med att svälja och problem med andningen. Botulinumtoxin kunde dock inte hittas i patienternas serum. Uppföljningen visade emellertid på ett samband: båda var förare i samma bussbolag. De hade visserligen inte jobbat eller ätit tillsammans men sammanträffandet var så uppseendeväckande att Smittskyddet kontaktade bussbolaget och gick ut med en pressrelease för att spåra eventuellt andra drabbade.

Ytterligare sju fall hittades. De flesta hade redan uppsökt sjukhus men fått felaktiga diagnoser som stroke, diabeteskomplikation och Guillain-Barrés syndrom (se campylobacter). Samtliga nio drabbade hade hängande ögonlock, sex hade dubbelseende och svårt att fokusera blicken, fem var svårt utmattade, fyra hade muskelsvaghet, fyra andningsproblem och fyra svårighet med att prata. Botulinumtoxin kunde bara påvisas i serum hos tre av de drabbade.

Samtliga nio visade sig köra för samma bussbolag och samtliga hörde till de 27 förare som körde morgonskiftet (ingen av förarna i eftermiddags- eller kvällsskiftet hade drabbats). Symptomen hos de nio hade debuterat under en period av nio dygn vilket visade att de hade förgiftats vid olika tidpunkter. Bussbolaget hade ett servicehus vid ändhållplatsen där förarna kunde koppla av och äta och det var uppenbarligen här som något gått snett. Inga livsmedel var kvar från den aktuella veckan men gemensamt för alla förarna var att de ätit skivor av *matambre*, ett slags jättelik kokt köttrulle (i det här fallet på fyra kg) som uppenbarligen förvarats flera veckor i kyl. Man konstaterade att kylarna i servicehuset bara höll 10°C men att det ändå troligaste var att *matambren* förmodligen redan var förgiftad när den köptes på en lokal marknad där den förvarades i ett kylskåp: andra konsumenter informerade nämligen om att *matambren* den aktuella perioden sålts mycket billigt på grund av ett långvarigt strömavbrott…

Fiskprodukter

Fisk och skaldjur har ofta botulinumsporer i sin tarmkanal och regeln är att frekvensen fisk med botulinumsporer ökar i kustnära trakter. Fisk som fångas långt ute till havs, t ex Ishavsfisk,

innehåller färre botulinumsporer. Fisk är den viktigaste orsaken till botulism i ett nordligt bälte som sträcker sig från Skandinavien över norra Ryssland och Japan till Alaska och Kanada.

Botulism i Sverige har nästan uteslutande handlat om heminlagd sill eller gravad lax. Botulism från kommersiellt tillverkade produkter har vi i stort sett varit förskonade för. Tre personer insjuknade dock 1994 efter att ha ätit rökt och vakuumpaketerad lax. Rökning i sig ger inget särskilt bra skydd mot botulism och om hållbarheten på laxen förlängs genom vakuum-förpackning får botulinumbakterierna extra tid på sig att växa till. Men trots att en del tillverkare stämplar fram bäst-före-datum onödigt långt (högst två veckor borde vara regeln) är det ingen risk för botulism så länge laxen verkligen hanterats i en obruten kylkedja. Problemet är naturligtvis att konsumenten inte har någon möjlighet att avgöra om kylkedjan varit intakt.

Kommersiellt tillverkade laxprodukter har i USA varit upphov till två större utbrott på senare tid och även i övrigt har kommersiellt tillverkade fiskprodukter orsakat en del stora utbrott. Det rör sig nästan alltid om typ E när det gäller fisk: det enda påtagliga undantaget är Norges *rakefisk* (vanligtvis öring, röding eller sik som tillverkas ungefär som vår surströmming), den vanligaste orsaken till botulism i Norge, som av någon anledning lika ofta blir giftig av typ B som av typ E.

Den egyptiska surströmmingen

Sedan faraonernas tid har egypterna tillverkat ett slags surströmming av abborrfisken multe. Saltad och ourtagen multe placeras i träkärl och lagras svalt i upp till ett, eller – för de verkliga entusiasterna – två år. Några historiska belägg för att multen orsakat botulism eller andra sjukdomar finns inte. Men 1991 blev fermenterad multe orsaken till det största kända utbrottet av botulism då minst 91 personer i Kairo drabbades av typ E-förgiftning. Trots att 18 människor dog hade hälsomyndigheterna stora problem med att utreda fallet eftersom butiksinnehavaren som sålt den giftiga fisken vägrade att samarbeta och förnekade all kännedom om försäljningen. Tillverkaren kunde aldrig spåras men en sannolik förklaring till utbrottet var att man försökt skynda på mogningen genom att höja lagringstemperaturen.

Botulism på export

Ett liknande fall av typ E-botulism 1987 drabbade åtta personer, två i USA och sex i Israel som ätit *kapchunka*, en traditionell judisk rätt av torkad och saltad, ourtagen sötvattensfisk. En person dog. Kapchunkan tillverkades i New York varefter en mindre del flygtransporterades till Israel. Typ E har egentligen ingen möjlighet att utvecklas i fiskköttet eftersom kapchunkan håller alltför hög salthalt. Däremot tar det ganska lång tid för saltet att tränga in i inälvorna och fram till att en hämmande saltkoncentration uppnås i inälvorna kan botulinumbakterierna tillväxa och göra fisken giftig. Att fallen blev flera och svårare i Israel berodde på att

kapchunkan inte kyldes under flygtransporten. Tack vare en snabb utredning kunde partiet dras bort från marknaden och man undkom därigenom ett betydligt större utbrott. En följd av just detta fall var att all tillverkning och försäljning av den här typen av produkter med ourtagna fiskar förbjöds i USA.

Vegetabilier

Sporer från jord sprids lätt till rotsaker och vegetabilier och låga halter av botulinumsporer (10 sporer per kg) finns därför naturligt på sådana livsmedel. Globalt sett är vegetabilier den vanligaste orsaken till botulism. I USA och större delen av Asien är det framför allt hemkokta vegetabilier som varit boven. Kokningen är tillräcklig för att döda de flesta konkurrerande bakterier men inte sporerna från grupp I-stammarna och om konserverna inte innehåller några konserveringsmedel och dessutom lagras i svaltemperatur (12°C) eller rentav rumstemperatur är risken för botulism överhängande.

Från sjuttiotalet och framåt har det framför allt i USA, men även i resten av den industrialiserade världen, förekommit en hel del fall av kommersiellt tillverkade vegetabilier som orsakat stora utbrott. Det är anmärkningsvärt att det även i kontinentala Europa, där förgiftningsfallen ju nästan uteslutande rör sig om hemkonserverade charkprodukter, så är det pepparfrukter, svamp, sparris, oliver och äggplanta som varit orsaken till de största utbrotten av kommersiellt tillverkade produkter. I regel är det något som gått snett med värmebehandlingen och oftast hinner man upptäcka felet och dra tillbaka konservburkarna innan någon konsument drabbats. Så skedde till exempel i Skottland 1999 då företaget Organic Valley drog tillbaka 6000 burkar med vegetarisk soppa och i USA 2002 då Old El Paso fick dra tillbaka 4000 burkar med stekta bönor. I Danmark hade man ett liknande fall 2003 då 18000 glasflaskor med hela vitlökar i chiliolja samlades in från hyllorna på Dansk Supermarked, men först då en konsument redan förgiftats. Och 2006 drabbades tre amerikaner av botulism sedan de druckit morotsjuice som distribuerades internationellt. Året därpå var det fyra amerikaner som blev sjuka av en kommersiellt producerad chilisås.

I oktober 2011 drabbades två finländare av botulism från importerade italienska oliver. En av de insjuknade dog och fallet väckte stor uppståndelse och då den italienska tillverkaren Bio-Gaudiano enbart producerade ekologiska varor drogs en del förhastade slutsatser. Ett par myndigheter menade att den ekologiska produktionen var en del av problemet eftersom man ”inte använde konserveringsmedel”. Nu behöver man inte titta särskilt noga på oliv-inläggningar för att inse att egentliga kemiska konserveringsmedel (frånsett olja/saltvatten som alla använder) inte används av de övriga producenterna heller, de behövs helt enkelt inte. Problemet här var istället att oliverna urkärnats och fyllts med mandlar och mandelolja och det är tillsatserna som oftast skapar problemen (jämför med *Yoghurten från Lancashire* nedan). Det aktuella företaget har, förutom traditionella oliver, nio olika fyllnader: en del är välkända som sardeller, vitlök, mandel och chili, andra är mer otraditionella som tranbär och, faktiskt, räkor!

Räddad av Internet

Juli 2002. Mark och Judy Barley renoverar sitt kök och äter därför middag tillsammans med sina barn ute på en lokal restaurang i den lilla staden Meaford i Kanada. Mark har jobbat med köket hela dagen utan att äta så han är rejält hungrig och beställer en jätteportion biff med bakad potatis. Det skulle bli den sista måltiden på mycket länge. På morgonen dagen därpå har Mark svårt att se, allting verkar vara ur fokus och han märker att han dessutom har svårt att tala.

Symptomen skulle kunna tyda på en lättare stroke, men Mark är en 35-årig vältränad man så det verkar inte sannolikt. Med Judys hjälp knackar han in alla sina symptom på en läkarsida på nätet och svaret kommer omedelbart och utan tvekan: botulism! Han har alltså så att säga redan diagnosen ställd när han kommer till det lokala sjukhuset och det räddar förmodligen hans liv. Läkarna tror på hans egendiagnos och han flygs omedelbart till ett stort universitetssjukhus med helt andra resurser att sätta in mot förgiftningen. Men trots den snabba behandlingen kommer han att vara nästan fullständigt förlamad i tre månader: andningen står en lungmaskin för och maten får han genom en sond. ”Han kan blinka och trycka min hand lite grand, det är allt ” säger Judy.

De övriga familjemedlemmarna hade ätit samma meny men valt pommes frites i stället för den bakade potatisen. Och både Mark och Judy hade märkt att den bakade potatisen luktade illa när kyparen kom med den. Mark hade tagit en tugga men smaken var förfärlig och han hade klagat på den och kyparen hade tagit tillbaks den. Den bakade potatisen var naturligtvis inte kvar, men potatisen hade sannolikt bakats många timmar tidigare och sedan svepts i aluminiumfolie och antingen varmhållits vid för låg temperatur eller förvarats i det sommarvarma restaurangköket.

Flera liknande fall med botulism från folieinslagen bakad potatis har inträffat i USA, i ett som omfattade 30 personer hade potatisen förvarats vid 20°C under ett dygn. Vid ugnsbakning kommer temperaturen i potatisen aldrig över 100°C och typ A-sporer överlever lätt denna värmebehandling. Genom att potatisen är folieinsvepta bibehålls en hög vattenhalt som gör att botulinumbakterier både kan gro ut och tillväxa i potatisen då den förvaras i rumstemperatur.

Dödlig gåva

I Japan handlar botulism nästan uteslutande om typ E i samband med fiskkonsumtion. Fram till 1984 hade det bara inträffat ett enda isolerat fall av typ A-botulism då landet drabbades av sitt svåraste botulismutbrott. Runtom i hela Japan började folk insjukna och det stod tidigt klart att det rörde sig om typ A. När slutsummeringen gjordes hade 36 människor förgiftats varav 11 dog.

Utbrottet spårades till en senap som var smaksatt med rötter från lotusblomman. Senapen var stekt, vakuumförpackad och såldes vid en flygplats som en slags turistsouvenir och köptes av de flesta för att ges bort som gåva. Det förklarade att senapen på kort tid kunde spridas över hela landet. I somliga regioner var det sed att äta senapen kall och det var här som botulismfallen inträffade, i de regioner där man åt senapen efter uppvärmning klarade man sig. Den troliga förklaringen är att lotusrötterna varit kontaminerade med botulinumsporer som efter stekningen kunnat gro ut i senapsblandningen. Vakuumförpackningen hade antagligen underlättat för bakterierna att föröka sig.

Het sås

Det största botulismutbrottet hittills i USA inträffade 1977 då 59 personer i Michigan drabbades av typ B-förgiftning. Eftersom det rörde sig om typ B var symptomen förhållandevis lindriga och alla kunde räddas, elva efter att ha behandlats på intensivavdelning. De drabbade hade ätit nachos med en stark jalapenopepparsås på en lokal mexikansk restaurang.

Undersökningen av Centers for Disease Control and Prevention (CDC) visade på en rad häpnadsväckande misstag som visade hur dåligt insatta i riskerna med botulism som åtminstone dessa kockar var. Jalapenon var "hemlagad", d v s konserverad i glasburkar på restaurangen genom att sänkas ned i kokande vattenbad. Efter kokningen förvarades jalapenon i rumstemperatur. Redan inom en vecka exploderade många av burkarna, framför allt återanvända glasburkar som tidigare innehållit majonnäs, jordnötssmör och liknande och alltså inte var avsedda för att tåla några större påfrestningar. De burkar som inte exploderade, sådana som var avsedda för hemkonservering, behölls trots dessa handfasta varningar.

Nachos med chilisås är ju en varmrätt, men CDC:s undersökning visade att temperaturen som mest bara var 53-60°C under en kortare tid vilket är långt ifrån tillräckligt för att inaktivera toxinet. Eftersom så många drabbats kunde man göra några allmänna iakttagelser, de som hade de lindrigaste symptomen fick symptom efter 2-3 dygns inkubationstid och av dessa drabbades bara en minoritet av diarré. De svårast insjuknade hade en inkubationstid på 24 timmar och av dessa hade tre av fyra diarré.

Trendmat som riskfaktor

Nya tider kräver nya maträtter men ibland blir kombinationerna olycksbringande. I Peoria, Illinois, förgiftades 28 personer av typ A-botulism efter att ha ätit varma smörgåsar på en restaurang. Tolv krävde intensivvård med mekanisk andningshjälp och en dog efter att ha legat 6 månader på sjukhuset.

Inledningsvis misstänktes hemkonserverad pickles eftersom denna var den enda

värmebehandlade produkt som användes i smörgåsarna. Det visade sig emellertid att det var något så osannolikt som skivad kokt lök som var boven i dramat. Löken, som var "importerad" från västra USA där typ A till skillnad från i Illinois finns i jorden, innehöll sporer som överlevde kokningen. Men lökskivorna var tunna och borde därför inte kunna erbjuda den nödvändiga anaeroba miljön och de användes inom 24 timmar. Men, över den skivade löken hälldes ett tjockt lager margarin varefter löken varmhölls vid 41°C i upptill ett dygn. Margarinet gav den nödvändiga anaeroba miljön och temperaturen var naturligtvis optimal för tillväxt av typ A.

Ett nästan oupptäckt utbrott

Det största botulismutbrottet i Kanada kunde ha förblivit oupptäckt. Hos en av två tonårssystrar som kom till sjukhus i Montreal konstaterades typ B-toxin i blodet. Systrarna hade bland annat ätit på en restaurang i Vancouver ett par dagar tidigare och en rundringning till sjukhusen där gav napp och fallet kunde rullas upp. Under en sexveckorsperiod 1985 hade 36 människor som ätit på restaurangen drabbats av milda botulismsymptom utan att utbrottet observerats. Fyra av de drabbade var i själva verket restaurangpersonal vilket, tycker man, borde ha gjort åtminstone någon misstänksam.

Vitlökssmör som bretts på smörgåsar var den gemensamma nämnaren och på restaurangen hittades kommersiellt tillverkad värmebehandlad krossad vitlök i vatten. Vitlöken hade på restaurangen förvarats 8 månader i rumstemperatur trots att produkten var en kylkonserv som inte innehöll några pH-sänkande syror eller kemiska konserveringsmedel.

Varje sandwich innehöll förmodligen mindre än ett gram vitlök och de flesta restaurang-gästerna hade bara ätit en sandwich. Eftersom det dessutom rörde sig om det – relativt sett – lindriga typ B-toxinet orsakade utbrottet inga dödsfall eller allvarligare komplikationer. Sju av de drabbade krävde dock intensivvård med mekanisk andningshjälp och här noterades etniska skillnader. Av de sju var nämligen sex av kinesisk härkomst trots att kineserna bara utgjorde 10 av de 36 drabbade. Som tidigare nämnts kan det röra sig om en specifik känslighet för just typ B, eftersom data från Kina tyder på att kineser drabbas hårdare av typ B än av typ A.

Honung har varit det livsmedel som framför andra satts i samband med spädbarnsbotulism. Honung innehåller normalt ganska få botulinumsporer, i storleksordningen 1 spor per gram d v s ungefär som för rotsaker. Tillväxt av botulinumbakterier i döda bin har lanserats som en förklaring till förhöjda halter botulinumsporer i honung, men eftersom spädbarnsbotulism är en infektiös sjukdom spelar halten kanske mindre roll. Honung har definitivt kunnat kopplas till en del fall av spädbarnsbotulism. Det uppges ibland att 30-35 % av fallen orsakats av honung men då rör det sig mer om misstankar: honung har varit det enda obehandlade livsmedel som de drabbade barnen fått i sig. Ett amerikanskt fall som inträffade i en liten by

med 800 invånare tyder på att även damm och jord kan vara riskfaktorer. Tre fall av spädbarnsbotulism inträffade under en halvårsperiod i denna by. Inget av barnen hade fått honung. Två av barnen hade använt samma vagga och från vaggan, damm i husen och från trädgårdsjorden runt husen hittades botulinumbakterier av samma typ som orsakat infektionerna. Det ska i sammanhanget tilläggas att botulinumtoxinet mycket väl kan inhaleras, den dödliga dosen vid inhalation är ungefär ett nanogram typ A-toxin per kg kroppsvikt.

I Sverige finns numera rekommendationer om att inte ge spädbarn honung, men faktum är att risken av någon anledning verkar vara betydligt lägre med just svensk honung. I en studie som omfattade skandinavisk honung hittades botulinumsporer i 26 % och 10 % av dansk respektive norsk honung, men i bara 2 % av den svenska honungen. Möjligen har det att göra med att typ B – som i huvudsak hittades i honungen – är tämligen ovanlig i Sverige.

Mejeriprodukter

Mejeriprodukter räknas normalt som säkra livsmedel när det gäller botulism. Även pastöriserad mjölk kan betraktas som en råvara eftersom värmebehandlingen är så pass mild att många olika typer av bakterier överlever. Och i råvaror har botulinumbakterierna ingen chans att konkurrera mot de snabbt växande livsmedelsförskämmande bakterierna.

I syrade produkter som ost och yoghurt är pH normalt under 4.6 vilket effektivt stoppar botulinumbakterierna. Det finns därför mycket riktigt bara ett dussin kända fall av botulism från mejeriprodukter. I flera av dessa har det varit tillsatser till mejeriprodukterna som varit en bidragande orsak som t ex i fallet med den konserverade ostsåsen som orsakade ett typ A-utbrott i USA 1993 med åtta förgiftade varav en dog. Det första fallet vi redovisar illustrerar detta. Det andra fallet däremot är exempel på att det kan gå snett även inom mejeriindustrin.

Yoghurten från Lancashire

Britterna är inte särskilt roade av hemkonservering och det är antagligen därför som botulism är mycket ovanligt i Storbritannien, det kan gå många år mellan botulismfallen. Det väckte därför enorm uppståndelse sommaren 1989 när 27 människor i Lancashire och norra Wales drabbades av botulism typ B. Tolv behövde intensivvård och en dog.

Den epidemiologiska undersökningen stötte på problem. Den enda gemensamma nämnaren var yoghurt som vid kontroll visade sig ha ett alldeles normalt, lågt pH. Och yoghurt kunde ju inte rimligen orsaka botulism. Eller?

– Det kunde den. Yoghurten var smaksatt med hasselnötspuré och det var i purén som botulinumbakterierna tillväxt. Utredarna hade det inte lätt. Purén var värmesteriliserad och det är ytterst ovanligt att helkonserver orsakar botulism, nästan lika ovanligt som att yoghurt

skulle göra det. Men utredningen visade att värmebehandlingen hade varit otillräcklig för att döda sporerna. En bidragande faktor var att man i denna sats i stället för socker, som hade hindrat tillväxten av överlevande sporer, hade sötat med aspartam.

Mascarponeost

I augusti-september 1996 insjuknade 8 personer i botulism efter att ha ätit mascarponeost, färskosten som används för desserter som tiramisù. En av de förgiftade dog. Typ A-toxin och mer än 100 000 botulinum A-sporer per gram hittades i osten och tack vare en snabb insats kunde ett parti med 100 000 kartonger på export till bl a Sverige stoppas.

Just den här typen av ost har ett förhållandesvis högt pH-värde och i den aktuella satsen var pH uppenbarligen tillräckligt högt (data har inte redovisats men har rimligtvis varit över 5.2) för att tillåta utväxt av botulinumbakterierna. Mascarponeost är en kylvara, men någonstans under distributionen hade osten förvarats vid en temperatur på över 10°C, kanske rentav vid mycket hög temperatur eftersom osten producerades i augusti, den varmaste månaden i Italien. Undersökningar på mejeriet visade att praktiskt taget all nyproducerad mascarpone var kontaminerad med botulinumsporer (i genomsnitt 4 sporer per gram) vilket gör mascarpone till en riskfaktor om såväl pH som lagringstemperatur är för höga.

Även Iran drabbades av ett liknande fall 1997 då 27 personer insjuknade och en dog av en lokalt tillverkad färskost.

VIRULENSFAKTORER

Neurotoxinen

Vid botulism är det egentligen endast neurotoxinen som räknas som virulensfaktorer. Det finns sju antigena typer av dem, A-G. Neurotoxin C kallas ibland för C1 eftersom det också finns ett C2-toxin som tidigare felaktigt troddes vara ett neurotoxin. Alla neurotoxinen fungerar på samma sätt oavsett om det rör sig om matförgiftning, spädbarnsbotulism eller sårbotulism. Toxinet blockerar överföringen av nervimpulser vid övergången mellan nerv och muskel vilket orsakar förlamning. De sju toxinen, som kemiskt sett är att betrakta som zinkproteaser, binder in mycket specifikt till sju olika synapsproteiner på nervcellsändarna och hydrolyserar dessa. Inbindningen är irreversibel och bestående nervskador blir följden även om förgiftningen överlevs. Inbindningen går inte att häva utifrån. Nervcellerna nybildas så småningom men det kan ta flera år att bli helt återställd.

Från bakteriecellen till nervcellen

Samtliga sju toxiner har en mycket likartad kemisk uppbyggnad och är variationer på ett och

samma toxin. Det är en lång peptid på 1250-1300 aminosyror med en molekylvikt på ungefär 150 kDa. Toxinet bildas vid tillväxt och frigörs då cellerna lyserar i ett större proteinkomplex på vanligtvis 900 kDa. Detta större komplex antas skydda toxinet vid passagen genom magen. Stelkrampstoxinet som produceras av en annan klostridie, har samma inbindningsmönster och binder på exakt samma ställe som B-toxinet, men är inte skyddat av något proteinkomplex. Det är kanske enda anledningen till att inte också stelkramp är en matförgiftningsorsak.

Vid det basiska pH-värde som råder i tarmkanalen frigörs toxinet ur proteinkomplexet och kan sedan vandra genom tarmepitelet ut i blodbanan där det transporteras till nervcellerna. Toxinets fulla toxicitet uppnås först då ett proteolytiskt enzym klyver en peptidbindning som gör att toxinet får en tvådelad form. Toxinets mindre del, A-delen, är på ca 50 kDa medan den större B-delen är på ca 100 kDa. Proteinaktiveringen av toxinet kan ske redan i bakteriecellen, annars sker den i tarmkanalen genom inverkan av den drabbade organismens egna proteaser, främst trypsin.

B-delen binder in till speciella proteinreceptorer och hjälper till att överföra den aktiva A-delen till nervändarna. Det är A-delen som hämmar frisläppningen av acetylkolin som fungerar som ett signalämne mellan nerv och muskel. Överförs inte acetylkolin går ingen elektrisk impuls fram till musklerna vilket betyder att musklerna förlamas. Den dödliga dosen för en människa av A-toxinet beräknas till ungefär 50 nanogram. Ett gram skulle alltså vara tillräckligt för att döda 20 miljoner människor.

C2-toxinet = enterotoxin

Vissa stammar som bildar typ C och D-toxin kan också producera ett enterotoxin som betecknas C2. Det är ungefär lika stort som botulinumtoxinet, har i likhet med detta en AB-struktur och troddes därför tidigare vara en variant av C-toxinet. Enterotoxinet har inte påträffats hos stammar som orsakar botulism hos människan och har därför ingen betydelse för den diarré som ibland uppträder vid botulism.

Genetik

Var finns egentligen toxinerna? På kromosomen eller plasmider? Och hur många av toxinerna kan induceras av bakteriofager? Här går åsikterna isär. Säkerställt är att G-toxinet hör hemma på en 114 kb (76 MDa) plasmid och att C1, D, E och F-toxinen är kromosombundna. En del forskare menar att A-toxinet och kanske också B-toxinet är plasmidkodade. Andra menar att samtliga toxiner A-F finns på kromosomen. Säkerställt är också att C1- och D-toxinen induceras av en bakteriofag. Samt att A, B och G inte gör det. Huruvida E och F-toxinerna (som ju även finns hos stammar av *C. baratii* och *C. butyricum*) induceras av bakteriofager eller inte är omdiskuterat.

PÅVISNING

Toxintestning

Vid utbrott av botulism är det i första hand toxinen man letar efter. Standardmetoden sedan massor av år har varit att testa det misstänkta livsmedlet på möss. Om mössen dör görs neutralisationstester, d v s prover av livsmedlet behandlas med antitoxin före test på möss. Även marsvin kan användas för toxintestningen. Fördelen med metoden är att den är känslig, den kan detektera runt 5-10 pikogram toxin. Nackdelarna är dels etikfrågan om djurförsök överhuvudtaget, dels att testet är långsamt, det tar ungefär 6 dygn.

Immunologiska metoder för att påvisa toxinen har funnits i över 30 år, men de har dragits med en del problem. Grundproblemet har varit att de immunologiska metoderna måste uppnå samma detektionsnivå som djurförsöken vilket betyder att antingen måste toxinet anrikas eller så måste den immunologiska reaktionen på något sätt förstärkas. Det har försvårat utvecklingen av kommersiella immunokits och för närvarande finns få på marknaden. Ett EIA (*enzyme immuno assay*) från Elcatech Inc ger inom 5 timmar svar på om A, B eller F-toxin finns närvarande i ett prov eller i en kultur.

Antitoxin är lättare att få tag på, det finns att tillgå från flera tillverkare. Med dessa kan känsliga immunologiska metoder sättas upp, en Elisa-teknik som publicerades 2010 hade en detektionsnivå på 40 pikogram toxin (jämfört med mustestets 5 pikogram).

Även mass-spektrografi-baserade metoder med förmåga att skilja mellan toxinerna har beskrivit av vilka en (”Endo-pep MS”, publicerad 2011) anges ha en detektionsnivå på mindre än 5 pikogram.

Kommersiella kits för molekylärgenetisk toxinpåvisning har tidigare funnits på marknaden men de kits som fanns 2001 verkar ha försvunnit ur marknaden. En anledning kan vara att toxindetektion efter den 11 september 2001 fått en annan dimension: för tillfället är det *snabb* påvisning av toxinet som gäller. Flera tillverkare från vapenindustrin har lanserat molekylärgenetiska sonder som ska visa om det finns toxin eller inte i miljön. De fungerar för screening av terrorhot men är inte några fullgoda alternativ för kvantitativ bestämning av toxinen. PCR-metoder för påvisning av toxingenerna har funnits länge, men eftersom dessa inte visar om det finns toxin eller inte i produkten, har de haft en begränsad betydelse.

Isolering av bakterien

I samband med botulismfall försöker man isolera den ansvariga botulinumstammen, men det är inte alltid så lätt. Det finns inget bra selektivt medium för botulinumbakterierna och man är därför hänvisad till att försöka isolera bakterierna på i stort sett icke-selektiva medier. Det

skapar naturligtvis problem om botulinumbakterierna bara utgör en minoritet i livsmedlets mikroflora. Tillvägagångssättet varierar, men ska man maximera sina chanser att hitta stammen får man leta längs flera vägar.

Värmebehandling

Ett prov av livsmedlet värmebehandlas 70-80°C under 10-20 minuter medan ett annat prov testas utan värmebehandling. Värmebehandlingen förutsätter att det finns sporer och ibland kan även en mild värmebehandling knäcka stammar som tillhör grupp II. Fördelen är att man slipper alla vegetativa celler.

Anrikning

Ett anrikningssteg av det obehandlade eller värmebehandlade livsmedlet hör till rutinen. Ett prov av livsmedlet anrikas anaerobt vid 30°C under ca 5 dygn i t ex cooked meat- eller brain heart infusion-buljong.

Järnsulfitagar

Livsmedelsproverna testas på järnsulfitagar. Alla klostrider reducerar sulfit och järnsulfitagar är kommersiellt tillgängligt från många tillverkare. En vanlig komposition är (gram per liter): tryptos 15, soyton 5, jästextrakt 5, dinatriumdisulfit 1, järnammoniumcitrat 1 och agar 20. Sulfiten reduceras av klostrider till sulfid som reagerar med järnet och fälls ut som en svart metallsulfid.

C. botulinum ger svarta kolonier på järnsulfitagar och så gör de flesta klostridier, men metallsulfider kan vara lite besvärliga under olika redoxförhållanden och en del klostridier, däribland *C. butyricum*, ger oftast vita kolonier ("negativt" resultat) trots att de faktiskt reducerar sulfiten.

Mediet inkuberas anaerobt vid 30°C upp till ca 3 dygn. Om man vet att det rör sig om psykrotoleranta bakterier kan man gärna inkubera vid rumstemperatur i stället. Man måste dagligen kontrollera järnsulfitagar eftersom en del klostridier kan bilda svarta kolonier som svärtar hela plattan och gör den oläslig inom loppet av en dag. Mediet är ganska selektivt för klostridier. Svarta kolonier överförs till ägguleagar (eventuellt blodagar).

Ägguleagar

Ett vanligt steg i försöken att isolera *C. botulinum* är att testa misstänkta kolonier (eller att direkttesta livsmedlet) på ägguleagar. *C. botulinum* är lipolytisk och ger kolonier med utfällningar på detta substrat. Ett rikt standardmedium kompletterat med 5-10 % äggula (som finns kommersiellt tillhandahållet för bakteriologiska ändamål) ger bra resultat. Noteras bör att typ G inte är lipolytisk.

Blodagar

Anaerobt inkuberad blodagar (5 % oxblod) har många förespråkare. Antingen testar man livsmedlen direkt på blodagar eller så överför man kolonier från t ex järnsulfitagar till blodagarn. Blodagar är ett utmärkt medium för *C. botulinum* men *C. botulinum*-stammar har inte något "typiskt" utseende. Att det är så populärt har nog mera historiska orsaker: före Gas Pac-systemens tid var anaerobodling besvärlig och blodagar ger en låg redoxpotential som underlättar anaerobodling. Blodagar kan däremot med fördel användas som renstrykningssubstrat.

Identifiering

Om man följt alla varianterna ovan sitter man nu antagligen med en hel provkarta av lipolytiska kolonier som isolerats från livsmedlet. Det enda sättet att identifiera dem är att testa om de bildar toxin. De inkuberas därför anaerobt i cooked meat-buljong eller liknande i ca en vecka varefter ett prov av buljongen toxintestas, förslagsvis med någon immunologisk metod.

Traditionell biokemisk identifiering är svår att utföra eftersom det inte alltid går att skilja *C. botulinum* från andra klostrider, speciellt besvärligt är det att skilja grupp I från arten *C. sporogenes*. Immunologiska och molekylärgenetiska metoder för att påvisa toxinen respektive toxingenerna finns beskrivna.

Typning

Epidemiologisk typning av *C. botulinum* vid utbrott har sällan använts. En orsak är att det finns betydande restriktioner vid arbete med *C. botulinum*. En annan är att man tidigare funnit det tillräckligt att konstatera att det funnits t ex en typ A-stam både hos de drabbade och i det misstänkta livsmedlet. Men det finns fall där samma toxintyp isolerats från fler än ett livsmedel och i de fallen skulle en typningsmetod ha varit till stor hjälp. I dagsläget kan man dessutom påstå att det finns ett direkt behov av en bra typningsmetod för att kunna spåra infektionskällorna till spädbarnsbotulism eftersom det i dessa fall inte ens är säkert att det är livsmedel som utgör den största risken.

AFLP har visat sig användbart och PFGE har som vanligt har gett de bästa resultaten. I en större europeisk studie (”Biotracer”) har nyligen (2011) en real-time PCR-metod för detektion och typning av toxinen i livsmedel föreslagits som ny internationell standard.

Clostridium perfringens

— Storkökens fasa —

ÖVERSIKT

Clostridium perfringens har bakterievärldens mest explosiva tillväxt. Den har klockats för generationstider nedåt 7 minuter så det är inte förvånande att perfringensenterit är en vanlig orsak till "matförgiftning". I de flesta industriländer rankas sjukdomen på tredje eller fjärde plats i statistiken över livsmedelsburna enteriter.

Bakterien är framför allt storhushållens skräck. Bakteriernas sporer är värmeresistenta och överlever kokning. Vid långsam nedkylning av stora partier kött får bakterien flera timmar på sig att tillväxa i det kritiska intervallet 30-50°C. Giftet bildas inne i bakterien och frigörs först när bakterien sporulerar i tarmen. Enteriten är förhållandevis godartad och klingar i regel av inom ett dygn.

Perfringensenterit misstänktes så tidigt som 1895 men det var först på 1940-talet som sambandet mellan bakterierna och enteriten fastslogs. Den relativt milda form som är så vanlig i industrialiserade länder kallas typ A-enterit, men det finns också en nekrotisk typ C-form med blodiga diarréer och vävnadsdöd som framför allt drabbar barn i tredje världen. Dödligheten i denna nekrotiska enterit är mycket hög.

De stammar som är farliga förekommer nästan uteslutande som husflora i storhushållens eller restaurangernas kök. Däremot finns de nästan aldrig i livsmedel eller i privata kök. Orsaken är att högst en av tiotusen miljöstammar bär på enterotoxingenen i sin kromosom. Ungefär en av hundra har anlag för enterotoxinproduktion, men hos miljöstammarna finns generna nästan alltid på en plasmid och sådana stammar är sällan farliga, de producerar för litet toxin. Men, om en sådan stam ständigt utsätts för värmebehandling kommer den att överföra generna från plasmiden till kromosomen (generna för toxinproduktion är nämligen kopplade till sporuleringsförmåga). Och det är normalt först då som den blir farlig. Det betyder också att det egentligen inte är i livsmedlet som man ska leta efter bakterierna, utan i stället i själva restaurangköket. Det är därifrån den farliga husfloran sprids till livsmedlen.

C. perfringens orsakar också flera olika typer av dödliga enteriter hos våra husdjur. En del har varit kända sedan länge, andra som hos hästar och griskultingar orsakas av stammar som producerar det ganska nyligen upptäckta beta-2-toxinet.

BAKTERIEN

C. perfringens är en anaerob och sporbildande bakterie som skiljer sig från flertalet andra klostridier genom att den är orörlig. Bakterien brukar beskrivas som förhållandevis syretolerant vilket bl a gör den lättodlad. Syretoleransen hänger samman med att bakterien under sin snabba tillväxt utvecklar enorma mängder koldioxid och vätgas. Har den bara någorlunda förutsättningar ser bakterien alltså till att bilda sin egen anaeroba miljö.

C. perfringens delas in i fem "typer" som fått bokstavsbeteckningarna A-E. Det är produktionen av de fyra toxinen alfa, beta, epsilon och iota som är grunden för indelningen vilken framgår av Tabell 8.1. Endast stammar i Typ A, C och D kan producera enterotoxin och i praktiken är det bara typ A-stammar som orsakar livsmedelsförgiftningar.

Tabell 8.1. Indelning av *Clostridium perfringens* i typerna A-E.

	Producerade toxiner			
Typ	Alfa	Beta	Epsilon	Iota
A	+	–	–	–
B	+	+	+	–
C	+	+	–	–
D	+	–	+	–
E	+	–	–	+

De fem typerna av C. perfringens

Till skillnad från *C. botulinum* är *C. perfringens* en någorlunda homogen art. Indelningen som man får av att påvisa de fyra toxinerna har visat sig stabil, man hittar nästan aldrig stammar med avvikande mönster som att t ex en producent av iota-toxin också producerar beta- eller epsilontoxin.

Typ A

Mer än 95 % av perfringensstammarna räknas till typ A. Det är nu inte så märkligt eftersom typ A ju omfattar alla stammar som *inte* producerar något av de tre (tämligen ovanliga) toxinen beta, epsilon eller gamma. Det betyder också att typ A-stammar sinsemellan inte behöver vara särskilt lika.

Typ A är den enda som orsakar den klassiska perfringensenteriten hos människan, trots att enterotoxinproduktion även kan förekomma hos stammar i typerna C och D. Det är endast ca 1 % av stammarna i typ A som producerar enterotoxin.

Typ A är en vanlig orsak till enteriter också hos djur. Det förefaller som om olika stammar har olika värddjur. Djurstammar av typ A är inte farliga för människan. En del stammar bildar det

så kallade beta-2-toxinet (som inte har med beta-toxinet att göra!) som ger dödliga enteriter hos framför allt hästar och griskultingar.

Typ B

Typ B är ganska ovanlig. Den orsakar mycket svåra, inte sällan dödliga, enteriter hos ungdjur. Dessa smittas ofta av vuxna, immuna djur. Såväl beta- som epsilontoxinet kan vara inblandade vid sjukdomarna. Typ B producerar inte enterotoxin.

Typ C

Typ C är ganska vanlig och hittas särskilt ofta hos grisar. Den orsakar många dödliga enteriter bland djur till följd av att stammarna bildar betatoxin. Samma stammar kan hos människan orsaka den fruktade, men ovanliga nekrotiska enteriten. En del av stammarna bildar även enterotoxin.

Typ D

Typ D är ganska vanlig hos får och getter, men ses annars sällan. Lamm är särskilt utsatta för typ D och det är epsilontoxinet som orsakar de svåra, ofta dödliga enteriterna. Också bland typ D kan en del stammar bilda enterotoxin.

Typ E

Den ovanligaste av de typer som isoleras från djur är typ E. Dess spridning är dåligt känd, men den kan orsaka enteriter hos bl a kalvar och lamm. Sjukdomarna orsakas av iotatoxinet. Praktiskt taget alla stammar av typ E bär på generna för enterotoxin, men de uttrycks inte och därför produceras inte heller något enterotoxin.

Förekomst i naturen

Alla stammar av *C. perfringens* hör hemma i tarmkanalen där de kan förekomma i mycket höga halter utan orsaka sjukdom. Praktiskt taget alla däggdjur och fåglar härbärgerar någon perfringensstam och det verkar som om dessa stammar är värdspecifika. Halten perfringens i människans avföring ligger normalt inom intervallet 1000 – 100 000 per gram. Ännu högre halter – upp till flera miljoner per gram – ses ibland särskilt hos äldre människor. Från avföring sprids bakterierna till jord och vatten där de i sporform kan överleva i nästan obegränsad tid. De stammar som orsakar perfringensenterit hos människan förefaller för det mesta vara speciella varianter som endast utvecklas under trycket av upprepade värmebehandlingar.

SJUKDOMEN

Perfringens-enterit

Den vanliga perfringensenteriten orsakas av enterotoxinbildande stammar av *C. perfringens* typ A. Djur- och miljöstammar bär toxingenen på en episom (en plasmid som kan infogas i kromosomen) medan stammar som orsakar utbrott av enteriter hos människan däremot i regel har den på kromosomen. De farliga stammarna verkar alltså ha en speciell nisch och denna verkar faktiskt vara restaurang- och storköken. Enterotoxinet är kopplat till sporbildning och då en stam upprepade gånger utsätts för värmebehandling gynnas sporbildning och toxingenen överförs så att säga på köpet från plasmiden till kromosomen. Och om det enbart är storköksstammar som är riskabla är det naturligtvis också meningslöst att leta efter något speciellt livsmedel som ”orsakat” ett utbrott: livsmedlet är i så fall bara en vektor för spridning av de stammar som redan finns i storköket. Den viktigaste åtgärden blir därför att sanera köket från den aktuella stammen.

Det bör dock påpekas att det finns undantag, en del utbrott har orsakats av stammar som har enterotoxingenen på plasmiden. Det rör sig snarare om kvantitativa än kvalitativa skillnader: det är förvisso svårare att uppnå en kritisk toxinhalt om generna finns på plasmiden, men omöjligt är det inte.

Infektionsdos

Infektionsdosen är mycket hög, man räknar med att man måste sätta i sig uppåt 100 miljoner bakterier för att bli sjuk. Livsmedel som innehåller färre än 100 000 *C. perfringens* per gram innebär därför knappast någon risk.

Inkubationstid

Diarrén bryter vanligtvis ut 8-15 timmar efter att man ätit det smittade livsmedlet. Som vanligt finns stora individuella skillnader och allt ifrån drygt en timme till ett par dygn har beskrivits.

Symptom

En kraftig vattnig diarré av närmast explosiv karaktär och intensiva buksmärtor är de främsta symptomen. Illamående och huvudvärk kan ibland förekomma, medan uppkastningar och feber får betraktas som ovanligt även om de rapporteras då och då. Sjukdomen klingar normalt av inom 24 timmar och leder ytterst sällan till några bestående men. Ändå ska man inte helt nonchalera den. Eftersom storköksmat oftast är boven i dramat är sjukhusavdelningar och äldreboende automatiskt i riskzonen och för de mycket sjuka eller mycket gamla kan även en perfringensenterit vara riskabel. Inte sällan drabbas dessa utsatta grupper dessutom för en ganska långvarig diarré.

Incidens

För storhushållsmat ligger perfringensenterit som en mycket tydlig tvåa i statistiken i Europa och USA, strax efter salmonella och långt före andra bakterier. I amerikanska fängelser står perfringensenteriter för en tredjedel av de klarlagda utbrotten och samma nivå har observerats i undersökningar på engelska äldreboenden. För sporadiska enteriter, alltså sådana som drabbar det enskilda hushållet, har *C. perfringens* däremot troligen ingen större betydelse. Det bör rimligen vara mycket få privata hem som löper risk att dra på sig en specialanpassad köksstam.

Perfringensenterit på cellnivå

När *C. perfringens* typ A når tunntarmen sporulerar de och stora mängder av det sporbundna enterotoxinet frigörs. Enterotoxinet attackerar sedan tarmcellerna, förmodligen på två sätt. Det kan fästa till speciella receptorer på cellmembranen och bildar med dessa ett porformigt proteinkomplex genom vilket cellvätskan läcker ut. Detta räcker i och för sig för att förklara diarrén men kanske behövs också ett ytterligare steg för att diarrén ska bli så explosiv som den ofta är. Detta andra steg skulle i så fall vara att enterotoxinet fäster in och förstör strukturen hos de barriärproteiner som finns i utrymmena mellan cellerna och som har till uppgift att förhindra vätskeläckage.

Nekrotisk enterit

Den nekrotiska enteriten, som också kallats tarmbrand eller *pig-bel*, orsakas av typ C. Sjukdomen förekommer nästan enbart hos kroniskt undernärda människor som abrupt ökar sitt intag av protein, oftast genom att äta griskött i vilket typ C är ganska vanlig.

Infektionsdos

I likhet med vanlig perfringensenterit krävs massor med bakterier för att orsaka sjukdom, men vid den nekrotiska enteriten är tarmens trypsinhalt egentligen viktigare än infektionsdosen. Ju lägre trypsinhalt, desto större risk. Låg trypsinhalt orsakas av svält eller av en kost baserad på vegetabilier som innehåller antitrypsiner (sojabönor, sötpotatis, jordnötter med mera). Människor med normal trypsinhalt drabbas inte av sjukdomen hur många typ C-bakterier de än får i sig.

Inkubationstid

Det finns ingen riktigt bra statistik, men inkubationstiden i beskrivna fall varierar från några timmar till flera dygn.

Symptom

Den nekrotiska enteriten kännetecknas av blodiga diarréer, mycket svåra buksmärtor och feber. Obehandlad leder sjukdomen till döden i ungefär hälften av fallen. Behandling, som innebär kirurgi och insättande av antitoxin, sänker dödligheten till 20 %.

Incidens

Den nekrotiska diarrén förekommer bland svältande befolkningar i framför allt Asien och har också rapporterats från Afrika. I Papua Nya Guinea, som varit särskilt utsatt, har mass-vaccination mot betatoxinet drastiskt sänkt sjukdomens utbredning. Idag följer sjukdomen ofta krigshärdarna: där svälten är svår och långvarig är det särskilt barnen som drabbas. I Europa rapporterades flera fall under 1940-talet, men idag är sjukdomen extremt ovanlig i industrivärlden. Som fallet med *Vegetarianen i Oxford* visar, är sjukdomen numera i stället förknippad med mycket speciella kostsituationer.

Nekrotisk diarré på cellnivå

Förloppet vid nekrotisk diarré är ofullständigt känt. Om betatoxinet lyckas klara sig undan klyvning av tarmens trypsiner kan det fästa och bilda porer i tarmcellernas membraner. Genom porerna läcker cellvätska ut vilket resulterar i diarré. Så småningom dör de angripna cellerna och sjukdomens svåra förlopp kan ha att göra med att väldigt många celltyper är känsliga för toxinet, symptom kan härledas från såväl inre organ som från nervceller.

Andra perfringensinfektioner hos människan

Gasbrand

Gasbrand är en följd av en djupt liggande infektion där muskelvävnaden angrips och bryts ned av vissa anaeroba bakterier under våldsam gasutveckling. *C. perfringens* är den vanligaste orsaken till gasbrand och till följd av bakteriens oerhört snabba tillväxt kan en angripen kroppsdel förvandlas till en svartnande, gasfylld massa på några timmar. På 1800-talet var sjukdomen närmast hundraprocentigt dödlig. Även idag är det svårt att hinna behandla gasbrand orsakad av *C. perfringens* annat än med kirurgi, trots intensivvård med massor av antibiotika kan bakterien hinna med att förstöra muskelvävnad med en hastighet av ungefär en dm i timmen och minst 20 % av dagens insjuknade dör av organkollaps. I fredstid är sjukdomen ovanlig i industriländer men i krig ökar gasbrand dramatiskt som en följd av infekterade skottskador.

Plötslig spädbarnsdöd

I en uppmärksammad amerikansk undersökning i början av nittiotalet påvisades perfringens enterotoxin (CPE) i avföringen hos en tredjedel av de barn som dött i plötslig spädbarnsdöd, medan CPE inte förekom alls hos en frisk kontrollgrupp. Sedan dess har bakteriella toxiner som orsak till plötslig spädbarnsdöd tonats ned något, men CPE utgör definitivt – tillsammans med en del toxiner från kolibakterier och stafylokocker – en av de viktigaste bakteriella orsakerna till plötslig spädbarnsdöd.

Antibiotika-relaterad diarré

Sporadisk diarré, som *inte* är kopplad till livsmedel, är vanlig på sjukhusen. Perfringensstammar som bildar enterotoxin har visats stå för ungefär 10 % av diarréerna, inklusive sådana som är knutna till användningen av antibiotika och som annars mest förknippats med *Clostridium difficile*. Intressant är att dessa diarréer, till skillnad från livsmedelsburna enteriter, kopplas till stammar som bär genen för enterotoxin på plasmider. Ett par uppgifter tyder på att stammar som producerar beta-2-toxinet kan vara inblandade vid sporadisk diarré.

Dödliga enteriter hos djur

Det är välkänt att *C. perfringens* är en mycket vanlig orsak till dödliga enteriter hos ungdjur av bland annat nötboskap, gris, får, getter och hästar. Det rör sig då om stammar som producerar de letala toxinerna beta, epsilon eller iota, d v s typerna B-E. Det har varit betydligt svårare att knyta typ A till specifika sjukdomar eftersom även helt friska djur har en eller flera stammar av typ A i tarmkanalen. Först genom upptäckten av beta-2-toxinet har typ A kunnat kopplas till svåra enteriter hos hästar och smågris. Även hos kalvar misstänks beta-2 vara en viktig dödsorsak.

LIVSMEDEL: TILLVÄXT

Temperatur

Temperaturen är nyckeln för att kontrollera bakteriens tillväxt. Den enda nyckeln skulle man kunna tillägga, det finns ingen annan patogen som är så beroende av en optimal temperatur. Tillväxt kan ske inom temperaturintervallet 12-50°C. I livsmedel är det dock sällsynt att *C. perfringens* tillväxer vid temperaturer under 20°C. Även vid rumstemperatur är bakteriens tillväxt ganska långsam men med stigande temperatur ökar tillväxtkurvan sedan mycket brant. Intervallet 30-50°C är det mest riskabla och högst tillväxthastighet nås vid 43-47°C. En undersökning gör gällande att stammar som bär enterotoxingenen på kromosomen tolererar högre temperaturer vid tillväxt än andra stammar.

Värmeresistens

Sporerna hos *C. perfringens* har mycket varierande värmeresistens, men de stammar som förekommer vid utbrott av enterit klarar i regel kokning under flera timmar. Värmeresistensen hos toxinet är däremot negligerbar. Redan vid 53°C börjar toxinet sönderfalla och vid 60°C går nedbrytningen snabbt.

Syre

C. perfringens är visserligen en anaerob bakterie, men den tolererar små mängder syre. I praktiken kan man bortse från syrets inverkan eftersom bakterierna bara tillväxer i värmebehandlade livsmedel och i sådana drivs syrgasen ut i tillräcklig omfattning av värmebehandlingen.

pH

C. perfringens är ganska pH-känslig, den nedre gränsen för tillväxt är 5.0. Fermenterade produkter är därför säkra produkter.

Saltning och rökning

Charkuteriprodukter är praktiskt taget aldrig inblandade vid perfringensenterit. Detta har tagits som intäkt för att de kombinationer av tillväxthämmande effekter en charkprodukt utsätts för (saltning, rökning, nitritbehandling, viss torkning) sammantaget räcker för att stoppa bakteriens tillväxt. Uppfattningen är ganska utbredd, men en enklare förklaring är att charkprodukter ju faktiskt inte befinner sig i den riskabla temperaturzonen någon längre tid. Och som framgår av *St Patricks Day* kan även ett ordentligt saltat kött ställa till med problem om det hanteras felaktigt.

Mikrobiologisk konkurrensförmåga

I råvaror har *C. perfringens* ingen chans att konkurrera med livsmedelsförskämmare. I likhet med andra sporbildande patogener får bakterien sin chans först efter en värmebehandling av livsmedlet som följs av alltför långsam avsvalning. Men får den då sin chans i ett proteinrikt livsmedel i temperaturintervallet 30-50°C kommer den genom sin enorma tillväxthastighet garanterat att konkurrera ut alla andra bakterier.

LIVSMEDEL: PRODUKTER

C. perfringens förkommer nästan överallt i naturen och alla livsmedel kan innehålla små mängder av bakterien (<100 per gram) utan att det betraktas som anmärkningsvärt. Högst är frekvensen i köttprodukter eftersom bakterierna förekommer i höga halter i tarmkanalen hos slaktdjuren. Men också i vegetabilier och mejeriprodukter kan *C. perfringens* hittas. Samtidigt kan man ju ifrågasätta värdet av att leta *C. perfringens* i livsmedel då det bara är någon enstaka procent av stammarna som producerar enterotoxin, och dessa dessutom ytterst sällan bär toxingenen på kromosomen.

Kött

Kött står för över 80 % av de stora utbrotten av perfringensenteriter. Ofta är det kött som tillagas som hela köttdetaljer, t ex rostbiff, kokt skinka eller oxstek, som är inblandade. Hela

köttstycken är svåra att kyla effektivt och om de inte äts direkt efter tillagningen får *C. perfringens* tid att växa till sig under avsvalningen. Även kött som varmhålls vid för låg temperatur är en vanlig enteritorsak. I Sverige domineras statistiken över utbrott av grytor av fläsk, nötkött och kyckling. Ägg är däremot riskfritt att äta.

Corned beef på St Patricks Day: ett typfall

Den sjuttonde mars firas den irländska nationaldagen, St Patricks-dagen, i USA traditionellt med att äta *corned beef*, ett kraftigt saltat och kokt nötkött. På St Patricks Day 1993 inträffade två likartade matförgiftningsutbrott, ett i Virginia och ett i Ohio. I Virginia spårades 85 insjuknade, i Ohio 156. I Virginia hade köttstycken på 5 kg ugnsbakats och kylts för att dagen därpå skivas och värmas upp. I Ohio hade köttstyckena kokats i tre timmar, fått svalna i rumstemperatur varefter de lagrats i kyl. Flera dagar senare hade köttet skivats och varmhållits vid 49°C (!).

Symptomen hos de drabbade var diarré och buksmärtor samt hos ungefär var tionde även uppkastningar. Den genomsnittliga inkubationstiden i de båda utbrotten var 9 respektive 12 timmar med en variation på mellan två timmar och två dygn. De flesta var symptomfria efter ett dygn medan några förblev sjuka upp till fyra dygn. En person behövde sjukhusvård.

Symptomen och det misstänkta livsmedlet pekade på *C. perfringens* och de rester av corned beef som kunde undersökas visade halter på mer än 10^5 *C. perfringens* per gram. I Virginia isolerades samma serotyp från corned beef som från avföringen hos de drabbade, medan den misstänkta stammen i Ohio inte kunde serotypas. Köttet hade levererats från flera håll både i Virginia- och Ohio-utbrottet. Bakterierna hade därför högst sannolikt tillförts köttet i de båda köken. Alltför långsam nedkylning bedömdes vara huvudorsaken till utbrotten och för låg varmhållnings-temperatur i delikatessbutiken i Ohio-fallet bidrog till detta utbrotts omfattning.

Fabriken som slog igen

I Connecticut fick en fabrik tillfälligt stängas då hälften av dess 1400 anställda drabbades av matförgiftning. Alla drabbade hade ätit på personalmatsalen under olika tider på dygnet och ett ovanligt mönster växte fram: dagskiftet drabbades hårdare än nattskiftet och de som kom först till matsalen både på dagen, kvällen och natten var mer utsatta än eftersläntrarna.

Matsalen serverade fyra huvudrätter och den undersökningsgrupp som kallades in försökte först spåra den misstänkta rätten. Det lyckades inte, ingen av rätterna kunde korreleras med utbrottet. Folk hade blivit sjuka vilken rätt de än hade ätit. Personalmatsalar i allmänhet är ju inte direkt kända för någon framträdande matlagningskultur. Och det gällde i synnerhet för denna personalmatsal konstaterade undersökarna. För enkelhets skull serverades nämligen samma sås till alla rätter...

Det visade sig vara såsen som var orsaken. Den var gjord på en konserverad såsbas som blandades med kycklingsoppa. Sjuttio liter sås kokades varefter den fick avsvalna 5-6 timmar i rumstemperatur för att sen placeras i kylrum. Nära nog perfekta förutsättningar för perfringenstillväxt. Inkubationstiden vid utbrottet var i genomsnitt 11 timmar. De dominerande symptomen var diarré (88 %), gasbildning (76 %) och buksmärtor (75 %), medan 33 % drabbades av huvudvärk, 11 % av feber och 5 % av uppkastningar. Symptomen tydde på *C. perfringens* som också kunde isoleras i höga halter (mer än 10^5 per gram) från avföringen hos personalen. Det ovanliga mönstret med att dagpersonalen drabbades hårdare än nattskiftet fick också sin förklaring. Såsen återuppvärmdes under betydligt kortare tid för dagskiftet. Och de som var hungrigast och stod först i kön, fick naturligtvis den med allra kortast värmebehandling.

Två bröllop och en…cateringfirma

I juli 2009 larmades Londons Smittskydd till ett stort bröllop där deltagarna började insjukna ett par timmar efter att de ätit en buffé. Några timmar senare var det dags igen i en annan del av London. Ytterligare ett bröllop och ytterligare en buffé. Från samma cateringfirma visade det sig…

Även om man hade svårt att isolera *C. perfringens* från något livsmedel så stod det klart att det var två currybaserade rätter som låg bakom de båda utbrotten, lamm *Karahi* och kyckling *Jeera*. Totalt drabbades 93 bröllopsgäster. Den genomsnittliga inkubationstiden var 10 timmar med en spridning från 1 till 22 timmar. Varaktigheten var 2 dygn i genomsnitt, spridning 1-10 dygn. Symptomen var diarré (hos 95 %), buksmärtor 90 %, illamående 50 %, huvudvärk 40 % samt uppkastningar respektive feber hos vardera 20 %.

Fisk och skaldjur

Kokt lax på bufébordet har gett upphov till flera stora utbrott av perfringensenterit. Om laxen koks hel och avsvalningen går för långsamt hinner *C. perfringens* växa till. Men utöver kokt lax så utgör fisk- och skaldjur sällan någon risk. Dåligt avsvalnad kokt tonfisk har någon enstaka gång förekommit i statistiken och fiskgrytor och fisksoppor som varmhållits vid för låg temperatur förekommer då och då som orsak till utbrott. Men totalt sett utgör fisk och skaldjur en ganska säker produktgrupp.

Mejeriprodukter

Mejeriprodukter är närmast helsäkrade mot perfringensenterit. En viktig orsak är naturligtvis att mejeriprodukter sällan hamnar i det kritiska temperaturintervallet. Vispad grädde kan i och

för sig temperaturmisshandlas, men *C. perfringens* behöver massor av aminosyror för att tillväxa och det kan grädden inte tillgodose så den klarar sig på det. Och ost med sitt låga pH-värde är givetvis helt säkert.

Vegetabilier

Proteinrika vegetabilier som ärter, linser och bönor är den näst vanligaste orsaken till perfringensutbrott. En anledning är att rätter som exempelvis ärtsoppa på restaurang görs i mycket stora satser och att avsvalningen då kan bli bristfällig. Men också varmhållning vid för låg temperatur är en vanlig orsak till utbrott orsakade av vegetariska rätter.

Vid den nekrotiska diarrén är antitrypsiner i livsmedel som sojabönor, sötpotatis, vattenkastanjer och jordnötter en viktig faktor. Antitrypsinerna hämmar trypsinets förmåga att oskadliggöra betatoxinet.

Ärtsoppan i Tierp

Den 12 februari 2002 får skolbarnen i Tierp välja på risgröt och ärtsoppa till lunch. De allra flesta väljer risgröten och köket får massor med ärtsoppa över. Den kyls och förvaras i kylrum fram till torsdagen då den värms upp på morgonen och transporteras i värmeskåp med bil till fem äldreboende och en långvårdsklinik där den serveras som lunch. På två av hemmen insjuknar ingen, men i de övriga fyra drabbas 90 % – ett sjuttiotal personer – av häftig diarré och i en del fall också uppkastningar. Fyra av de insjuknade avlider. Tierpsfallet visar att även en så beskedlig matförgiftning som perfringensenterit kan få katastrofala konsekvenser om den drabbar de redan sjuka, tre av de avlidna hade mycket svåra sjukdomar. Tierpsfallet visar också den enorma betydelsen av någon enstaka timme vid felaktig förvaringstemperatur: de två kliniker som klarade sig oskadda från förgiftningen var de som låg först i transportkedjan.

Den husmor som vid Centralköket ansvarade för ärtsoppan åtalades, men friades. Det lite märkliga var att åtalet i första hand gällde om husmor hade kylt ärtsoppan i fel lokaler, i ett renseri. Diskussionen gällde för åklagare som för försvar om ”jordbakterier” från renseriet hade orsakat utbrottet. Domstolens ogillande av åtalet är enligt vår mening helt rimlig, men av fel orsaker. Varken åklagare eller försvar hade experter med tillräcklig kunskap för att smula sönder det befängda åtalet: eventuella *C. perfringens* från jord hade givetvis ingen betydelse eftersom det var husfloran i Centralköket som (i kombination med långsam nedkylning och varmhållning vid för låg temperatur under transporten) orsakat utbrottet. Det finns inga uppgifter om att Tierps Centralkök har sanerats efter utbrottet. Förmodligen har kunskaperna om husflorans betydelse fortfarande inte nått fram.

Vegetarianen i Oxford

Ett av de mycket få fallen av nekrotisk perfringensdiarré i Europa inträffade 1996 i England. Den drabbade var en idrottskvinna och vegetarian som inför ett kanotmästerskap under tre månader hade laddat med kolhydratdiet och levt på pasta och sötpotatis. Efter tävlingen hade hon däremot satt i sig en jätteportion med fisk, sojabönor och jordnötter.

Kvinnan lyckades göra det mesta fel. Hennes långa kolhydratdiet minskade trypsinhalten i tarmen och sötpotatisen med sina antitrypsiner gjorde sitt till. Därefter festar hon med massor av proteiner (förutsättningen för att bakterierna ska växa till) och som inte det var nog med det, så sätter hon dessutom i sig sojabönor och jordnötter, som båda innehåller massor med antitrypsiner.

Om det var fisken eller sojabönorna som var smittkällan fick man aldrig möjlighet att undersöka, men båda kandidaterna duger så det kan kvitta. En sak man kan ta till sig är i alla fall att inte överdriva kolhydratladdningen. Kvinnan överlevde efter operation.

Vatten

Vatten i alla sina former är helt säkert att konsumera, perfringens är inte vattenburen.

VIRULENSFAKTORER

C. perfringens är en veritabel giftfabrik från vilken det finns uppåt 20 toxiner beskrivna. Sju av dem har en mer eller mindre klarlagd betydelse för bakteriens förmåga att orsaka sjukdom. Flera av dessa kan orsaka skador på celler i tarmkanalen med påföljande enterit, men hos människan är det bara enterotoxinet (CPE) och betatoxinet som kan orsaka diarré. De övriga toxinerna kan ge diarré hos djur, framför allt ungdjur.

C. perfringens enterotoxin = CPE

CPE är ett protein på 35 kDa som bildas i samband med sporulering vilket sker spontant när bakterierna når tarmkanalen. CPE har ingen känd analog hos andra bakterier och förefaller vara ett helt unikt enterotoxin. Vid sporulering utgör CPE upp till 20 % av bakteriens torrvikt. CPE kan också bildas i livsmedel men eftersom bakterierna sporulerar dåligt i livsmedel blir halterna låga och CPE anses därför inte ge upphov till den klassiska formen av matförgiftning med färdigbildat toxin i maten.

CPE produceras bara av en liten andel av stammarna, de flesta undersökningar från livsmedel pekar mot en frekvens runt eller under en procent. Och då ska det observeras att merparten av dessa bär genen på en plasmid och sådana stammar är som tidigare nämnts mycket sällan

inblandade vid enteriter. Andelen stammar med kromosomburet CPE är därför försvinnande låg utanför storkökens och restaurangernas domäner.

CPE verkar på celler i praktiskt taget hela tunntarmen, men har störst effekt på cellerna i den nedre delen, ileum. Det har länge varit känt att CPE kan fästa till speciella receptorer på epitelcellernas membran och bilda porer som släpper ut cellvätskan. Nyare uppgifter visar att CPE också binder in till en grupp av membranproteiner, claudinerna. Claudinerna har en viktig barriärfunktion för att förhindra vätskeläckage i utrymmena mellan cellerna (de så kallade *tight junctions*) och barriären skadas genom att CPE förändrar claudinernas struktur. Möjligtvis finns ytterligare, ännu okända, komplikationer eftersom stamcellsforskningen har visat att claudinerna inte bara har betydelse som barriär utan också inverkar på celltillväxt och celldifferentiering.

Alfatoxin = fosfolipas C

De flesta fosfolipaser är vare sig celltoxiska eller hemolytiska men fosfolipaset hos *C. perfringens* är det. Det går också under beteckningen alfatoxin och det är ett protein på 43 kDa som bildas av nästan alla stammar. Alfatoxinet binder till fosfolipider på cellmembraner och klyver dem enzymatiskt med celldöd som följd. Hos eukaryota celler är det fosfatidylkolin och sfingomyelin som attackeras av alfatoxinet. Generna för alfatoxinet finns på kromosomen.

Betatoxin

Det nekrotiska betatoxinet är ett protein på 35 kDa med uppenbart celltoxiska effekter: det är huvudorsaken till de dödliga perfringensenteriter som ofta drabbar kycklingar samt ungdjur av svin, nötkreatur, får och getter. Det anses verka genom att bilda porer i mottagliga celler men mycket är oklart när det gäller betatoxinet. Hos ungdjur är inte bara tarmceller utan också hudceller mottagliga och med tanke på att toxinet inte sällan ger upphov till neurologiska symptom så kan förmodligen listan på mottagliga celler göras lång.

Den hos människan ovanliga nekrotiska perfringensenteriten orsakas också av betatoxinet och likheterna mellan denna och de dödliga nekrotiska enteriterna hos djuren är uppenbar. Betatoxinet är mycket känsligt för trypsin (det proteolytiska enzym som människor har i tarmkanalen) och inaktiveras snabbt av detta. Toxinet finns endast hos stammar av typerna B och C och generna för det sitter på en plasmid.

Beta-2-toxin

Trots namnet har det här toxinet inget att göra med betatoxinet. Det fick beteckningen eftersom det första gången upptäcktes hos en betaproducerande stam, men det visade sig senare att det nästan undantagslöst bara produceras av stammar i typ A. Ungefär hälften av A-stammarna förefaller bära på genen för toxinet, men skillnaderna är stora mellan olika miljöer. Stammar som isoleras från grisar och hästar har mycket ofta beta-2-genen, liksom stammar som bär

enterotoxingenen på plasmider medan däremot stammar som bär genen på kromosomen sällan har beta-2-genen. Samtidigt så kompliceras bilden av att det endast verkar vara en minoritet av de stammar som har kapacitet att bilda toxinet som verkligen gör det.

Beta-2 är ett nekrotiskt toxin på 28 kDa som dödar mottagliga celler framför allt i tarmen men även hudcellerna hos djuren kan skadas. Beta-2 har visats vara en viktig orsak till dödliga enteriter hos hästar och grisar. Även hos kalvar misstänks beta-2 vara en viktig dödsorsak. Hos människan kan beta-2 möjligen ha ett samband med de sporadiska diarréer som förekommer på sjukhusen. Generna för toxinet finns på en plasmid.

På senare tid har man också konstaterat att det finns åtminstone två varianter av toxinet, B2h1 och B2h2, och att B2h1 bedöms som ungefär 10 gånger så toxiskt som B2h2.

NetB-toxin (necrotic enteritis B-like toxin)
Hos vissa stammar bildas ett nekrotiserande, porbildande toxin som ganska nyligen isolerats från kycklingar som drabbats av nekrotisk enterit.

Epsilontoxin

Epsilontoxinet är ett protein på 31 kDa vars gen är beläget på en plasmid hos stammar av typ D. Det är ett nekrotiskt porbildande toxin som dödar mottagliga celler. I sjukdomsbilden hos ungdjur av getter finns förutom enterit också kraftiga njurskador. Det finns strukturella likheter mellan epsilontoxinet och aerolysinet hos *Aeromonas hydrophila*.

Iotatoxin

Iotatoxinet är ett nekrotiskt dubbelprotein som finns på en plasmid hos stammar av typ E. Det ger bland annat skador på hudceller. Den mindre delen på 48 kDa, iota-a, är det aktiva toxinet som hör till klassen aktin-ADP-ribosylerande toxiner vilka förhindrar uppbyggnaden av aktin. Den större delen, iota-b, är på 72 kDa och svarar för dubbelproteinets inbindning till mottagliga celler. Som för flera andra perfringenstoxin finns numera uppgifter om att även iotatoxinet är porbildande.

Thetatoxin = Perfringolysin O

Thetatoxinet är ett hemolysin på 54 kDa som bildar porer i cellmembran som innehåller kolesterol. Det produceras av praktiskt taget alla stammar och är tillsammans med alfatoxinet orsaken till de svåra symptomen vid gasgangrän. Generna för thetatoxinet finns på kromosomen.

PÅVISNING

Det vanligaste referensmediet är TSC (tryptos sulfit cykloserinagar). Basmediet innehåller (gram per liter) tryptos 15, sojapepton 5, köttextrakt 5, jästextrakt 5, natriummetabisulfit 1, järnammoniumcitrat 1, agar 20. Till en liter basmedium tillsätts 80 ml 0.5 % sterilfiltrerad cykloserin D-lösning i vatten. Eventuellt kan även ägguleemulsion (5 % i slutkoncentration) tillsättas.

Provet djupodlas på TSC som inkuberas anaerobt (vätgas plus koldioxid) 35-37°C 18-24 timmar. *Clostridium perfringens* bildar 1-3 mm svarta kolonier i mediet. Färgen beror på att sulfiten i mediet reduceras till sulfid som fälls ut som svart järnsulfid. Ytodling kan användas men tenderar att ge kolonier som mycket snabbt sprider sig och svärtar hela agarytan. Distinkta ytkolonier är i regel endast svarta i centrum medan koloniernas rand är vit.

Om TSC med äggula används, omges de svarta kolonierna av en 2-4 mm vit precipitationszon som orsakas av att äggulan hydrolyserats av alfatoxinet. Tyvärr gör äggulan ofta avläsningen svårare. Dessutom finns ett tiotal perfringensutbrott beskrivna av stammar som inte producerar alfatoxin.

Biokemisk konfirmering

TSC tillåter utväxt av flera klostridiearter och konfirmering av misstänkta kolonier är därför nödvändig om man ska kunna ange analyssvaret som *C. perfringens*. Det finns en rad olika metoder som man kan använda för detta. Utsättning till laktos-gelatinagar och motility-nitratmedium är en vanlig strategi. *C. perfringens* producerar syra från laktos, reducerar nitrat och hydrolyserar gelatin samt är orörlig i dessa tester.

Den så kallade Nagler-reaktionen används i många länder. Den innebär att ena halvan av en ägguleplatta behandlas med antitoxin mot alfa-toxinet. I den del som inte behandlats bildar *Clostridium perfringens* en kraftig precipitationszon längs utstryket genom alfatoxinets hydrolys av äggulan. I den del som behandlats med antitoxin tillväxer bakterien normalt men precipitationszonen uteblir. Som redan noterats förekommer det dock att matförgiftande stammar inte bildar alfatoxin.

Dubbelhemolys på hästblodagar är också karakteristiskt för *C. perfringens*. På hästblodagar omges kolonier av *C. perfringens* närmast av en kraftig betahemolys och utanför denna finns en mera diffus hemolyszon (som för övrigt kan göras helt klar om man placerar blodplattorna några timmar i kylen, så kallad "*hot-cold hemolysis*"). Den kraftiga hemolysen orsakas av thetatoxinet, den diffusa av alfatoxinet så samma inskränkning som gäller Nagler-reaktionen gäller naturligtvis även här.

Immunologisk påvisning

Eftersom bara kanske en procent av stammarna producerar CPE bör påvisningen inriktas på dessa. CPE kan spåras med en immunologisk RPLA-metod som finns kommersiellt tillgänglig från Oxoid. Det finns dock ett problem med metoden: många perfringensstammar sporulerar inte särskilt villigt i laboratoriemedier och kan man inte få stammen att sporulera hittar man heller inget CPE eftersom enterotoxinet produceras under sporuleringen. Sen kan man tillägga att det ju egentligen är stammar som har CPE-genen på kromosomen som man helst bör leta efter och var genen sitter ger metoden ingen information om.

Alfa-, beta-, epsilon- och iota-toxinerna är mest av veterinärmedicinskt intresse och för dessa har seroneutralisation på möss länge varit standardmetoden. De går dock numera lätt att påvisa toxingenerna med hjälp av PCR-teknik.

Molekylärgenetisk påvisning

Såväl bakterien som generna för toxinproduktion kan påvisas med PCR-metoder. Numera kan PCR också användas för att visa om generna är plasmid- eller kromosombundna.

Epidemiologi

Serologiska scheman användes ganska mycket under 70- och 80-talen men en betydande del av stammarna, runt 20-30 %, var inte typbara med den uppsättning antisera som användes. Serologin verkar ha spelat ut sin roll idag. Något större behov av molekylärbiologiska typningsmetoder för *C. perfringens* vid utbrott har inte funnits, endast några enstaka PFGE-studier har utförts. Däremot har den genetiska variationen hos stammar från olika djur eller andra miljöer ofta undersökts. Och eftersom stammarna av C. perfringens förefaller ha påtagligt stor genetisk variation har alla typningsmetoder fungerat bra: ribotypning, AFLP, PCR-tekniker, MLVA (*Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis*) och – givetvis – PFGE.

Cyanobakterier

– De blommande bakterierna –

ÖVERSIKT

Cyanobakterier – eller blågröna alger som de alltför ofta kallas – har fått miljöpolitisk betydelse till följd av de "algblomningar" som allt oftare slår till i vår omgivning. Det är övergödningen, alltså utsläpp av närsalter till sjöar och kustnära hav, som lett till massiva blomningar. Cyanobakterierna frodas i övergödda vatten, bildar massor av biomassa och när de dör räcker syret inte till för att bryta ned dem. Följden blir vad massmedierna brukar rubricera som "döda havsbottnar".

Merparten av blomningarna är dessutom giftiga därför att många cyanobakterier bildar toxiner, förmodligen som en strategi för att förgifta de alger som konkurrerar om födan. Det finns ganska gott om fall där nötkreatur och hundar dött av att sätta i sig cyanobakterier. Ofta har de då inte bara druckit vattnet utan också ätit av det skum som bildas vid blomningen och som innehåller enorma kvantiteter cyanobakterier. Djuren äter gärna skummet och det verkar faktiskt som om de gillar de toxiska sorterna allra bäst. De äter bokstavligen tills de dör.

Cyanotoxiner är också farliga för människor. Mest toxiska är de livshotande nervgifterna, framför allt saxitoxin, men förgiftningar är lyckligtvis sällsynta. Betydligt vanligare är att cyanobakterier producerar levergifter som microcystin och om råvatten tas från blommande ytvattentäkter kan giftet ibland spåras i dricksvattnet även om det klorerats. Halterna är dock låga och anses av de flesta bedömare inte kunna ge upphov till akuta förgiftningar. Vad den långsiktiga effekten kan vara av låga halter är mera omdiskuterat, gifterna misstänks orsaka levercancer.

Under 2005 grävdes en gammal surdeg upp av amerikanska och svenska forskare. Den neurotoxiska ”aminosyran” BMAA, som enligt en gammal teori orsakar demenssjukdomar som ALS och Alzheimers, producerades nämligen av i stort sett alla cyanobakterier. Givetvis var stoffet minst sagt brännbart och pressen tävlade i att hitta säljande vinklar på nyheten. De svenska forskarna lanserade 2010 teorin att BMAA dessutom bioackumulerades i fiskar och musslor. Och eftersom vi bevisligen äter fisk men oftast inte cyanobakterier skapades nya rubriker. De uppmätta halterna i fisk är dock så låga att kritiker till teorin inte låter sig imponeras.

BAKTERIERNA

Cyanobakterierna är gramnegativer vars främsta utmärkande egenskap är en syrgasalstrande fotosyntes. Cyanobakterier har existerat i ungefär 2.5 miljarder år och att det finns syrgas i atmosfären är deras förtjänst. Cyanobakteriernas fotosyntetiska maskineri övertogs av eukaryoterna för någon miljard år sedan och finns nu hos såväl alger som gröna växter.

Eftersom cyanobakterierna tidigare uppfattades som alger vilar indelningen sedan gammalt på morfologisk grund och omfattar idag ett femtiotal släkten av vilka ett dussintal innehåller arter som kan bilda toxiner. Genetisk kartläggning påbörjades ovanligt sent men har hunnit visa att många av de nuvarande släktena måste ombildas. En hel del nya släkten och namn är alltså att vänta.

Utvecklingsmässigt utgör cyanobakterierna en alldeles egen grupp inom bakterierna men denna ligger väl inbäddad bland de övriga gramnegativa bakterierna. Cyanobakterierna är alltså inte någon slags mellanform mellan bakterier och alger som det ibland hävdas.

I miljödebatten kan det förefalla tämligen likgiltigt vad man kallar dem men så är det faktiskt inte. Att minska kväveutsläppen är en god tanke av flera skäl men påverkar i det här sammanhanget i huvudsak *äkta* algblomning eftersom det är algerna som begränsas av kväve. De flesta cyanobakterier kan däremot – i likhet med många andra bakterier – fixera kvävet direkt från luften och för "bakterieblomning" är det därför *fosforutsläppen* som måste kontrolleras. Flertalet cyanobakterier hör hemma i söt- och brackvatten men det finns även marina former som helt och hållet lever i oceanerna.

Cyanobakterier föder kolera?

Kolerabakteriens egentliga nisch har länge varit en gåta, men omkring 1990 började man misstänka att bakterien mellan sjukdomsutbrotten överlevde i en icke-odlingsbar form inuti cyanobakterier. Misstanken har stärkts under åren och i en studie visades att kolerabakterien kunde överleva och föröka sig i åtminstone 2 år i skydd av en cyanobakteries hölje. Den oväntade koleraepidemin i Peru på nittiotalet har också tillskrivits kolerabakterier som förts till landet i en cyanobakterieblomning.

SJUKDOMARNA

Skaldjursförgiftning är den sammanfattande termen för fyra olika förgiftningar: förlamande, spastisk, diarréframkallande respektive amnesisk skaldjursförgiftning. Ursprungligen trodde man att det var skaldjuren själva som bildade gifterna, sedan upptäcktes att gifterna härrörde från dinoflagellater (en form av encelliga plankton) inuti skaldjuren. Och idag tror en del forskare att de verkliga giftproducenterna är marina heterotrofa bakterier inuti dinoflagellaterna! Att dessa bakterier kan bidra till giftproduktionen är säkerställt men om de

verkligen behövs är däremot omdiskuterat. En del av svårigheten är att finna analysmetoder som visar vad som verkligen sker inuti dinoflagellaterna.

Viktigare för detta kapitel är att cyanobakterier – helt på egen hand – kan ge upphov till såväl den förlamande som den spastiska formen av skaldjursförgiftning genom produktion av nervgifterna saxitoxin och anatoxin. Dessutom har levergifterna microcystin och nodularin som produceras av många cyanobakterier samma biologiska verkan som ses vid den diarréframkallande skaldjursförgiftningen. I sällsynta fall kan cyanobakterier också ge en infektionssjukdom som kännetecknas av en långvarig diarré.

1. Förlamande skaldjursförgiftning (PSP): saxitoxin

Den förlamande skaldjursförgiftningen (*Paralytic Shellfish Poisoning* = PSP), har varit känd sedan 1700-talet. Orsaken är nervgiftet saxitoxin som bildas av vissa dinoflagellater samt av cyanobakterier inom släktena *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Lyngbya*, *Planktothrix*, *Raphidiopsis* och *Scytonema*. Det är framför allt musslor som blir giftiga då de lever i vatten med höga halter toxiska dinoflagellater eller cyanobakterier. Molluskerna ackumulerar då stora mängder av giftet, saxitoxin.

Inkubationstiden är kort, typiskt mellan en halv och två timmar och sällan överstigande 12 timmar. Regeln är att ju kortare inkubationstid desto svårare förgiftning. De första symptomen är domningskänslor vid munnen, till följd av en lokal verkan av toxinet, som sedan sprider sig till ansiktet och nacken. Därefter påverkas armar och ben och känseln i fingrar och tår förloras. Yrsel är vanligt och blodtrycket stiger ofta kraftigt samtidigt som pulsen ökar. Illamående och uppkastningar kan förekomma. Vid höga toxinhalter förlamas muskulaturen och andningsstillestånd kan inträffa. Normalt klingar förgiftningen av snabbt och de flesta drabbade är besvärsfria inom 12 timmar även om muskelbesvär kan sitta i uppåt en vecka vid svåra förgiftningar.

Dödligheten beräknas till 1-2 % i länder där man kan få snabb läkarvård med mekanisk andningshjälp. I utvecklingsländer kan dödligheten vara högre, i ett utbrott som drabbade nära 200 personer i Guatemala dog 7 % av de vuxna och 50 % av barnen.

Incidensen är låg, högst ett 50-tal utbrott rapporteras globalt per år. Men förgiftningarna är svåra att diagnosticera och framför allt i utvecklingsländerna är mörkertalet stort. Förgiftningen är fruktad och alla industriländer försöker numera kontrollera den genom skördeförbud av mollusker i samband med blomningar av framför allt alger. I Sverige är tidsbegränsade skördeförbud för blåmusslor ganska vanliga i Skagerrak.

Det måste poängteras att dinoflagellater är den helt dominerande orsaken till PSP. Ett skäl är att toxiska cyanobakterier är vanligast i sötvatten medan ätliga musslor mestadels hämtas från

havet. Å andra sidan är det ingen som vet hur ofta marina cyanobakterier orsakar PSP, det finns helt enkelt inga epidemiologiska undersökningar på området.

2. Spastisk skaldjursförgiftning (NSP): anatoxin

Den spastiska skaldjursförgiftningen (*NSP = neurotoxic shellfish poisoning*) kan ha extremt kort inkubationstid, ned till 5 minuter har rapporterats. De flesta insjuknar inom två timmar men variationen är betydande och några utvecklar symptom först efter 24 timmar. Variationen beror troligtvis på att flera olika toxiner kan vara inblandade vid NSP. Symptomen omfattar inledningsvis domningskänslor i läppar, tunga och hals samt yrsel och en omväxlande känsla av värme och frossa. Därefter följder magsmärtor, diarré, uppkastning och mer eller mindre svåra muskelkramper. Även vid NSP kan andningsstillestånd bli följden men som regel är NSP mycket lindrigare än PSP. De förgiftade återhämtar sig inom något dygn utan några komplikationer. Liksom vid PSP är konsumtion av musslor och ostron den vanligaste orsaken till NSP.

Det är dinoflagellaternas *brevetoxin* som är den vanligaste orsaken till NSP. Cyanobakteriernas NSP-gifter kallas anatoxiner och om dessa vet man att de kan orsaka massdöd hos fiskstim. De är också kända för dödliga förgiftningar hos boskap, hundar och vilda djur. Däremot finns det inga säkra belägg för att anatoxiner också dödat människor. Anatoxiner har hittats inom släktena *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Hydrocoleum*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Planktothrix* och *Trichodesmium*.

3. Andra neurotoxiner

Saxitoxin och anatoxin är vanligast hos cyanobakterier som lever i söt- och brackvatten. Det finns saltvattensformer som producerar dem, men saltvattensformerna producerar kanske oftare andra neurotoxiner vars verkan och betydelse är mera okänd. Bland dessa neurotoxiner finns antillatoxin och kalkitoxin.

Ciguateratoxin orsakar ”ciguatera fiskförgiftning”, en mycket svår förgiftningsform som människan kan drabbas av genom att äta fiskar som lever i tropiska vatten. Toxinet produceras av dinoflagellater men bioackumuleras i fiskar och når högst halter hos till barracudor, havsabborrar och andra rovfiskar högst upp i näringskedjan. Toxinet har nyligen (2010) också hittats hos marina cyanobakterier inom släktet *Trichodesmium*. Just detta släkte, som är en vanlig global orsak till cyanobakterieblomningar i näringsrika sjöar, verkar vara en riktig giftfabrik: det producerar massor av cytotoxiner, däribland en klororganisk förening, trichotoxin.

4. BMAA och demenssjukdomar

I ingressen nämndes att en internationell forskargrupp kommit fram till att praktiskt taget alla undersökta cyanobakterier producerade BMAA (Beta-Metyl-Amino-Alanin). BMAA är en

modifierad aminosyra som sedan sextiotalet misstänkts vara ett nervgift. Anledningen till att BMAA överhuvudtaget diskuterats som en möjlig orsak till demenssjukdomar är en teori som lanserades på 1960-talet. Man kände sedan artonhundratalet till att delar av befolkningen i Guam uppvisade en extremt hög förekomst av den dödliga demenssjukdomen ALS (amytrofisk lateral skleros). Sjukdomen kopplades på sextiotalet till ett mjöl som tillverkades av den giftiga kottepalmens fröer och som användes som stapelvara av befolkningen. Halten BMAA i kottepalmens mjöl var dock så låg att många forskare ifrågasatte teorin. Paul Cox, som är förstanamn på artikeln om cyanobakterierna och BMAA, hade tidigare lanserat en annan teori som återuppväckte intresset för BMMA, nämligen att det var konsumtionen av flygande hundar som var den egentliga orsaken till intaget av BMAA. Tanken var att de flygande hundarna, som livnärde sig på kottepalmernas frön, och i sin tur åts av befolkningen, tog upp BMAA som substitut för alanin i sitt protein och att BMAA således anrikades hos de flygande hundarna.

Cox och medarbetare hittade också BMAA i hjärnan hos personer som dött av ALS i Guam samt hos kanadensare som dött av Alzheimer. Att BMAA bildades i palmernas frön kopplades nu för övrigt också till förekomsten av cyanobakterier hos träden, en upptäckt som banade väg för den artikel som publicerades 2005 och som hittade BMAA hos i stort sett alla cyanobakterier. De redovisade halterna var inledningsvis uppseendeväckande höga (tusentals mikrogram per gram cyanobakterier) men kritiker menade att dessa undersökningar led av stora metodfel, och att det inte var BMAA man fick fram i de kromatografiska analyserna.

Att kottepalmens frön är neurotoxiska står helt klart, men frågan kompliceras av att palmens egentliga och unika neurotoxiska ämne faktiskt är ett annat, cykasin. Halterna av BMAA i hjärnor hos människor som avlidit av ALS eller Alzheimers skiljer sig kraftigt åt mellan olika forskargrupper, en del hittar inget, andra hittar mycket. Uppenbarligen finns ett metodfel hos endera gruppen. Så frågan är lika omdebatterad idag som under tidigare decennier. Vi ställer oss mycket tveksamma till att cyanobakterier skulle vara en viktig anledning till demenssjukdomar. De halter som noterades från mjölet hos kottepalmer var något eller några tiotal mikrogram BMAA per gram mjöl, medan undersökningar efter 2008 (däribland den svenska forskargruppens) noterar halter på mindre än 0.1 mikrogram per gram hos cyanobakterier. Även i de uppgifter från 2010 där BMAA upptäckts hos en del fiskarter fångade på västkusten i Sverige, är halterna under 0.1 mikrogram per gram fiskkött.

I en jämförande metodundersökning på prover av cyanobakterier, publicerad 2012, konstaterades att HPLC/FLD (*High Performance Liquid Chromatography with Postcolumn Fluorescence Derivatization*) gav felaktigt höga värden för BMAA (det är med denna metod en del forskare observerat halter på ibland flera tusen mikrogram/gram cyanobakterier). Med LC-MS/MS (*Liquid Chromatography with tandem Mass Spectrometry*) på samma prover kunde BMAA endast hittas i den positiva kontrollen och med denna mera selektiva analysteknik har BMAA

tidigare bara hittats i nanogramnivåer per gram cyanobakterier, alltså nästan en miljon gånger lägre halter än med HPLC/FLD.

5. Hepatotoxiner = levertoxiner

De gifter man oftast förknippar med cyanobakterier är levertoxiner. Det vanligaste är mikrocystin men också det närbesläktade giftet nodularin förekommer ofta. Levertoxiner produceras av stammar inom många släkten: hittills har de hittats inom *Anabaena, Anabaenopsis, Aphanizomenon, Cylindrospermopsis, Hapalosiphon, Microcystis, Nodularia, Nostoc, Oscillatoria* och *Planktothrix*. Eftersom taxonomin för cyanobakterierna vilar på ålderdomliga grunder kommer åtskilliga nya släktnamn att tillfogas i den nära framtiden.

Mikrocystin och nodularin är specialiserade på leverceller och gifterna ansamlas snabbt i levern när de kommit in i kroppen. Det är levergifterna och då framför allt mikrocystin som är den främsta orsaken till massdöd hos boskap, hundar och vilda djur i samband med cyanobakterieblomning. Särskilt utsatta för förgiftningarna är sjöfåglar som änder.

Hos människor har diarré, feber, aptitlöshet, illamående och kräkning rapporterats och i svårare fall (badare som fått i sig kallsupar) har gulsotsliknande symptom och mer eller mindre kraftig påverkan av lever och njure konstaterats. Inkubationstiden varierar från några timmar till ett par dygn. Vad som händer när stora mängder av giftet kommer direkt in i blodsystemet framgår av fallbeskrivningen *Dialyskatastrofen i Brasilien*.

Cyanobakterier antas inte spela någon roll för uppkomsten av diarré-skaldjursförgiftning (DSP) som är en mycket vanlig form av mild skaldjursförgiftning. Den orsakas av okadasyra och DSP kännetecknas av diarré, illamående, uppkastningar och frossa. Men cyanobakteriernas levergifter har faktiskt samma biologiska effekt som dinoflagellaternas okadasyra så kanske är cyanobakterierna inte helt oskyldiga här heller.

6. Cytotoxiner

Utöver neuro- och hepatotoxiner kan en del cyanobakterier också producera mer generellt verkande cytotoxiner. Ett sådant är cylindrospermopsin som finns hos sötvattensformer inom släktena *Anabaena, Aphanizomenon, Cylindrospermopsis, Raphidiopsis och Umezaki*a. Cylindrospermopsin är giftigt för flera typer av celler, däribland lever- och njurceller. Det är känt för att orsaka dödliga förgiftningar hos boskap och har kopplats till ett åtminstone ett utbrott hos människor, *Mysteriet på Palm Island*. Tidigare har cylindrospermopsin ansetts begränsat till tropiska länder, men för några år sedan hittades toxinet också i Finland.

För saltvattensformer är bland annat lyngbyabellin och hektoklorin beskrivna, men dessa är förmodligen bara toppen på isberget. Deras effekt och betydelse är bristfälligt kända men de är cytotoxiner med bland annat kraftig effekt på hudceller. Det finns fall där simmare i tropiska

vatten bokstavligt talat fått huden avskalad efter alltför nära kontakt med cyanobakterier som bildat dessa gifter.

7. Infektioner = Cyanobacterial-like bodies = CLB

Fynd i tarmkanalen av cyanobakterieliknande organismer (CLB) har gjorts vid flera utbrott av långvarig diarré. Bakterierna har inte kunnat identifieras men det rör sig uppenbarligen om en form som kan växa heterotroft i tarmen (vissa cyanobakterier har förmågan till heterotrof växt i mörker). Inkubationstiden är lite oklar eftersom man inte kunnat klarlägga infektionskällorna, men i ett fall insjuknade turister i Nepal 2-11 dygn efter ankomsten till landet. Bakterierna har bara i ett fall hittats utanför patienterna och då på en grönsallat som de drabbade åt 2 dygn före insjuknandet.

Symptomen inleds med illamående och en lätt feber och följs därefter en mycket långvarig, vattnig diarré. I två stora utbrott som registrerats bland turister och infödda i Nepal pågick diarrén under i genomsnitt 43 dygn med en spridning på 4-103 dygn. Utöver diarré hörde trötthet, aptitlöshet och ibland också kräkning till symptomen. Vid ett utbrott i USA noterades en mycket kortare varaktighet, i genomsnitt 4 dygn, men flera patienter fick återfall inom en fyraveckorsperiod.

LIVSMEDEL

Tillväxt i livsmedel är begränsat till vatten. För optimal tillväxt krävs en temperatur på 25°C, tillgång till fosfor (och för några arter även kvävesalter) samt massor av ljus.

Kött

Kött och ägg är ingen riskfaktor i länder med slaktkontroll. Den enda – och högst teoretiska! – risken utgörs av levern hos nötkreatur eller får som ätit skum från blomningar av cyanobakterier och då förgiftats av levertoxiner.

Fisk och skaldjur

Musslor och ostron är den helt dominerande orsaken till den dödliga skaldjursförgiftningen, PSP. Giftet ackumuleras i molluskernas inre organ och eftersom djuren äts hela får man i sig hela giftmängden. Det kan i värsta fall röra sig om halter på uppåt ett gram saxitoxin per kg kött vilket kan jämföras med gränsvärdet på 0.8 mg per kg kött som de flesta länder numera infört. Det saknar betydelse om molluskerna äts råa eller kokta eftersom saxitoxin överlever kokning. Giftet kan också förekomma i krabba och hummer, men då mest i de delar som motsvarar vår lever och njure och som normalt inte äts. I kött och rom är toxinhalten mycket lägre. Inte heller fisk som livnär sig på musslor utgör någon större risk, halten toxin i köttet blir sällan särskilt hög.

Cyanobakterier, som har sin huvudsakliga nisch i söt- och brackvatten, är sällan inblandade vid utbrott av PSP eller NSP. Sötvattenskräftor kan innehålla såväl anatoxiner som saxitoxiner när de levt i cyanobakterierika vatten, men inga förgiftningar är kända. Historiskt finns det belägg för att lever från sötvattensfiskar orsakat PSP-dödsfall och i dessa fall har cyanobakterier i efterhand misstänkts. Även från Sverige är sådana fall kända från 1940-talet, det har då rört sig om lever från lake.

Då det gäller cyanobakteriernas levergifter har dessa ibland konstaterats förekomma i såväl fisklever som i fiskleverolja.

Mejeriprodukter

Alla typer av mejeriprodukter är helt riskfria. Även om kossorna skulle sätta i sig stora mängder cyanobakterier överförs gifterna inte till mjölken.

Vegetabilier

Sallater som vattnats med cyanobakterieinfekterat vatten kan innehålla små mängder toxin men utgör knappast någon fara. Om sallat kan sprida CLB-infektioner är mera oklart, vid åtminstone ett av infektionsutbrotten i Nepal återfanns CLB på sallat.

Cyanobakterier finns också på hälsokostmarknaden där de saluförs som kosttillskott. De finns numera också i en del smoothies. Cyanobakterierna *Aphanizomenon flos-aquae* skördas vid naturliga blomningar och det säger sig självt att risken för infektion med toxiska stammar är betydande. En amerikansk undersökning visade att tre fjärdedelar av sådana hälsokostprodukter innehöll mikrocystin i halter överstigande gränsvärdet 1 μg per gram hälsokost. En riskutvärdering har lett till rekommendationen att högst 2 gram av hälsokosten bör intas under en dag! Utöver infektionsrisken har det visat sig att många stammar av *A. flos-aquae* själva är toxiska och förutom levertoxiner också kan bilda saxitoxiner. Även en annan hälsokostbakterie, *Spirulina*, som huvudsakligen odlas i Kina, kan producera microcystin.

Vatten

Den största risken att få i sig gift löper man vid bad i sjöar med blommande cyanobakterier. Det finns statistik på det mesta och en simmare anses i genomsnitt få i sig runt två dl vatten. Ännu mer, uppemot en halv liter, lär vattenskidåkare få räkna med.

Det finns också ganska gott om uppgifter om simmare, vattenskidåkare, kanotister, exercerande soldater och andra som fått besvär efter rejäla kallsupar. Men trots att många av cyanobakteriernas toxiner verkligen är mycket giftiga, finns få rapporter om livshotande situationer. En viktig anledning är att halten fritt toxin i vattnet är relativt låg. Merparten av toxinerna finns inuti cyanobakterierna och frigörs först när cyanobakterierna dör. I naturen bryts toxinerna ned, om än ganska långsamt, av många bakterier. Och till skillnad från djuren,

som gärna äter av det blommande koncentratet, riskerar vi knappast att få i oss några större mängder av den illaluktande sörjan.

En australisk undersökning av badare visade en förhöjning av ospecifika symptom (alltifrån diarré och influensaliknande symptom till öroninflammation och eksem) hos de som utsatts för cyanobakterier jämfört med de som inte gjort det. Undersökningen kunde dock inte påvisa något samband mellan förekomst av levertoxiner och symptom. Man kan ju spekulera i om inte endotoxinen (cellväggen) hos cyanobakterierna skulle vara en sannolikare förklaring till sådana symptom. Om vi utsätts för andra gramnegativa bakterier i motsvarande halter ger endotoxinen en klart allmänirriterande effekt.

Klorering av dricksvatten med hypoklorit är mycket effektivt under förutsättning att halten organiska ämnen (som cyanobakterier!) i vattnet är låg, men det hindrar inte att även klorerat dricksvatten som tas från ytvattentäkter kan innehålla låga halter levertoxin, framför allt mikrocystin. Halterna anses dock inte tillräckliga för att orsaka akuta skador. Den rekommendation som WHO anger är att dricksvatten inte bör innehålla mer än 1 μg mikrocystin per liter. Livsmedelverkets undersökningar på dricksvatten i Sverige har inte gett några belägg för att denna halt överskrids. Av ett hundratal undersökta prover innehöll bara två detekterbara halter och då runt 0.4 μg/L.

Levertoxinernas verkningssätt är dock sådant att man misstänker att de orsakar levercancer och gränsvärdena är inte satta för denna eventualitet. Även för anatoxin anses ett gränsvärde på 1 μg per liter vatten vara säkert enligt en studie.

Dialyskatastrofen i Brasilien = Caruaru-syndromet

I februari 1996 fanns 147 patienter på en avdelning i dialyscentret i Caruaru, Brasilien. 133 av dem drabbades av en mystisk sjukdom som började med synsvårigheter, huvudvärk, illamående och kräkningar för att sedan övergå i diffusa leversymptom och konvulsioner. En del patienter förlorade hörsel och syn. När utbrottet ebbat ut hade 63 patienter dött. I en annan avdelning intill fanns 47 patienter men ingen av dessa insjuknade.

Den undersökning som givetvis följde visade att dialyscentret använt vatten från en närliggande reservoar till dialyserna. Vattnet innehöll mikrocystin och detta kunde spåras hela vägen till patienterna. I leverprover från de döda hittades stora mängder av giftet. Det visade sig att den drabbade avdelningen använt orenat vatten till dialyserna medan vattnet till den andra avdelningen både filtrerats och klorerats.

Mikrocystin som på det här sättet leds in direkt i blodbanan hos en patient beräknas ha 100-1000 gånger kraftigare effekt än om det upptas via tarmen vilket förklarar omfattningen av

katastrofen (man gjorde inga mätningar men i efterhand uppskattades mikrocystinhalten till 20 µg per liter). Men det visar också på ett dramatiskt sätt effekten av att filtrera och klorera mikrocystinhaltigt råvatten.

Och Brasilien igen...

I samband med ett dammbygge i Brasilien drabbades 2000 människor av blödande enteriter efter att ha druckit orenat vatten från området. Av de insjuknade dog 88 och den påföljande undersökningen pekade ut cyanobakterier som en tänkbar orsak. Detta är det enda (och ofta refererade) fall i litteraturen som indikerar cyanobakterier som orsak till ett stort dödligt utbrott hos konsumenter. Det finns dock skäl att vara tveksam till undersökningens slutsats. Den bygger på två omständigheter: man fann 1 000-10 000 enheter cyanobakterier i vattnet och man hittade inga andra patogener. Halten cyanobakterier var förvisso hög, men inte exceptionellt hög, vid blomningar kan den mycket väl vara 10-100 gånger högre.

Några toxinanalyser utfördes inte och symptombilden pekar snarare mot en annan vattenburen infektion, campylobacter, som ju är dokumenterat besvärlig att isolera från vatten. Visserligen finns uppgifter om att en del av de döda druckit kokt vatten men uppgifterna är av anekdotisk karaktär och svåra att värdera.

Mysteriet på Palm Island

1979 drabbades 149 människor i Palm Island, Australien, av en mystisk vattenburen infektion. Det började med uppkastningar och huvudvärk som övergick till magsmärtor och en blodig diarré. En smärtsam leverförstoring kunde konstateras hos många av de drabbade och i en del fall slutade njurarna att fungera. Nästan alla insjuknade var barn och för många krävdes sjukhusvård. Så småningom tillfrisknade alla.

Under flera år diskuterades orsaken livligt, man fann inga kända patogener vid de bakterie-, virus- och parasitanalyser som utfördes. Däremot isolerades höga halter av ett tidigare okänt cyanotoxin, cylindrospermopsin, från en vattenreservoar, Solomondammen, i närheten. Solomondammen hade plågats av en kraftig blomning av cyanobakterier och för att bli kvitt bakterierna behandlades dammen med kopparsulfat. Förgiftningen inträffade en vecka efter behandlingen och de drabbade hade druckit oklorerat vatten som pumpats från dammen.

Idag får det betraktas, om än inte bevisat, som sannolikt att det var cylindrospermopsinet som orsakade förgiftningen. Idag vet vi att just detta cyanotoxin slår mot såväl lever- som njurceller och att det antagligen kommit ut i dricksvattnet i extremt höga halter efter kopparbehandlingen som dödade och lyserade cyanobakterierna.

VIRULENSFAKTORER

Saxitoxin

Toxinet som orsakar förlamande skaldjursförgiftning (PSP) är alkaloiden saxitoxin, en liten purinförening med en molekylvikt omkring 300 Da. Det är ett kraftigt neurotoxin som binder mycket hårt in till mottagliga cellmembrans natriumkanaler där det blockerar natriumjonflödet. Följden blir att transmittorämnet acetylkolin, som förmedlar nervimpulserna, hämmas och nervimpulserna förhindras. Musklerna förlamas och i värsta fall kan andningen upphöra. Dödsfall på grund av hjärtstillestånd har också rapporterats.

Saxitoxinmolekylen kan substitueras på flera platser och eftersom påvisningen hittills skett med kromatografiska metoder (som behöver ta hänsyn till substitueringarna) räknar man 2012 med 58 kända varianter av toxinet. Deras biologiska verkningssätt är identiskt men giftigheten varierar en del mellan varianterna. Inom saxitoxinerna finns en grupp som innehåller ett par sulfatmolekyler, dessa brukar kallas gonyautoxiner.

Ett annat, föga studerat neurotoxin hos cyanobakterierna som blockerar natriumkanalen, är jamaicamid.

Anatoxin

Det cyanotoxin som är inblandat vid spastisk skaldjursförgiftning (NSP) är en annan alkaloid, aminen anatoxin. Anatoxin fungerar på omvänt sätt jämfört med saxitoxin, det aktiverar natriumkanalen i cellmembranen i stället för att blockera den. Toxinet finns i ett dussintal varianter med molvikter mellan 165 och 300 Da och med ganska betydande variation i giftighet. En metylerad variant brukar gå under namnet homo-anatoxin-a.

I kontakt med cellmembranen kan de fungera på två olika sätt. De flesta varianterna, som till exempel anatoxin-a, binder specifikt in till en receptor i nervändarna och fungerar där exakt som acetylkolin vilket innebär att musklerna drar ihop sig. Men till skillnad från acetylkolin bryts anatoxin-a sedan inte ned av acetylkolinesteras så muskelsammandragningen kvarstår även när esteraset frisläpps.

Den variant som har den otympliga beteckningen anatoxin-a (s) – där (s) står för salivutsöndring – hämmar i stället esteraset vilket innebär att acetylkolin inte kan brytas ned. Resultatet blir detsamma: musklerna låses i en sammandragning. I höga doser orsakar anatoxinerna andningsstillestånd, men några dokumenterade dödsfall hos människor har de inte orsakat. Anatoxin-a (s) är den enda kända naturliga organofosfaten, den grupp av syntetiska gifter som annars ofta används för insektsbekämpning inom lantbruket.

Andra cyanobakterietoxiner som aktiverar natriumkanalen är hoiamiderna. Dessa är

lipopeptider som har dubbel effekt, de verkar också på kalciumkanalen (som däremot blockeras). Hur pass vanliga hoiaminderna är vid förgiftningar är helt okänt.

Hepatotoxiner

Till skillnad från saxitoxin och anatoxin som är metaboliter, är levertoxinerna peptider och därför troligen genetiskt kontrollerade. Det rör sig om mycket små, ringformade peptider med från 5 (nodularin) till 7 aminosyror (mikrocystin) med en molekylvikt strax under 1 kDa. Alla innehåller den unika aminosyran ADDA (3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetyl-10-fenyldeca-4,6-dienoic acid) som är central för giftigheten. Framför allt mikrocystin kan substitueras på åtskilliga ställen och analyserat med jonkromatografi räknar man därför med uppåt 75 varianter.

Levertoxinerna är nekrotiska och dödar levercellerna med massiv blodansamling som följd. Den direkta orsaken är att toxinerna fungerar som inhibitorer av proteinfosfataser vilket leder till hyperfosforulering av proteinerna. Massdöden som observerats hos djur orsakas av cirkulationschock. Levertoxinerna är mycket stabila och överlever såväl kokning som magens sura pH. Levertoxinerna är tumörframkallande och i Kina anses att det finns ett dokumenterat samband mellan levercancer och konsumtion av orenat ytvatten som innehåller mikrocystiner.

Till skillnad från neurotoxinerna kan levertoxinerna åtminstone i viss mån behandlas med läkemedel, antibiotikumet rifampin skyddar delvis mot effekterna.

Övriga toxiner

Cylindrospermopsin hämmar proteinsyntesen hos framför allt lever- och njurceller och det tycks även ha en viss neurotoxisk effekt. Hos marina cyanobakterier har man numera upptäckt en lång rad cytotoxiner med i stort sett okänd effekt och betydelse. Bara ett fåtal som neurotoxinerna antillatoxin, gonyatoxin och kalkitoxin, de celltoxiska guamamid och micromid samt de hudcellsnekrotiska lyngbyatoxin och aplysiatoxin har man ens fragmentariska kunskaper om.

PÅVISNING

Cyanobakterier

Cyanobakterier är svårodlade och kan inte identifieras med biokemiska tester på traditionellt sätt. De identifieras idag huvudsakligen genom mikroskopering. Molekylärgenetisk identifiering med hjälp av hybridiseringssonder är möjlig men kommersiella kits finns inte på marknaden.

Toxiner

Standardmetoden för att påvisa toxinernas biologiska effekt är genom injektion på möss. De dödliga doserna för möss (24 h-LD_{50}) är runt 50 μg/kg för mikrocystin (variationen är betydande: 25-600 μg/kg), 30-50 μg/kg för nodularin, 2000 μg/kg för cylindrospermopsin, 10-20 μg/kg för saxitoxiner, 200 μg/kg för anatoxiner med effekt på cellreceptorer och 20-40 μg/kg för anatoxin-a (s) som är ett antikolinesteras. Metoden används numera knappast alls för att testa vattenprover, dels av etiska skäl och dels för att den inte är tillräckligt känslig. Det behövs 1 μg/ml mikrocystin i en injektion för att döda en mus. Det av WHO rekommenderade gränsvärdet för vatten är på 1 μg/L, följaktligen måste ett prov då koncentreras minst 1000 gånger.

Referensmetoden är kromatografi, vanligtvis HPLC eller LC/MS. Metoderna är känsliga, för mikrocystin ned till i storleksordningen 0.01 μg/L vatten. För saxitoxin i livsmedel räknar man med detektionsnivåer på ungefär 0.1 μg/kg livsmedel. Med kromatografi kan man dela upp toxinerna i ett antal varianter vilket är en fördel i forskningssammanhang men mest till besvär om man vill testa vatten. Alternativa och mindre omständliga metoder är därför efterlängtade.

Immunologiska ELISA-metoder har länge använts för att påvisa levertoxinerna och det finns kommersiella kits tillgängliga från bl.a. Mitsubishi Corp, Envirologix Inc och PBR Laboratories. ELISA är tillräckligt känslig för att påvisa mikroscystin i vatten, normalt i storleksordningen 0.1 μg/L och i vissa fall har ännu lägre detektionsnivåer uppgetts. De olika varianterna av toxinerna reagerar olika mot den eller de antikroppar som används och därför är ELISA inte alltid kvantitativt godtagbar. Som screeningmetod är den däremot mycket användbar. Även för saxitoxiner finns kommersiella ELISA-kits.

Levergifterna inverkar i kroppen specifikt på proteinfosfatas vilket kan utnyttjas för en enzymatisk inhibitionstest för proteinfosfatas. De känsligaste teknikerna bygger på isotopmärkt protein vilket både är dyrt och besvärligt. De billigare varianterna bygger på färgomslag, även dessa är ganska känsliga men får liksom ELISA betraktas som screeningmetoder. Kommersiell tillhandahållen teknik finns för proteinfosfatasinhibering (PBR Laboratories).

Sensorer som bygger på artificiella molekylära receptorer för mikrocystin har testats några år och i åtminstone en studie visat hög känslighet kombinerat med snabb analys, men förekomsten av ett otal varianter av toxinet begränsar metodens användbarhet.
Även flera molekylärgenetiska screeningmetoder för potentiellt toxiska blomningar har på senare tid beskrivits. Särskilt för levergifterna har PCR-teknik för att detektera generna blivit allt vanligare och idag finns även kvantitativa PCR-tester.

Epidemiologi

Någon typning av cyanobakterier i egentlig mening har aldrig utförts.

Erysipelothrix

– Den gamle grisplågaren –

ÖVERSIKT

Erysipelothrix fortsätter att vara ett gissel för grisuppfödare över hela världen trots att det nu är 120 år sedan det första vaccinet togs fram. Också fårskötare och kalkonfarmare har alla skäl att vara ängsliga för bakterien. För att nu inte tala om de stackars djuren.

Veterinärerna kallar sjukdomen erysipelas eller rödsjuka. Den kan också drabba människor men eftersom de veterinära namnen redan är upptagna för humansjukdomar som orsakas av streptokocker respektive shigella, så kallas sjukdomen erysipeloid hos oss. Erysipeloid är ovanligt i Sverige och eftersom sjukdomen dessutom effektivt kan behandlas med vanligt penicillin brukar man inte spilla mycket krut på den. Men, virulenta stammar av bakterierna är faktiskt mycket vanliga på kött och fisk även i Sverige och sjukdomen kan ge omfattande ledbesvär (polyartriter) även via en smygande infektion utan kliniska symptom på erysipeloid. Därför finns det anledning att ta bakterien med ett visst mått av allvar. Livsmedelsburen smitta sker vanligen genom att bakterierna från infekterat kött eller fisk tränger in i småsår i huden, men kan också ske via konsumtion av köttet eller fisken.

BAKTERIEN

Släktet *Erysipelothrix* består av grampositiva, fakultativt anaeroba, orörliga stavar som är katalasnegativa och bäst trivs under mikroaerofila förhållanden. Släktet omfattar för närvarande två arter: *E. rhusiopathaie* och *E. tonsillarum*. Arternas rRNA är identiskt till 99.8 % vilket visar att de är mycket närbesläktade. Tillsammans indelas de i 26 serotyper som har varierande virulens (Tabell 10).

Tabell 10. Arter, serotyper och virulens hos *Erysipelothrix*.

Art	***Serotyper***	***Patogen för gris***
E. rhusiopathaie	1, 2, 4-6, 8, 9, 11, 12, 15-17, 19, 21,23	Ja, särskilt 1 & 2
E. tonsillarum	3, 7, 10, 14, 20, 22,24-26	Nej
Ännu inte namngivna arter	13 (”strain 1”), 18 (”strain 2”)	Nej

(En tredje namngiven art, *E. inopinata*, introducerades 2004 men denna har av allt att döma inte något gemensamt med de livsmedelsassocierade arterna och beaktas därför inte här.)

Serotypsindelningen stämmer anmärkningsvärt väl överens med virulensen: samtliga serotyper av *E. rhusiopathiae* utom 9 och 16 är kända grispatogener, medan ingen av serotyperna utanför *E. rhusiopathiae* har visats vara grispatogena. (Å andra sidan finns det exempel på avirulenta stammar även inom normalt virulenta serotyper.) De mest virulenta stammarna förefaller finnas i serotyp 1 och 2. De svarar för ungefär 80 % av rödsjukefallen hos gris och är också den vanligaste orsaken till erysipeloid. Från svin med akut sjukdom isoleras nästan alltid bara serotyperna 1 och 2. Från svin med kronisk sjukdom är serotyperna 1, 2, 7, 10 och 11 klart vanligast.

Utvecklingsmässigt hör *Erysipelothrix* till en mycket speciell gren i den grampositiva utvecklingslinjen: den ligger djupt inbäddad i en stor grupp av cellväggslösa bakterier som till exempel *Mycoplasma*.

Förekomst i naturen

Båda erysipelothrix-arterna hör hemma hos djur och de har isolerats från ett åttiotal djurarter, alltifrån däggdjur till fåglar och fiskar. Man räknar med att hälften av alla grisar bär på erysipelothrix i tonsillerna, ofta då avirulenta stammar, inte sällan *E. tonsillarum*. Även virulenta stammar isoleras ofta från friska grisar men eftersom merparten av industrivärldens grisar numera är vaccinerade är det svårt att bedöma om dessa virulenta stammar hålls i schack enbart av vaccinet eller om det krävs speciella förhållanden för att de ska kunna utveckla sjukdom.

Vaccinen (det finns flera) har bara har en kortvarig effekt, på många håll i världen tvingas man vaccinera grisarna upp till fyra gånger under första levnadsåret för att hålla rödsjukan under kontroll. Vaccineringen är effektiv mot akut rödsjuka, men betydligt mindre effektiv på att förhindra de kroniska effekterna: artriter orsakade av erysipelothrix är ganska vanliga även hos vaccinerade djur.

Stammar som är avirulenta för grisar och människor kan vara farliga för andra arter. Det bästa exemplet på det är den tidigare förmodat harmlösa *E. tonsillarum* serotyp 7 som visats vara en viktig anledning till hjärtklaffsinflammation hos hundar.

SJUKDOMEN

Akut erysipeloid är en hudsjukdom. Den kända komplikationen hos människan är hjärtklaffsinflammation (endokardit). Hjärtklaffsinflammation kan dock inträffa utan föregående hudförändringar vilket möjligen kan tolkas som att bakterierna nått blodbanan via tarmen.

Infektionsdos
Infektionsdosen är okänd men är förmodligen låg i samband med sticksår. Infektionsdosen via födan är okänd.

Inkubationstid
1-4 dygn efter att hudskada har blivit infekterad uppträder symptom på erysipeloid.

Symptom
Centimeterstora, något upphöjda, blåvioletta hudrodnader på händer eller fingrar som ömmar, kliar och känns varma. Normalt självläker erysipeloid inom 2-3 veckor. Behandling med penicillin ger snabbt tillfrisknande. Sällsynta komplikationer i obehandlade fall är blodförgiftning som kan leda till infektiös artrit samt till hjärtklaffsinflammation. Den senare har en dödlighet på ungefär 40 %.

Incidens
Diagnosticerade fall av erysipeloid är mycket sällsynta i Sverige. Att orapporterad erysipeloid inte är helt sällsynt bland grisuppfödare förefaller dock klart. Och en undersökning vi genomförde i slutet på åttiotalet indikerade förhöjda antikroppssvar gentemot *E. rhusiopathiae* hos 20 av 138 slakteriarbetare i Skåne. Om dessa hade haft symptom eller om infektionen varit symptomlös gick inte att få svar på.

Incidensen av hjärtklaffsinflammation orsakad av erysipelothrix är mycket låg. I en del fall har det dock visats att de kliniska bakteriologerna inte är förtrogna med bakterien och därför kan felidentifiera den.

Rödsjuka hos grisar
Akut rödsjuka hos grisar yttrar sig som ett par centimeter stora blåvioletta, något upphöjda hudförändringar. Hudförändringarna uppkommer efter ett par dagars apati och ofta också feber. Efter detta kan rödsjukebakterierna vandra ut i blodet och ge blodförgiftning. Kronisk rödsjuka yttrar sig som svåra polyartriter som gör att grisarna får svårt att stå på benen och ibland också som inflammation på hjärtklaffarna vilket inte sällan leder till döden. Hos ovaccinerade suggor kan följden bli abortering av hela kullen.

LIVSMEDEL
Någon tillväxt i livsmedel är inte sannolik oavsett vilka förhållanden som livsmedlet lagras vid. Däremot är erysipelothrix, som de flesta grampositiver, ganska okänslig för hantering och överlever utan problem i såväl kyllagrade som frysta livsmedel. Eftersom de är fakultativt anaeroba påverkas de heller inte av lagring i luft eller i modifierad gasatmosfär och de är vidare tämligen resistenta mot såväl rökning som saltning. Pastörisering dödar bakterierna.

Kött och fisk

När vi på åttiotalet gjorde en undersökning på svenskt nystyckat kött kunde vi, med viss förvåning, konstatera att en mycket stor del av grisköttet och kycklingarna (men inte nötkött) var infekterade med låga halter av virulenta *E. rhusiopathiae*. Uppgifterna kunde konfirmeras i uppföljande studier som också visade att nyfångad torsk och sill innehöll virulenta stammar av serotyper som brukar orsaka rödsjuka.

Under nittiotalet och efter millenieskiftet har liknande undersökningar genomförts i flera andra länder och resultatet är entydigt: kött från gris och fågel samt många fiskar innehåller mycket ofta virulenta stammar av erysipelothrix. Risken att infekteras av bakterien genom att hantera köttet eller att äta dåligt stekt kött är förmodligen liten, men oupptäckta eller orapporterade fall av erysipeloid kan å andra sidan heller inte uteslutas.

Ägg förefaller inte smittas av hönor som bär på bakterierna och är därför riskfria att äta.

Övriga livsmedel

Mejeriprodukter innehåller inte erysipelothrix och inte heller i vegetabilier har man hittat några virulenta stammar. För vatten saknas data.

VIRULENSFAKTORER

Virulenta stammar har cellväggsassocierade virulensfaktorer som adhesiner och kapslar. Ett neuraminidas som bakterien producerar tros ha betydelse för såväl adhesion som invasion. De producerar en lång rad antioxidant-faktorer som undertrycker makrofagernas kemiska arsenal och bildar dessutom ett tiotal fosfolipaser som också tros ha betydelse för intracellulär överlevnad. I dessa avseenden är erysipelothrix lik parasitära bakterier som brucella och francisella.

PÅVISNING

Erysipelothrix kan vara svår att odla fram från infektioner. Däremot är den lätt att isolera från livsmedel med selektiva medier. Referensmetodik för bestämning av bakterierna i livsmedel saknas.

Selektiv isolering

När vi själva på åttiotalet isolerade erysipelothrix använde vi oss av Woods selektiva medium för att anrika bakterierna. Mediet innehåller en blandning av kanamycin, neomycin och vancomycin som få andra bakterier klarar av. Men mediet kan vara lite besvärligt att tillverka eftersom det innehåller färskt sterilt hästserum och senare undersökningar har visat att det går lika bra att använda andra medier, till exempel det kommersiellt tillhandahållna *brain heart*

infusion-buljong, som grund till antibiotikablandningen. Den selektiva buljongen inkuberas 37°C 48 h varefter renstrykning görs på hästblodagar.

Identifiering

Grampositiva stavar, ofta med lite coryneform karaktär, testas på svavelväteproduktion i TSI (*Triple Sugar Iron*). Erysipelothrix tillhör de ytterst få grampositiver som bildar svavelväte i TSI så testet är en mycket bra screeningmetod.

Serotypstillhörigheten kan testas med kommersiellt tillhandahållna antikroppar. För virulenstestning är för närvarande dessvärre bara test på möss tillgängligt.

Annan påvisning

Påvisning av såväl släktet *Erysipelothrix* som arterna kan göras med PCR-metodik. Sonder mot de tre Sp-antigenen (*surface protective antigen*) SpA, SpB och SpC har visat sig mycket användbara eftersom de korrelerar med serogrupperna. SpA förekommer enbart hos *E. rhusiopathiae* serotyp 1, 2, 5, 9, 12, 15-17 och 23; SpB endast hos *E. rhusiopathiae* serotyp 4, 6, 8, 11, 19 och 21 medan SpC endast hittats hos serotyp 18 i den onamnade arten ”*strain 2*”. Serotyp 13 i den onamnade arten ”*strain 1*” och samtliga serotyper hos *E. tonsillarum* saknar antigenen.

Snabba ELISA-baserade immunologiska tester har använts för att testa misstänkta sjukdomsfall. Särskilt från kliniskt material, varifrån bakterierna kan vara svåra att isolera, har det visat sig vara en fördel att använda PCR-baserade metoder.

Epidemiologi

Serologi är det klassiska sättet att typa erysipelothrix och metoden har för just dessa bakterier fått stor betydelse eftersom virulens med god korrelation kan kopplas till vissa serotyper. Som egentligt epidemiologiskt vapen fungerar dock inte det ganska begränsade serologiska schemat särskilt väl, och då framför allt inte då det gäller de högvirulenta serotyperna 1 och 2.

Molekylärgenetiska fingeravtrycksmetoder som ribotypning, RFLP och PFGE har däremot alla varit framgångsrika för att typa bakterierna.

Escherichia coli

– Den sjufaldige mördaren –

ÖVERSIKT

Egnas barn. Andras ungar.

Ingenstans blir ordspråket så tydligt som när det gäller *E. coli*. Varje år dödar kolibakterier en till två miljoner barn i tredje världen. Det är gamla nyheter som aldrig skapat rubriker. Men då hotet nådde västvärldens barn 1982 i form av den hemorragiska (= ger upphov tillblödningar) bakterien O157:H7 vaknade intresset. Forskningen om enteropatogena koli exploderade och idag har vi ingående kunskaper om flera av de patogena koligrupperna.

För det finns åtminstone sju olika grupper. Fyra av dem är mycket svåra patogener för barn i tredje världen: det är de enteropatogena (EPEC), de enterotoxiska (ETEC), de enteroaggregativa (EAEC) samt dysenteribakterierna som visserligen kallas shigella men som i själva verket också är en variant av *E. coli*. Ytterligare en allvarlig, om än inte lika vanlig, orsak till barndiarré i utvecklingsländerna är de enteroinvasiva koli (EIEC).

I vår industrialiserade del av världen är det däremot alltså i stället en sjätte grupp, de enterohemorragiska koli (EHEC) som betraktas som den svåra barnpatogenen medan ETEC (turistdiarré) och shigella här mer karakteriseras som vuxensjukdomar. EHEC är för övrigt egentligen bara en undergrupp till shigatoxikogenerna (STEC). Den sjunde gruppen är de så kallat diffust adherande koli (DAEC).

BAKTERIEN

Escherichia coli är en gramnegativ, fakultativt anaerob, oxidasnegativ stav som är rörlig med hjälp av peritrika flageller. I likhet med flera andra enteropatogener tillhör den familjen Enterobacteriaceae. Kolibakterier ingår i normalfloran i tarmen hos nästan alla däggdjur och fåglar och testning av ”koliforma bakterier”och ”termostabila koli” har därför i över 50 år använts för att undersöka fekal förorening av livsmedel, dricksvatten och badvatten.

De flesta kolistammar är nyttiga och lever i harmoni med sin djurvärd. Koli fäster till tarmslemhinnans celler med hjälp av små trådar, fimbrier, oftast med specifik inbindning till vissa receptorer. Specificiteten innebär för det första att kolibakterier normalt bara lever i

bestämda delar av tarmkanalen, för det andra att kolistammar oftast har värdspecifik inbindning. Stammar som fäster in till tarmslemhinnan hos exempelvis grisar koloniserar därför normalt inte människor. Detta gäller för såväl nyttiga som patogena kolistammar. Från avföringen sprids kolibakterier till jord, vatten och livsmedel varifrån de åter når djur och människor.

Genetiskt sett är *E. coli*, trots de stora olikheterna i virulens hos olika stammar, en väldefinierad art. Arten omfattar förutom ”typiska koli”, dit både nyttiga och flertalet patogena kloner hör, en del metaboliskt avvikande stammar av vilka en del räknas till enteroinvasiva *E. coli* och en del till *Shigella*. Men genetiskt sett är dysenteribakterierna inom shigella alltså inget annat än *E. coli*!

SJUKDOMARNA

Kärt barn har många namn och det vimlar av förkortningar i *E. coli*-litteraturen. Vi har samlat de vanligaste i Tabell 11.1. Utöver de sju enteropatogena grupperna finns även två andra, helt fristående patogena grupper: UPEC (uropatogena) som orsakar urinvägsinfektion och NMEC (neonatal meningit) som ger blodförgiftning/hjärnhinneinflammation. Dessa behandlas inte i denna bok.

Tabell 11.1. Ofta använda förkortningar för enteropatogena *E. coli*.

AAF, aggregativa adhesionsfimbrier, se avsnitt 4. EAEC.

A/E – *Attachment and effacement*, se avsnitt 1. EPEC.

AEEC – *Attaching and effacing E. coli*, synonym till EPEC.

Afa/Dr – Familj av adhesiner, se avsnitt 5. DAEC.

BFP – *Bundle forming pilus*, se avsnitt 1. EPEC.

CFA – *Colonization factor antigens*, se avsnitt 2. ETEC.

CS – *Coli Surface antigen*, annan terminologi för CFA.

DAEC – Diffust adherande *E. coli*, se avsnitt 5.

eae – Genen som kodar för intimin, se avsnitt 1. EPEC.

EAEC – Enteroaggregativa *E. coli*, se avsnitt 4.

EAF – EPEC adhesionsfaktor. avsnitt 1. EPEC

EAggEC – Äldre synonym till EAEC.

EAHEC – Enteroaggregativa hemorragiska coli (O104:H4) – se avsnitt 3 och 4

EAST 1 – Enteroaggregativt enterotoxin, se avsnitt 4. EAEC.

EHEC – Enterohemorragiska *E. coli*. En undergrupp av STEC, se avsnitt 3.

EIEC – Enteroinvasiva *E. coli*, se avsnitt 6.

Enterohemolysin – Se avsnitt 3. STEC.

EPEC – Enteropatogena *E. coli*, se avsnitt 1.

Esp – *E. coli secreted proteins*, se avsnitt 1. EPEC.

ETEC – Enterotoxiska E. coli, se avsnitt 2.

HUS – Hemolytiskt uremiskt syndrom, se avsnitt 3. STEC.

Intimin – Se avsnitt 1. EPEC.

Ipa – *Invasion plasmid antigen*, se avsnitt 6. EIEC.

LAEC – Lokalt adherande *E. coli*, synonym till EPEC.

LEE – *Locus of enterocyte effacement*, se avsnitt 1. EPEC.

LT – (Värme)-labilt toxin, se avsnitt 2. ETEC.

Map – Mitokondrie-associerat protein, se avsnitt 1. EPEC.

O157:H7 – En speciell serotyp av EHEC, se avsnitt 3.

pAA – Plasmid innehållande virulensfaktorer, se avsnitt 4. EAEC.

pInv – Invasionsplasmid, se avsnitt 6. EIEC.

pO157 – Plasmid, se avsnitt 3. STEC.

Pet – *Plasmid encoded toxin*, se avsnitt 4. EAEC.

sen – Genen för produktion av Shet2, se avsnitt 6. EIEC.

Shet2 – Shigella enterotoxin 2, se avsnitt 6. EIEC.

SLTEC – Shiga-liknade toxikogena *E. coli*, äldre beteckning för STEC.

ST – (Värme)-stabilt toxin, se avsnitt2. ETEC.

STx – Shigatoxin, se avsnitt 3. STEC.

Tir – *Translocated intimin receptor*, se avsnitt 1. EPEC.

STEC – Shiga-toxikogena E. coli, se avsnitt 3.

VTEC – Verotoxikogena E. coli, synonym till STEC.

De sju grupperna av enteropatogena *E. coli*

1. EPEC = Enteropatogena *E. coli*

Historia och definition

Redan på 1920-talet var man klar över att vissa *E. coli*-stammar orsakade diarré hos spädbarn. Begreppet EPEC myntades på femtiotalet för att täcka in stammar som epidemiologiskt kunde kopplas till spädbarnsdiarré och som tillhörde vissa serotyper. Ända fram till mitten av nittiotalet var det också serotypen som definierade EPEC-stammarna: om ett isolat tillhörde serotyp O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125 – O128, O142 eller O158 så var det en EPEC-stam, annars inte.

Och visst är det så att en del serotyper är tydligt kopplade till EPEC, men det betyder inte att alla stammar i en viss serotyp är patogena. Dessutom vet man numera att det finns det massor av EPEC som inte hör hemma i de klassiska serotyperna.
Idag definieras EPEC istället utifrån två andra kriterier:
1. De orsakar så kallad *attachment/effacement* (A/E)-förändringar på mottagliga celler.
2. De producerar *inte* shigatoxiner.

Man skiljer på typiska och atypiska EPEC. Typiska EPEC är *eae+* (producerar intimin) och *bfp+* (producerar *bundle-forming pili*) medan atypiska EPEC saknar genen för bfp.

Smittkälla och smittspridning

Den vanligaste smittspridningen för EPEC-infektioner hos barn i utvecklingsländer är direkt eller indirekt kontakt med andra sjuka barn eller med symptomlösa bärare, inte sällan modern. Smittan sprids från fekalier via händer eller textilier. Förorenat livsmedel, framför allt vatten, är en annan vanlig smittkälla. Däremot är avföring från djur vanligtvis ingen smittkälla för människor, typiska EPEC-stammar hos djur orsakar inte infektion hos människor.

Däremot har i undantagsfall atypiska EPEC-stammar hos djur smittat människor, men det är i dessa fall oklart om det verkligen rört sig om EPEC eller om det handlat om STEC-stammar som förlorat sin förmåga att producera shigatoxiner.

Infektionsdos

EPEC har en mycket markerad åldersfördelning. Känsligast är barn under 6 månaders ålder. Infektionsdosen hos dessa är inte känd men antas vara låg, kanske färre än tusen bakterier. För detta talar bland annat att person-till-person-smitta är mycket vanlig.

Barn mellan 6 månader och 2 år har måttlig känslighet medan barn över två års ålder i likhet med vuxna anses vara i stort sett oemottagliga. I de få utredda fall där vuxna insjuknat har infektionsdosen varit hög, miljontals bakterier. Hos vuxna försökspersoner har EPEC gett diarré först efter doser på över 100 miljoner bakterier och då endast om magsyran först neutraliserats.

Inkubationstid och symptom

Barn som drabbas av EPEC insjuknar efter 6-72 timmars inkubationstid, med ett genomsnitt på ca 18 timmar. Vuxna försökspersoner insjuknar snabbare, vanligtvis efter ca 10 timmar, antagligen på grund av att de utsatts för högre doser.

EPEC orsakar en mycket riklig, vattnig diarré. Uppkastning och en lätt feber är andra vanliga symptom. Obehandlad kan EPEC-diarré vara livsfarlig för spädbarn: upp till 30 % dödlighet har rapporterats i utbrott i tredje världen. Varaktigheten varierar från ett par dygn upp till många veckor: en mycket stor del av barnen får diarré i mer än 14 dagar vilket är en väsentlig orsak till den höga dödligheten. I den industrialiserade världen är dödsfall sällsynta på grund av att vätskeersättning ges.

Incidens

I tredje världen beräknas EPEC orsaka en tredjedel av alla akuta diarréer hos barn under 2 års

ålder. EPEC är en starkt bidragande orsak till den höga spädbarnsdödligheten i utvecklingsländerna och anses skörda hundratusentals offer varje år. I utvecklingsländerna kan en betydande andel, upp till 20 %, av barnen mellan 6 månader och 2 års ålder vara symptomfria bärare av EPEC vilket sannolikt betyder mycket för smittspridningen. I den industrialiserade världen anses EPEC numera vara ovanlig. Det kan dock delvis bero på att man inte rutinmässigt söker efter den: epidemiologiska studier har indikerat att EPEC kan vara orsak till 3-4 % av spädbarnsdiarréerna i USA. Bröstmjölk förhindrar effektivt EPEC-stammarnas förmåga att binda in till tarmens epitelceller och amning anses därför ge ett gott skydd mot EPEC.

EPEC som orsak till större utbrott av matförgiftning hos vuxna är mera tveksam. Det finns visserligen flera utbrott runtom i Europa och USA som tillskrivits EPEC. Ett drabbade för några år sedan en del Minnesotabor som avnjöt – vad de trodde – en gourmetbuffé, men i vare sig detta eller andra ofta återgivna fall undersöktes om kolibakterierna producerade shigatoxin. Det kan alltså ha rört sig om STEC-stammar i stället. Däremot verkar det troligt att någon procent av turistdiarrérna kan förklaras med EPEC-infektion hos mottagliga vuxna. Möjligen är atypiska EPEC vanligare i Europa än man oftast tror, en undersökning visade till exempel att 5 % av diarréerna på ett spanskt sjukhus orsakades av atypiska EPEC medan endast 0.2 % orsakades av typiska EPEC.

Annars förefaller det som att många vuxna är oemottagliga mot EPEC, vilket troligtvis bara delvis har med immunitet att göra. I västvärlden, där ganska få vuxna har utvecklat immunitet, verkar ändå de flesta klara sig ifrån en EPEC-infektion.

EPEC-infektionen på cellnivå: manipulation av tarmcellerna

EPEC-infektionen brukar beskrivas som ett drama i tre akter. När EPEC når fram till tarmens epitelceller börjar bakterierna bilda små trådliknande utskott. Trådarna har formen av ett knippe och kallas därför *bundle-forming pilus* (BFP). BFP medverkar dels till att bakterierna autoaggregerar i små kolonier, dels att de binder in till epitelcellerna på ett sätt som kallas ”lokal adhesion” till följd av de lokala anhopningarna av autoaggregerade bakterier. I denna första fas är inbindningen lös och inga skador på tarmcellerna kan ses.

I andra fasen tillverkar bakterierna en slags injektionsnål genom vilken ett speciellt protein, Tir, sprutas in i tarmcellernas membran. Tir fungerar som en receptor för ett annat protein, intimin, som sitter på bakteriernas yttre membran. Intimin binder EPEC mycket hårt till tarmcellernas yta. Det är i denna fas som de för EPEC så typiska cellförändringar som kallas *attachment and effacement* uppkommer. Det är de fingerliknande borst (mikrovilli) som sticker upp från tarmcellerna som utplånas (*effaces*) av EPEC.

I tredje fasen styrs tarmcellernas membranproteiner till en position direkt under bakterierna.

Där polymeriseras de i en sådan omfattning att EPEC snart sitter som på en piedestal av aktin och andra utfällda proteiner. EPEC utgör det enda exemplet på icke-invasiva bakterier som på detta sätt kan manipulera värdcellernas biokemiska signalsystem för egna syften. En tänkbar förklaring till piedestalerna är att de skyddar EPEC mot kroppens makrofager som får svårt att nå fram till bakterierna. Hela förloppet, från EPECs autoaggregering till att de sitter på piedestaler, går på ca 3 timmar.

Diarrén som uppstår i samband med EPEC-infektion kopplas till skador på tarmcellernas klorid- eller möjligen karbonatjonsbalans. Vad som utlöser obalansen är inte klarlagt: det räcker sannolikt inte med de stora mängder av vätskeabsorberande mikrovilli som förstörs vid A/E-skadorna. Men EPEC skyfflar iväg många proteiner genom den kanal de bildar till tarmcellerna. Minst 10 av proteinerna stör cellfunktionerna vilket bidrar till virulensen. De imiterar cellernas nukleotidreglering, de hämmar den programmerade celldöden (apoptosis), de stör cellernas inflammatoriska signalsystem och de stör också fagocytosen.

När diarrén väl är ett faktum bildas bland annat ett pseudomembran över cellerna som medför att kroppen får svårt att tillgodogöra sig näring och som därför förlänger diarrén.

2. ETEC = Enterotoxikogena *E. coli*

Historia och definition

ETEC var tidigt av veterinärmedicinskt intresse, man visste att en speciell serotyp orsakade diarré hos spädgrisar och att en annan drabbade spädkalvar. År 1961 klarlades att också spädbarn kunde drabbas och att diarrén berodde på enterotoxiner. ETEC definieras idag som kolibakterier vilka producerar minst ett av två väldefinierade enterotoxiner: det värmelabila LT och det värmestabila ST.

Smittkälla och smittspridning

Reservoaren för ETEC är tarmkanalen hos människor. ETEC-bakterier finns också hos djur men de är av en annan typ och ofarliga för människor. I tredje världen sprids ETEC via livsmedel och vatten som förorenats av avföring från sjuka människor samt från friska (immuna) bärare. Till skillnad från EPEC, där person-till-person-smitta är vanlig, smittar ETEC inte via direktkontakt.

Infektionsdos

Hos vuxna försökspersoner krävs en infektionsdos på minst hundra miljoner bakterier för att sjukdomen ska bryta ut. Hos spädbarn är förmodligen infektionsdosen lägre, men med all sannolikhet ändå mycket högre än för EPEC.

Inkubationstid och symptom

Inkubationstiden beror dels på vilken typ av toxin som dominerar (ST ger ett snabbare förlopp än LT) dels på infektionsdosen. Vid höga doser kan diarrén bryta ut efter 10-12 timmar, men vanligtvis räknar man med 1-3 dygns inkubationstid. Symptomen varierar alltifrån en lätt diarré till en närmast koleraliknande, våldsam vattnig diarré. Trots LT-toxinets likhet med koleratoxinet är det inte sällan ST som ger de svåraste diarréerna. Sekundära symptom är buksmärtor samt illamående. Hos 10-20 % förekommer även uppkastningar och en lätt feber. Vanligtvis självläker sjukdomen inom 3-7 dygn, men hos en inte obetydlig andel fortsätter symptomen under flera veckor vilket är orsaken till de många ETEC-orsakade dödsfallen bland spädbarn i tredje världen.

Incidens

Enligt Världshälsoorganisationen beräknas ETEC orsaka 600 miljoner diarréfall årligen. Omkring 800 000 barn under 5 års ålder, de flesta spädbarn, dör av sjukdomen i utvecklingsländerna. I skolåldern har de flesta barn i dessa länder utvecklat immunitet mot ETEC.

I västvärlden är större utbrott ovanliga, i USA identifierades till exempel bara 14 ETEC-utbrott mellan 1975 och 1995. Möjligen utgör Japan ett undantag, där har såväl utbrott som sporadiska fall av ETEC noterats i anmärkningsvärt hög utsträckning.

Övriga västlänningar drabbas annars av ETEC nästan uteslutande genom turistande i varma länder med dålig hygien. Inte heller kryssningsfartygen med hemmahamn i väst är säkra, på dessa har ETEC på senare år tagit över som den ledande orsaken till större utbrott. Uppenbarligen har en del fartygskök stora problem antingen med hygien eller med kylförvaring.

Beroende på vilka länder som gästas, drabbas 20-60 % av resenärerna av turistdiarré och en av tre beror enligt vissa forskare på ETEC. En del turistdiarréer kan vara nog så häftiga vilket ”Montezumas hämnd” och likartade beteckningar indikerar, men för en i övrigt frisk individ är ETEC ofarlig och självläkande. Vid särskilt svåra fall ges vätskeersättning och ofta även antibiotika som visats kunna förkorta sjukdomstiden. ETEC-stammarna blir dock alltmera resistenta mot antibiotika.

Det finns numera även ett flertal vaccin mot ETEC. De har varierande effektivitet.

ETEC-infektionen på cellnivå: giftbombardemang på avstånd

ETEC koloniserar och tillväxer i mukusskiktet på tarmslemhinnan (alltså det skikt som ligger

utanför tarmcellerna och som är i ständig långsam rörelse) med hjälp av långa fimbrier (utskott) som kallas kolonisationsfaktorer (CFA). Olika stammar har olika typer av CFA och ETEC som koloniserar djur kan inte kolonisera människor.

Medan ETEC tillväxer i mukusskiktet avger de sitt enterotoxin mot tarmcellerna. LT-toxinet fäster aktivt till cellmembranet varefter en del av toxinet transporteras in i cellen och påverkar kloridjonbalansen med osmotisk diarré som följd. ST efterliknar ett mänskligt hormon vilket leder till överstimulering av klorid- eller möjligen vätejonutsöndringen. ST svarar för 75 % av ETEC-fallen.

3. STEC = Shigatoxin-producerande E. coli

Historia och definition

1977 upptäckte en forskargrupp att vissa kolistammar gav upphov till cellskador på odlade Veroceller och begreppet verotoxiska *E. coli* (VTEC) myntades. Samma år upptäckte en annan forskargrupp att några kolibakterier bildade toxiner som neutraliserades av antisera mot shigellatoxiner. Bakterierna ifråga kallades SLTEC för shiga-liknande toxikogena *E. coli*. Sex år senare stod det klart att VTEC och SLTEC var synonyma beteckningar. Samtidigt visades att det faktiskt var äkta shigatoxiner som producerades och att bakterierna följaktligen borde kallas STEC.

Samma år, 1983, publicerades de första rapporterna om en speciell klon av koli, O157:H7, som orsak till blodiga diarréer och skador på inre organ. Bakterierna kallades enterohemorragiska *E. coli*, EHEC.

Idag defineras humanpatogena STEC som kolibakterier vilka:
1. Orsakar *attachment/effacement* (A/E)-skador på mottagliga celler, samt
2. Producerar shigatoxiner, Stx.

Stammar som kan producera Stx men *inte* orsakar A/E-skador är vanliga hos djur och kan i mycket hög frekvens isoleras från köttprodukter, men de betraktas som ofarliga för människor.

Ett viktigt undantag är klonen O104:H4. Denna producerar Stx2 men bär inte på *eae*-genen. I stället aggregerar den som EAEC och klonen betraktas som en EAEC-stam som förvärvat förmågan att producera shigatoxin. Denna klon finns inte hos djur, bara hos människan. Det var denna klon som orsakade Europas största utbrott av STEC i Tyskland sommaren 2011 (se fallbeskrivningen *Den egyptiska smittan*).

EHEC är en undergrupp av STEC som karakteriseras av att de ger blodiga diarréer. EHEC-stammarna har särskilt hög virulens och har speciella virulensfaktorer utöver de som ger A/E-

skador och Stx-produktion. Dessa virulensfaktorer är dock inte klarlagda och därför kan EHEC inte definieras annat än kliniskt. En virulensfaktor som har tydlig koppling till EHEC är produktionen av enterohemolysin, men denna räcker inte för att definiera EHEC-stammarna. I övrigt stör de cellernas nukleotidutbyte, signalsystem, fagocytos och programmerade celldöd med exakt samma 10 proteiner som redogjorts för i avsnittet om EPEC ovan.

STEC omfattar över 200 serotyper och EHEC-stammar har återfunnits i omkring 100 av dessa. Mest känd är serotypen O157:H7.

Smittkälla och smittspridning

Till skillnad från alla andra här beskrivna patogena koligrupper, kan STEC och då framför allt de högvirulenta EHEC-stammarna, spridas från djur till människor. Många EHEC-stammar lever i tarmkanalen hos framför allt nötkreatur. Hos ungdjuren kan de orsaka en övergående diarré men äldre djur koloniseras utan sjukdomssymptom. Även får, getter, grisar, kaniner, kycklingar, hundar, katter och vilda djur kan härbärgera humanpatogena STEC och EHEC. EHEC-stammar har även visats kunna kolonisera husflugor i kreatursstallen.

Från djurens avföring sprids bakterierna via livsmedel, främst kött och mjölk, men även vatten och grönsaker, till människor. Vid EHEC-utbrott är även kontaktsmitta från person till person vanlig.

Infektionsdos

De EHEC-bakterier som studerats mest, d v s O157:H7, är extremt högvirulenta och kan orsaka sjukdom i mycket låga doser: tiotals eller något hundratal bakterier är allt som krävs. För övriga STEC och EHEC varierar infektionsdosen.

Inkubationstid och symptom

För EHEC, som är bäst studerad, är inkubationstiden vanligtvis 3-4 dygn med en spridning på 1-8 dygn. Sjukdomens första symtom är buksmärtor och inte sällan en kort feberperiod. Därefter följer en vattnig diarré under ett eller två dygn. Ungefär hälften av de insjuknade drabbas samtidigt av uppkastningar. Därefter tilltar buksmärtorna och diarrén övergår till att bli blodig. Den blodiga diarrén pågår 4-10 dygn varefter sjukdomen självläker hos mer än 90 % av de insjuknade.

EHEC-komplikationer förekommer hos ungefär 10 % av smittade barn under 5 års ålder. Den typiska komplikationen är hemolytiskt uremiskt syndrom, HUS, som kännetecknas av hemolytisk anemi (blodbrist på grund av förstörda röda blodkroppar) och njursvikt. Trots intensivbehandling kan upp till 30 % få bestående men av HUS och 3-5 % av barnen dör. Även äldre kan drabbas hårt av EHEC och bland dem över 65 års ålder som utvecklar HUS beräknas 20 % dö.

För STEC som inte är EHEC stannar sjukdomsbilden vanligtvis vid en vattnig diarré, men enstaka HUS-komplikationer kan förekomma även med -dessa stammar.

Antibiotika har tidigare använts för att häva svåra sjukdomsfall, men senare data har indikerat att antibiotikabehandling i stället ökar risken för HUS, något som kan hänga samman med att bakterierna tycks svara med att producera mer toxiner då de utsätts för antibiotika.

Incidens

I USA anses den viktigaste EHEC-organismen, O157:H7, orsaka minst 20 000 infektioner och 250 dödsfall per år. Även i Europa är såväl utbrott som sporadiska fall av EHEC ganska vanliga, men i många europeiska länder är det andra serotyper än O157:H7 som dominerar. I tredje världen har EHEC varit ovanlig fram till helt nyligen då flera utbrott av O157:H7 konstaterats. Det förefaller därför som att vissa kloner av främst O157:H7 är på väg att spridas globalt.

I Sverige insjuknar enligt den officiella statistiken omkring 100 personer, mest barn, per år i O157:H7. Sedan 2004 har Smittskyddsinstitutet utökat anmälningsplikten till att omfatta alla EHEC oavsett serotyp och då har antalet fall ökat till 300 per år. Skåne och Halland är hårdast drabbade.

Den vanligaste smittspridningen i Sverige är person-till-person eller genom kontakt med djur. Att klappa kossor är trevligt men föräldrarna bör se till att barnen inte gör det om det inte finns tvål och vatten i närheten.

De mera harmlösa STEC-infektionerna är förmodligen vanliga men mörkertalet för dessa är stort inte minst därför att insatserna från bakteriologernas sida i så hög grad koncentrerats på O157:H7.

STEC-infektionen på cellnivå: hämning av proteinsyntes

Olika STEC-stammar kan uppvisa lokal eller diffus eller ibland också aggregativ adhesion. STECs första kontakt med tarmslemhinnan verkar därför kopplat till olika typer av fimbrier hos olika stammar. Hur de fungerar är inte känt. Till skillnad från flertalet andra enteropatogena koli så koloniserar STEC även tjocktarmen.

STEC producerar inte de knippe-bildande fimbrierna (Bfp) som hos EPEC ger den typiska lokala adhesionen. I nästa fas av infektionen uppstår däremot exakt samma *attachment and effacement*-skador som vid EPEC-infektion. Virulensfaktorerna är också desamma med Tir, esp-proteiner och intimin i huvudrollerna.

I den tredje fasen exporteras shigatoxinerna, antingen Stx1 eller Stx2 eller en kombination av båda, till tarmcellerna där de fäster på speciella receptorer. Tarmcellerna dödas genom att Stx inhiberar deras proteinsyntes.

Varför en del STEC-infektioner, de som benämns EHEC, går vidare till ett svårare förlopp med hemolytisk anemi och njursvikt är inte klarlagt. Men om toxinerna väl kommer fram till njurarna finns det på njurcellerna massor av de receptorer som Stx behöver och det är anledningen till att njurarna är särskilt mottagliga för toxinerna.

4. EAEC = Enteroaggregativt adherande E. coli

Historia och definition

Beteckningen EAEC stod ursprungligen för enteroadherande *E. coli*, alltså alla typer av adhesion. Ganska snart insågs att det fanns åtminstone tre adhesionssätt: lokal adhesion som är typiskt för EPEC, diffus adhesion som behandlas i nästa avsnitt (DAEC) samt aggregativ adhesion som behandlas här. De aggregativa bakterierna betecknades tidigare EAggEC vilket alltså numera förenklats till EAEC. (Det ska tilläggas att en del forskare fortfarande föredrar beteckningen EAggEC.)

Aggregativt adherande koli beskrevs första gången 1987.
EAEC definieras som kolibakterier vilka:
1. Adherar till odlade HEp-2-celler i ett aggregativt mönster (ungefär som tegelstenar med långsidan emot varandra), samt
2. *Inte* producerar värmelabilt LT eller värmestabilt ST.
Det bör påpekas att denna definition omfattar såväl patogena som apatogena kloner. Först när virulensfaktorerna är bättre utredda kan definitionen modifieras så att enbart enteropatogena kloner omfattas.

Smittkälla

EAEC sprids från människans avföring via livsmedel och vatten till andra människor. Smitta från djur till människor förekommer inte.

Infektionsdos

För vuxna försökspersoner krävs en mycket hög infektionsdos, över 100 miljoner bakterier. För barn är infektionsdosen inte känd, men två slutsatser kan nog dras. Den ena är att friska barn tolererar EAEC betydligt bättre än såväl EPEC som ETEC och att infektionsdosen alltså borde vara hög eller mycket hög också för barn. Den andra är att barn som lider av svår undernäring däremot insjuknar ganska lätt.

Inkubationstid och symptom

I typfallet orsakar EAEC, efter en inkubationstid på 20-48 timmar, en vattnig eller något

slemmig diarré som dock i ungefär en tredjedel av fallen i stället är utpräglat slemmig och även blodig. Uppkastningar och feber förekommer sällan. Varaktigheten är normalt runt en vecka men hos en del blir diarrén mycket långvarig, vanligtvis 3-4 veckor men ibland ända upp till ett halvår.

Incidens

Alltmera tyder på att EAEC är en mycket vanlig orsak till diarréer hos barn i utvecklingsländerna. Särskilt drabbade är de undernärda barnen. En del forskare anser att även diarréfria EAEC-infektioner kan vara en bidragande orsak till att barnen inte tillväxer normalt. I den industrialiserade världen är utbrott av EAEC ovanliga, men de är kända hos barn i sjukhusmiljö och hos AIDS-patienter. Även en hel del fall av turistdiarré hos vuxna friska misstänks vara orsakade av EAEC. Vid enstaka fall är det dock svårt att med säkerhet avgöra om EAEC varit orsaken eftersom det inte med säkerhet går att skilja patogena stammar från apatogena och många människor är bärare av apatogena stammar.

EAEC-infektionen på cellnivå: slemutsöndring

EAEC etablerar sig liksom ETEC i slemskiktet utanför tarmcellerna. Den aggregativa adhesionen innebär att de stavformade bakterierna klumpas ihop med långsidorna mot varandra i ett tegelstensmönster. Adhesionen orsakas av speciella ”aggregativa adhesionsfimbrier” (AAF).

Av okänd anledning stimuleras sedan tarmen att producera mera slem, vilket kan leda till en slemmig diarré men framför allt innebär att EAEC får möjlighet till en kraftig förökning i slemmet. Slemhinnan kan bli helt täckt av ett gelliknande slemlager där EAEC förekommer i extremt höga halter. Gelen har förmodligen betydelse för den närmast kroniska diarré som inte sällan ses med EAEC.

Hur det tredje stadiet av infektionen ser ut beror på vilken stam som bundit in. En del stammar ger ganska liten påverkan på tarmcellerna, andra har uppenbarligen cytotoxiner som dödar cellerna. Den blodiga diarré som en tredjedel drabbas av beror sannolikt på kraftfulla cytotoxiner men det är inte klarlagt vilka dessa är. En tänkbar kandidat är det plasmidburna enterotoxinet Pet.

Klonen O104:H4

Utbrottet sommaren 2011 i Tyskland med flera tusen insjuknade och många döda, orsakades av en mycket ovanlig klon, O104:H4. Klonen visade sig vara en enteroaggregativ stam som förvärvat förmågan att producera shigatoxin. Se vidare fallbeskrivningen *Den egyptiska smittan*.

5. DAEC = Diffust adherande E. coli

Historia och definition

Som DAEC räknas för närvarande bakterier vilka:
1. Adherar till odlade HeLa- eller HEp-2-celler i ett ”diffust” mönster, samt
2. Inte ger A/E-skador; inte producerar LT, ST, eller Stx; och inte heller bär någon av de gener som förknippas med virulens hos övriga koligrupper.

Självfallet är detta en otillräcklig definition eftersom den inkluderar såväl patogena som ofarliga stammar. Först då virulensfaktorerna hos DAEC är klarlagda kan man med någon säkerhet avgöra hur vanliga DAEC-infektioner är.

Smittkälla

Liksom för de flesta andra grupperna är det människans tarmkanal som är den enda reservoaren för virulenta DAEC. Det finns inga uppgifter som tyder på att djurstammar skulle infektera människan.

Infektionsdos

Det mesta tyder på att infektionsdosen för DAEC är hög eller mycket hög, d v s miljontals bakterier antas krävas för att orsaka infektion.

Inkubationstid och symptom

Det finns inga säkra uppgifter om någotdera. DAEC har associerats med persistent diarré, d v s diarré i mer än 14 dagar, i flera undersökningar.

Incidens

DAEC är vanliga och isoleras ofta från diarréfall, men de isoleras å andra sidan ofta också från friska kontrollgrupper. Lika ofta, anser en del forskare som tvivlar på att DAEC är patogena. Det finns dock några studier som ganska klart korrelerar DAEC med diarré, och då inte sällan långvarig diarré, hos barn över 2 års ålder. Hos spädbarn har man däremot inte kunnat se någon korrelation mellan diarré och DAEC. Möjligen skyddar bröstmjölk mot infektion, åtminstone tyder försök som visar att komponenter i bröstmjölk hindrar DAEC att adhera till odlade celler på det.

DAEC är vanliga vid urinvägsinfektioner hos vuxna, en del källor uppger att en tredjedel av alla återkommande urinvägsinfektioner orsakas just av DAEC.

DAEC-infektionen på cellnivå: förlängning av mikrovillierna

Eftersom virulensfaktorer hos DAEC är okända, är det omöjligt att ge en bild av hur (eller ens om) DAEC orsakar infektion. Hos en del stammar har man på odlade celler observerat ett salmonella-liknande angreppssätt. DAEC polymeriserar då tarmcellernas membranproteiner

med följd att de fingerliknande mikrovillierna på cellernas yta förlängs. Bakterierna hamnar i en fördjupning av mikrovillierna och omsluts så småningom helt av dessa. Men till skillnad från salmonella (eller EIEC som har ett snarlikt angreppssätt) stannar DAEC utanför tarmcellen och invaderar alltså inte.

De senaste åren har en teori om att DAEC med en viss typ av fimbrie utlöser en kemisk kaskad hos värdecellen vilket leder till att polymorfonukleära neutrofiler (en form av vita blodkroppar) aktiveras tillsammans med proinflammatoriska cytokiner: de egna cellernas försvarsmekanismer skulle i så fall förklara inflammationerna.

6. EIEC = Enteroinvasiva E. coli

Historia och definition

EIECs förmåga att orsaka dysenteriliknande diarré har varit känd sedan 1971. Då inträffade ett större utbrott i USA som var orsakat av importerad fransk brie och samma år konstaterades att EIEC orsakade diarré hos försökspersoner. EIEC definieras som invasiva kolibakterier. Invasiviteten kan undersökas på odlade HeLa-celler, men mera vanligt är att misstänkta bakterier testas på närvaron av invasiva gener med molekylärgenetisk teknik. Shigella har samma invasiva gener som EIEC men ett annat metaboliskt mönster.

Smittkälla och smittspridning

Reservoaren för EIEC är människans tarmkanal. Dokumenterade utbrott har varit vatten- och livsmedelsburna men även person-till-personsmitta har förekommit, dock i väsentligt mindre utsträckning än för shigella.

Infektionsdos

De mest virulenta stammarna av EIEC har en sannolikt en mycket låg infektionsdos. För detta talar bland annat den person-till-person-smitta som ibland dokumenterats. Infektionsdosen tros dock vara högre än för de mest virulenta shigellastammarna för vilka ett tiotal bakterier räcker för att orsaka sjukdom. För EIEC-stammar som enbart ger lindriga diarréer är infektionsdosen däremot hög, många miljoner bakterier.

Inkubationstid och symptom

Inkubationstiden för EIEC-infektioner varierar, allt mellan 12 timmar och 6 dygn anses normalt. Hos mer än 90 % av de insjuknade är diarrén vattnig och relativt lindrig. Buksmärtor, feber eller frossa och uppkastningar är vanliga sekundära symptom. Varaktigheten är normalt 5-10 dygn varefter sjukdomen självläker. Hos en minoritet, uppgifterna varierar från mindre än 10 % till var tredje, övergår den vattniga diarrén till att bli dysenteriliknande med blod och slem i avföringen. Hos en liten del av de dysenteridrabbade kan komplikationer i form av hemolytiskt uremiskt syndrom symptom (se avsnitt 3. STEC ovan) följa. För barn i

utvecklingsländer kan dysenteri vara livshotande.

Incidens

Den globala incidensen av EIEC är okänd eftersom man i de länder där dysenteri är vanlig inte har haft resurser att skilja på shigella och EIEC. Men även om EIEC, som man tror, bara orsakar några procent av dysenterifallen är det tillräckligt för att beteckna bakterierna som svåra patogener: shigelladysenteri anses kosta livet för över en halv miljon människor årligen. I utvecklingsländerna är EIEC-infektioner ganska vanliga hos barn över 6 månaders ålder. Antikroppar i bröstmjölk skyddar mot EIEC och därför ger amning ett gott skydd.

I den industrialiserade världen är EIEC-utbrott ovanliga. En del av de sporadiska fall som tillskrivs shigella orsakas helt klart av EIEC men det är först på senare år som man börjat göra åtskillnad mellan shigella och EIEC så andelen är osäker.

Möjligen är det så att EIEC uppträder endemiskt. Fjärran Östern, Sydamerika och Östeuropa förefaller ha särskilt stora problem med EIEC. En epidemiologisk studie av 11 tyska fall av EIEC-infektioner visade att samtliga var importerade från öst, framför allt från Rumänien.

EIEC-infektionen på cellnivå: drama i fem akter

Liksom EHEC koloniserar EIEC tjocktarmen. Vid direktkontakt mellan bakterie och tarmcell sänder EIEC ut ämnen som omväxlande polymeriserar och depolymeriserar aktinet i tarmcellernas membran. Följden blir att membranet får ingröpningar vari bakterien sjunker in. Till slut ligger bakterien i en blåsa inne i cellen helt omsluten av membran.

Bakterien har då lyckats ta sig in tarmcellen utan att förstöra den. Nästa fas blir att lysera membranet och i tredje fasen förökas bakterierna inuti tarmcellen. Fjärde fasen innebär att bakterierna förflyttar sig till cellens kanter. Eftersom EIEC till skillnad från flertalet övriga koli saknar flageller måste rörligheten åstadkommas på annat sätt. Och återigen är det cellernas aktin som utnyttjas. Genom att polymerisera aktin i ena ändan av bakterien byggs en pelare upp som genom att tillföras nytt aktin knuffar ut bakterien mot kanten. Processen är likartad den som EPEC använder för att bilda piedestaler av aktin utanför tarmcellen. Femte fasen innebär att EIEC när den väl nått kanten på cellen sprids till närliggande celler.

Ur klinisk synvinkel inleds sjukdomsbilden alltid med en vattnig diarré. Den orsakas sannolikt av enterotoxiner och ett sådant, Shet-2, har hittats hos EIEC-stammar. I vilken fas av invasionen som enterotoxinerna avges är inte känt. Egentlig dysenteri, alltså blodig diarré, som bara drabbar en minoritet av de smittade är däremot en direkt följd av själva invasionen. Vid svåra infektioner uppstår vävnadsskador som visar sig i blodig avföring. Vävnadsskadorna ger också upphov till en kraftig antiinflammatorisk reaktion som resulterar i slemavsöndring.

7. Shigella

Som vi tidigare varit inne på, ska de fyra shigella-arterna egentligen ses som en sjunde variant av patogena *E. coli*. Men shigella redovisas alltid separat i andra sammanhang och vi följer traditionen. Därför återfinns shigella i ett eget kapitel senare i boken.

LIVSMEDEL: TILLVÄXT

Temperatur

E. coli är utpräglat mesofil och flertalet stammar växer inom temperaturintervallet 8-48°C. Enstaka stammar av framför allt STEC växer ända ned till 5°C men då endast långsamt och under i övrigt optimala betingelser. I princip kan man därför utgå ifrån att kyllagrade livsmedel är säkrade för *tillväxt* av *E. coli*. Kolibakterier är känsliga för upphettning och dör snabbt vid pastörisering.

Syre

Kolibakterierna är fakultativa anaerober och kan alltså tillväxa i såväl luftlagrade som vakuumförpackade eller gaslagrade livsmedel.

pH

Kolibakterierna är ganska ordinära med avseende på pH. Den nedre gränsen för tillväxt är pH 4.4 vilket betyder att fermenterade produkter och lagrade ostar inte innebär någon risk för tillväxt. De stammar som är virulenta i mycket låga doser, framför allt EHEC, överlever dock i veckor eller till och med månader vid pH 3-4. Därför kan även syrliga produkter som i andra sammanhang anses helt säkra; till exempel fermenterad korv, yoghurt, majonnäs och fruktjuicer fungera som smittspridare.

Saltning och rökning

Lättare saltning och rökning har ingen effekt på *E. coli* men om salthalten når 5-6 % som i vissa spickeskinkor eller om rökningen är så kraftig att den torkar ut ytan stoppas bakteriernas tillväxt.

LIVSMEDEL: PRODUKTER

Smittkällor

Reservoaren för humanpatogena stammar av EPEC, ETEC, EAEC, EIEC, DAEC och merparten av STEC är människans tarmkanal. Genom bristande hygien sprids bakterierna från avföring till livsmedel och vatten och sedan vidare till människor.

Reservoaren för vissa EHEC, främst O157:H7, är – förutom människan – tarmkanalen hos främst nötkreatur men även andra djur. Från djurens kött och mjölk – eller vid direktkontakt med djuren – kan bakterierna sedan spridas till människor.

Kött

Utbrott av EHEC, och då framför allt O157:H7, är starkt kopplat till konsumtion av nötkött. Det första utbrottet i USA 1982 orsakades av dåligt stekta hamburgare och alltsedan dess kopplas hamburgare och O157:H7 intimt samman. Med viss rätt, den moderna tidens stordrift innebär att köttråvaror från många håll blandas centralt och distribueras till ibland miljontals konsumenter. Ett enda infekterat köttparti kan smitta ned stora mängder köttfärs i en centraliserad hamburgerproduktion eftersom O157:H7 (och en del andra EHEC) har så extremt låg infektionsdos. Även kallrökt korv är en ganska vanlig smittkälla, Skånes största utbrott med 30 insjuknade inträffade 2002 och då var en lokalt producerad kallrökt korv orsaken.

EHEC har en klar koppling till nötkött därför att många av de stammar som orsakat utbrott härrört från tarmkanalen hos djuren. Vid styckningen har sedan köttet smittats från djurens avföring. Undersökningar från olika delar av världen har visat att 0.1-10 % av ungdjuren härbärgerar EHEC-bakterier.

STEC-stammar förekommer praktiskt taget alltid i tarmen hos köttdjur, framför allt nötkreatur och får. De sprids sedan lätt till köttet och molekylärgenetiska undersökningar från flera västländer pekar på att 50-90 % av nöt- och fårköttet innehåller åtminstone små mängder Stx-producerande bakterier. Flertalet av dessa djurstammar är emellertid helt ofarliga för människor. Även ETEC-stammar påvisas i hög omfattning i många djurs tarmkanal men de orsakar inte sjukdom hos människan.

Spädgrisar och spädkalvar kan liksom spädbarn drabbas av EPEC men receptorerna i tarmen för dessa stammar är olika för olika djur och djurpatogena stammar påverkar därför inte människan. För atypiska EPEC, alltså sådana stammar som kan orsaka sjukdom trots att de saknar de vanliga adhesionsmekanismerna, är det mera oklart om smitta från djur till människa förekommit. Det är möjligt att atypiska EPEC är en speciell undergrupp som i sällsynta fall kan överföras från djur till människa, det är också möjligt att det i sådana fall rört sig om STEC-stammar som förlorat förmågan att producera shigatoxiner.

För EAEC och DAEC gäller också bedömningen att de inte kan överföras från djur till människa även om man för dessa grupper ännu inte är klar över virulensfaktorerna. EIEC förefaller precis som shigella ha primater som sin enda nisch.

Quarterpounder O157:H7 Meal

Problemet med hamburgerkött visades med all önskvärd tydlighet efter ett utbrott 1997 då 15 amerikaner i Colorado insjuknade i O157:H7. Smittan spårades till Hudson Foods i Nebraska, storleverantör till Burger King. Till att börja med drog Hudson tillbaka 500 000 kg hamburgare från två dagsproduktioner. Men efter noggrannare inspektion av företaget upptäcktes så stora hygienbrister i produktionen samt ytterligare kontamination av deras quarter-pounder att fabriken temporärt stängdes. Hudson Foods tvingades samtidigt dra in 12 miljoner kg, motsvarande 100 miljoner hamburgare. Burger King sa upp kontraktet.

Lunch i Wishaw Parish Church Hall

I november 1996 deltog ett hundratal pensionärer i en kyrklunch i den lilla sömniga staden Wishaw i centrala Skottland. Trots brinnande galna-kosjukan-hysteri stod oxstek med brunsås på menyn. Ett par dagar efter lunchen började rapporter om en svår infektionssjukdom i Wishaw att nå Lanarkshires regionala sjukhusstyrelse. Den första dagen rapporterades 15 fall, men inom tre veckor skulle utbrottet svälla till 501 insjuknade varav 151 krävde sjukhusvård och 21, samtliga över 65 års ålder, dog. Det konstaterades snabbt att O157:H7 låg bakom utbrottet och att flera av de första 15 patienterna hade deltagit i kyrklunchen vars mat levererats av en lokal charkuteributik, John Barr and Sons.

Spåret till John Barr verkade dock svalna när många av de följande fallen kom från platser långt utanför Wisham och utan koppling till charkuteributiken. Det skulle dröja ytterligare sex dagar innan fallet löstes, sex dagar då människor helt i onödan infekterades och dog av O157:H7 i den dödligaste matförgiftning som Skottland upplevt. För det visade sig att det första spåret varit riktigt och att samtliga inblandade charkbutiker hade fått sitt kött levererat av John Barr and Sons. Dessa hade en mindre känd och dåligt redovisad sidoverksamhet med leverans till, som det visade sig, 85 butiker och andra storkunder som sålde köttet vidare.

Reservoaren var John Barrs kokkittlar och – vilket förmodligen var det viktigaste ur smittspridningssynvinkel – en vakuumpaketeringsmaskin.

Fisk och skaldjur

Fisk och skaldjur härbärgerar inte humanpatogena kolistammar. Men de kan naturligtvis kontamineras med sådana om hygienen brister. Fiskprodukter är därför ibland orsak till koliutbrott. I Japan är de till och med vanliga, där har sushirätter som rå fisk och saltad laxrom spritt svåra O157:H7-infektioner. Det mest omfattande fiskrelaterade koliutbrottet skedde också i Japan då 800 middagsgäster i Osaka förgiftades av en ST-producerande stam av ETEC.

Mejeriprodukter

Opastöriserad mjölk kommer som god tvåa efter köttprodukter när det gäller spridning av

EHEC-bakterien O157:H7. De flesta industriländer har inskränkningar eller till och med förbud mot att saluföra opastöriserad mjölk. En stor del av de fall som ändå inträffar hänger samman med besök på lantgårdar, inte minst av skolklasser där eleverna bjudits på opastöriserad mjölk. Även i Sverige har flera sådana fall inträffat.

Också färskostar och korttidslagrade ostar som vitmögelostar är påtagligt ofta inblandade vid 0157:H7-utbrott. Eftersom EHEC-baktererierna har god överlevnad och smittar vid låg infektionsdos är den här typen av ostar inte säkra. Däremot är lagrade hårdostar mycket osannolika som smittspridare. Utöver EHEC har det också förekommit fall av ETEC- och EIEC-utbrott efter konsumtion av färskost och vitmögelost.

Vegetabilier

Några av de största utbrotten med O157:H7 härrör från vegetabilier. Groddar är den ojämförligt vanligaste orsaken och har bland annat orsakat världens mest omfattande utbrott då nästan 13 000 japanska skolbarn insjuknade varav 12 dog. Även i USA finns flera fall registrerade. I Nordtyskland spreds en smitta försommaren 2011 som drabbade över 4000 personer varav 53 dog (se fallbeskrivningen *Den egyptiska smittan*). Just groddar är för övrigt en av de få färska vegetabilier där en massiv tillväxt av koli kan förekomma genom kombinationen av hög fuktighet och rumstemperatur vid groningen. Därför kan även ETEC växa till sådana halter att de orsakar sjukdom vilket vi kunnat notera också i Sverige. Utöver groddar är det främst grönsallater som orsakat större utbrott av O157:H7. Sveriges hittills största utbrott av ehec-infektion drabbade 135 personer, främst vuxna, i Halland och Västra Götaland och orsaken var isbergssallat odlad i Halland. Sallaten hade bevattnats med vatten från en å som var förorenad med kodynga.

I Blekinge fick för några år sedan en kvinna en ehec-infektion efter att ha ätit svamp som hon plockat i en kohage. I ett större norskt utbrott drabbades 13 barn av njursvikt efter att ha ätit salami, men det visade sig vara importerade kryddor i korven som var smittkällan.

Vegetabilier i form av tofu har också orsakat ett utbrott av EIEC-infektion i Japan.

Var är hamburgaren?

Hösten 1996 började en våg av O157:H7-fall skölja över USA. Det var en speciell klon som isolerades från insjuknade i flera delstater. Totalt insjuknade 70, huvudsakligen barn, varav 14 utvecklade HUS. Ett barn dog. Myndigheterna drog igång sin undersökning med standardfrågeformuläret men ingen gemensam nämnare kunde hittas. Med de tidigare erfarenheterna av O157:H7 kretsade frågorna kring hamburgare och andra välkända riskfaktorer.

En av de drabbade familjerna tillhörde dock inte den förväntade riskgruppen eftersom de var vegetarianer. I en andra, utökad frågeomgång blev det napp: alla drabbade hade druckit äpplejuice, dessutom opastöriserad och av samma märke och, visade det sig, samma produktionsdatum. Men de följande bakteriologiska undersökningarna vid Odwalla i Diuba, Kalifornien gav negativt resultat. Inga O157:H7 hittades. Men sambandet var ju solklart och en omfattande och tidsödande testning av redan buteljerade flaskor påbörjades. Flera tusen testades innan man äntligen hittade en enda som var positiv för O157:H7. Stammen var identisk med de som orsakat utbrottet och sambandet kunde alltså säkerställas. Historien visar svårigheten med att identifiera orsaken till utbrott av bakterier som är sjukdomsframkallande även i mycket låga doser. Det kan gå tusentals negativa prover på ett enda positivt.

Fruktjuicer har mycket låga pH-värden, oftast mellan 3 och 3.8. Fruktjuicer hade i och för sig redan tidigare kopplats till ett utbrott av O157:H7, men kunskapen hade inte riktigt nått ut. Hur bakterierna hamnat i äpplejuicen fick man aldrig utrett, men den kanske intressantaste teorien var att företaget använt fallfrukt från en äppelodling där hjortar var vanligt förekommande. Hjortarna testades – givetvis – och bar mycket riktigt på O157:H7, men just den klon som orsakat smittan lyckades man aldrig hitta. Efter Odwalla-fallet har andra studier visat att opastöriserade fruktjuicer sannolikt stått för en hel del oupptäckta sporadiska fall av O157:H7.

Fallet slutade inför rätten: Odwalla dömdes till 1.5 miljoner dollar i böter. Det kan tilläggas att Odwalla numera pastöriserar sina juicer.

Den egyptiska smittan

Den 2 maj 2011 fick Smittskyddet i Tyskland in de första fallen med ehec-infekterade människor i Nordtyskland. Det skulle bli många, många fler. Två månader senare, den 2 juli, var utbrottet över och då hade 4400 tyskar drabbats och 53 avlidit. Det ovanliga med ehec-utbrottet var dels att flertalet insjuknade var vuxna, dels att så mycket som 25 % drabbades av hemolytiskt uremiskt syndrom (HUS). Turister från många andra europeiska länder och Nordamerika drabbades också, i Sverige insjuknade 53 varav 18 med HUS och utbrottet skördade här 1 dödsfall.

Normalt är EHEC-smitta en zoonos och man avrådde inledningsvis turister från att äta nötkött i Nordtyskland. Senare, efter kontroll av 8000 livsmedelsprodukter, hittade man ehec-stammar på gurkor importerade från Malaga och Almeria i Andalusien. Gurkimporten stoppades tills man fått klart för sig att det inte rörde sig om samma bakterieklon på gurkorna och hos de drabbade. De spanska producenterna var inte glada över stoppet som kostade dem stora summor och hotade med rättsliga åtgärder. (Å andra sidan har Spanien många gånger exporterat livsfarliga grönsaker över hela Europa utan att spanjorerna fått betala några böter för det.)

Den aktuella bakterien var av en mycket ovanlig serotyp, O104:H4 och hade egentligen bara påträffats två gånger tidigare, i Centralafrika 2001 och i Sydkorea 2004. Den tyska stammen var så aggressiv att man spekulerade i om det kunde röra sig om en mutation och krigsrubrikerna låg nära.

Efter en månad lyckades man hitta klonen på ett livsmedel, groddar som producerades av en stor ekologisk odlare i den lilla staden Bienenbüttel, några mil söder om Hamburg. Nu misstänktes att den ekologiska odlingen hade smittat groddarna med avföring och verksamheten stängdes. Men det visade sig att de infekterande groddarna kunde följas tillbaka till två partier bockhornsklöver som importerats 2009 och 2010 från Egypten. Undersökningar i Frankrike visade på samma källa.

Så småningom stod det klart att den aktuella stammen egentligen var en slags hybrid mellan en ehec-stam och en enteroaggregerande stam. Man gjorde snabbt en fullständig kartläggning av klonens arvsmassa och det stod klart att stammen var en EAEC-stam som lyckats förvärva shigatoxin från någon STEC-stam. I och med att klonen i grunden var en EAEC-stam stod det också klart att någon smitta från djur inte var aktuell, allt tyder på att det var mänsklig avföring som smittat bockhornsklövern.

Senare data tyder på att klonen, om än ovanlig, är endemisk i åtminstone Turkiet, Afghanistan, Egypten och Tunisien. På hösten 2011 smittades 8 franska turister av O104:H4 vid besök i Turkiet (dock inte av exakt samma klon).

Vatten

Dricksvatten infekterat med O157:H7 har orsakat åtskilliga utbrott i västvärlden. Den vanligaste orsaken är att brunnar eller ytvatten infekterats av kogödsel. Även fall av ETEC-utbrott från dricksvatten har inträffat, men då har smittkällan varit kommunalt avloppsvatten som trängt in i dricksvattenledningarna. Gemensamt för alla utbrott är att klorering inte utförts eller varit bristfällig.

"Det visste vi inte och den har inte fungerat på länge"

Den lilla staden Walkerton i den kanadensiska delstaten Ontario har bara 4800 invånare. På försommaren 2000 började många av dem att insjukna i O157:H7. Hälsoskyddet misstänkte direkt att drickvattnet var orsaken men vattenbolaget förnekade ihärdigt några problem. Så småningom utfärdade hälsoskyddet ändå order om att koka dricksvattnet. Men det var för sent. Smittan hade nått hela staden och under de närmaste dagarna skulle totalt tusen personer insjukna och elva dö.

Vattenbolaget hade själva sedan en tid övertagit ansvaret för kolitesterna. Och egenkontrollen hade fungerat, åtminstone på sitt sätt. Testresultaten visade nämligen att vattnet hade blivit koliinfekterat redan fem dagar innan hälsoskyddet informerades. Men utbildning saknades, de ansvariga visste helt enkelt inte att bakterien kunde vara farlig. Som alltid i sådana här fall hade kloreringen dessutom misslyckats och operatörerna medgav att ”maskinen för dosering av klor inte hade fungerat på ett bra tag”.

Vid utredningen ansågs den troligaste orsaken till smittan vara att kodynga runnit till vattentäkterna på grund av ett ihärdigt regnande.

Det ojämförligt största problemet med infekterat dricksvatten gäller dock utvecklingsländerna och där är huvudproblemet spridning av ETEC och EPEC som tillsammans beräknas döda en miljon barn varje år. Till detta kommer shigella och alla de övriga koligrupperna som dödar uppåt en halv miljon barn. Men för dessa barn finns inga fallbeskrivningar.

VIRULENSFAKTORER

1. EPEC

BFP – Bundle forming pili

Den lokala adhesion som är typisk för EPEC orsakas av de fimbrier (utskott) som kallas BFP, på svenska ungefär ” knippebildande pili”. Det finns flera varianter av BFP. Generna finns vanligtvis på en plasmid som kallas EPECs adhesionsfaktor (EAF). Såväl själva genen som plasmiden används för att påvisa EPEC. Det är dock inte alla EPEC som bär på EAF-plasmiden. EPEC som saknar plasmiden betecknas som atypiska EPEC.

Esp – Escherichia coli secreted proteins

EPEC utsöndrar en rad så kallade Esp-proteiner. Åtminstone tre av dem har betydelse för virulensen: EspA, Esp B och Esp D, som bildar en kanal från bakterien till tarmcellen genom vilken de två viktigaste proteinerna, Tir och intimin, transporteras. Ytterligare två exporterade proteiner anses av en del forskare ha betydelse för virulensen: det celltoxiska Esp F och det mitokondrieassocierade proteinet, Map.

Tir – Translocated intimin receptor

EPEC binder mycket hårt in till tarmcellerna och de kan göra det därför att de överför Tir, en egentillverkad och skräddarsydd receptor till bindningsproteinet intimin. Tir landar i tarmcellernas membran.

Intimin

Intimin är det sista steget i EPECs mycket kraftiga inbindning till tarmcellerna. Esp-proteinerna har bildat en injektionsnål genom vilken receptorn Tir transporterats och lagts på plats i tarmcellen. Nu binds bakterien och tarmcellen intimt ihop genom att bakteriens yttre membranprotein – intimin – förankras till Tir. Det är först nu som de karakteristiska *attachment and effacement* (A/E; ungefär: infästning och utplåning)-skadorna uppkommer genom att intimin-Tir-komplexet bland annat orsakar polymerisering av aktin och andra membranproteiner i tarmcellen. Det finns åtminstone ett 20-tal varianter av intimin. Intimin kodas av en gen för entero-attaching-effacing, *eae*, som tillsammans med generna för Esp och Tir ingår i en gemensam grupp av gener på kromosomen som kallas LEE (*locus of enterocyte effacemen*t). Genetiska sonder riktade mot *eae* används vid påvisning av EPEC.

A/E-skador kan orsakas inte bara av EPEC utan också av STEC samt vissa stammar inom andra släkten av Enterobacteriaceae, *Citrobacter* och *Hafnia*.

2. ETEC

CFA – Koloniseringsfaktor-antigen

De så kallade koloniseringsfaktorerna hos ETEC är helt enkelt fimbrier (utskott), men det finns i dagsläget 25 kända varianter av dem och fler lär upptäckas. Fimbrierna är påtagligt specifika i sin inbindning vilket bland annat innebär att stammar som koloniserar olika djurslag har olika fimbrier. Djurstammarnas CFA fungerar därför inte i människans tarmkanal. Det finns en viss begreppsförvirring när det gäller kolonisationsfaktorerna och med undantag för den först upptäckta (CFA/I) rekommenderas det numera att de i stället betecknas som CS (*coli surface antigen*). Generna för CFA (CS) bärs på plasmider.

ST, värmestabilt enterotoxin

Det värmestabila toxinet är egentligen två med helt olika verkningssätt: STa (=ST-I) och STb (=ST-II). Människor drabbas nästan uteslutande av STa som är en peptid på 18-19 aminosyror med en molvikt på 2 kDa. STa har samma men kraftigare verkan som det mänskliga hormonet guanylin och binder till samma membranenzym, guanylatcyklas. Effekten blir överproduktion vilket ökar halten cykliskt GMP som i sin tur anses stimulera kloridsekretionen med diarré som följd. En alternativ förklaring där i stället utbytet mellan väte- och natriumjoner är orsaken till diarrén har föreslagits. STa förekommer inte enbart hos koli utan också hos *Yersinia enterocolitica* och vissa stammar av *Vibrio cholerae*.

STb finns framför allt hos ETEC-stammar i grisar, men enstaka STb-fynd har också gjorts i humana ETEC-stammar. STb består av ett 48 aminosyrors protein med en molvikt på 5 kDa. Det är inte helt klarlagt hur toxinet verkar, men effekten av STb är att vätskeabsorberande

mikrovilli på tarmcellernas yta förstörs och att utsöndringen av bikarbonat ökar. STb har bara hittats hos kolibakterier.

Generna för ST bärs i regel på plasmider, antingen ensamt eller tillsammans med LT och alltid tillsammans med stammens kolonisationsfaktor. ST-toxinerna överlever kokning i åtminstone 15 minuter.

LT, värmelabilt enterotoxin

Det finns två immunologiskt helt olika former av det värmelabila enterotoxinet, LT-I och LT-II, men det är bara LT-I som är av intresse här. LT-II finns endast hos kolistammar som koloniserar djur och det är ofarligt för människor.

LT-I är ett högmolekylärt A-B-protein på 86 kDa som består av fem identiska B-delar vilka mycket starkt fäster in till en speciell gangliosid på tarmcellens yta. Därefter transporteras den aktiva A-delen på 28 kDa genom tarmcellens membran. A-delen stimulerar adenylatcyklas så att den intracellulära halten av cykliskt AMP ökar. Det medför att kloridjoner pumpas ut ur cellen och följden blir en osmotisk diarré. Möjligen finns även andra angreppssätt för LT-I som också leder till diarré. LT-I är mycket likt koleratoxinet med vilket det delar 80 % i proteinsekvens.

Ungefär var fjärde ETEC-stam producerar enbart LT, medan runt var tionde producerar såväl LT som ST. Generna för LT eller LT+ST bärs på samma plasmid som kodar för stammens kolonisationsfaktor. Hos åtminstone en del stammar som producerar LT finns det uppgifter om ett invasivt protein som underlättar adhesion och invadering av odlade humana tarmceller. Dess betydelse för bakteriernas virulens är inte klarlagd.

LT förstörs snabbt av värme, 60°C under 15 minuter räcker för inaktivering.

3. STEC

A/E-skador

Esp, Tir och intimin delar STEC med EPEC och dessa virulensfaktorer är behandlade i avsnitt 1 om EPEC. Det som kan noteras är att Tir-receptorn hos STEC aktiveras på ett annorlunda sätt (hos EPEC tyrosinfosforyleras Tir när det förankras, men det sker inte hos STEC).

Stx, shigatoxiner

STEC-stammar kan producera endera eller båda av två immunologiskt skilda toxiner, Stx1 och Stx2. Stx1 är identiskt med det toxin som produceras av *Shigella dysenteriae* 1, medan Stx2 finns i flera olika varianter. En enskild stam kan faktiskt samtidigt producera flera olika varianter av

Stx2.

Båda toxinerna har samma uppbyggnad: de är AB-proteiner där B-delen precis som hos LT består av fem identiska enheter, hos Stx på totalt 38 kDa. B-delen binder till en glykolipid-receptor (globotriaosylceramid, Gb_3) som finns hos många celler, däribland tarmceller, njurceller och de odlade HeLa- och Verocellerna. När toxinet binder in överförs den aktiva delen av det 32 kDa stora A-proteinet in i cellen där det stoppar proteinsyntesen genom att skada ribosomerna. Resultatet blir att cellerna dör. Stx inducerar också ett kemiskt försvar (cytokininer) från kroppens makrofager som gör cellerna mera mottagliga för toxinet.

Stx1 är enhetligt uppbyggd hos alla STEC medan Stx2 däremot finns i ett otal olika versioner: det är B-delen som varierar vilket medför att olika Stx2-varianter binder in till olika receptorer. Om en sådan receptor är specifik för ett visst djur kan människan inte drabbas av just denna form. Men receptorerna kan också vara desamma för människor och djur, så många ”animala STEC” kan även ge sjukdom hos människan. Produktion av Stx2 är särskilt vanlig hos EHEC-stammar.

De receptorer som Stx binder in till finns i mycket hög frekvens hos människans njurceller och det är anledningen till njursvikten vid de svåra EHEC-fallen. Stx förs då till njurarna där de fäster och slår ut njurcellerna i så hög grad att njurarna upphör att fungera.

Generna för Stx finns på en i kromosomen integrerad bakteriofag. Produktionen av åtminstone Stx2 ökar kraftigt om bakterierna utsätts för antibiotika.

Enterohemolysin

Nästan 90 % av de humana STEC-stammarna producerar ett hemolysin. Det förefaller ha betydelse för virulensen men det är oklart hur. Det faktum att en hel del stammar som är involverade vid svåra HUS-symptom inte bär på generna för enterohemolysinet visar också att det inte är absolut nödvändigt för virulensen. Enterohemolysinet bärs på en 60 MDa plasmid.

pO157-plasmid

Nästan alla stammar av serotypen O157:H7 bär på en plasmid som kallas pO157. Även flertalet av övriga humana STEC-stammar bär på plasmiden som fått betydelse för molekylärgenetisk påvisning av stammarna. Man misstänker att plasmiden innehåller gener som har betydelse för adhesionen.

4. EAEC

AAF, aggregativa adhesionsfimbrier

Aaf gör att bakterierna autoaggregerar i den tegelstensmosaik som är så typisk för EAEC. Dessa bakterieklumpar bildas i tarmkanalens mukuslager. Generna för de två Aaf som studerats (det finns sannolikt många eftersom bara en liten del EAEC-stammarna är positiva för de kända varianterna) finns på en 65 MDa plasmid som kallas pAA.

EAST-1, enteroaggregativt (värme-)stabilt toxin-1

Många EAEC producerar ett litet värmestabilt enterotoxin på 4 kDa som påminner om ST hos ETEC. När EAST-1 upptäcktes i början av 90-talet trodde man att enterotoxinet gav förklaringen till EAECs enteropatogenitet. Men senare har det visat sig att EAST-1 produceras av många stammar inom såväl EPEC, ETEC och STEC samt av ungefär 20 % av de stammar som betraktas som helt ofarliga. Betydelsen, om någon, är därför fortfarande oklar.

PET, plasmid-encoded toxin

Pet, det värmelabila 104 kDa toxin som finns på Aaf-plasmiden, är ett dokumenterat enterotoxin och har också förmågan att tränga in i odlade HEp-2-celler. Möjligen kan Pet förklara, eller vara en del av förklaringen till, EAECs förmåga att orsaka svåra diarréer. Det krävs dock mer undersökningar för att fastställa detta.

5. DAEC

De enda virulensfaktorer som mera noggrant studerats är adhesinerna, alltså de proteiner och fimbrier som medverkar till att DAEC adherar i ett diffust mönster. Virulenta DAEC producerar flera proteiner som betecknas Afa samt fimbrier kallade Dr, tillsammans går de under benämningen Afa/Dr-familjen. Afa/Dr kan förklara inbindningen till värdceller, men knappast hela virulensförmågan. Det är dock känt att DAEC exporterar en del proteiner som liknar *esp*-proteinerna hos EPEC, men forskningen om dessa proteiner är fortfarande i sin linda.

De senaste två åren har man i cellodlingar kunnat konstatera att DAEC utlöser en ”nedbrytningsaccelererande” faktor kallad DAF (*Decay Accelerating Factor*) hos cellerna tillsammans med cytokinproduktion som är cellens svar på infektion. Detta i sin tur leder till att vita blodkroppar (närmare bestämt polymorfonukleära neutrofiler, PMN) samlas vid bakterierna och att cellerna svarar med en oxidativ kaskad. DAEC verkar dock kunna stå emot PMN ganska bra och dessutom reducera deras livslängd. Kroppens egna försvarsmekanismer kan alltså vara en bidragande anledning till den långvariga diarrén hos barn liksom de återkommande urinvägsinfektionerna hos vissa vuxna.

Shet-2, shigella enterotoxin 2.

Fyra av fem stammar av EIEC och shigella producerar ett enterotoxin som kallas shigella enterotoxin 2. Dess verkningssätt är inte klarlagt men Shet-2 antas ha betydelse för den vattniga diarré som majoriteten av EIEC-infektionerna begränsas till och som också inleder symptomen vid de svårare dysenterifallen. Shet-2 är ännu inte renframställt men det antas vara ett A-B-protein (se LT-toxinet ovan) med en beräknad molvikt på 63 kDa. Även stammar där generna för Shet-2 tagits bort har kvar en reducerad enterotoxinaktivitet vilket tyder på att de producerar ytterligare enterotoxiner. *Sen*, den gen som kodar för Shet-2, finns på samma plasmid som härbärgerar generna för invasionsförmågan.

Shet-1, som finns hos en del shigella, har inte hittats hos EIEC.

Ipa, invasion plasmid antigen

Hos EIEC och shigella exporteras flera så kallade Ipa-proteiner från bakterierna till mottagliga celler i samband med invasion. De fyra viktigaste betecknas IpaA till IpaD. Dessa svarar för den aktinpolymerisering som krävs både för att bakterierna ska kunna ta sig in i cellerna och för att förflytta sig inuti cellen. Ett par av dem bildar också porer in till tarmcellerna genom vilka EIEC kan exportera toxiner och andra virulensfaktorer. EIEC som saknar Ipa-proteinerna är inte virulenta. Hos EIEC finns alla generna för Ipa-proteinerna i en 140 MDa plasmid, betecknad pInv. EIEC förlorar ofta snabbt pInv vid odling i laboratoriet.

PÅVISNING

Isolering av *E. coli* från livsmedel

MacConkey är det klassiska och närmare hundra år gamla mediet för räkning av koliforma (=kolililiknande) i livsmedel och vatten. MacConkey bygger på två egenskaper hos koli: förmågan att fermentera laktos och att tillväxa i en måttlig koncentration av gallsalter. Den hämmande effekten av gallsalterna är dock ganska liten och de flesta gramnegativer och även många grampositiver växer därför villigt i mediet.

MacConkey har under åren fått en rad efterföljare med syftet att försöka förbättra selektiviteten så att små halter av koli inte dränks i överväxt av andra bakterier. Efterföljarna har många olika beteckningar men de kan alla ses som tämligen beskedliga modifikationer av MacConkeys koncept. Alla kräver konfirmativa tester för att säkerställa att det verkligen rör sig om *E. coli*.

För EHEC-bakterien O157:H7 har ett MacConkey-medium där laktos bytts ut mot sorbitol länge varit den traditionella metoden. På många håll, framför allt i USA, har metoden idag

ersatts med andra medier som utnyttjar speciella färgämnen som kopplats till utnyttjande av någon viss förening (kromogena eller fluorogena substrat).

För klassiska laktosfermenterande koli är det sedan mycket länge Violet Red Bile (VRB) agar som är referensmediet. VRB innehåller (g/L): jästextrakt 3, pepton 7, NaCl 5, bile salts no 3 (Oxoid) 1.5, laktos 10, neutralrött 0.03, kristallviolett 0.002, agar 15. Normalt inkuberas mediet vid 37°C 24 h varefter kraftigt röda eller purpurfärgade kolonier (=presumtiva *E. coli*) testas vidare med biokemisk eller annan metodik. De röda kolonierna är ofta omgivna av en kraftig zon av utfällda gallsalter. Dubbelgjutningsteknik förbättrar selektivitet och utseende på kolonierna, men medför problem med efterarbetet.

Ett sätt att vässa selektiviteten är att inkubera VRB vid 44.5°C (”termotoleranta koli”). Då hämmas många konkurrerande bakterier. Tyvärr finns det en del patogena koli som inte heller klarar temperaturen, det gäller till exempel många stammar av O157:H7.

Tillsats av 0.1 g/L MUG (4-metylumbelliferyl-beta-D-glukuronid) till VRB rekommenderas av amerikanska FDA som ett sätt att snabbare screena fram koli. De allra flesta, 96 %, av kolistammarna producerar enzymet beta-glukuronidas som bryter ned MUG till det fluorescerande ämnet 4-metylumbelliferon. Detta ger ett kolonierna ett blågrönt sken vid belysning med UV-ljus vid 366 nm. Som alltid finns dock patogena stammar som saknar enzymet. Klonerna av O157:H7 är till exempel normalt MUG-negativa.

Laktosnegativa koli förekommer inom alla patogena grupper och särskilt inom EIEC där laktosnegativa stammar är regel. För EIEC finns ingen speciell referensmetodik utan man är hänvisad till att isolera bakterierna från MacConkey-substrat där EIEC alltså är färglösa eller har en avvikande färg mot klassiska koli. Tryptofanbaserade medier som Tryptone Bile agar är egentligen bättre, eftersom 99 % av *E. coli*-stammarna är positiva för indolproduktion medan bara 90 % är positiva för laktosfermentation. De tryptofanbaserade medierna är dock mera tidsödande att arbeta med så de har inte fått någon större spridning.

För EHEC O157:H7 har Cefiximin-Tellurit Sorbitol MacConkey (CT-SMAC) agar oftast använts som referensmetod. Mediet innehåller (g/L): pepton 20, sorbitol 10, bile salts no 3 (Oxoid) 1.5, NaCl 5, neutralrött 0.03, kristallviolett 0.001, agar 15. Till grundmediet tillsätts cefiximin och kaliumtellurit till en slutkoncentration av 0.05 mg/L respektive 2.5 mg/L. Plattorna ytodlas och inkuberas 37°C 18-24h. Typiska kolonier är sorbitolnegativa och därmed färglöst genomskinliga. Centrum av de 1-2 mm stora kolonierna är dock brunaktigt mörka. Det måste poängteras att andra EHEC än O157:H7 ofta är sorbitolpositiva och att mediet alltså inte är generellt användbart för att detektera EHEC- eller STEC-stammar. Även bland O157:H7-stammar förekommer sorbitolpositiva varianter.

Alternativa medier för O157:H7 är vanliga inte minst i USA och Japan. Dessa bygger på kromogena eller fluorogena ämnen som används för att ge färgreaktioner kopplade till nedbrytningen. Den nämnda MUG-varianten av VRB kan räknas in bland dessa medier, men det som fått bredast användning – och FDAs stöd – är Rainbow O157 agar från Biolog Inc., USA. Mediet är egentligen bara en variation på temat laktosfermentation/MUG-nedbrytning: det bygger på påvisning av det laktosnedbrytande enzymet beta-galaktosidas och det MUG-nedbrytande enzymet beta-glucuronidas. Närvaro av det första ger en mörk, nästan svart färg till kolonierna medan det andra ger en röd färg. Stammar av O157:H7 är normalt positiva för galaktosidas och negativa för glukuronidas vilket resulterar i en svart eller gråsvart kolonifärg. Andra kommersiellt tillgängliga kromogena substrat för O157:H7 är BCM O157:H7 (Biosynth, Schweiz), Fluorocult O157:H7 (Merck, Tyskland) och CHROMagar O157 (CHROMagar, Frankrike).

Identifiering och påvisning

Biokemisk identifiering av *E. coli* är lätt att utföra med traditionella tester som och det finns dessutom en uppsjö av kommersiella kits för ändamålet. Men biokemisk identifiering klarar inte av att hitta de sex patogena grupperna, till det behövs molekylärgenetiska eller immunologiska metoder. En del sådana finns kommersiellt tillgängliga, annars finns gott om PCR-protokoll att tillgå i litteraturen med olika grader av specificitet. Multiplex-PCR som kan påvisa alla grupperna utom DAEC har beskrivits.

1. Påvisning av EPEC

Till EPEC räknas stammar som ger A/E-skador på mottagliga celler och som inte producerar shigatoxiner. A/E-effekten kan observeras direkt i odlade HeLa- eller HEp-2-celler, men det är något som nog helst bör överlåtas till vana bedömare. Eftersom den genetiska bakgrunden till A/E är väl studerad, är det betydligt enklare att testa bakterierna för närvaro av dels EAF-plasmiden, dels av *eae*-genen. I plasmiden finns generna bakom den lokala adhesionsmekanismen medan *eae*-genen kodar för intimin, det protein som är direkt verksamt för uppkomsten av cellskadorna.

Som typiska EPEC räknas stammar som är positiva både för EAF (*bfp*) och *eae* medan atypiska EPEC innefattar stammar som enbart har *eae*. Distinktionen är viktig. Typiska EPEC är den vanliga orsaken till EPEC-infektioner och de överförs aldrig från djur till människor. Livsmedelsburen smitta handlar följaktligen alltid om kontamination av livsmedlet från människor.

Atypiska EPEC har lägre virulens och är därför åtminstone globalt en mindre vanlig orsak till infektioner. I vissa industrialiserade länder som exempelvis Spanien förefaller de dock vara så vanligt förekommande att de faktiskt kan vara en viktigare orsak till diarréer hos vuxna än

typiska EPEC.

Undantagsvis kan atypiska EPEC överföras från djur till människa. Eftersom även STEC-stammar producerar A/E-skador är frågan varifrån de atypiska EPEC-stammarna härrör? – Troligen från två håll: dels kan det vara typiska EPEC-stammar som förlorat sin EAF-plasmid, dels kan det röra sig om STEC-stammar som förlorat förmågan att producera shigatoxiner. Eftersom vissa STEC-stammar kan överföras från djur till människa skulle det förklara varför enstaka atypiska EPEC-infektioner är zoonoser.

Det finns gott om protokoll beskrivna för påvisning av EAF-plasmiden eller bfp-genen inuti denna samt för intimingenen. Intimingenen *eae* finns i flera varianter som ibland är identiska för EPEC och STEC. Den variant som är mest specifik för EPEC och den man numera försöker påvisa kallas *eaeA*. Det finns numera även PCR-metoder som skiljer mellan typiska och atypiska EPEC.

Immunologisk teknik har inte använts i någon nämnvärd omfattning för att påvisa virulensfaktorer. Ett undantag är en RPLA-metod som utvecklats för att påvisa EspB-proteinet vilket visats sammanfalla med närvaron av *eaeA*-genen hos EPEC.

2. Påvisning av ETEC

Påvisning av såväl det värmelabila (LT) som det värmestabila toxinet (ST) har länge kunnat utföras med hjälp av kommersiellt tillhandahållen immunologisk teknik. Kits som bygger på RPLA för LT och ELISA för ST finns bland annat hos Oxoid.

Även PCR och genetiska sonder har länge använts för att spåra toxinen och det finns idag ett stort antal metoder beskrivna i litteraturen.

3. Påvisning av STEC

För shigatoxinerna finns idag immunologiska kits för enkel påvisning. De saluförs av de amerikanska företagen Antex (före detta MicroCarb) och Meridian Diagnostics samt av japanska Denka Seiken. Protokoll för genetisk påvisning finns beskrivna.

För specifik påvisning av O157:H7 finns idag uppskattningsvis ett 50-tal kits som är kommersiellt tillhandahållna. De omfattar såväl olika immunologiska som molekylärgenetiska tekniker.

4. Påvisning av EAEC

Referensmetoden för att påvisa EAEC är cellodling i HEp-2 där bakteriernas förmåga till aggregativ adhesion kan testas. Cellodling kan ha sina problem för ovana användare men för testning av just EAEC har en teknik med formalinfixerade HEp-2-celler förenklat påvisningen.

De PCR-protokoll som finns beskrivna i litteraturen baseras i regel på generna för de aggregativa adhesionsfibrierna AAF, det värmestabila toxinet EAST-1 eller enterotoxinet Pet. För Pet finns för övrigt även en immunologisk snabbmetod beskriven.

5. Påvisning av EIEC

Invasionsförmågan kan testas i HeLa-celler som helt förstörs av virulenta EIEC.
Beskrivna PCR-metoder är riktade mot gener i den invasionsplasmid som EIEC-stammar har, men någon standard finns ännu inte.

6. Påvisning av DAEC

Den diffusa adhesionen kan testas på flera olika celler, bland annat HEp-2. Några mera omfattande molekylärgenetiska arbeten har inte utförts på DAEC, men de självklara kandidaterna till PCR-metoder är de gener som kodar för de adhesiner som ingår i Afa/Dr-familjen och sådana PCR-protokoll finns också publicerade.

Epidemiologi

Serologi

Kolibakterier kan indelas i hundratals somatiska antigen (O-grupper) och var och en av dessa kan indelas i flera flagellära antigen (H-grupper). En del av dessa som O157:H7 (eller 0157:H- för orörliga varianter) har stor klinisk betydelse men till skillnad från salmonelladiagnostik räcker sällan immunologisk epidemiologi för att spåra kolistammar. Kolibakterierna är helt enkelt för vanliga. I många länder fagtypas O157-stammar.

Molekylärgenetik

Standardmetoden är PFGE som använts framför allt för att spåra O157, dels efter utbrott och dels som kartläggning av stammar i olika miljöer. Ett standardiserat Pulse Net-protokoll från CDC används av de flesta. Det är utlagt på internet på adress www.cdc.gov/pulsenet/

Francisella

– Den norrländska pesten –

ÖVERSIKT

Dödliga epidemier bland harar uppmärksammades redan för 200 år sedan i Japan och det är från japanerna vi övertagit beteckningen harpest. Annars hade vi antagligen istället kallat sjukdomen ekorrpest, för det var ifrån ett utbrott bland ekorrar som bakterien *Francisella tularensis* isolerades 1911. Det skedde i det kaliforniska distriktet Tulare vilket gett det officiella namnet på sjukdomen, tularemi.

Tularemi kan förekomma hos bortåt 200 djurarter. Sjukdomen är vanligast bland däggdjur men också ganska vanlig hos fåglar och förekommer undantagsvis också hos en del reptiler och fiskar. Känsligast är gnagare som harar och ekorrar där hela bestånd kan utrotas på några dagar.

Människan kan också infekteras och särskilt den amerikanska varianten av bakterien är livsfarlig med uppåt 30 % dödlighet om den smittade inte kommer under behandling. Den variant som förekommer i Sverige är lyckligtvis mindre virulent och ger färre och mildare komplikationer men dödsfall förekommer även här.

Sjukdomens utbredning är ovanlig: den förekommer endast på den norra hemisfären och särskilt vanlig är den i riktigt nordliga trakter: sett till invånarantalet är Norrland faktiskt världens mest drabbade område och harpesten kan betraktas som endemisk i Norrland. Reservoaren för Norrlands harpest är framför allt skogshare och lämmel. Från dessa sprids bakterien till människa vanligtvis genom mygg, men smitta genom rosastekt hare eller infekterat dricksvatten är också fullt möjlig.

Till de två ganska självklara kategorier som drabbas i Sverige, alltså jägare och bärplockare, har på senare år på fullt allvar tillförts en tredje: golfspelare. Kanske dags att dika ut vattenhindren?

BAKTERIEN

Släktet *Francisella* består av gramnegativa, orörliga, ovala, mycket små stavar som är aeroba och katalaspositiva. I likhet med *Legionella* har nästan alla stammar av *F. tularensis* ett absolut krav på cystein vid tillväxt på laboratoriemedier. Tidigare indelades harpestbakterierna i två grupper: A och B som stod för underarterna *tularensis* respektive "*palaearctica*" (numera *holoarctica*). Trots att grupp B senare delats upp i en europeisk och en centralasiatisk underart (Tabell 12.1) är grupp B "*palaearctica* " fortfarande en vanlig beteckning i amerikansk litteratur. En fjärde underart, *novocida*, som orsakar harpest hos djur men praktiskt taget aldrig hos människor, har också förts till *F. tularensis* efter att tidigare ha varit en egen art. Till skillnad från de humanpatogena underarterna har denna inget krav på cystein och växer bra på många odlingsmedier.

Tabell 12. Underarterna av *F. tularensis*, deras förekomst och virulens.

Underart	Humanvirulens	Geografisk förekomst
F. tularensis ssp *tularensis*	Mycket hög	Nordamerika*
F. tularensis ssp *holoarctica*	Hög	Europa (Asien, Nordamerika)
F. tularensis ssp *mediaasiatica*	Hög	Centralasien
F. tularensis ssp *novicida*	Mycket låg	Europa, Asien, Nordamerika

* Ett fynd av denna underart har också beskrivits från Slovakien.

Utvecklingsmässigt hör *Francisella* hemma i proteobakteriernas gammalinje i en gren som också omfattar *Legionella*.

På senare tid har ett antal fisk- eller molluskpatogena arter beskrivits: *F. asiatica, F. halioticida, F. noatunensis, F. philomiragia, P. piscicida* samt en art isolerad från blod hos en människa: *F. hispaniensis*. Om någon av dessa är virulent mot människor är oklart.

Värddjur

Harar, smågnagare och bävrar tillhör de vanligaste värddjuren men francisella kan spridas till ett mycket stort antal djur, alltifrån insekter till däggdjur, fåglar, reptiler och fiskar. Totalt har bakterien hittats i uppåt 200 djurarter. I Sverige är det framför allt skogshare men också lämmel, sork, ekorre och bäver som betraktas som reservoarer. Dessutom har bakterien här påträffats hos korp, fjällvråk och slaguggla.

Djurens känslighet för bakterien varierar, i Sverige är det framför allt hararna som drabbas av epidemiska dödliga utbrott. Husdjuren, inklusive tamkaniner, är tämligen okänsliga för den europeiska underarten medan många husdjur som får, tamkanin och katt däremot kan drabbas hårt i Nordamerika.

I vatten och jord

Francisella kan i väntan på ett värddjur tillbringa flera månader i vatten och jord. Om förhållanden blir dåliga kan de övergå i en VNC-form (*Viable Not Culturable*) som är svår att spåra. VNC-formen anses avirulent men VNC-formerna hos andra och bättre studerade patogener kan återgå till sin virulenta form och det förefaller troligt att så också gäller för francisella. I likhet med legionella kan francisella tillväxa i vatten om det finns lämpliga encelliga värdar som exempelvis vissa amöbor.

SJUKDOMEN

Harpest är en zoonos och den vanligaste spridningsvägen från smittade djur är myggor i Europa och fästingar i Nordamerika. Även i Centraleuropa verkar dock fästingar vara en viktig spridningsväg. Direkt kontakt med smittade djur är också en viktig spridningsväg, däremot sker det trots bakteriens smittsamhet av någon anledning nästan aldrig någon spridning från människa till människa. Dåligt värmebehandlade livsmedel (i Sverige endast skogshare) och infekterat dricksvatten är andra spridningsvägar som dock anses mindre vanliga.

Smitta kan också förekomma via inandning och *Francisella tularensis* klassas i Sverige som en av de nio högriskbakterierna (grupp 3-bakterier) vid laboratoriearbete. Ett utbrott av inhalations-tularemi inträffade i Frankrike då 15 middagsgäster blev sjuka efter att en hund vid matbordet skakat sig och spritt bakterierna från pälsen genom luften till människorna.

Infektionsdos

Som luftburen smitta eller via insektsbett är infektionsdosen låg, man räknar med att tio bakterier är tillräckligt för att ge symptom. Halten som krävs för smitta genom mag-tarmkanalen är sannolikt högre.

Inkubationstid

Inkubationstiden är omkring 3 dygn med en spridning från 1 till 10 dygn.

Symptom

Influensaliknande symptom med hög feber, huvudvärk, illamående och hosta är vanligt förekommande men sedan varierar symptomen beroende på vilken väg bakterien tagit sig in i kroppen. De som smittats genom insekter får pestliknade varande bölder vid platserna för insektsbetten och stora, ömmande lymfkörtlar. Såväl bölderna som lymfkörtlarna kan brista. Förstorade lymfkörtlar är vanligt även då bakterien tagit sig in genom luftvägarna eller via ögonen (en inte helt ovanlig inkörsport). Infektion via luftvägarna kan ge alltifrån halsflussliknande symptom till lunginflammation.

Ungefär var tionde drabbas av en infektion där diarréer, som i Nordamerika ofta är blodiga, förekommer. Det är antagligen bland dessa fall som livsmedels- eller vattenburen tularemi kan sökas.

Komplikationer som skador på lever, mjälte och benmärg är vanliga vid infektion av *F. tularensis* subspecies *tularensis*, mindre vanliga vid infektion med de andra underarterna. Det är när bakterierna vandrar ut till blodet och ger blodförgiftning som skadorna uppstår. Obehandlad harpest orsakad av den amerikanska underarten kan ha en dödlighet på upp till 30 %, medan dödligheten i den obehandlade europiska formen "bara" uppgår till någon procent. I Sverige har vi inte i modern tid registrerat något dödsfall.

Sjukdomen kan hävas med antibiotika om den diagnosticeras i tid. Även vaccin finns till riskgrupper, men hittills har de vacciner som tagits fram bara haft begränsad verkan. Sjukdomens varaktighet är högst 10 dygn om inte komplikationer tillstöter. Genomgången infektion ger livslång immunitet.

Incidens

Harpest förekommer över praktiskt taget hela den norra hemisfären, alltså även i södra Asien, norra Sydamerika och Nordafrika (på senare tid har det rapporterats fall även från tropiska Australien, så man verkar inte gå helt säker någonstans). Utbredningen är dock tydligt nordlig med högst incidens i norra Skandinavien, norra Ryssland samt Kanada och nordstaterna i USA. I Sverige utgjorde Dalälven fram till år 2000 en definitiv gräns: det var norröver som sjukdomen grasserade och sett till folkmängden är Norrland ett av världens allra hårdast drabbade område.

Antalet fall i Sverige varierar dock starkt från år till år. Sett över den senaste 15-årsperioden (1997-2011) har vi haft fyra år med 15-80 insjuknade, sex år med

runt 200 insjuknade och fem år med ca 400-700 insjuknade (2000, 2003, 2008, 2010 och 2011). Enstaka år kan flera tusen drabbas, vilket senast hände 1967. Alla åldersgrupper kan smittas, men det förefaller som att barn och äldre drabbas oftare.

Från och med år 2000 har sjukdomen också övervunnit sin rädsla för Dalälven och rört sig söderut. Framför allt Närke och Värmland redovisar numera många fall. Till och med i Skåne förekommer 1-4 fall ungefär vartannat år. Och åtminstone för två insjuknade skånskor kunde det verifieras att de verkligen smittats på hemmaplan. I Sverige finns ett klart samband med så kallade gnagarår och den vanligaste smittvägen är definitivt myggor (vilket klargjordes i en svensk studie över harpest i Dalarna som publicerades 2012), även om direktkontakt med djuren samt insektsbett av fästing/broms/hästflugor också förekommer.

I USA var harpest vanlig under första halvan av nittonhundratalet men har sedan dess haft en stadigt vikande kurva och ligger nu på omkring 200 fall per år vilket alltså är i samma storleksordning som i Norrland.

LIVSMEDEL

Francisella tillväxer inte i livsmedel. Bakterierna är mycket känsliga för hög temperatur och dödas redan vid en värmebehandling på 55°C under 10 minuter. Syrade, saltade eller rökta produkter betraktas som riskfria (den för människan nästan ofarliga *F. tularensis* subsspecies *novicida* påverkas dock inte av saltning). De enda livsmedel som kan sprida francisella är kött, fisk/skaldjur och vatten. Hur vanlig livsmedelsburen smitta egentligen är vet knappast någon. Vid de stora väldokumenterade utbrotten är det mycket få fall som härrört från livsmedel eller vatten, men det kan vara annorlunda med de sporadiska fall som uppenbarligen inträffar utan att rätt diagnos ställs.

Kött

I Europa är det praktiskt taget endast hare som kan ge köttburen infektion. Det är framför allt genom hanteringen av haren som smittan sprids. Genomstekt kött är helt riskfritt medan ”*medium rare*” är mera tveksamt. I USA kan även annat viltkött samt fårkött vara bärare av bakterierna. Det torde dock vara ytterst ovanligt att man drabbas av tularemi genom köttkonsumtion. Jakt på hare orsakade däremot ett mycket stort utbrott i norra Spanien i december 1997.

Före 1997 betraktades hela Spanien som praktiskt taget fritt från tularemi men i december detta år drabbades nästan 600 personer i Castilla y Leon av tularemi. I en uppföljande undersökning av blodprover tagna från tiden före det första utbrottet konstaterades att 0.2 % av befolkningen redan tidigare uppvisade antikroppar mot francisella. Om detta är riktigt (antikroppstitrarna var genomgående ganska låga) visar undersökningen att även i länder som är fria från utbrott av tularemi kan det förekomma sporadiska fall och att dessa förblir oupptäckta. Och Castilla y Leon är särskilt drabbat: 2004 var det dags igen med 13 smittade och 2007 kom ett nytt stort utbrott med över 500 drabbade. I samtliga fall var det underarten holoarctica som var orsaken.

Jägare kan utsättas för harpest även vid jakt på fåglar. En jägare (tjuvskytt?) i Bulgarien som sköt en ormvråk fick huden upprispad av vråkens klor och insjuknade i harpest.

Bakterierna överlever åtminstone en månad i kyllagrat och flera år i fryslagrat kött.

Fisk och skaldjur

Francisella kan spridas till vissa fiskar och även om inga utbrott registrerats till följd av fiske eller hantering av fisk visar fallet i spanska Castilla y Leon (återigen!) 1999 att det inte kan uteslutas. Ett mindre utbrott i ett angränsande område till det där många jägare drabbades av tularemi efter att ha jagat hare, drabbade kräftfiskare.

Vatten

I slutet av nittiotalet inträffade ett vattenburet utbrott av tularemi i en liten rysk stad. Undersökningen redovisade en vattenhantering närmast i förfall där vattentäkter, hygien och misslyckad klorering gemensamt hade lett fram till utbrottet. Hur pass vanligt vattenburen smitta är i områden med ytvattentäkter är inte studerat. Bakterierna kan överleva lång tid i infekterade vattentäkter och kan till och med tillväxa där om det finns amöbor som de kan invadera.

Ett misstänkt vattenburet utbrott noterades i Georgien 2006 där 26 människor insjuknade. På grund av en närmast obefintlig medicinsk behandling vid smittotillfället drabbades flera insjuknade av långvariga symptom, upp till 5 månader.

År 2009 inträffade ett annat fall i en liten by i Turkiet där 11 personer smittades

med underarten *holoarctica* genom oklorerat dricksvatten. Klorering av dricksvattnet löste problemet. Även 2004-2005 hade Turkiet ett utbrott sannolikt orsakat av källvatten. Totalt drabbades 188 människor, varefter dricksvattenkällan stängdes och fallen upphörde.

Även 2011 inträffade ett utbrott i Norge som misstänktes orsakats av infekterat dricksvatten från borrade brunnar. Det hade föregåtts av ett lämmelår och vid den kraftiga snösmältningen denna vår ansågs det att exkrementer från lämlarna nått brunnarna. Totalt insjuknade 33 norrmän.

VIRULENSFAKTORER

Virulensfaktorerna är dåligt studerade. Möjligtvis är det en ändring på gång nu när tularemi sedan 11 september 2001 tilldragit sig politikernas intresse som ett tänkbart biologiskt terrorvapen. Bakgrunden är att tularemi är mycket smittosam när den förekommer i aerosoler.

Det man i dagsläget känner till är att francisella är en invasiv bakterie som överlever och förökar sig inuti makrofager. Francisella motstår makrofagernas kemiska arsenal i form av reaktiva kväve- och syreradikaler. När de är inneslutna i makrofagernas fagosomer kan de i likhet med listeria förhindra fagosomernas mognad (surgörande) och de kan då ta sig ut i makrofagernas cellvätska där de förökar sig. I samband med att de tar sig ut genom fagosomernas membran aktiverar de makrofagernas programmerade celldöd vilket resulterar i att makrofagerna dör och bakterierna kan angripa nya makrofager.

Med tanke på att de olika underarterna har så pass olika virulens så finns det självfallet en rad andra virulensfaktorer, men dessa är inte kända.

PÅVISNING

Rutinmässig bakteriologisk odling för att testa livsmedel eller vatten förekommer inte. Dels är det mycket svårt att isolera bakterierna, dels är francisella högriskbakterier som bör överlåtas till speciallaboratorier.

Odling

Egentlig selektiv isolering förekommer inte, i de fall man försöker odla fram

francisella används näringsrika blodmedier som det kommersiellt tillhandahållna Cystin Heart Agar vars bas består av (g/L): proteos pepton 10, beef heart infusion 10, NaCl 5, agar 20 och där det efter autoklavering tillsätts glukos 10, L-cystin 1 samt kaninblod 100. (Cystin kan ersättas med cystein.)

Mediet inkuberas aerobt, gärna med något förhöjd koldioxidhalt, vid 37°C i upp till 3 veckor. De flesta stammarna växer dock fram till små genomskinliga kolonier redan efter 2-3 dygn. Negativa odlingsresultat är vanliga även från patienter med tydliga symptom. Underarterna kan indelas med biokemiska metoder, men det har mest varit en fråga för amerikaner eftersom de har både *F. tularensis* ssp *tularensis* och *F. tularensis* ssp *holoarctica* i sin miljö. Den förstnämnda växer på glycerol medan den senare inte gör det.

Annan påvisning

Eftersom odling dels är riskfyllt och dels ger ganska dåligt resultat, har immunologiska och molekylärgenetiska metoder numera företräde. De ger dessutom betydligt snabbare resultat. Det går att påvisa såväl arten och underarterna med olika immunologiska och PCR-baserade metoder. Även en MS-baserad metod som kan skilja på underarterna har publicerats.

Epidemiologi

Trots att bakterien består av fyra underarter är francisella en genetiskt mycket homogen art. Såväl RFLP-profilerna som PFGE-profilerna följer till exempel ganska väl underarterna. Först med MLVA (*Multiple Locus Variable-number tandem repeat Analysis*) har en egentlig typning kunnat utföras och med denna metod upptäcktes även att den mycket virulenta *F. tularensis* ssp *tularensis* innehåller minst två utvecklingslinjer.

Legionella

– Amöbaparasiten som lurar i badrummet –

ÖVERSIKT

Philadelphia, 4 juli 1976: De gamla krigsveteranerna i American Legion har samlats för att fira 200-årsdagen av *Independence Day*. Mötet går programenligt men när deltagarna börjar skingras är katastrofen undervägs. Dagarna efter kongressen insjuknar mer än 200 veteraner i en svår och mystisk form av lunginflammation. Trots intensivvård dör 34.

Pressen myntar omedelbart begreppet legionärssjuka och när andra misstänkta utbrott blossar upp utan att vare sig läkare eller mikrobiologer förstår varför, tar skräcken överhand. Är det en bakterie som muterat och fått dödsbringande egenskaper? Står vi inför en ny farsot? Det tar utredarna sex månader efter den olycksaliga veterankongressen att spåra och isolera bakterien som ges namnet *Legionella pneumophila*. Liksom francisella har legionella ett absolut behov av aminosyran cystein och först när man insett detta växer bakterien snällt fram på odlingsmedierna.

Idag vet vi att legionella är en mycket vanlig bakterie i omgivningen. Den är så vanlig att praktiskt taget alla människor, om inte dagligen, så i alla fall mycket ofta utsätts för den. Och detta utan att någonsin insjukna i lunginflammation. Vi vet också att bakterien inte är någon ny bekantskap, prover som sparats från andra världskriget visar att den förekom redan då. Trots det så fortsätter legionella sitt spektakulära massmedieliv, det finns knappast någon annan bakterie som får så stort utrymme i spalterna vid ett sjukdomsutbrott. När en luftventil sommaren 2002 sprejade infekterat vatten över en gågata i England och smittade 140 med legionellos följde BBC upp med över 50 pressreleaser. ”Mördarbakterien” som lurar i duschen eller i luftkonditioneringen är det vanliga temat och det fascinerar tydligen rubriksättarna.

Just luftkonditioneringsanläggningar har alltsedan Philadelphia-utbrottet stått i skottgluggen som den främsta orsaken till bakteriernas spridning. Det har upprepats så många gånger och i så många sammanhang att det blivit en

etablerad sanning. Ändå är det faktiskt så att just luftkonditionerare hittills aldrig kunnat verifieras som orsak till något utbrott. Att bakterierna vid alla kända utbrott varit aerosolburen står däremot helt klart. Det rör sig om alltifrån läckande kyltorn och wc-spolare till duschar, grönsaksbefuktare och fontäner. Vad som orsakar de sporadiska fallen (de som drabbar enskilda individer) vet man inte, det är oerhört svårt att spåra källan i sådana fall. På senare tid har man börjat misstänka att dricksvatten, som tidigare alltid negligerats, kan vara en källa till infektion.

Det står nu också klart att det finns åtminstone ett tjugotal olika arter av legionella som kan ge sjukdom i varierande omfattning. Några av dem ger en mildare, influensaliknande form av legionellos som kallas pontiac-feber efter den stad i Michigan där sjukdomen först diagnosticerades.

BAKTERIERNA

Legionella är numera ett stort släkte som omfattar över 50 arter av vilka 24 har associerats med legionellos (oftast milda former) eller pontiacfeber. Eftersom flera av virulensfaktorerna finns spridda över hela släktet så kan i dagsläget ingen av de 50 arterna helt uteslutas som patogen. *L. pneumophila* är den dominerande orsaken till legionellos. Den indelas i 15 serotyper och *L. pneumophila* serotyp 1 svarar för runt 85 % av fallen globalt, i Sverige 95 %. Tre arter svarar för 2-7 % av fallen: *L. bozemanae*, *L. micdadei* och *L. longbeachae.* Den sistnämnda är vanlig i Australien och Nya Zeeland där den står för 30 % av fallen.

Legionella omfattar gramnegativa, strikt aeroba stavar som är rörliga med en eller flera polära eller subpolära flageller. Bakterierna har en mycket begränsad metabolisk repertoar och lever framför allt av aminosyror. De har ett betydande behov av järnsalter och kräver aminosyran cystein som nödvändig tillväxtfaktor. Utvecklingsmässigt intar legionella en ganska isolerad position inom gamma-2-linjen av proteobakterierna.

Legionellas naturliga hemvist är förmodligen inuti encelliga djur (protozoer) eller cyanobakterier. I protozoerna lever de som parasiter, i cyanobakterierna som symbionter. Möjligen kan de i symbios med vissa andra bakterier även tillväxa i de biofilmer som bildas överallt där fasta ytor möter vatten, det finns en del data som tyder på detta. Ur epidemiologisk synvinkel har det kanske inte så stor betydelse eftersom dessa biofilmer också är den naturliga hemvisten

för de protozoer som är legionellas värdorganismer. Det är framför allt i amöbor de förökas men även en del frilevande ciliater verkar vara en naturlig värd. Och bland cyanobakterierna finns det flera arter som härbärgerar legionella. Från sina värdar sprids de till den omgivande jorden eller sötvattnet där de utan näringsämnen kan överleva i flera månader, särskilt vid låga temperaturer, genom att övergå till en icke-odlingsbar och avirulent viloform. Viloformen återgår sedan till en odlingsbar och virulent parasitär form då bakterierna äts av amöbor eller ciliater. Tidigare antogs att legionella inte kunde klara sig helt utan andra levande organismer, men nyare data indikerar att de faktiskt kan föröka sig även på döda bakterier.

Legionella är oerhört vanliga i alla typer av sötvatten. Två nyare holländska studier med PCR-teknik fann dels bakterierna i samtliga ytvatten som användes för att bereda dricksvatten, i vissa fall i halter uppemot en miljon legionella per liter, dels i 10 % av mineralvattnet på flaska. PCR-påvisning är mycket känsligare än odling av legionella. Äldre data, baserade på cfu-bestämningar, därför bör tas med en nypa salt, de visar genomgående alltför låga frekvenser för legionella i yt- och flodvatten. Nackdelen med PCR är att metodiken inte nödvändigtvis skiljer på levande och döda celler och i studien på mineralvattnet kan det mycket väl ha rört sig om rester av DNA från döda bakterier.

Störst risk för smitta är det dock ändå från varmvattensystem: i Sverige har vi genom byggnormer en viss kontroll på legionellatillväxten, men utomlands är det snarare regel än undantag att hotellen duschar oss med legionella. I Italien konstaterades till exempel att mer än hälften av varmvattnet i hotellens och färjornas duschar innehöll *L. pneumophila*, som regel i halter överstigande ett tusen bakterier per liter.

SJUKDOMEN

Legionellos tycks nästan enbart drabba människor. Visserligen är många försöksdjur mottagliga för infektion men bara under speciella förhållanden och vid infektionsdoser som knappast förekommer normalt. En enstaka rapport om att en kalv smittats och dött i legionellos finns i litteraturen, men det förefaller vara en isolerad händelse och någon spridning av sjukdomen från djur till människa är inte aktuell.

Samma bakteriestam kan hos vissa människor ge upphov till legionellos, hos

andra den mildare formen pontiacfeber medan de långt flesta individerna inte får några symptom alls. Sedan verkar det finnas vissa mindre virulenta stammar, inte sällan av andra arter än *L. pneumophila*, som enbart ger upphov till pontiacfeber.

Riskgrupper

Den grupp som framför allt insjuknar i legionellos är åldringar, oftast de med svåra underliggande sjukdomar. I princip är det samma grupp som riskerar att dö i influensa (varje år dör ca 3000 svenskar i sviterna efter influensa). Barn och ungdomar drabbas praktiskt taget aldrig. Bland vuxna i arbetsför ålder är två grupper utsatta: storrökare samt personer med svåra underliggande sjukdomar. Vid utbrott av legionellos beräknas 2-4 av 1000 exponerade insjukna. Legionella hos vuxna, arbetsföra rökare har ett tydligt samband med arbetsresor och hotellvistelser, det är uppenbart så att stress, övertidsarbete och vistelser utanför hemmet anses som utlösande faktorer för legionellos.

Det finns en ofta uttalad uppfattning att legionellos med *dödlig* utgång också enbart drabbar åldringar eller individer som har svåra underliggande sjukdomar eller som behandlas med immunosuppressiva ämnen, till exempel inför en transplantation. Uppfattningen baseras på undersökningar i samband med utbrott av legionellos på sjukhus, inte sällan på dialysavdelningar. Och självklart ger svåra underliggande sjukdomar och kraftig medicinering vid transplantationer en starkt ökad risk för att dra på sig sjukdomen och att drabbas hårt av den. Men urvalet av individer blir lika självklart inte representativt för normalbefolkningen om bara de som redan ligger inne på sjukhus för andra svåra sjukdomar undersöks.

Så frågan är, vilka predisponerande faktorer leder till *dödsfall* i normal-befolkningen? Ett tillfälle att undersöka detta gavs i Holland 1999 då 141 personer togs in på sjukhus för legionellos efter att ha smittats av aerosoler från en infekterad vattenfontän på den årliga Västfrisiska blomsterfestivalen. Arton av de intagna patienterna dog. Den *enda* faktor som kunde kopplas till hög dödlighet var rökning. Underliggande sjukdomar eller ålder hade ingen signifikant betydelse för utgången av sjukdomen.

Däremot hade både ålder och underliggande sjukdomar som väntat stor betydelse för risken att *insjukna* i legionellos vilket visades av att genomsnittsåldern var 67 år och att flertalet hade någon form av underliggande sjukdom, framför allt hjärtproblem. Det kan nämnas att blomsterfestivalen

bevistades av 77 000 människor och att förmodligen en betydande del av dessa utsatts för smittan. Totalt insjuknade 188 personer (0.2 % av de besökande, 0.6 % av utställarna).

Infektionsdos

Infektionsdosen för särskilt mottagliga individer är låg, tiotals bakterier kan vara tillräckligt för att orsaka sjukdom. Om individer utanför riskgruppen exponeras för miljontals legionella blir resultatet snarare pontiacfeber än legionellos.

Inkubationstid och symptom

Inkubationstiden för legionellos är ungefär en vecka med en spridning från 1 till 18 dygn. Symptomen är framför allt feber, inte sällan över 40°C, och lunginflammation. Vid det holländska utbrottet vid blomsterfestivalen var feber över 38.5 °C och dubbelsidig lunginflammation signifikant kopplade till hög dödlighet (hos rökare). Övriga ganska vanliga symptom är frossa, hosta, huvudvärk, yrsel, muskelvärk, trötthet, aptitlöshet och diarré. Hos de svårast drabbade är njurkollaps en ganska vanlig komplikation. Dödligheten är omkring 5 % om antibiotikabehandling sätts in i ett någorlunda tidigt skede, annars kan den uppgå till 10-15 % eller rentav 25 % om speciellt utsatta grupper på sjukhus drabbas.

Inkubationstiden för pontiacfeber är kortare än för legionellos, vanligtvis något dygn, med en spridning från några timmar till en vecka. Symptomen är influensaliknande med feber samt ofta också huvudvärk och muskelvärk. Torrhosta förekommer hos ungefär hälften. Lunginflammation förekommer per definition aldrig (vid lunginflammation blir diagnosen legionellos). Pontiacfeber pågår 2-6 dygn och är självläkande. Även barn kan drabbas av pontiacfeber som kanske mera ska ses som en överkänslighet mot de stora mängderna endotoxin från legionellas cellväggar som man exponeras mot.

Incidens

Legionellos är en anmälningspliktig sjukdom i Sverige och 50-100 personer drabbas varje år enligt Smittskyddsinstitutets statistik. För sporadiska, relativt lindriga fall är förmodligen mörkertalet betydande eftersom legionellos inte kan skiljas från andra typer av lunginflammation om inte bakterierna eller antikroppar mot dem påvisas. Många bedömare menar därför att det verkliga antalet fall i Sverige uppgår till omkring 500 per år. Incidensen i Sverige skulle i så fall vara på samma nivå som i USA där man uppskattar att ungefär 15 000

personer årligen insjuknar.

Legionellos på cellnivå

Legionellos är ett drama i fyra akter. I första akten transporteras legionella till lungorna i aerosoler. Förmodligen är det ofta amöbor och ciliater som egentligen andas in; en enda av dessa protozoer kan innehålla flera hundra och i vissa fall över tusen legionella vilket kraftigt ökar risken för infektion.

I andra akten upptäcks och angrips legionella av lungornas försvarande makrofager som i enlighet med sina instruktioner snabbt äter upp (fagocyterar) bakterierna.

Akt tre börjar med att legionella, fortfarande helt planenligt i kroppens försvarsstrategi, återfinns inneslutna i en så kallad fagosom. Fagosomen med sitt innehåll ska nu bara sammanstråla med kroppens kemiska giftarsenal i form av en lysosom så är inkräktaren oskadliggjord. Men det är nu som saker och ting börjar gå snett. Legionella kan, i likhet med andra intracellulära parasiter, avstyra fusionen mellan fagosom och lysosom och i stället bilda en skyddad nisch i fagosomen där den snabbt förökar sig.

Akt fyra börjar i slutet av bakteriens tillväxtfas då makrofagen dödas och bakterierna tar sig ut ur den lyserade värdcellen. Cirkeln är sluten och en ny omgång med nya attackerande makrofager tar vid. Det är först när kroppens specifika antikroppssvar har mobiliserats som sjukdomen kan hävas, men då är det redan för sent för de svårast drabbade.

Det är långtifrån enbart makrofager som drabbas. Även alveolernas epitelceller invaderas av legionella som genom att förändra värdcellens membranproteiner (aktinerna) tvingar cellerna att ”fagocytera” bakterierna. Strategin att via aktinet komma in i värdcellen är inte unik för legionella, den praktiseras av många andra invasiva bakterier, till exempel vissa kolibakterier. Invasionen av olika typer av epitelceller är förmodligen en viktig anledning till de svåra komplikationer som ibland blir följden av legionellos.

LIVSMEDEL

Den klassiska källan för utbrott av legionellos är varmvattensystemet. Tillväxt sker ofta i blindavgångar eller i perifera delar av ledningsnätet som exempelvis

packningar, kranar eller duschslangar där vattentemperaturen kan nå ned till den riskabla nivån 45°C. Legionella börjar avdödas vid 50°C, men det sker långsamt. D-värdet (den tid det tar att döda 90 % av populationen) vid praktiska försök i vattenledningar är uppåt 2 timmar vid 50°C, ca 20 minuter vid 55°C, och 2 minuter vid 60°C.

Dricksvatten har inte ansetts som en riskfaktor trots att man redan i början på nittiotalet kopplade flera fall av legionellos till dricksvatten på sjukhus. Det gällde då fastande patienter som inför njurtransplantation fått suga på isbitar och den vägen fått i sig bakterierna. Men dessa patienter är en extremt utsatt grupp och för andra grupper har man inte betraktat dricksvatten som riskfaktor.

En anledning till bedömningen är att legionella är en mesofil bakterie som växer bäst vid 35-40°C och som inte växer alls under 12-15°C. Dricksvatten som från källan till tappstället håller lägre temperatur än så är därför riskfritt. Men även dricksvatten som håller högre temperatur än så har bedömts som ofarligt. En del forskare ifrågasätter dock detta och menar att dricksvatten mycket väl kan vara en orsak till sporadiska fall av legionellos. Amerikanska studier visar också på att många faktiskt smittats genom dricksvatten. Det ska tilläggas att legionella i sådana fall *inte* smittar genom tarmkanalen utan genom att vattendimma andas in när man dricker.

VIRULENSFAKTORER

Adhesionsfaktorer

Såväl flageller som utskott i form av fimbrier har betydelse för legionellas adhesionsförmåga, däremot är det osäkert om de ska betraktas som egentliga virulensfaktorer. Ett yttre membranprotein (MOMP; *major outer membrane protein*) isolerades tidigt från *L. pneumophila*, det fäster in till specifika receptorer på eukaryota celler. MOMP förekommer inte hos övriga arter hos vilka det dock finns andra receptorspecifika membranproteiner som underlättar bakteriernas adhesion till olika värdceller. Vilken betydelse som dessa proteiner har är oklart.

Mip-proteinet

Ett speciellt intresse har knutits till ett 24 kDa enzymatiskt membranprotein, Mip-proteinet (*Macrophage infectivity potentiator protein*). Att Mip-proteinet har

betydelse för virulensen är väldokumenterat och det binder till värdcellernas kollagen. Enzymets aktiva centrum måste vara intakt för att det ska fungera som virulensfaktor. Hos amöbor har det visats att proteinet ackumuleras på värdens egna membraner och det verkar sannolikt att Mip har betydelse för den intracellulära tillväxten snarare än – som namnet antyder – vid själva infektionsprocessen. Mip-proteinet finns hos praktiskt taget alla legionella och har numera även hittats hos många andra bakterier. Att det i olika varianter finns hos så många legionella har använts för att utveckla PCR-metoder för påvisning av de olika arterna.

Peptidtoxiner

Två lågmolekylära cytotoxiner med molvikter på 1.2 respektive 3.4 kDa har varit kända länge hos legionella. Tidigare troddes de vara mycket viktiga för virulensen men betydelsen har numera tonats ner. Peptidtoxinerna slår mot makrofagernas förmåga att producera giftiga syreradikaler och minskar därmed risken för legionella att utsättas för skadliga doser.

RtxA-toxinet

Rtx-toxinerna är en hel familj av stora, cytotoxiska och porbildande toxiner som finns hos många gramnegativa patogener. Rtx står för *repeats in toxin* vilket syftar på att toxinerna har en kalciumbindande peptiddel som ofta repeteras i molekylen. Rtx-toxinet hos legionella, RtxA, betraktas av en forskargrupp som en viktig virulensfaktor medan en annan menar att RtxA om något bara spelar en mindre roll i sammanhanget och inte har någon betydelse som porbildande toxin vare sig i kontaktskedet eller i avslutningsfasen då värdcellen dödas.

Rib-toxinet

Rib-toxinet (*Release of intracellular bacteria*) är ett annat porbildande cytotoxiskt protein som tycks ha betydelse för hur snabbt värdcellen dödas när den intracellulära tillväxten upphör. Det är möjligt att Rib-toxinet därmed har betydelse för hur snabbt och hur omfattande sjukdomen utvecklas, men toxinet är egentligen inte nödvändigt, värdcellen dör ändå, om inte annat genom den kaspasaktivering som sker redan i infektionsstadiet.

Kaspasaktivering (programmerad celldöd)

Kaspaser är en grupp av ”domedagsproteaser” som finns som latenta enzymer i alla celler. När de aktiveras inifrån cellen sker en kaskadreaktion som slutar med att cellen dör. Processen kallas programmerad celldöd (apoptosis).
L. pneumophila har förmågan att aktivera cellens kaspaser, det sker redan vid

den första kontakten men eftersom processen tar en viss tid så hinner legionella tillväxa inuti värdcellen innan denna dör. Fördelen för legionella med att aktivera kaspaserna är dels att bakterierna lätt kan ta sig ut från cellen när tillväxtfasen är över, dels att en del näringsämnen frigörs när kaspaserna börjar bryta ned cellen.

Intracellulär tillväxt

När bakterierna inneslutits i en fagosom börjar den verkliga utmaningen. För nu måste ett batteri av virulensfaktorer sättas igång för att bakterierna ska kunna tillväxa: makrofagens giftarsenal måste hejdas, mitokondrier måste dirigeras till fagosomen, signalsystem måste upprättas så att näringsämnen och byggstenar hittar rätt. Och så vidare.

Ganska lite är känt om de exakta mekanismerna bakom detta. Däremot vet man numera en hel del om vilka gener som är inblandade. Nästan allting styrs från två kromosomala genfamiljer som brukar sammanföras under beteckningen icm/dot som står för *intracellular multiplication* respektive *defective for organelle trafficking*. Icm/dot är ett typ 4 sekretionssystem (T4SS) som injicerar verksamma proteiner in i värdcellen. Totalt omfattar icm/dot 27 gener men frånsett generna som styr T4SS, kaspasaktivering och som producerar Rib-toxinet, är deras egentliga funktion ganska lite känd. Några av generna i icm är i själva verket komponenter i bakteriernas konjugativa DNA-transfer som verkar ha modifierats till att styra tillväxten inuti amöbor och makrofager.

PÅVISNING

Påvisning av legionella i dricksvatten kan göras genom isolering på selektiva medier eller med PCR-metodik. För PCR finns flera kommersiellt tillgängliga kits att tillgå. De har varierande specificitet, en del är nästan helt inriktade på *L. pneumophila*, andra täcker i princip hela släktet. På senare tid har även kvantitativa metoder publicerats. För vattenprover finns också kommersiell FISH-teknik för mikroskopering.

Isolering av legionella från dricksvatten

Vattenprovet koncentreras med hjälp av filtrering genom 0.45 μm membranfilter. Mängderna varierar i olika länder och för olika vatten, men storleksordningen är att en liter vatten antingen koncentreras till 10 ml eller att membranfiltret används direkt. I bland annat Storbritannien är det standard att dela upp det koncentrerade vattenprovet i tre satser varav en behandlas med

syra (pH 2.2 i 3 minuter), en värmebehandlas (50°C i 30 minuter) och en testas obehandlad. Syra- och värmebehandlingarna är tänkta att reducera antalet konkurrerande bakterier, men de reducerar samtidigt antalet legionella så det är tveksamt om förbehandlingen verkligen är värd merarbetet.

Vattenprovet eller membranfiltret sätts ut på ett selektivt medium som inkuberas aerobt eller i 2-5 % koldioxidatmosfär 35-37°C i upp till 10 dygn. Det vanligaste basmediet är Edelsteins BCYE (*buffered charcoal yeast extract*) som innehåller (g/L): Acesbuffert/kaliumhydroxid 10, jästextrakt 10, aktivt kol 2, alfa-ketoglutarat 1, L-cystein 0.4, järnpyrofosfat 0.25, agar 13. Till detta basmedium tillsätts en selektiv blandning som kan variera: en som visat sig ge gott utbyte består av glycin 3 g/L, vancomycin 0.1 mg/L, cykloheximid 80 mg/L och polymyxin B-sulfat 79 200 IU/L. Såväl grundsubstrat som antibiotikablandning finns att tillgå från flera medietillverkare, bland annat Oxoid. Olika arter av legionella ger mycket olika koloniutseende på BCYE och därför måste alla framväxta kolonier testas. BCYE med vancomycin, cykloheximid och polymyxin är konstruerat för *L. pneumophila* men tillåter utväxt av flertalet humanpatogena arter.

Identifiering

Klassisk biokemisk screening av de framväxta kolonierna innebär att man stryker kolonierna på en BCYE-platta som inte innehåller cystein. Legionella växer inte där (notera dock att laboratoriestammar av legionella, alltså sådana som renodlats flera gånger, kan få ett ändrat tillväxtmönster och då faktiskt kan börja bilda kolonier på medier som nyisolerade legionella inte växer på).

Oavsett om man gör sig besväret att screena de framväxta kolonierna eller inte, så sker egentlig identifiering numera alltid med immunologisk eller molekylärgenetisk metodik. För immunologisk identifiering finns kits för bland annat latexagglutinering och EIA att tillgå från flera tillverkare. För PCR-metodik finns också en rad kommersiellt tillhandhållna kits att tillgå, en del av dessa har för övrigt konstruerats för att korrelera med serogruppsindelningen, det gäller till exempel OnarLp från Minerva Biolabs i Berlin.

Epidemiologi

Serologi

De arter av legionella som studerats närmare (det gäller framför allt de 21 arter

som betraktas som humanpatogena) indelas i 60 serotyper. *L. pneumophila* omfattar 15 serotyper, övriga arter endast en eller två serotyper. Vissa serotyper, som den viktigaste humanpatogenen *L. pneumophila* serotyp 1 (som står för 95 % av sjukdomsfallen i Sverige), kan indelas vidare med hjälp av monoklonala antikroppar. Sådana undergrupper har namn efter den ort där de först påträffades, till exempel Bellingham, Benidorm eller Knoxville.

Molekylärgenetik

Den serologiska typningen är ett ganska effektivt redskap för att spåra stammar men även de monoklonala undergrupperna kan indelas ytterligare med hjälp av molekylärgenetiska fingeravtrycksmetoder. För just legionella har man sedan länge använt en databas som baseras på AFLP-mönstret och denna finns på internet under namnet EWGLI (*European Working Group of Legionella Infections*). Även PFGE och SBT (*Sequence Based Typing*) används flitigt som typningsmetoder.

Listeria monocytogenes

— Terroristen i färdigmaten —

ÖVERSIKT

Det finns ingen enkel sanning då det gäller *Listeria monocytogenes*. Möjligen kan man säga att det finns fyra olika. En sanning är att var tjugonde människa bär omkring med bakterien i sin tarmkanal utan att känna några obehag av det. En andra sanning är att alla då och då, förmodligen nästan dagligen, får i sig små mängder av bakterien utan att märka av det. En tredje sanning är att då friska människor får i sig astronomiska mängder – vi talar om miljardtals bakterier – så insjuknar visserligen många, men bara i en snabbt övergående och komplikationsfri enterit med en lätt feber. Kort sagt: listeria är nästan fullständigt harmlös för andra än för riskgrupperna.

Den fjärde sanningen, och den som gör listeria så fruktad att man i en del länder infört nolltolerans mot bakterien, är att riskgruppen verkligen råkar mycket illa ut. Hos mottagliga individer invaderar och förökas bakterierna i de drabbades celler och sprids sedan från cell till cell rakt genom tarm- och blodbarriärerna. Följden blir blodförgiftning som ofta leder vidare till hjärnhinneinflammation. Riskgruppen är dels den vanliga, alltså de mycket gamla och de mycket sjuka. Om dessa insjuknar i listerios är dödligheten 20-30 %, en förfärande hög andel som bland de livsmedelsassocierade bakterierna bara överträffas av *Vibrio vulnificus*. Den andra riskgruppen är foster och nyfödda barn. För dessa är dödligheten extrem, mellan 50 % och 80 % har observerats i olika studier.

Listeria förekommer i praktiskt taget alla typer av livsmedelsråvaror. Bakterierna dör vid värmebehandling men färdigmat kan återkontamineras av listeria om bakterierna fått fotfäste i produktionslokalerna. Kylförvaring ger inget fullständigt skydd eftersom listeria kan förökas ända ned mot fryspunkten. Dessertostar av opastöriserad mjölk är en välkänd infektionskälla, men höga halter listeria kan man också finna i färdigmat som charkprodukter och kallrökt fisk där bakterierna i skydd av vakuumförpackning har möjlighet att ostört tillväxa i en månad eller mer.

BAKTERIEN

Listeria omfattar grampositiva, katalaspositiva, oxidasnegativa rörliga stavar som kan växa såväl aerobt som anaerobt. De är vitt spridda i naturen där de lever saprofytärt genom att bryta ned kolhydrater i växter. De två patogena arterna har dessutom en nisch intracellulärt hos djur och de förekommer också hos friska bärare från vilka bakterierna utsöndras i stora mängder genom avföringen. Fylogenetiskt hör listeria hemma i den aeroba grenen av de GC-fattiga grampositiverna där de har närmast släktskap med de livsmedelsassocierade bakterierna inom *Brochotrix*.

Släktet omfattar sex arter av vilka två, *L. monocytogenes* och *L. ivanovii* är intracellulära parasiter medan de övriga fyra (*L. grayi, L. innocua, L. seeligeri* och *L. welshimeri*) betraktas som apatogena. *L. ivanovii* är en betydande patogen för vissa djur, framför allt får och getter, men brukar uppfattas som ofarlig för människor även om enstaka infektioner finns beskrivna. Den ende humanpatogenen är därför *L. monocytogenes.* Samtliga stammar av *L. monocytogenes* betraktas som patogena, men vissa är helt klart mera virulenta än andra: över 95 % av listerioserna orsakas av tre serotyper: 1/2a, 1/2b samt 4b och särskilt den sistnämnda verkar omfatta speciellt aggressiva kloner.

Namnet *Listeria* är tillägnat den brittiske kirurgen Joseph Lister som på 1800-talet införde ”karbolsyra” (fenol) som antiseptikum vid operationer.

SJUKDOMARNA

Man måste skilja på listerios, som är en invasiv, livshotande sjukdom med långsamt förlopp och listeriaenterit som är en mild ”matförgiftning” med snabbt förlopp.

Infektionsdos, listerios

Frågan om infektionsdosen är nästan minerad mark: i USA har man infört nolltolerans mot bakterien med motiveringen att det inte är klarlagt att låga halter listeria (enstaka bakterier) i livsmedel är ofarliga. Men det vi kan konstatera är att när det gäller större utbrott av listerios, så har halterna i livsmedlen genomgående varit så höga att de drabbade fått i sig miljontals bakterier. Det förefaller alltså som att infektionsdosen är hög även för personer som tillhör riskgrupperna. En beräkning från Världshälsoorganisationen och FAO (*Food and Agriculture Organization*) gör också gällande att om man kunde

komma tillrätta med livsmedel med listeriahalter över log 3.5 per gram (alltså 3000 bakterier per gram) så undviker man också mer än 99 % av listeriosfallen. Den nuvarande gränsen på max 100 listeria per gram livsmedel som de flesta länder inklusive Sverige har verkar därför rimlig.

Infektionsdos, listeriaenterit

När stora grupper av helt friska individer drabbas av listeriaenterit är halterna i livsmedlen astronomiska och de drabbade har utsatts för miljardtals bakterier. Man bör observera att dessa individer normalt enbart drabbas av listeriaenterit och alltså inte i ett senare läge drar på sig listerios.

Inkubationstid, listerios

Inkubationstiden är mycket varierande. Vanligtvis insjuknar man 1-3 veckor efter att ha ätit det infekterade livsmedlet, men alltifrån 3 dygn till 10 veckors inkubationstid har förekommit.

Nyfödda som smittats av modern utvecklar antingen tidiga symptom 1-2 dygn efter födseln eller sena symptom efter 1-8 veckor. Vid tidiga symptom har barnet smittats redan under fostertiden, vid senare symptom smittas barnet antingen under själva födseln eller via kontaktsmitta från andra barn. I de fall då fostret aborteras sker detta 2-14 dagar efter att modern insjuknat.

Inkubationstid, listeriaenterit

Till skillnad från vid listerios är inkubationstiden för listeriaenterit kort, ungefär 20-30 timmar.

Symptom, listerios

Gravida som infekteras får ofta inga symptom alls och i annat fall lätt influensaliknande symptom med måttlig feber. Fostret, särskilt under den senare halvan av graviditeten, drabbas däremot hårt: spontanaborter och dödfödslar är vanliga. De nyfödda kan drabbas av lunginflammation och blodförgiftning med mycket hög dödlighet. Även hjärnhinneinflammation med ibland bestående hjärnskador kan bli följden. Dödligheten för nyfödda smittade kan vara över 50 % vid tidiga symptom och 10-20 % vid sena symptom. Modern själv drabbas ytterst sällan av några komplikationer.

Övriga vuxna infekterade i riskgrupperna (svåra underliggande sjukdomar eller hög ålder) kan ha en inledande period av milda influensaliknande symptom som feber, muskelvärk och ibland också illamående och diarré.

Många är dock helt besvärsfria tills listeriosen slår till med full kraft: då sprids bakterierna till blodet med blodförgiftning som följd och/eller till centrala nervsystemet varvid symptomen kan omfatta huvudvärk, nackstelhet, balansproblem, förvirring och konvulsioner. Listerios är en långvarig sjukdom som kan ta flera veckor eller till och med månader att repa sig från. Antibiotika kan sättas in men har begränsad effekt om komplikationer inträffar. Hjärnhinneinflammation är en mycket vanlig komplikation och 20-30 % av de drabbade inom riskgrupperna dör.

I de flesta större utbrott kan man notera att det finns en liten andel insjuknade som inte tillhör riskgrupperna. Dessa till synes fullt friska individer kan utveckla svåra symptom men de repar sig praktiskt taget alltid.

Symptom, listeriaenterit

Diarré, buksmärtor och feber är de vanligaste symptomen, men ofta förekommer även uppkastningar och huvudvärk. I sällsynta fall sprids bakterierna till blodet men som regel är sjukdomen snabbt övergående. Det ska än en gång påpekas att listeriaenterit uppkommer efter intag av ofantliga mängder listeria och att denna ”matförgiftning” drabbar alla, även helt friska individer. Det är förklaringen till att man vid listeriaenterit sällan ser några komplikationer. I det största kända utbrottet av listeriaenterit insjuknade nästan 1600 personer, men bakterierna spreds vidare till blodet endast hos en och även denna person överlevde. Vid detta utbrott var det framför allt barn som drabbades och andelen insjuknade uppskattades till 70 % av dem som utsatts för smittan. Varaktigheten vid listeriaenterit är 3-4 dagar.

Incidens, listerios

Listerios är av allt att döma en ovanlig sjukdom. I USA räknar man med 2500 fall årligen vilket är en försvinnande liten del av de många miljoner ”matförgiftningar” som inträffar. Räknar man däremot antalet döda, i USA uppskattat till 500 per år, är däremot listerios en av de farligaste livsmedelsassocierade sjukdomarna. Det ska påpekas att diagnosen listerios ställs kliniskt vilket innebär att det endast är de svårare fallen som räknas som listerios, de som insjuknar med influensaliknande symptom faller utanför statistiken.

I Sverige är antalet insjuknade omkring 60-70 per år. Av dessa utgör gravida kvinnor bara en liten del, normalt två fall per år. Större utbrott av listerios är ovanliga, det förekommer endast några enstaka fall årligen över hela världen. I

Sverige har vi bara haft ett säkerställt utbrott, det drabbade i mitten av nittiotalet åtta personer som ätit kallrökt regnbåge (två personer dog).

Incidens, listeriaenterit

Eftersom sjukdomen är mild kan man räkna med att många fall går ouppmärksammade. Det var först på nittiotalet man uppmärksammade listeriaenterit och sedan dess har man noterat ungefär lika många utbrott av listeriaenterit som av listerios. I Sverige hade vi ett misstänkt utbrott 2001 som tillskrevs gårdstillverkad färskost av opastöriserad mjölk.

Listerios på cellnivå

Listeria är en intracellulär patogen och måste därför först ta sig in i de celler den förökas i. Det sker naturligt med makrofager som aktivt tar upp listeria och innesluter dem i en membranförsedd fagosom i vilken bakterierna sedan normalt ska dödas genom makrofagens kemiska arsenal. Men fagosomen hinner aldrig mogna, när den första fasen inleds med surgörande av fagosomen aktiveras ett listeriatoxin som kollapsar membranet genom att bilda porer i det. Till icke-fagocytära celler tilltvingar sig listeria tillträde genom att bilda en inbuktning i cellmembranet som till sist snörps av och listeria blir då innesluten i cellen i en membranförsedd vakuol.

Efter att ha kollapsat cellmembranet slipper listeria ut i cellvätskan där de förökas. Nu aktiveras ett protein som ombildar värdcellens klotformiga aktin till trådformigt aktin. Detta trådformiga aktin avsätts kontinuerligt i ena änden på bakterien så att bakterien successivt skjuts framåt i andra riktningen. Aktinet fungerar alltså likt en raketmotor som driver bakterien mot värdcellens membran. När bakterien når cellmembranet fortsätter aktinmotorn att knuffa listeria framåt och värdcellens membran tänjs utåt så kraftigt att utbuktningen går in i granncellen. Utbuktningen ”fagocyteras” sedan av granncellen varvid listeria lyckats sprida sig till en ny cell utan att hamna utanför cellen och därmed utsättas för kroppens antikroppsförsvar.

Även om man har ganska klart för sig hur listeria fungerar inuti värdcellerna så är mycket oklart om hur listerios egentligen utvecklas. Experimentellt har man kunnat visa att listeria mycket snabbt, faktiskt på bara några minuter, kan nå vitala organ. Men detta rimmar dåligt med den månadslånga inkubationstiden innan sjukdomen manifesteras. Man kan anta att det under inkubationstiden råder ett utnötningskrig mellan kroppen och bakterierna. Hos friska individer går infektionen aldrig särskilt långt, listeria dödas redan tidigt i processen och

får ingen chans att växa till. Det är det anpassade immunförsvaret med T-celler i spetsen som tar hand om bakterierna.

Det allra första hindret är annars magsyran som ganska effektivt dödar åtminstone små mängder av bakterierna. Användning av mediciner som hämmar syrabildningen anses därför som en riskfaktor. I tunntarmen har listeria experimentellt visats kunna förökas i den lymfoida vävnad som kallas Peyers plack och som normalt är en försvarslinje mot patogener. Från Peyers plack transporteras sedan listeria genom det lymfatiska systemet till mjälte och lever. Just levern verkar vara det primära målet och hos mottagliga individer med nedsatt immunförsvar förökas listeria i levercellerna tills de når sådana halter att de tränger ut i blodbanan med blodförgiftning som följd och till centrala nervsystemet med hjärnhinneinflammation som en vanlig följd.

Riskgruppernas T-lymfocyter är försvagade på grund av svåra underliggande sjukdomar eller medicinering och klarar inte av uppgiften. Den mycket höga östrogenproduktionen under senare delen av graviditeten försämrar också T-lymfocyternas funktion vilket möjliggör listerias spridning till fostret.

De många dödsfallen vid listerios beror på att listeria har en obehaglig förmåga att passera moderkakan och blod/hjärnbarriären. Den senare består av en mycket tät formation av epitelceller där inte ens antibiotika kan passera, men listerias förmåga att spridas sig från cell till cell gör att de kan passera barriären.

Listeria hos djur

Listeria, och då inte bara *L. monocytogenes* utan också *L. ivanovii*, är en vanlig patogen hos såväl däggdjur som fåglar. Komplikationerna är desamma som hos människan, alltså abortering och hjärnhinneinflammation med hög dödlighet som följd. Bland husdjuren är det framför allt får och getter som är känsliga och de smittas oftast av dåligt ensilage där syraproduktionen antingen uteblivit eller där revor i förpackningsmaterialet lett till att syre kommit in, vilket gynnat mögelsvampar som höjt pH-värdet tillräckligt mycket för att listeria kunnat växa till.

LIVSMEDEL: TILLVÄXT

Temperatur

Listeria kan växa inom temperaturintervallet 0°C till 44°C. Optimum-temperatur är 30-37°C men bakterien växer påfallande snabbt även vid rumstemperatur och utbrott har skett där bakterien på bara 10 timmar i rumstemperatur nått extremt höga halter i livsmedel. Även inom intervallet 10-15°C sker tillväxt ganska snabbt i livsmedel med optimalt pH-värde (6-8) och sannolikt har många av de livsmedel som figurerat i utbrott av listeria haft en historia med temperaturmisshandel som ingrediens.

För även om listeria under i övrigt helt optimala förhållanden kan tillväxa i kyltemperatur (0-8°C) så är tillväxt i livsmedel i praktiken begränsad till intervallet 4-8°C. Gränsen tycks gå vid 4°C där bakterierna under goda förhållanden (optimalt pH-värde och vakuumförpackning) kan utvecklas ganska väl. Under 4°C är signifikant tillväxt i livsmedel osannolik under rimliga tidsperioder oavsett övriga förhållanden.

Värmeresistens

Listeria är liksom de flesta andra grampositiva bakterier relativt värmetålig, men pastörisering (72°-74°C i 15 sekunder) räcker gott för att döda bakterierna. Så kallad termisering, d.v.s. lågtemperatursbehandling vid 60-65°C under 30 minuter, är också fullt tillräckligt för att döda bakterierna.

Syre

Listeria kan leva både aerobt och anaerobt, men den föredrar en miljö med begränsad syrgashalt och 5-10 % koldioxid vilket gör vakuumförpackningar till en nära nog ideal miljö. I modifierad gasförpackning beror det på sammansättningen av gasen om listeria förökas eller inte, förpackningar med >50 % koldioxid anses ge ett fullgott skydd mot tillväxt i kyla.

pH

Under i övrigt optimala förhållanden kan listeria växa inom pH-intervallet 4.3 till 9.6. Det förutsätter dock en temperatur på 30-37°C vilket ju är orealistiskt för livsmedel. Fermenterade produkter med pH under 5.2 är säkrade för tillväxt under rimliga lagringsförhållanden och i kylförvarade produkter sker tillväxt endast om pH ligger inom 6-8.

Saltning och rökning

Listeria är mycket motståndskraftig mot salt, under optimala förhållanden klarar bakterien av att växa i en saltlag på 12 % vilket innebär att saltlakar som används för produktion av charkprodukter och ostar mycket väl kan fungera som en smittkälla. Saltade och rökta charkprodukter ger alltså inget skydd mot bakterierna om inte rökningen är så kraftig att produkten torkar in.

Mikrobiell konkurrensförmåga

Även om listeria kan växa i kyltemperatur så erbjuder livmedelsråvaror som kött och mjölk inga lämpliga tillväxtförhållanden under aeroba lagringsförhållanden. Förskämningsbakterier som pseudomonas växer helt enkelt så mycket snabbare och förstör råvarorna långt innan listeria fått någon chans att utvecklas. Störst chans att tillväxa har listeria i värmebehandlade och återkontaminerade charkprodukter eller i gravad/rökt fisk. Om sådana produkter – med ett pH-värde över 6 – vakuumförpackas ges en nära nog optimal miljö för listeria att utvecklas i. Tillväxten sker då snabbt vid 8°C och tillräckligt snabbt även vid 4°C för att produkterna ska kunna innehålla betydande listeriahalter vid bäst-före-datum.

LIVSMEDEL: PRODUKTER

L. monocytogenes förekommer i alla typer av råvaror. Generellt sett kan man säga att bakterien finns i storleksordningen 10 % av nästan alla typer av råvaror. Halterna är dock låga och råvarorna i sig utgör ingen större fara. I färdigmat av olika slag där listeria teoretiskt kan förökas ligger frekvensen i regel inom området 1-3 % och här är halterna undantagsvis höga, mer än 100 000 bakterier per gram hittas då och då i rutinanalyser. Det som egentligen avgör halten är hur lång hållbarhetstid den kylförvarade produkten har: ju längre hållbarhetstid desto större är risken. Erfarenhetsmässigt är det charkvaror av kött och fågel som ställer till med mest bekymmer medan opastöriserade dessertostar är en annan vanlig riskfaktor. Gravad och kallrökt lax är ingen stor bov på den internationella marknaden men är förmodligen de produkter som riskgrupperna i Sverige ska vara mest försiktiga med.

Frågan om nolltolerans av listeria i livsmedel är flitigt diskuterad, en del menar att det är politiska snarare än vetenskapliga beslut som dikterat den amerikanska hållningen. I förlängningen innebär den ett totalförbud för ost gjord på opastöriserad mjölk som lagrats kortare tid än två månader vilket i klartext innebär ost importerad från Europa och särskilt Frankrike.

Nolltoleransens effektivitet har också kritiserats av forskare från amerikanska livsmedelsindustrin. Myndigheten (FDA) införde 2008 en ändring, gränsen ligger numera på 100 listeria per gram livsmedel som *inte* tillåter växt av listeria. Däremot är det fortfarande nolltolerans (vilket i praktiken betyder <0.04 listeria per gram livsmedel) i produkter som tillåter tillväxt av listeria.

Kött

Låga halter *L. monocytogenes* är ganska vanliga, i västvärlden kan man räkna med att hitta bakterien på 10 % av slaktkropparna av såväl gris, lamm och nötboskap som kyckling, kalkon och andra fjäderfän. Men slakthygien, rengöring och desinfektion är viktig eftersom bakterierna kan spridas till kropparna såväl via djurens avföring som personalens redskap och slakteriets tekniska utrustning. Därför finns det stora skillnader i listeriafrekvens mellan olika länder och även mellan slakterier i samma land.

Men det är inte råvarorna som orsakar listerios utan i stället värmebehandlad och vakuumförpackad färdigmat. Listeria överlever inte värmebehandlingen men från köttet sprids bakterien till charkuterimiljön där listeria etableras som en husflora och kan återkontaminera färdigmaten. Hygien, rengöring och desinfektion är återigen nyckelorden för att hålla nere återkontaminationen. Listeriafrekvensen i charkvaror kan beräknas till 1-3 % i de flesta västländer. I vakuumförpackade produkter har listeria gott om tid att växa till om temperaturen är 4°C eller högre och man kan kallt räkna med att vid bäst-före-dag i storleksordningen var tusende förpackning av vakuumförpackad färdigmat har halter över 1000 listeria per gram.

Franska gristungor

Produktionslinjen spelar som sagt en helt avgörande roll vid utbrott av listerios. Vid det stora franska utbrottet 1992-1993 då 85 människor dog spårades smittkällan till gristungor i gelé tillverkade av Coudray, en liten producent av traditionella franska rätter. Samma tillverkare hamnade i blåsväder också år 2000 då tre människor dog efter att ha ätit paté från fabriken. Vid samma tid figurerade återigen gristunga i gelé i ett utbrott som krävde ytterligare fem människors liv. Det gick aldrig att spåra tillverkaren men allmänhetens förtroende för Coudray gick i botten. Ägarkoncernen Paul Prédault införde ett massivt hygienarbete och bytte namn på tillverkaren, men inget hjälpte och den tidigare så välmående koncernen förlorade massor av

pengar. Efter några år tröttnade man och sålde Coudray till en lokal ägarförening. Företaget heter numera Cosnelle…

Wampler-listerian

Hösten 2002 inträffade ett utbrott i USA som tydligt visade svårigheten med att spåra upp en infektionskälla. Med facit i hand kunde man konstatera att 54 personer från 8 delstater insjuknat i listerios och att den sannolika orsaken var färdigskivat kokt kalkonkött som distribuerats över nordöstra USA.

De första fallen kom i slutet av augusti. Flera personer i Philadelphia drabbades nästan samtidigt av en mystisk förlamande sjukdom som kännetecknades av hög feber med starka inslag av hallucinationer. Listeria isolerades från blodet hos samtliga insjuknade och diagnosen stod därför klar: ett lokalt utbrott av listerios. En av de insjuknade var en 98-årig före detta läkare som en gång i tiden hade förlöst Bruce Springsteen vilket per omgående väckte massmedias intresse.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) i Atlanta kontaktades och en mödosam jakt påbörjades. Stammarna från de insjuknade i Philadelphia hade alla samma ”fingeravtryck” (PFGE-mönster) och utgjorde därför sannolikt en klon från en gemensam källa. Så långt var allt som väntat. Men en kontroll av listeriosfall från andra delstater visade att samma PFGE-mönster började dyka upp på flera platser. Det som antogs vara ett lokalt och begränsat utbrott hade svällt till ett nationellt utbrott. Samtidigt började utbrottet att skörda sina första dödsoffer så trycket på CDC att hitta källan ökade.

Men listerios har en månadslång inkubationstid och det är inte lätt att få fram vad människor åt för någon månad sedan och de smittade livsmedlen fanns heller knappast kvar ute i handeln. Men mängder av prover måste ändå tas både i konsument- och produktionsled. Kyckling- och kalkonkött toppade redan från början listan över misstänkta produkter men det fanns många tillverkare som distribuerade sina varor över nordöstra USA.

Man hittade inte listeriastammen i någon produkt men i avloppet hos Wampler Foods, strax utanför Philadelphia, blev det napp: samma PFGE-mönster som hos de insjuknade. Wampler Foods, en av områdets allra största producenter, tvingades återkalla 12 miljoner kg kalkondelikatesser av det senaste halvårets tillverkning vilket dock låter mer än vad det var (det allra mesta var ju sedan

länge uppätit). Eftersom den aktuella stammen, i massmedia nu kallad Wamplerlisterian, inte hittades i företagets produkter hävdade Wampler Foods att man var oskyldigt till utbrottet. Men stämningarna började regna in då det visade sig att företaget nyligen fått mängder av anmärkningar för bristande hygien, bland annat hävdade en inspektör att avloppsvatten stänkt upp på det färdigkokta och oskyddade kalkonköttet. Och inte blev det bättre av att företagets internkontroll hade visat en kraftig ökning av listeria i produkterna vid tiden för det misstänkta utbrottet.

Mitt i all uppståndelsen hittar CDC dessutom nu stammen för första gången i ett par kalkonprodukter. Men inte hos Wampler utan hos Jack Lambersky Poultry som hör hemma i Camden, New Jersey! CDC:s förklaring är att båda tillverkarna förmodligen fått smittad råvara från en gemensam uppfödare (de båda producenterna ligger ganska nära varandra på var sin sida om delstatsgränsen). Att CDC inte kunde fastställa vem som orsakat utbrottet medförde dock att juristerna fick ge upp försöken att klämma åt Wampler Foods.

Åtta av de 54 insjuknade dog (det åttonde offret var Springsteens gamle läkare) och tre kvinnor drabbades av missfall. Samtliga åtta döda var antingen gamla eller svårt sjuka. Men vid listeriosutbrott är det vanligt att en liten del av de insjuknade inte tillhör någon riskgrupp. Så var det också här, sex personer var tillsynes helt friska. Varför fullt friska människor kan vara mottagliga finns det ingen bra förklaring till, men sker det så drabbas de sällan särskilt svårt och de överlever nästan alltid.

Fisk och skaldjur

Hur stor andel av fiskarna som innehåller listeria varierar starkt mellan olika undersökningar (0-100 %!), men här i Norden kan vi räkna med att *L. monocytogenes* återfinns i 10-20 % av all rå fisk som saluförs. Fisk är därför den livsmedelsråvara som oftast innehåller bakterien. Halterna är låga och tillagad färsk fisk innebär ingen fara. Men trots låga halter ska nog gravida se till att undvika sushi på fisk och skaldjur. Att frekvensen positiva fynd varierar så starkt mellan olika undersökningar har att göra med var fisken är fångad: fisk fångad i djuphavsmiljöer långt från kuster innehåller bara undantagsvis listeria medan fisk i kustnära trakter och i sötvatten uppvisar högre frekvens, det rör sig om påverkan från land.

Ännu större anledning har gravida att undvika kallrökt och gravad lax (och annan fisk). Frekvensen listeria i sådana produkter ligger i Sverige runt 15 % för gravad fisk och runt 10 % för kallrökt fisk vilket kan jämföras med 3 % för varmrökt fisk (vilket är ungefär som för charkuteriprodukter.) Gravad fisk kan ju betraktas som rå, medan kallrökning trots den för listeria gynnsamma produktionstemperaturen på 20-30°C faktiskt tycks ge en viss hämmande effekt och antalet positiva prover är därför något färre än i gravade och råa produkter. Varmrökning sker vid så hög temperatur (50-60°C) att effekten blir en lågpastörisering. Varmrökta fiskprodukter är därför inte mer utsatta än till exempel kokta charkuteriprodukter och listeria i varmrökt fisk beror på återinfektering.

Genom att fiskprodukterna vakuumförpackas och stämplas en hållbarhet på ibland flera veckor får listeria lång tid på sig att tillväxa om temperaturen inte understiger 4°C. I ett finskt fall av listeriaenterit hade den kallrökta fisken vakuumförpackats 17 dagar före konsumtion. Man kunde i detta fall kontrollera temperaturen i kylkabinettet där produkterna förvarades och kunde konstatera att temperaturen i botten var 5°C men i toppen hela 12°C. Bland övriga fisk- och skaldjursprodukter som orsakat utbrott av listerios eller listeriaenterit finns färskrökta musslor, imiterat krabbkött samt räkor.

Mejeriprodukter

Det stora amerikanska utbrott av listerios som 1985 krävde 48 människoliv spårades till en färskost som i USA går under benämningen ”Mexican-style cheese” vilket i sammanhanget bara betyder att färskosten var tillverkad på ett sätt som gav den bra smältegenskaper, en slags mexikansk variant av Mozzarella. I efterrapporteringen har ”Mexican-style” däremot kommit att antyda ”opastöriserad mjölk” och rentav insinuera ”dålig hygien”. Nå, nu var osten ifråga ingalunda importerad från Mexiko utan tillverkades av ett kaliforniskt mejeri som dessutom termiserade mjölken, det vill säga upphettade den till 60-65°C under 30 minuter. Man kunde inte hitta den aktuella listerian i leverantörsmjölken men möjligen låste man vid denna tid sig fast vid att smittkällan ”måste” vara opastöriserad mjölk och i slutrapporten drogs slutsatsen att opastöriserad mjölk sannolikt av misstag blandats med den termiserade mjölken.

Boskap med mastit kan utsöndra hundratals miljoner listeria per liter mjölk och opastöriserad mjölk samt ost gjord av opastöriserad mjölk har alltsedan

åttiotalet ansetts utgöra den största riskfaktorn. Med ökande uppmärksamhet kring listeria och testning av inkommande mjölk till osttillverkningen har dock riskerna minskat. Det finns till och med moderna undersökningar som visar på att frekvensen listeria kan vara högre i pastöriserade dessertostar än i opastöriserade. Det är nog i och för sig ingen allmän sanning, men det visar att medvetenheten om problemet nog kan vara högre hos producenterna av ost från opastöriserad mjölk. Pastöriseringen kan invagga många producenter i en falsk säkerhet där man glömmer att också produktionslokalerna måste vara fria från listeria för att inte osten ska återinfekteras.

Harzer Käse och Quargel

Den tyska pastöriserade kittosten *Hartzer Käse* (*Quargel* i Österrike) har de senaste åren orsakat två större listeriautbrott. Osten har en mycket kort tillverkningstid, ofta bara 2 veckor och lagras under denna tid vid förhållandevis hög temperatur. Det är en typisk dietost med mycket lågt fettinnehåll. Det första utbrottet i Tyskland 2006-2007 drabbade omkring 200 personer varav 80 % krävde sjukhusvård och 14 % dog. Det andra fallet inträffade 2009 och orsakades av en österrikisk tillverkare: 14 personer insjuknade varav 4 dog. Hos en av patienterna hittades en ost i kylen, den innehöll över 2 miljoner listeria per gram.

Å andra sidan kan det knappast råda någon tvekan om att de riktigt höga halterna listeria är kopplade till produkter som gjorts från opastöriserad mjölk från kor, får eller getter. Ett franskt utbrott på nittiotalet spårades exempelvis till den opastöriserade *Brie de Meaux* och flera andra fall finns dokumenterade. I detta sammanhang ska man tillägga att risken gäller färska dessertostar, alltså sådana med mindre än två månaders lagringstid. Vällagrade opastöriserade hårdostar som exempelvis *Emmenthal, Gruyere* eller *Parmiggiano reggiano* är oskyldiga och figurerar inte i statistiken.

De flesta vitmögelostar har egentligen så pass lågt pH-värde att listeria inte trivs (det viktigaste undantaget är *Camembert*), men strax under mögelytan är pH förhöjt och just där skapas goda förutsättningar för tillväxt av listeria. Problemet är likartat för kittostar där det är brevibakterier och andra coryneforma bakterier som höjer pH i ytlagret. Det gäller inte bara för rödkittsostar som *Münster* utan också för grönmögelostar med kittbakterier som *Gorgonzola*. I Japan insjuknade 86 personer i listeria-enterit efter att ha ätit

en lokalt producerad kittost som vid uppföljning visade sig innehålla 50 miljoner *L. monocytogenes* per gram.

Det är inte bara mjölk och ost som gett orsakat utbrott av listerios. Glass har varit smittkälla och i Finland inträffade 1998-1999 ett utbrott av listeria på ett sjukhus som osannolikt nog spårades till portionsförpackningar av smör. Listeria kan givetvis inte växa i smör så bakterierna fanns där redan vid tillverkningen. Man uppmätte inga extrema halter listeria i smöret, som mest ca 10 000 per gram. Men många patienter hade ätit smöret under lång tid och det fick undersökarna att spekulera i om många måttliga doser eventuellt kunde ha adderats till en mycket stor slutdos.

Mont d'Or-utbrottet

Under åren 1983-1987 drabbades Schweiz av en kraftigt ökad listeriosfrekvens och när rapporten om det amerikanska "Mexican-cheese"-utbrottet blev offentlig började de schweiziska myndigheterna att titta över ostkonsumtionen bland de drabbade. Det visade sig då att minst 122 fall av epidemiologiska skäl kunde kopplas till konsumtionen av en speciell dessertost, *Vacherin Mont d'Or* som tillverkades av ett dussintal små familjemejerier i Jurabergen på gränsen till Frankrike. (Osten har inget att göra med storproducenten av mjuka rödkittsostar, *Vacherin*, som vi kan hitta i nästan alla svenska ostdiskar.)

Trettiofyra människor dog av osten som är en korttidslagrad produkt (3 veckor) med ett nära nog flytande inre, den äts faktiskt med fördel med sked. Det har varit lite begreppsförvirring om ostens tillverkningssätt eftersom *Mont d'Or* också tillverkas på den franska sidan av gränsen och då med helt opastöriserad mjölk. Men det var den schweiziska *Mont d'Or* som var boven i dramat och denna tillverkades då som nu av termiserad mjölk, alltså en mjölk som fått en värmebehandling vid drygt 60°C. Den schweiziska undersökningen gjorde dock klart att de hygieniska förhållandena vid en del av de små mejerierna var sådana att listeria i stora mängder ympades in i ostarna från produktionslokalerna och att man också misstänkte att delar av produktionen faktiskt blandade termiserad och obehandlad mjölk.

Schweizisk *Vacherin Mont d'Or* är numera garanterat termiserad medan den franska varianten som också går under namnet *Vacherin du Haut Doubs* fortfarande är opastöriserad. Om någon nu skulle känna sig manad att välja utifrån detta.

Vegetabilier

Det första dokumenterade utbrottet av listerios från vegetabilier inträffade i Kanada 1981 då 41 personer insjuknade efter att ha ätit vitkålssallad. Vitkålen hade gödslats med listeriainfekterad fårspillning. Sannolikt hade lagringsbetingelserna varit sådan att listeria kunnat tillväxa på kålen under vinterlagringen. Att listeria snabbt kan tillväxa på kolhydratrika vegetabilier visades av ett utbrott i Turin 1997 då nästan 1600 drabbades av listeriaenterit efter att ha ätit en sallad av tonfisk och konserverad majs. Praktiska försök visade att listeria nådde astronomiska halter i konserverad majs som förvarades i rumstemperatur i 10 timmar, något man visste hade skett före utbrottet.

Jensens meloner

Hösten 2011 drabbades USA av ett ovanligt listeriautbrott. Ovanligt därför att fyra olika kloner av *L. monocytogenes* från en och samma källa var upphovet till utbrottet. Och ovanligt därför att det för första gången rörde sig om ett utbrott orsakat av hela frukter, cantaloupmeloner som var odlade på *Jensens Farm* i Colorado. Minst 146 personer i 28 stater insjuknade. Trettio människor dog. Utredningen visade att en husflora med listeria hade bildats i kylrummet. När de solvarma melonerna packades i kylrummet kondenserade vatten på ytan, kylningen gick mycket långsamt och husfloran hade gott om tid att växa till riskabla halter.

Vegetabilier av olika slag är internationellt sett en ganska vanlig – och ibland glömd – anledning till listerios. Groddar, svamp och grönsallat har alla figurerat i statistiken liksom fruktsallader och potatissallad. Den moderna trenden med färdiggjorda, blancherade och skurna sallater frigör näringsämnena och kan därför sägas öka listerias möjlighet att tillväxa, men så länge produkterna kylförvaras är risken ändå minimal. Undersökningar som gjorts på färdiggjorda grönsallater har också visat att listeria mycket sällan förekommer i anmärkningsvärda halter i västvärlden. Däremot ska man nog undvika att äta sådana produkter i varmare länder, en liknande undersökning från Indien visade på en listeriafrekvens på 80 %…
Vilket egentligen inte var särskilt förvånande eftersom samtliga vegetabilier som testades på en lokal marknad innehöll listeria.

Vatten

Ytvattentäkter innehåller ofta små mängder listeria medan källvatten är säkrare. Det är i miljöer som är påverkade av urbanisering eller jordbruk som vattnet innehåller listeria. Trots att bakterien är vanlig i naturen så betraktas inte *L. monocytogenes* som ett problem i dricksvatten, den överlever inte klorering och har knappast någon möjlighet att tillväxa i dricksvatten.

VIRULENSFAKTORER

Listeria monocytogenes har minst fyra typer av virulensfaktorer. Den första är förmågan att fästa till värdcellerna vilket möjliggörs av en lång rad ytproteiner med internalinerna i spetsen. Den andra är förmågan att tvinga värdcellerna att fagocytera bakterierna vilket framför allt ordnas av internalin A och B. Den tredje är att splittra cellmembranet när listeria är innesluten i en fagosom eller vakuol (hålrum) vilket utförs dels av listeriolysin O, dels av ett fosfolipas. Den fjärde är att spridas från cell till cell och här kommer ActA-proteinet in i bilden. Samtliga virulensfaktorer finns samlade på en liten del av kromosomen.

Act A-proteinet

För att kunna spridas till grannceller måste listeria intracellulärt kunna förflytta sig mot värdcellens membran. Det gör de med en mekanism som också hittats hos shigellabakterier. ActA (*actin assembling*)-proteinet hos listeria inducerar polymerisering av värdcellens klotformiga aktiner så att det i stället bildas trådformigt aktin. Dessa trådar avsätts kontinuerligt som en allt längre kometsvans i ena änden av bakterien så att bakterien skjuts fram i motsatt riktning, ungefär som principen för en raketmotor. Hastigheten är – i sammanhanget – ganska imponerande, runt 1 μm i sekunden vilket är fullt tillräckligt för att snabbt föra listeria till värdcellens membran. Väl framme vid membranet fortsätter aktinmotorn att knuffa fram bakterien så att en utbuktning bildas i membranet. Utbuktningen tränger in i granncellen där den snörps av som en vakuol med dubbelt membranlager.

ActA är ett 65 kDa ytprotein (det har en lite speciell sammansättning så det migrerar som om det vore ett 95 kDa protein vilket förklarar att det finns varierande uppgifter om molvikten). Det ActA i praktiken gör för att kontrollera aktinmotorn är att kapa värdcellens egen komplicerade reglering av aktinsyntesen och använda den för sitt eget ändamål.

Fosfolipaser

L. monocytogenes producerar två fosfolipas C betecknade PLCa och PLCb. Båda exporteras som protoxiner på 33 kDa och aktiveras som 29 kDa toxiner först när de når målet (detta för att skydda bakteriens eget membran). PLCb har en ganska bred substratspecificitet och har stor betydelse för listerias förmåga att ta sig ur de dubbelmembran som bildas när bakterien sprids från cell till cell. PLCb aktiveras när pH faller under 7.0 och samverkar med listeriolysin (se nedan) för att bryta ned det dubbla membranet. PLCa har bara fosfatidylinositol som substrat och förmodligen liten betydelse som virulensfaktor.

Internaliner

Internaliner är en grupp på uppemot 20 ytproteiner med varierande molvikter men med en gemensam domän som tros ha betydelse för listerias förmåga att fästa till värdceller. Samma proteindomän finns också hos ett par gramnegativa patogener, pestbakterien *Yersina pestis* och dysenteribakterien *Shigella flexneri*. Utöver att fungera som adhesiner är två av dem, internalin A och internalin B, även invasiner som är nödvändiga för bakteriernas förmåga att tränga in i värdcellerna.

Det 88 kDa stora internalin A fäster specifikt till receptorn E-cadherin, ett glukoprotein som är beläget tvärs genom cellmembranet. E-cadherin finns framför allt på epitelceller men förekommer även på de mikrovilli i moderkakan där listeria gärna etableras. Internalin B, som är ett något mindre protein på 65 kDa, kan fästa till flera olika receptorer och har därför ett bredare spektrum bland värdcellerna. I båda fallen påverkas värdcellens aktinkomplex vid inbindningen så att cellmembranet ändrar form och listeria kan ”fagocyteras”. Vid invasion av leverceller, det kanske primära målet för listeria, behövs både internalin A och B.

Listeriolysin O, LLO

Listerias hemolysin är ett toxin på 58 kDa som kallas listeriolysin O eller kort och gott LLO. Det har avgörande betydelse för listerias förmåga att bryta sig ut ur de fagosomer som de inneslutits i efter fagocytosen. LLO tillhör gruppen *Cholesterol Dependent Toxins* (CDTX) som är porbildande toxiner vilka attackerar kolesterolhaltiga membraner, ett vanligt tema hos grampositiva patogener där CDTX hittills hittats hos över 20 bakterier.

I fagosomer och vakuoler sjunker pH snabbt och då aktiveras LLO som har sitt optimala pH mellan 4.5 och 6.5. LLO bildar porer i de cellmembran som omger fagosomen. När bakterierna väl sluppit ut i cellvätskan inaktiveras LLO genom att pH där är 7.4. Det finns listeriastammar med LLO som är aktivt vid detta pH och sådana stammar är visserligen kraftigt celltoxiska men förlorar samtidigt sin virulens eftersom de inte kan spridas från cell till cell när LLO förstör värdcellens membraner.

PÅVISNING

Selektiva medier

I Sverige har man länge letat efter listeria med en trepunktsmetod som omfattar primär anrikning i en selektiv buljong, följt av sekundär anrikning i en ännu mera selektiv buljong och därefter utstryk på en selektiv agar. 25 g prov homogeniseras och inkuberas aerobt 30°C 24 timmar i 225 mL MUVM-buljong varefter 0.1 mL av denna kultur överförs till 10 mL MUVM2 som inkuberas på samma sätt. Från den anrikade kulturen görs sedan utstryk till Oxfordagar som inkuberas aerobt vid 37°C och undersöks efter 24 h och 48 h. Minst 10 misstänkta kolonier – brunaktiga med svart zon – testas sedan för hemolys på blodagar. Presumtiva *L. monocytogenes* (vilka ger en smal zon av beta-hemolys runt kolonin eller enbart under kolonin) konfirmeras sedan biokemiskt och serologiskt.

MUVM uttyds som *Modified University of Vermont Medium* och innehåller (g/L): proteos pepton 5, trypton 5, köttextrakt 5, jästextrakt 5, NaCl 20, KH_2PO_4 1.35, Na_2HPO_4 12, eskulin 1. Till detta grundmedium tillsätts (mg/L) nalidixinsyra 20, akriflavin-HCl 12.
MUVM2 innehåller en högre halt akriflavin-HCl (25 mg/L) men är i övrigt identiskt med MUVM.
Grundmediet för Oxfordagar är (g/L): Colombia blodagarbas 39, eskulin 1, järnammoniumcitrat 0.5, LiCl 15. Till grundmediet tillsätts (mg/L) cykloheximid 400, kolistinsulfat 10, akriflavin-HCl 5, cefotetan 2, fosfomycin 10.

Metodiken tillåter utväxt av listeria och ett antal andra grampositiva bakterier medan den ganska väl undertrycker den gramnegativa floran. Inom listeriagruppen selekterar metoden däremot inte särskilt bra för

L. monocytogenes, tvärtom har den kritiserats för att i stället gynna de apatogena arterna som därmed kan komma att maskera eventuella *L. monocytogenes*.

I olika delar av världen finns ytterligare uppåt tio olika referensmetoder beskrivna för isolering av *L. monocytogenes*, men i regel är de bara modifikationer på samma tema. Det finns ingen metodik som visat sig helt tillfredsställande enligt de jämförande tester som publicerats. En av de i litteraturen mest använda selektiva buljongerna, Frasers, skiljer sig bara från LBII genom att den inkluderar 3 g/L LiCl, vilket gör den något mera selektivare, samt ett järnsalt som gör att buljongen blir svart när eskulin bryts ned.

Övriga selektiva agarmedier

Utöver Oxford stöter man i litteraturen på en handfull agarmedier och det kan vara användbart att veta hur dessa skiljer sig från Oxfordagar. Ofta används för övrigt isolering på två olika agarmedier för att öka känsligheten.

Mox står för modifierad Oxfordagar och enda skillnaden är att den mögelhämmande och påtagligt giftiga cykloheximiden ersatts med det något mindre farliga amphotericin B.

Palcam är ett klassiskt medium som ofta används tillsammans med Oxford. Grundsubstratet är ungefär som Oxford med den skillnaden att Palcam också innehåller mannitol och en syraindikator: listeria bryter till skillnad från många andra bakterier inte ned mannitol och ger därför inget färgomslag. Som selektivt supplement innehåller Palcam (mg/L) akriflavin-HCl 5, polymyxin B 10 och ceftazidin 20 och mediet är något mera selektivt än Oxford. Palcam inkuberas helst mikroaerofilt (campylobacter gasgenereringskit kan användas). En variant är en dubbelgjutningsteknik där inkuberade plattor övergjuts med blodagar. Det underlättar detektionen av hemolytiska listeria, men ger också en besvärligare arbetsteknik.

En blodagar baserad på trypticase soja-agar med 5 % fårblod och med 10 g/L LiCl, 20 mg/L ceftazidim och 10 mg/L polymyxin B-sulfat som inhibitoriska ämnen har använts på finska livsmedelsverket. Mediet har fördelen att man lättare kan sortera bort de icke hemolytiska listeriarterna.

Under senare år har en ny generation agarmedier, de så kallade kromogena agarmedierna, tagits fram. I och för sig utnyttjas färgreaktioner även hos

Oxford och Palcam men de nyare medierna är lite mer sofistikerade: de bygger på att listeriaspecifika nedbrytningar kopplas till en reaktion som i sin tur ger ett färgomslag. Det finns flera kommersiellt tillhandahållna som *Aloa, BCM, Chromagar Listeria, Ocla* och *Rapid'L.mono*. Samtliga dessa bygger ytterst på att detektera fosfolipas hos listeria (i regel PLCa) med olika tekniker och de anses ge såväl säkrare som snabbare resultat, i synnerhet om de används parallellt med ett av standardsubstraten.

Biokemisk konfirmering

Det finns flera kommersiella biokemiska testkits som exempelvis API Listeria men det är lätt att skilja *L. monocytogenes* från övriga arter även med klassiska tester. Tre av arterna är hemolytiska: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* och *L. seeligeri*. Av dessa är det enbart *L. monocytogenes* som fermenterar rhamnos och *inte* fermenterar xylos.

Ett klassiskt listeriatest är CAMP (Christie-Atkins-Munch-Peterson)-testet, alltså ett test där man undersöker om hemolysen hos ett listeriaisolat förstärks av ett korsande utstryk av en annan bakterie. I fallet listeria är det stammar av *Staphylococcus aureus* och *Rhodococcus equi* som används för CAMP-testet. Hemolysen hos *L. monocytogenes* förstärks kraftigt av *S. aureus*, mera marginellt av *R. equi*. Hos *L. ivanovii* förstärks hemolysen endast av *R. equi* medan den hos *L. seeligeri* endast förstärks (och då ganska måttligt) av *S. aureus*.

Immunologisk konfirmering

Regelboken anger att immunologisk konfirmering av listeriaisolat alltid ska utföras. Listeria som helhet kan indelas i ett tjugotal serotyper varav *L. monocytogenes* omfattar 13 (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e och 7). Korsreaktioner är vanliga och man bör observera att flera av dessa serotyper (däribland 1/2b) även kan förekomma hos apatogena listeriaarter och att biokemisk konfirmering alltså också är nödvändig att utföra. Antisera för latexagglutinering av de vanligaste serotyperna finns hos bland annat Oxoid. För en fullständig immunologisk konfirmering är man hänvisad till speciallaboratorier.

Utöver traditionell latexagglutinering finns mer eller mindre automatiserade tekniker att köpa från bland annat bioMerieux och Tecra: de fungerar i regel bra.

Molekylärgenetisk konfirmering

Det finns en uppsjö kommersiellt tillhandahållna molekylärgenetiska kits antingen för direkt påvisning av *L. monocytogenes* i livsmedlet eller för att konfirmera ett renodlat isolat. De mest använda tillverkas av DuPont Qualicon (BAX), Gen-Probe (Accuprobe) och Gene-Trak. De brukar ha minst samma känslighet som selektiv isolering men ger snabbare resultat.

I övrigt finns gensonder och PCR-metoder publicerade för i stort sett alla ändamål och metodkombinationer, inklusive nya kommersiella, bland de kanske intressantaste är de som påvisar de högvirulenta serotyperna.

Epidemiologi

Serologi

Vid utbrott av listeria står tre serogrupper (1/2 a, 1/2 b och 4 b) för mer än 95 % av sjukdomsfallen vilket innebär att serologi som sådan inte kan användas för epidemiologiska undersökningar, inte ens om serologin utökas med fagtypning som vissa laboratorier utför. Molekylärgenetiska metoder är därför de enda som säkert kan typa ett isolat.

Molekylärgenetik

Ingenstans har epidemiologisk typning använts så flitigt som för *L. monocytogenes*. AFLP, MLST (*multi-locus sequence typing*), MVLST (*multi virulence-locus sequence typing*) och ribotypning har använts i massor av studier – ofta med gott resultat – men PFGE har tagit rollen som standard efter det att CDC infört metoden i sin PulseNet-övervakning (www.cdc.gov/pulsenet/).

Mycobacterium

– Bovin tbc –

ÖVERSIKT

Det var länge sedan lungsoten satte skräck i västvärlden. BCG-vaccination, förbättrad levnadsstandard, pastöriserad mjölk och behandling med antibiotika har reducerat tuberkulos till en nästan mytisk sjukdom som moderna läkare inte alltid ens känner igen. Men i fattiga länder har ingenting förändrats, där är tbc fortfarande Den Stora Döden med tio miljoner insjuknade och två, kanske tre, miljoner döda varje år. Sjukdomen har på senare år återvänt till delar av Europa: över en kvarts miljon fall rapporteras årligen i det kollapsade Sovjetiska imperiet. I Sverige registreras omkring 500 fall per år, huvudsakligen bland invandrare från Asien och Österuropa.

Tbc orsakas framför allt av *Mycobacterium tuberculosis*, en bakterie som sprids genom aerosolsmitta mellan människor och som därför faller utanför ramen för denna bok. Men gör vi en tillbakablick orsakades var fjärde tbc-fall i USA vid sekelskiftet 1900 av *M. bovis* och idag ger en försiktig uppskattning att en halv miljon av fallen i tredje världen orsakas av *M. bovis*. Den bakterien hör hemma hos nötkreatur och sprids till människor genom konsumtion av opastöriserad mjölk.

Paratuberkulos, eller Johnes sjukdom som den också kallas, är en kronisk tarmsjukdom hos nötkreatur, får och getter. Sett ur ett internationellt perspektiv är sjukdomen mycket vanlig och kostar uppfödarna enorma belopp. Den orsakas av en tredje mykobakterie, *M. avium* subspecies *paratuberculosis* (Map). Hos människan finns en likartad kronisk enterit kallad Crohns sjukdom som flera miljoner människor enbart i västvärlden lider av. Enligt en omdiskuterad och ifrågasatt teori orsakas även Crohns sjukdom av Map och företrädarna för denna teori menar vanligen också att bakterien är värmeresistent och sprids genom pastöriserad mjölk.

BAKTERIERNA

Släktet *Mycobacterium* omfattar över hundra arter av grampositiva, aeroba, katalaspositiva och orörliga stavar som gärna bildar klumpar eller nystan av korta filament (trådar). Gemensamt och unikt för dem är att cellväggen innehåller mycket långa (60-90 kolatomer) fettsyror som kallas mykolsyror.

M. bovis och Map är liksom flera andra patogena mykobakterier ytterst långsamväxande och tidigare var man hänvisad till mikroskopet för att snabbt kunna hitta dem i vävnadsprover. Den klassiska Ziehl-Nielsen-infärgningen bygger på mykobakteriernas innehåll av mykolsyror som gör att de, till skillnad från andra bakterier, förblir infärgade även efter extraktion med syra. Det är härifrån beteckningen ”syrafasta stavar” för mykobakterier kommer.

Släktet innehåller en lång rad patogener och har fått ökad aktualitet genom att flera av dem är opportunister som hårt drabbar patienter med långt framskriden HIV-infektion. De opportunt patogena bakteriernas naturliga hemvist är i slemhinnor hos djur och människor där de i regel tolereras väl. De kan spridas via jord och vatten där de överlever månader eller till och med år på grund av sin starkt lipidhaltiga cellvägg som gör dem motståndskraftiga mot uttorkning.

M. bovis är en primär patogen för många djur, särskilt nötkreatur, från vilken de kan spridas till människor genom direktkontakt med djuren eller genom infekterat kött och opastöriserad mjölk. Arten är nära släkt med den ”humana” tbc-bakterien *M. tuberculosis*, och bakteriestammen BCG (efter *Bacille Calmette-Guérin*) som länge använts för att vaccinera mot tbc är just en stam av *M. bovis*. Map är en underart till *M. avium* som är en opportunt patogen art med flera underarter som ger svåra infektioner hos patienter med sviktande immunförsvar. Map kan i sin tur indelas i flera typer efter vilka djur de är anpassade till. Den bovina typen är den som finns hos nötkreatur och det är enbart bovina Map som hittats hos patienter med Crohns sjukdom.

Utvecklingsmässigt hör mykobakterierna till de GC-rika grampositivernas så kallade mykolsyrafamilj som utöver *Mycobacterium* också innehåller en del coryneforma bakterier av vilka den närmaste släktingen är *Gordona*. Namnet betyder ungefär ”svampbakterien” vilket syftar på att mykobakterierna bildar grenade filament som påminner om svampmycel.

SJUKDOMARNA

Bovin tbc hos nötkreatur och människor

Trots det enorma hälsoproblem som tbc utgör i tredje världen finns inga exakta data som visar hur stor andel av tbc-fallen som orsakas av *M. bovis*. En försiktig uppskattning, baserad på enstaka nutida undersökningar i Afrika och erfarenheter från Europa före 1950 pekar mot storleksordningen 5 % vilket skulle betyda att bakterien kräver minst hundratusen liv varje år. I Västeuropa, som infört effektiva åtgärder mot smittspridning, är *M. bovis* däremot närmast negligerbar vid nysmitta. Mindre än en procent av tbc-fallen orsakas här av *M. bovis* och då rör det sig i de flesta fall om en reaktivering av en gammal smitta som uppträder hos äldre med sviktande immunförsvar.

Det är tre faktorer som inverkar vid spridningen av bovin tbc till människan. Den första är hur stor andel av nötkreaturen som är smittoförande. I Afrika och Sydostasien är smittade djur mycket vanliga. Men också bland stora köttexporterande länder som Argentina och Brasilien kan man räkna med att det finns sjuka djur inom mer än 10 % av besättningarna. Och sjukdomen är långtifrån försvunnen från Europa, tvärtom ökar den i flera länder och trots EU-program för att begränsa sjukdomens spridning bland djur så förekommer bovin tbc i 1-8 % av hjordarna i Storbritannien, Irland (som är värst drabbat) och Medelhavsländerna. Trots kontroller och vaccinering är det svårt att utrota sjukdomen eftersom vilda djur kan fungera som reservoarer för *M.bovis*, i Storbritannien har det visat sig att speciellt grävlingar fungerar som smittkälla. Endast i Norden och Österrike har man klarat av att utrota sjukdomen bland besättningarna. I Sverige har vi inte haft något fall sedan 1978 bland nötkreaturen, däremot påträffades *M. bovis* flera år senare hos importerade brittiska hjortar. Först 1997 fick man kontroll på spridningen bland hägnade hjortar, sedan dess har alla provtagningar i Sverige varit negativa.

Den andra faktorn som påverkar smittspridningen är kontroll av slaktdjur samt mjölkpastörisering. Trots att kanske ett av tusen nötkreatur är smittat i stora delar av Europa så innebär kontrollprogrammen att risken för konsumenten att drabbas av smittat kött eller mjölk är försvinnande liten. De sjukdomsfall som förekommit har drabbat medlemmar av lantbrukarfamiljer som förmodligen smittats vid direktkontakt med djuren. I tredje världen finns ofta ingen slaktkontroll alls och huvuddelen av mjölken dricks opastöriserad.

Den tredje faktorn som påverkar spridningen är befolkningens egen motståndskraft. När tbc grasserade i Europa infördes BCG-vaccinering bland barnen vilket dramatiskt sänkte smittspridningen. Nu när tbc-smitta är ovanlig behövs inte längre vaccineringen. Men i tredje världen finns sällan något vaccinationsskydd och sjukdomen kan härja fritt.

Paratuberkulos hos nötkreatur = bovin Johnes sjukdom = BJD

Undersökningar från Europa pekar på att minst 5 % av nötkreaturen är smittade med Map och i stora delar av USA är andelen så hög som 20 %. Map-smittade djur kan efter en lång inkubationstid utveckla BJD (i USA räknar man med att för varje fall av diagnosticerad BJD finns 25 Map-smittade djur). BJD är en kronisk enterit som leder till att djuren blir utmärglade och slutligen dör av svält. Någon effektiv behandling finns inte och i USA räknar man med att sjukdomen årligen kostar uppfödarna runt 10 miljarder kronor. Endast Sverige har lyckats med att helt radera ut sjukdomen. I Sverige lyder BJD under epizootilagen vilket innebär att besättningar med smitta slaktas ut.

Paratuberkulos hos människa = Crohns sjukdom?

Crohns sjukdom är en kronisk tarmsjukdom som oftast drabbar yngre människor. Den har likheter med BJD men det finns också skillnader. BJD anses för närvarande inte överförbart till människa och betraktas följaktligen inte som en zoonos. Men alltsedan 1987 har den engelske kirurgen och molekylärbiologen John Hermon-Taylor framhärdat i att Crohns sjukdom orsakas av Map.

Det har väckt en diskussion som förts i ett ovanligt högt tonläge och länge möttes Hermon-Taylor av ett kompakt motstånd, men teorin har faktiskt fått förnyad aktualitet efter millennieskiftet sedan man börjat påvisa bakterierna med PCR-teknik. Hermon-Taylors egen forskargrupp hittade Map hos 34 av 37 (92 %) patienter med Crohns sjukdom mot 26 % i en kontrollgrupp, två italienska studier påvisade Map hos 70 % av Crohn-fallen och i USA odlade man fram bakterierna från 50 % av Crohn-fallen medan man inte fann något odlingsfynd alls i kontrollgruppen.
Å andra sidan så kunde en kanadensisk studie inte påvisa någon skillnad i antikroppar mot Map hos Crohn-patienter jämfört med kontrollgrupper, en amerikansk PCR-undersökning av inflammerad vävnad hos 18 Crohn-patienter fann inga spår av Map och en brittisk epidemiologisk undersökning fann inga skillnader i Crohn-frekvens mellan människor som i sitt arbete var utsatta för Map jämfört med kontrollgrupper.

Infektionsdos

Infektionsdosen för *M. bovis* är hög, sannolikt krävs miljontals bakterier vilket i mjölk innebär en koncentration på åtminstone 10 000 bakterier per ml. Infektionsdosen för Map i djur tros däremot vara låg. Om Map har samband med Crohns sjukdom bör infektionsdosen vara låg även för människan, de halter av Map i mjölk eller andra livsmedel som redovisats är nämligen genomgående mycket låga (enstaka bakterier per gram).

Inkubationstid och symptom

Vid tbc varierar inkubationstiden från en månad till mer än ett halvt sekel. Risken att utveckla sjukdomen är störst inom två år efter smittotillfället men tbc kan blossa upp när som helst under hela livet i anslutning till andra svåra sjukdomar eller försämrat immunförsvar under ålderdomen. De flesta som smittas utvecklar en symtomfri så kallad primärinfektion 1-3 månader efter smittotillfället. Därefter är infektionen vilande och hos 90 % av de smittade klarar kroppens immunförsvar av att hålla bakterierna i schack livet ut. Primärinfektionen kan diagnosticeras genom ett tuberkulinprov men den infekterade är alltså i detta läge vare sig sjuk eller smittsam.

Den klassiska lungtuberkulosen, som fyra av fem drabbade insjuknar i, kännetecknas av långvarig hosta och avmagring. Vid övriga tbc-fall angrips andra organ än lungorna och det verkar som om just *M. bovis* förhållandevis ofta etablerar sig utanför lungorna: tarmen, huden, skelettet, njurarna och urinvägarna kan alla angripas och förstöras. Hos små barn är tuberkulos i hjärnhinnan en ganska vanlig och ytterst dödlig form. Förloppet vid tuberkulos är långvarigt, ofta flera år, och dödligheten är omkring 30 % om inte antibiotika sätts in. Behandlingen består av en kombination av 3-4 antibiotika som tas under 6-12 månader. Kombination av flera antibiotika är nödvändig eftersom mykobakterierna annars snabbt utvecklar resistens. På grund av felaktig medicinering med enstaka antibiotikapreparat finns idag stora problem med multiresistenta stammar, inte minst i Ryssland och i de baltiska staterna. BCG-vaccination finns ju sedan länge, men den är bara effektiv för småbarn och lämnar inget fullständigt skydd.

BJD hos djuren har mer än 6 månaders inkubationstid och ofta dröjer det åratal innan sjukdomen blossar upp. Det mest uppenbara symtomet är en kronisk, massiv diarré där miljardtals Map avsöndras med avföringen.
När det gäller Crohns sjukdom är det irrelevant att tala om någon inkubationstid eftersom inget orsaksförhållande mellan Map och Crohns

sjukdom är bevisat.

Incidens

Antalet människor som årligen insjuknar i bovin tbc ligger någonstans mellan hundratusen och en miljon. Säkrare än så är inte tillgängliga data, men en uppskattning är att omkring en halv miljon människor drabbas. Av dessa dör ungefär en tredjedel.

Skillnader i rapporteringssystem gör det vanskligt att bedöma incidensen av Crohns sjukdom i olika länder. Det kan dock vara värt att notera att Danmark, som har en av världens mest utbredda Map-smitta bland nötkreaturen, rapporterar ungefär samma incidens (ca 50 fall per år och miljon invånare) som det Map-fria Sverige.

Mykobakterierna på cellnivå

Makrofagerna är nyckeln både till tuberkulos och BJD. Efter det att *M. bovis* tagits upp av makrofagerna och inkapslats i en fagosom finns tre möjliga scenarier. I det första klarar makrofagerna av sin uppgift och dödar bakterierna. Hur ofta det händer är oklart men att det sker visas av att en del människor som är ständigt utsatta för smittan aldrig uppvisar positiv tuberkulinreaktion. Det immunologiska minnet i form av T-celler aktiveras inte och därför blir dessa människor inte heller immuna mot bakterierna men deras makrofager klarar uppenbarligen av att gång på gång döda inkräktarna.

Det andra scenariet innebär att mykobakteriernas tillväxt stoppas men att inte alla bakterierna dödas. En del finns kvar som en latent infektion som kan blossa upp till tuberkulos många år senare. I detta fall lyckas mykobakterierna förhindra sammansmältningen av fagosom och lysosom och kan därför överleva och till och med tillväxa inuti makrofagen. De mykobakterier som kommer fria när makrofagen dör tas om hand av T-celler varvid det immunologiska minnet aktiveras och tuberkulinprovet blir positivt. Detta scenarium är förmodligen det vanligaste och man räknar med att ungefär två miljarder av Jordens befolkning är i denna situation: infekterade men inte sjuka och inte heller smittsamma. Forskarna är inte eniga om den latenta infektionen skall förklaras av att mykobakterierna går in i en viloform som inte attackeras av kroppens försvar eller om det rör sig om ett ständigt pågående krigstillstånd där det råder jämvikt mellan förökning och avdödning av mykobakterier.

Hos ungefär 10 % av de infekterade bryter tuberkulos ut för eller senare.

Mykobakterierna förökas då och bildar kompakta ansamlingar tillsammans med infekterade makrofager och andra celler. Vävnaden förändras och blir säte för mycket aktiva angrepp från kroppens immunförsvar och det är den kemiska krigföringen från kroppen som orsakar att vävnadsskadorna blir allt större. Mot slutet av en dödlig tbc bildas stora håligheter i de angripna vävnaderna.

Map fungerar på ett likartat sätt men vid BJD begränsas skadorna till tarmkanalen med massiv diarré som följd. Tarmslemhinnan kan till sist inte ta upp någon näring och djuren svälter ihjäl.

LIVSMEDEL: TILLVÄXT

Mykobakterier tillväxer inte i livsmedel men deras kompakta cellvägg gör dem tåliga och de påverkas därför föga av rökning, saltning eller torkning. Det krävs värmebehandling eller fermentering för att döda dem.

Pastörisering

D-tiden (den tid det tar för att avdöda 90 % av bakterierna) för *M. bovis* är 0.15 sekunder vid 72°C och 15 sekunders pastörisering vid denna temperatur ger alltså ett garanterat skydd. Inte att undra på eftersom mjölkpastörisering infördes just för att avdöda denna bakterie.

Men kan Map överleva pastörisering? Det är en central fråga eftersom de fynd av Map som otvetydigt har gjorts i pastöriserad mjölk antingen beror på att bakterierna överlevt pastöriseringen eller på att de återinfekterat mjölkförpackningarna. Om det är det förra måste pastöriseringstemperaturen höjas till över 80°C (vilket Hermon-Taylor förespråkar), om det är det senare får man i stället sanera produktionslokalerna.

Vi har funnit åtta publicerade rapporter om värmeresistensen hos Map i mjölk. Flertalet indikerar att Map kan överleva pastörisering, det vill säga en värmebehandling på 72°C i 15 sekunder. Men, sex av rapporterna bygger på laboratoriemetodik där värmeresistensen testats i vattenbad. Det är en grov undersökningsmetod och vid så korta behandlingstider som det här handlar om ger den inte tillförlitliga resultat (vi har själva erfarenhet av metoden).

Återstår gör då två undersökningar som utförts med pilotskale-anläggningar liknande de som används vid kommersiell pastörisering. En av dem har ofta

tagits som intäkt för att Map överlever kommersiell pastörisering. Det kan man dock knappast göra. Inte i något av de hundratals testerna överlevde någon Map-stam när halten som tillförts mjölken var 10 000 bakterier per ml. Endast i de fall då halterna tillförda Map var 10 miljoner per ml fanns överlevande, och då endast när den verkliga pastöriseringstiden var betydligt kortare än 15 sekunder.

Utan att bli alltför teknisk, så kan flödet i en pastöriseringsanläggning antingen vara laminärt eller turbulent. Är flödet laminärt (som vid denna undersökning) kommer en del bakterier kommer att färdas nästan dubbelt så snabbt genom pastöriseringsröret som genomsnittsbakterien. För att garantera att *alla* bakterier värmebehandlas i 15 sekunder måste man därför kompensera genom att öka uppehållstiden i pastöriseringsröret till 25 sekunder. Detta görs i en kommersiell process och när undersökarna gjorde denna kompensation överlevde heller inga bakterier. Med de data som redovisas av författarna beräknar vi D-tiden vid 72°C till maximalt 2.0 sekunder.

I det andra pilotskale-testet användes turbulent flöde som ger nästan exakt samma hastighet för alla bakterier och då behövs bara en marginell kompensation av uppehållstiden. Undersökningarna utfördes med en tillsats av 10 000 bakterier per ml mjölk. Inte någon av de fem testade Map-stammarna överlevde pastöriseringen och D-tiden beräknades av författarna till just 2.0 sekunder.

Vi finner därför att de två redovisade studierna indikerar att Map *inte* överlever kommersiell pastörisering. Men en brasklapp är nödvändig: värmeresistensen hos Map är trots allt betydande och helt klart ligger man nära gränsen för överlevnad om mjölken är infekterad med extremt höga halter Map. Och man kan tillägga att inte heller kommersiell pastörisering alltid genomförs med strikt iakttagande av gällande regler.

pH

Det kan tyckas märkligt att syrafasta bakterier som Map faktiskt avdödas av organiska syror vid fermentering men så är fallet. D-tiden för avdödning i syrade produkter är visserligen runt en månad, men det innebär ändå att lagrade ostar och långtidslagrade fermenterade korvar får betraktas som riskfria.

LIVSMEDEL: PRODUKTER

I industrialiserade länder kan man på grund av kontrollprogrammen bortse från *M. bovis* i livsmedel. Däremot bör man definitivt undvika att dricka opastöriserad mjölk eller äta produkter av opastöriserad mjölk som är tillverkade i Afrika och Sydostasien. Nedanstående genomgång gäller enbart Map.

Kött

I USA räknar man med att minst 10 % av mjölkkorna är smittade med Map vid slakten. Det ska påpekas att detta inte innebär att alla dessa djur har BJD, amerikanska uppgifter pekar på en BJD-frekvens hos slaktdjur på 0.9 %. I Europa och övriga industriländer har man mest undersökt Map-frekvensen i besättningarna vilket inte direkt går att översätta till hur många slaktdjur som är smittade. Men i Danmark, Holland och Kanada är, i likhet med USA, ungefär hälften av besättningarna smittade medan Belgien, Österrike och Storbritannien redovisar frekvenser på 10-20 %. I de flesta övriga länder är dokumentationen bristfällig men Map-smitta bedöms genomgående som mycket vanlig. Sverige är det enda landet som sedan flera år är helt fritt från BJD vilket indikerar att de inhemska kreatursbesättningarna också är fria från Map-smitta. Det är Sveriges hårda krav på utslaktning av smittade besättningar som ligger bakom det goda resultatet.

Det finns inga undersökningar som visar på hur stor del av till exempel amerikansk eller europisk nötfärs som innehåller Map. Men har djuren bakterierna i tarmen finns naturligtvis också en risk att köttet kontamineras. Får och getter smittas av andra Map-stammar än nötkreaturen och sådana stammar tycks inte förekomma hos Crohn-patienter.

Fisk och skaldjur

Bovina Map-stammar förekommer inte hos fisk- och skaldjur.

Mejeriprodukter

Schweiziska undersökningar har visat att Map förekommer i 20-25 % av den opastöriserade bulkmjölken från såväl kor som getter och får. I Storbritannien har man hittat Map i ungefär 10 % av bulkmjölken från kor medan bakterierna däremot tycks vara ovanliga hos i får- och getmjölk. Mera anmärkningsvärt är

att även pastöriserad mjölk innehöll levande Map, i den brittiska studien kunde Map i låga halter odlas fram från 2 % av förpackningarna.

Det har lett till krav på att pastöriseringstemperaturen bör höjas men i avsnittet om pastöriseringseffekten konstaterade vi att det trots allt verkar osannolikt att Map verkligen skulle överleva kommersiell pastörisering. Men i så fall, varifrån härrör då Map i den pastöriserade mjölken? Ja, faktiskt är det så att oöppnade mjölkförpackningar till mycket stor del förskäms av gramnegativa bakterier med ytterst ringa värmeresistens. Dessa bakterier finns i mejeriernas husflora och återkontaminerar mjölken vid förpackningstillfället. Man inser inte alltid att de biofilmer som bildas på alla fuktiga ytor består av mycket mer än bakterier: här finns amöbor, ciliater och till och med flercelliga mikrodjur. Ciliater och amöbor erbjuder samma livsbetingelser som makrofager för många intracellulära parasiter som legionella och *M. avium*. Möjligen kan detta vara en förklaring till förekomsten av Map i pastöriserad mjölk.

Vegetabilier

Visserligen kan man väl tänka sig att vegetabilier som gödslats med kogödsel mycket väl skulle kunna innehålla Map, men det verkar ändå osannolikt att vegetabilier skulle utgöra någon risk. Några data finns dock inte.

Vatten

Map kan överleva länge i vattentäkter och kan spridas genom infekterat dricksvatten, men det är oklart om dricksvatten innebär någon egentlig risk.

VIRULENSFAKTORER

Trots att 2 miljarder människor är smittade och att 200 miljoner av dessa kommer att utveckla tbc och 60 miljoner kommer att dö, är tuberkelbakteriernas virulensfaktorer i stort sett okända. Det vi vet är att tuberkelbakterierna (inklusive *M. bovis*) förhindrar att fagosomer smälter samman med lysosomer, att de har system som gör dem motståndskraftiga mot syreradikaler och kväveoxider och att de lurar immunförsvaret genom att presentera modifierade antigen för de T-celler som ska oskadliggöra bakterierna. Men exakt på vilket sätt detta sker är fortfarande inte känt.

Bakteriernas långsamma tillväxthastighet utgör ett av de största hindren. Några toxiner i vanlig mening tycks inte produceras, de omfattande vävnadsskador som blir följden av en svår tbc är en följd av själva kriget mellan bakterierna

och kroppens immunförsvar: det är till stora delar kroppens egen kemiska arsenal som förstör vävnaderna i ett försök att oskadliggöra inkräktarna. Likheten i förloppet mellan tbc och BJD (och för all del andra sjukdomar orsakade av patogena mykobakterier) är slående. Även Map klarar av att undvika immunförsvaret på ungefär samma sätt och även vid BJD är det kroppens eget försvar som gör den största skadan. Mykobakteriernas cellvägg innefattar ett lipidmembran som är det tjockaste och mest ogenomträngliga man överhuvudtaget hittat inom biologin och att det har betydelse för virulensen har länge stått klart. Samtidigt finns ju samma struktur även hos apatogena arter så cellväggen spelar trots allt en underordnad roll.

PÅVISNING

Selektiva medier för isolering av *M. bovis* och Map är som regel baserade på äggmedier som kompletteras med en lång rad antibiotika. Bestämning av dessa bakterier i livsmedel med hjälp av selektiva medium är dock inget realistiskt alternativ med tanke på att de växer så långsamt att det krävs åtminstone 16-18 veckors inkubationstid för att få fram kolonierna. I vissa undersökningar har man faktiskt fått vänta upp till 40 månader innan en Map-kultur växt fram! Svampöverväxt eller överväxt med snabbväxande mykobakterier är det största problemet som resulterar i många falskt negativa resultat. Bactec, en radiometrisk automatiserad odlingsmetod från Becton Dickinson, har ganska länge funnits på marknaden och den halverar inkubationstiden för såväl Map som *M. bovis* men den bygger på likartade medier så problemen med falskt negativa resultat kvarstår.

Påvisning görs naturligtvis mycket snabbare med molekylärgenetiska metoder. För Map finns en standard att tillgå som bygger på en unik ”hoppande gen” hos Map (IS900) och det finns metoder som klarar att detektera färre än 1 bakterie per mL mjölk. Även automatiska ELISA-PCR-metoder med ungefär samma känslighet finns beskrivna. Problemet med PCR är att metoden normalt inte skiljer på levande och döda bakterier och därför blir man vid undersökning av pastöriserad mjölk ändå hänvisad till det mödosamma arbetet att odla fram bakterierna. Det är bovina Map som (av en del forskare) anses associerade med Crohns sjukdom och det krävs speciella molekylärgenetiska metoder för att skilja ut dessa från övriga stammar. Även för *M. bovis* finns PCR-teknik beskriven som skiljer ut denna mot närbesläktade tuberkelbakterier.

Epidemiologi

Typning av Map och *M. bovis* har bara förekommit sparsamt och då framför allt med RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), MLSSR (*Multilocus Short Sequence Repeat*) och MIRU-VNTR (*Mycobacterial Interspaced Repetitive Units – Variable Number of Tandem Repeats*).

Plesiomonas

– Den japanska turistdiarrén –

ÖVERSIKT

Plesiomonas shigelloides förekommer i sött och bräckt vatten över hela jordklotet men det är nästan bara i Sydostasien som bakterien uppmärksammats som orsak till livsmedelsburna diarréer. I Japan bedöms plesiomonas vara den tredje viktigaste inhemska livsmedelspatogenen och den klart vanligaste anledningen till att japaner drar på sig turistdiarré vid resor i övriga Asien. En trolig anledning är japanernas förkärlek för rå fisk och med tanke på sushins moderna segertåg över världen borde kanske även europeisk livsmedels-kontroll snart börja intressera sig för bakterien.

Plesiomonas förefaller orsaka två diarréformer. Den vanligaste formen är tämligen lindrig och ganska kortvarig, men hos kanske så många som en fjärdedel ger sjukdomen dysenteriliknande symptom med en våldsam och blodig diarré. Om skillnaden i symtom beror på varierande virulens hos bakterierna eller olika känslighet hos de drabbade vet man inte.

BAKTERIEN

Plesiomonas omfattar gramnegativa och oxidaspositiva stavar som är rörliga med hjälp av polära flageller. Av detta skäl sorterades de tidigare in i familjen Vibrionaceae, men är numera som en främmande fågel i stället placerade i den oxidasnegativa och peritrikt flagellerade familjen Enterobacteriaceae. Utvecklingsmässigt hör bakterien utan tvekan hemma i Enterobacteriaceae där den närmast är släkt med *Proteus*. Och det är just på grund av molekylär-genetiska data som bakterien trots sin avvikande oxidasreaktion numera också placerats där. *Pleisomonas* betyder ungefär ”grannbakterien” vilket syftar på att man tidigare trodde den var så nära förknippad med aeromonas att den ansågs som en granne till denna.

Bakterierna är vanligt förekommande i varma sötvatten över hela världen. I Europa är det mest under sommaren man påträffar bakterien, men den har

faktiskt hittats i kalla svenska sjöar även norr om Polcirkeln. I Sydostasien, Afrika samt Mellan- och Sydamerika är plesiomonas en vanlig invånare i tarmkanalen hos många sötvattensfiskar. Den kan förekomma hos fisk även på våra breddgrader, bland annat har man funnit den i danskodlad regnbåge men hemmavid utgör den bara en liten del av floran och dominerar inte alls på samma sätt som den kan göra i tropiska och subtropiska regioner. Det finns enstaka rapporter om att plesiomonas under speciella omständigheter kan vara patogen för såväl regnbåge som hummer, men normalt förefaller bakterien leva i sina värdar utan att ställa till med några besvär.

Bakterien trivs även i bräckt vatten medan den inte verkar förekomma i saltvatten annat än i direkt anslutning till utsläpp av fekala föroreningar. En lite udda nisch för plesiomonas runtom i världen är akvarier. Eftersom bakterien ofta tycks trivas alldeles förträffligt i den miljön kanske man ska tänka sig för innan man beställer in sushi från en restaurang med eget akvarium.

Plesiomonas har hittats i tarmkanalen även hos däggdjur och fåglar men hos dessa är bakterien mer att betrakta som en tillfällig besökare. Katter verkar liksom människor kunna drabbas av plesiomonasdiarré och av någon anledning är katter faktiskt även i Europa ibland symptomfria bärare av bakterien. Också människor kan bli symptomfria bärare vilket inte är helt ovanligt i Bangladesh och Thailand där upp till 5 % av befolkningen har bakterien i tarmkanalen. Det gör det naturligtvis också svårt att i dessa länder avgöra om en diarréepisod orsakas av plesiomonas eller inte. I Japan och Europa finns däremot praktiskt taget inga symptomfria bärare.

SJUKDOMEN

Det finns förvånansvärt lite data om plesiomonasenterit vilket beror på att sjukdomen är praktiskt taget obefintlig i den europeiska och amerikanska statistiken. Men det verkar finnas två former av plesiomonasenterit, en som förmodligen orsakas av toxiner och en annan av mer invasiv karaktär. Plesiomonas kan dessutom smitta genom sårskador och framför allt personer med nedsatt immunförsvar kan drabbas av blodförgiftning genom kontakt med till exempel fisk. Ett sådant fall finns rapporterat från Sverige i mitten av nittiotalet då en fiskhandlare vid Bottenviken insjuknade.

Infektionsdos

Infektionsdosen för friska vuxna är hög, definitivt i storleksordningen

miljontals bakterier. Det finns dock indikationer på att små barn (under två års ålder) och vuxna med sviktande immunförsvar kan vara känsligare för infektion.

Inkubationstid och symptom

Den vanligaste – och lättaste – formen av plesiomonasenterit har ett snabbt förlopp med en inkubationstid på 1-2 dygn och en varaktighet på 1-3 dygn. Symtomen är i huvudsak en vattnig diarré samt hos vuxna buksmärtor och hos barn uppkastningar. Även feber och huvudvärk är ganska vanliga symptom.

Den svårare formen har en mer diffus inkubationstid, allt mellan ett och sju dygn har rapporterats. Den kännetecknas av våldsamma grönfärgade diarréer (ibland mer än en diarréepisod i timmen) som särskilt hos barn i många fall även är blodiga. De flesta tillfrisknar efter 3-7 dygn men hos ungefär 5 % går sjukdomen över i en närmast kronisk fas som fortsätter i månader om inte antibiotika sätts in.

I en studie från Hongkong, som omfattade ett par hundra sjukhuspatienter, noterades att nästan var femte drabbad var under ett års ålder samt att nästan var tredje vuxen hade någon form av svår underliggande sjukdom, oftast diabetes eller njur- respektive leversjukdomar. Komplikationer är sällsynta men dödsfall har inträffat hos patienter med svåra underliggande sjukdomar och då oavsett om de drabbats av den mildare eller svårare formen av diarré.

Incidens

Det finns endast något dussin rapporterade utbrott av plesiomonasenterit och frånsett några fall där plesiomonas förekommit tillsammans med andra enteropatogener finns egentligen inga väldokumenterade utbrott. Sjukdomsstatistiken bygger därför nästan uteslutande på sporadiska fall, alltså sådana som drabbat enstaka personer.

Den mest tillförlitliga asiatiska statistiken har Japan och Hongkong och därifrån rapporteras att 5-6 % av de inhemska livsmedelsburna enteriterna orsakas av plesiomonas vilket gör bakterien till den tredje viktigaste bakteriella enteropatogenen. Liknande siffror har noterats i södra Kina och på Taiwan. Trots detta uppfattas plesiomonasenterit i Japan först och främst som en turistdiarré vilken drabbar japaner på resa i övriga Asien. I en undersökning av ett par tusen hemvändande japanska Asienresenärer tillskrevs faktiskt hela 70 % av de mikrobiellt konfirmerade diarréfallen plesiomonas!

I Indien, Bangladesh, Thailand och Malaysia utsätts människor i ännu högre grad för plesiomonas men statistiken därifrån är bristfällig och dessutom svår att tolka eftersom bakterien är så vanlig i miljön att en del människor blir friska bärare. Uppemot 90 % av fallen i Japan och Hongkong inträffar under sommarhalvåret då bakterierna har störst möjlighet att förökas i vatten och livsmedel. I Europa och Nordamerika är inhemsk plesiomonasenterit mycket ovanlig och de fall som rapporteras kopplas till turistdiarréer som drabbar resenärer till Asien respektive Centralamerika. Några livsmedelsburna utbrott har inte skett i Europa men sommaren 1990 drabbades åtskilliga Amsterdambor av plesiomonasenterit i samband med ofrivilliga kallsupar i en badsjö.

Plesiomonas på cellnivå

Virulensfaktorerna är i stort sett okända och frågan om bakterierna producerar enterotoxiner eller andra cytotoxiner har stötts och blötts i åratal. Troligen är det endast en del stammar som producerar toxiner och möjligen är det dessa toxiner som ger upphov till den vattniga diarrén som ses vid de milda fallen. I så fall är diarrén en reaktion på att bakterierna avger toxinerna i tarmkanalen. Om de svårare dysenteriliknande fallen med blodiga diarréer beror på speciellt stor produktion av toxiner, på särskilt verksamma toxiner eller på andra virulensfaktorer är det ingen som med säkerhet vet. En del forskare anser att plesiomonas primärt bör ses som en invasiv bakterie. Man menar att bakterierna tar sig in i värdcellerna genom en påtvingad fagocytos och att de inuti cellerna har förmåga att undvika försvarsmekanismerna och leva som intracellulära parasiter. Det förhållandet att en betydande del av de insjuknade har sviktande immunförsvar är också ganska typiskt för opportunt patogena parasiter.

LIVSMEDEL: TILLVÄXT

Temperatur

Plesiomonas är utpräglat mesofil med ett temperaturområde för tillväxt mellan 8 och 45°C. Det innebär att tillväxt i livsmedel bara kan ske vid temperatur-misshandel. Bakterien är liksom andra gramnegativer känslig för värmebehandling och dödas snabbt av pastörisering.

Syre

Plesiomonas är fakultativt anaerob och kan därför tillväxa både i luftlagrade

och i vakuumlagrade förpackningar under förutsättning att temperaturen överstiger 8°C. I vilken utsträckning den kan konkurrera med förskämningsbakterier i aeroba eller anaeroba miljöer är inte känt.

pH

Plesiomonas har en ovanlig förmåga att tolerera höga pH-värden vilket dock inte ger dem någon större fördel i livsmedelssammanhang. De är som de flesta gramnegativer känsliga för lågt pH och inaktiveras därför i fermenterade livsmedel som typiskt har ett pH-värde under 4.5.

Saltning och rökning

Bakterierna är känsliga och tål inte kraftig saltning eller rökning.

LIVSMEDEL: PRODUKTER

Man kan räkna med att 1-5 % av befolkningen i många länder i Sydostasien är symptomfria bärare av plesiomonas (det enda tydliga undantaget är Japan där praktiskt taget ingen bär på bakterien). I dessa länder är kocken den kanske viktigaste smittokällan och har kocken dessutom dålig handhygien är det bara nyligen uppvärmda livsmedel som går säkra.

Kött

Plesiomonas har isolerats från en lång rad djur och fåglar och i Asien har man hittat bakterien hos bland annat nötkreatur, getter, grisar och kycklingar. Av dessa har dåligt stekt kyckling då och då misstänkts vara smittkällan men annars står kött och köttprodukter inte särskilt högt på risklistan ens i Asien. I Europa torde kött och köttprodukter vara riskfria.

Fisk och skaldjur

Sushi är förmodligen den vanligaste anledningen till att japaner drabbas av inhemsk livsmedelsburen plesiomonasenterit. Sushi ska ju enligt konstens alla regler vara tillverkad av dagsfärska råvaror så varifrån kommer då de miljontals plesiomonas som behövs för att orsaka sjukdom? En möjlighet är att fiskköttet vid fileandet kontaminerats av tarminnehåll. Om fisken eller skaldjuret har plesiomonas som en viktig del av sin tarmflora krävs ytterst små mängder tarminnehåll för att göra sushin riskabel. En annan möjlighet är att det även i Japan naturligtvis förekommer fusk med fisk som sett bättre dagar

och som förvarats någon tid i rumstemperatur (en förutsättning för att plesiomonas ska tillväxa).

Att japaner så påfallande ofta drabbas av plesiomonasenterit vid utlandsresor i övriga Asien är däremot en gåta. Amerikaner och européer drabbas ju nästan aldrig trots lika ihärdigt ätande på gatuserveringarna. Men kanske är det helt enkelt så att en del japaner letar upp sushirestauranger även utomlands och att det i övriga Asien finns ställen som inte lever upp till de höga kraven på kvalitet eller hygien.

Stekt och kokt fisk är riskfri (så länge den fortfarande är varm) även i Asien. I Europa finns det knappast heller någon anledning att oroa sig för sushi så länge den är beredd av europeiska råvaror eller marina fiskar. Däremot kan den ökande importen av odlad fisk och skaldjur från Asien möjligen ställa till med problem om dessa råvaror används till sushi. Våra egna varianter av rå fisk som surströmming, inlagd sill och gravad lax är riskfria.

Ostron, som ju ofta äts råa, tros vara en annan vanlig orsak till plesiomonas-enterit och i ett fall med en havande kvinna som åt ostron 14 dagar före förlossningen, överfördes bakterierna till fostret och den nyfödda blev kraftigt infekterad.

Mejeriprodukter

Plesiomonas förekommer inte i mejeriprodukter.

Vegetabilier

Det finns få undersökningar om förekomsten av plesiomonas på vegetabilier men i tropiska länder som Zaire och Costa Rica har man funnit bakterierna på sallat och selleri. Och givetvis kan sallat och andra vegetabilier som vattnats med eller sköljts i infekterat vatten innehålla plesiomonas men om halterna är tillräckliga för att orsaka sjukdom är mera tveksamt. I Europa kan vegetabilier betraktas som riskfria.

Vatten

Nästan fyra miljarder människor har problem med att få tag på rent dricksvatten och kontaminerat vatten är förmodligen den viktigaste orsaken till

plesiomonasenteriter hos den fattiga delen av befolkningen i Sydostasien. Hur många som drabbas är oklart, det finns ingen egentlig statistik. Klorering dödar bakterierna och renat dricksvatten är därför i teorin ofarligt. Att man sedan som turist ändå ska undvika att dricka klorerat kranvatten i länder med bristfälliga ledningsnät beror på att färskvattenledningarna där i praktiken ofta kontamineras av avloppsvatten.

VIRULENSFAKTORER

Enterotoxiner, cytotoxiner och hämolysiner produceras av en del plesiomonasstammar och det verkar sannolikt att någon eller några av dessa toxiner kan sättas i samband med diarré. Men inget av toxinerna har studerats i detalj så framtiden får utvisa vilken betydelse toxinerna har.

Kanske är det i stället så att plesiomonas i likhet med listeria primärt ska betraktas som en intracellulär parasit som invaderar mottagliga personer och förökar sig i värdcellerna. Bakterierna har en tydlig invasiv förmåga i odlade celler där de förändrar cellskelettet (aktinet) så att bakterierna ”endocyteras” av värdcellen i likhet med till exempel shigella. I de odlade cellerna inducerar de dessutom apoptosis, programmerad celldöd.

PÅVISNING

Selektiva medier och biokemisk identifiering

Någon referensmetodik finns inte, men två medier brukar användas i tandem för isolering av plesiomonas från vatten och livsmedel: *Inositol Brilliant Green Bile Salt Agar* samt *Plesiomonas Differential Agar* (ibland används dessutom en anrikningsbuljong som alkaliskt peptonvatten före utodling på agar).

Den förstnämnda är en variant av ett salmonellamedium och innehåller (gram per liter): Pepton 10, köttextrakt 5, NaCl 5, gallsalter 8.5, inositol 10, neutralrött 0.025, briljantgrönt 0.0033 samt agar 15. Den senare innehåller pepton 1, jästextrakt 2, lysin 2, NaCl 5, mannitol 7.5, arabinos 5, inositol 1, gallsalter 1, fenolrött 0.08 samt agar 12.

Medierna inkuberas aerobt 37°C i ett dygn. Tyvärr är medierna inte särskilt selektiva och många andra inositolfermenterande bakterier från

Enterobacteriaceae och aeromonas växer bra och ger likartade kolonier. Något högre selektivitet gentemot aeromonas fås om man istället inkuberar vid 44°C. Misstänkta kolonier screenas för oxidas och indolproduktion där plesiomonas är positiva för båda testerna. Därefter görs en biokemisk identifiering exempelvis med kits för Enterobacteriaceae som API 20E. Plesiomonas är fenotypiskt homogena så identifieringen brukar sällan medföra några problem.

Molekylärgenetisk påvisning

PCR-metoder för påvisning av plesiomonas finns beskrivna och de omfattar numera även kvantitativa metoder.

Epidemiologi

Serologi

Tre scheman för typning av plesiomonas har lanserats i Japan (Shimada), Tjeckoslovakien (Aldova) och Tyskland (Schubert). De båda förstnämnda omfattar huvudsakligen kliniska stammar och har sedan länge förenats till ett gemensamt schema med över 100 somatiska och drygt 50 flagellära antigen. Schuberts schema, som mest omfattar miljöstammar, tillför ytterligare serotyper och nya isolat kan därför i mycket stor omfattning typas. Antisera finns dock inte kommersiellt tillgängliga.

Det kan nämnas att några somatiska antigen delas med shigella, så är till exempel antigenet hos *Plesiomonas shigelloides* O17:H2 närmast identiskt med *Shigella sonnei* fas 1-antigen. Förhållandet har varit känt länge och artepitetet, som betyder shigella-liknande, kommer just på grund av de många ”korsreaktionerna” med shigella.

Molekylärgenetik

Något större behov av fingeravtrycksmetoder har man inte haft, men PFGE har använts i några fall för att öka upplösningen och då har det kunnat konstateras att arten är mycket heterogen.

Salmonella

– Den politiske flyktingen –

ÖVERSIKT

Alvesta 1953.

Det sedan länge avsomnade lilla smålandsslakteriet kommer att få en dramatisk betydelse det här året. En slakteriarbetarstrejk har lett till ett stort överskott av slaktdjur. När strejken upphör går slakteriet på högvarv för att få ut slaktkropparna till affärerna. Vad man inte känner till är att en aggressiv salmonellastam fått fotfäste i slakteriet. Det är högsommar och värmebölja, kylbilar finns ännu inte och i den trettiogradiga värmen frodas salmonella-bakterierna på köttet. I månadsskiftet juni/juli exploderar krutdurken. Människor insjuknar inte bara i Småland utan över stora delar av landet. Tidningarna sätter krigsrubriker och kyrkorna håller pestböner för de drabbade. De insjuknades antal kommer innan sommaren är över att summeras till nästan 10 000. Etthundrafem människor dör, långt de flesta är i arbetsför ålder.

Utbrottet är det ojämförligt värsta i modern svensk salmonellahistoria. På sikt för katastrofen trots allt något gott med sig. Svenska myndigheter vaknar och under det kommande decenniet inför Sverige stenhårda, världsunika åtgärder mot salmonella. De bygger på bakteriologisk kontroll av besättningar och konsekvent utslaktning av smittade djur. Insatserna har under åren kostat massor av pengar men de har också lett till en 50-årig nära nog salmonellafri tillvarelse. För konsumenterna vill säga, djuren kan fortfarande smittas av infekterat importerat foder, det hände senast i år (2012) då 2000 grisar fick slaktas ut och destrueras på en gård utanför Kristianstad.

Men Sverige är en oas i en salmonellasmittad omvärld. Bara Norge och Finland tar, så småningom, efter den svenska modellen och har efter hand byggt upp en väl så god standard. Danmark, som har goda exportinkomster på fläskköttet, står utanför det nordiska initiativet. Danskarna accepterar länge, liksom övriga Europa och resten av världen, att 10-50 % av köttråvarorna är smittade med salmonella. Som en jämförelse kan nämnas att Köttforskningsinstitutet (där två

av författarna länge arbetade) under 25 års kontroll av köttprodukter analyserade över 100 000 prover ur Scans sortiment. Scan stod under perioden för 80 % av det färska köttet och över 50 % av charkprodukterna i landet. Under alla dessa år och alla dessa prover hittades salmonella vid *ett* tillfälle, en frekvens på mindre än 0.001 %!

Trots salmonellafria livsmedel insjuknar ändå 4000 svenskar årligen i salmonellos enligt de officiella siffrorna (det verkliga antalet är förmodligen minst tio gånger högre). Nio av tio smittas vid resor utomlands. Skärskådar vi fallen som smittas inom landet kan vi konstatera att smittkällan vanligtvis är importerade livsmedel. Mycket få smittas via inhemska livsmedel, och då nästan alltid av en salmonellaspridande kock eller kallskänka. De svenskproducerade livsmedel som kan köpas i affärerna är så gott som hundraprocentigt salmonellafria.

Idag lever svenskarna dock inte längre lika säkert som tidigare. Importerat och i praktiken okontrollerat kött finns nu överallt, inte minst ute på restaurangerna. Men har vi då inte ett undantag inskrivet i EU-handeln? Ett undantag som garanterar salmonellafritt importkött?

Nja, undantaget innebär att det räcker med en underskrift av en veterinär i exportlandet om att partiet är salmonellafritt. Om sådant intyg finns får svenska livsmedelsmyndigheter inte rutinmässigt kontrollera importen från EU. Att det fuskas med exportintygen är uppenbart. De svenska uppföljningar som gjorts av Livsmedelsverket i form av projektarbeten visar att salmonellaintyget inte sällan är just detta: ett intyg på att partiet är salmonellasmittat! Undersökningen av köttberedningar 2002 visade exempelvis att medan 13 % (5 av 39) av de partier som importerats *utan* salmonellaintyg var positiva för salmonella, så var nästan hälften (8 av 19) av partierna *med* salmonellaintyg smittade… Det ”garanterat” salmonellafria köttet det året kom från Danmark, Holland och Tyskland. Det kunde lika gärna ha varit från något annat EU-land. Det ska betonas att underlaget i dessa projektarbeten är litet, men å andra sidan hittas fler salmonellasmittade importpartier i dessa projektarbeten än vad man normalt gör i hela den svenska köttproduktionen under ett år. Det handlar därför inte längre om vetenskap och smittskydds-kontroll utan om politik.

Konsumenten har också andra politiskt klubbade beslut att ta hänsyn till. Ett är att så kallade köttberedningar är undantagna från salmonellaintyg och kontroll.

Hamburgare definieras till exempel som köttberedning och i ett sådant fall krävs inga intyg. Eller: importera kött från vilket land som helst utanför EU (som vi normalt kan kontrollera själva) men frys det i ett EU-land tillsammans med saltvatten (ett mycket populärt sätt att öka marginalerna på till exempel kycklingfilé i lågpriskedjorna) och vi är förbjudna att på ett effektivt sätt kontrollera det.

Det största importproblemet verkar vara malet nötkött. Under 2010-2012 har samtliga stora grossister (ICA, Coop och Axfood) vid flera tillfällen fått dra tillbaka stora partier nötfärs sedan företagens rutinkontroller hittat salmonella. När provsvaren kommer har färsen redan varit ute på marknaden ett bra tag. Det är nästan alltid irländsk nötfärs det gäller, vilket dock mest har att göra med att Irland exporterar mycket nötkött till just Sverige.

I framtiden kan konsumenten dessutom drabbas av andra konstigheter. Svenska slakteriföretag uttryckte på fullt allvar för några år sedan planer på att grovstycka svenskt kött i Polen och sedan sända det hem igen. Djuret skulle då vara uppfött i Sverige, slaktat i Sverige och (fin)styckat i Sverige. Inte någonstans skulle det framgå att köttet varit på turné utomlands och dragit på sig polska slakteriers husfloror av salmonella. Ur smittskyddssynpunkt är projektet huvudlöst och visar en monumental brist på bakteriologisk insikt. Men förhoppningsvis har projektet stoppats i sin linda, det finns trots allt en motståndsrörelse både bland livsmedelsbakteriologer och politiker.

BAKTERIERNA

Salmonella är ett släkte som liksom många andra enteropatogener hör till familjen Enterobacteriaceae och alltså omfattar gramnegativa och oxidasnegativa stavar som är rörliga med hjälp av peritrika flageller. Salmonella fermenterar inte laktos och koliformtester på salmonella blir följaktligen negativa.

Vacklande nomenklatur

Det finns i dagsläget (2012) två nomenklaturer för salmonella, en formellt riktig och en annan som används…

Om vi börjar med den användbara så omfattar salmonellabakterierna en enda art: *S. enterica*. Denna indelas i 6 underarter (subspecies =ssp) där underart 1 betecknas *S. enterica* ssp *enterica*. Denna underart indelas i sin tur i ca 1600

serotyper som alla bär egna namn, som exempel kan vi ta *S. enterica* ssp *enterica* Enteritidis och *S. enterica* ssp *enterica* Panama. För enkelhets skull skriver man enligt en accepterad konvention bara serotypsnamnet, alltså *S*. Enteritidis och *S*. Panama. För att markera att det inte rör sig om en art, skrivs serotypen med stor begynnelsebokstav och utan kursivering. De 1600 serotyperna i underart 1 svarar för mer än 99.5 % av sjukdomsfallen hos människan. De övriga 5 underarterna till *S. enterica* omfattar totalt ca 1000 serotyper och enligt en global överenskommelse från 2003 ska dessa inte namnges utan betecknas endast med själva formeln för serotypstillhörighet.

Så till den formellt riktiga nomenklaturen. Där har *S. enterica* ersatts med *S. choleraesuis* och dessutom har ett halvdussin serotyper i underart 1 (som alltså formellt heter *S. choleraesuis* ssp *choleraesuis*) upphöjts till egna arter: det gäller bland annat *S. enteritidis, S. typhimurium, S. typhi* och *S. paratyphi*. Ett specialproblem med den formella nomenklaturen är att epitetet ”choleraesuis” inte bara gäller art och underart, det finns även en serotyp som sedan gammalt har namnet Choleraesuis. Det gäller att hålla tungan rätt i mun!

I praktiken kan man konstatera att alla världens ledande laboratorier, med amerikanska CDC och franska Pasteurinstitutet i spetsen, liksom WHO rekommenderar den förstnämnda nomenklaturen. Därför använder vi den också genomgående i kapitlet. Förmodligen kommer den också så småningom att bli den officiella nomenklaturen (petitioner finns) men erfarenheten visar att sådana förändringar brukar ta åtskilliga år att genomföra, taxonomer är ett släkte för sig.

En välanpassad tarmbakterie

Salmonella är en otroligt väl anpassad bakterie. Dess nisch är tarmkanalen och genom successiv anpassning finns bakterien i tusentals varianter som har mer eller mindre bred värdspecificitet. Det verkar som om praktiskt taget alla djur; från insekter till fiskar, reptiler, fåglar och däggdjur bär omkring på någon variant av salmonella. För tillfället är 2600 serotyper kända av vilka uppåt 2000 har dokumenterats som orsak till sjukdom hos människan. Två av dessa serotyper har för övrigt människan som primärvärd: det är *S*. Typhi och *S*. Paratyphi. Dessa orsakar en annorlunda och svårare sjukdom (tyfoid- respektive paratyfoidfeber) än övriga serotyper. En del av de mest kända serotyperna finns redovisade senare i kapitlet.

I Alvestautbrottet anges inte sällan att den skyldiga serotypen var just

S. Paratyphi. Det är felaktigt, men misstaget är förklarligt: vid tiden för sjukdomsutbrottet 1953 användes nämligen ”paratyfus” som en vanlig benämning på salmonellasmitta, inte minst i pressen. I själva verket var det en stam av *S*. Typhimurium som orsakade utbrottet.

Namnet Salmonella (som *inte* betyder ”den lilla laxen”!) har getts i åminnelse av den amerikanske veterinären Salmon som 1885 isolerade bakterien (*S*. Choleraesuis) från tarmen hos en sjuk gris. Så brukar det i alla fall heta, men Salmon hade i själva verket bara en rent administrativ uppgift då hans kollega, mikrobiologen Theobald Smith, isolerade bakterien som alltså rätteligen borde hetat *Smithella* istället!

SJUKDOMEN

Man skiljer på två salmonellasjukdomar: tyfoid (eller tyfoidfeber), som är en allmäninfektion med hög feber, och salmonellos (salmonellaenterit) som kännetecknas av diarré. Det ska tilläggas att tyfoidfeber *inte* är detsamma som tyfus, vilket annars en del medicinska handböcker och till och med SAOL hävdar. Tyfus orsakas av den cellväggslösa bakterien *Rickettsia*.

Infektionsdos

Det är en vitt spridd uppfattning att det krävs en mycket hög infektionsdos, i storleksordningen hundra miljoner salmonellabakterier, för att orsaka salmonellos. Översatt till ett livsmedel betyder det halter på runt en miljon bakterier per gram livsmedel. Uppgiften grundar sig på experiment med försökspersoner.

Det finns dock två omständigheter som talar mot dessa resultat. För det första så är salmonellos *en mycket vanlig* sjukdom trots att det är *mycket ovanligt* att man i livsmedel hittar en miljon salmonellabakterier per gram. För det andra har det visats att vid utbrott av salmonellos så ligger medianhalten salmonella under 1000 per gram livsmedel. Det verkar därför som att måttliga doser (1000-100 000 bakterier) är tillräckliga för att orsaka sjukdom.

Det finns stora skillnader mellan serotyperna. Den för oss värdanpassade *S*. Typhi kan i vissa fall orsaka sjukdom även vid extremt låga infektionsdoser, ibland ned till ett tiotal bakterier. Låga infektionsdoser gäller troligen också för en del andra, för oss speciellt aggressiva serotyper som exempelvis *S*. Choleraesuis. Möjligen kan man anta det krävs höga doser, kanske just

hundratals miljoner bakterier, för serotyper som är mycket vanliga i livsmedel men däremot mycket sällan orsakar sjukdom.

Dosen salmonella har också betydelse för sjukdomens utveckling. Utsätts man för en verkligt massiv dos så kan förloppet bli riskabelt: en 44-årig fader och hans 18-årige son dog trots intensivbehandling i Danmark efter att fått i sig en miljard bakterier av en förhållandevis beskedlig stam av *S*. Enteritidis.

Det finns givetvis också skillnader i mottaglighet. Barn under 5 år, åldringar samt individer med nedsatt immunförsvar är känsligare för salmonellos än andra. Det är förmodligen förklaringen till att en del utbrott av salmonellos inträffat trots att salmonellahalten i det aktuella livsmedlet varit försvinnande låg (under 0.1 bakterie per gram). Teorin är att det bland tusentals normalt motståndskraftiga individer finns ett fåtal som inte klarar av att hantera ens enstaka salmonellabakterier. Om ett tillräckligt stort antal människor utsätts för smitta, kommer därför ett utbrott att ske även vid extremt låga halter av salmonella.

En annan förklaring till att enstaka salmonellabakterier ibland orsakar sjukdom (och då även hos friska människor) är att salmonellabakterierna kan skyddas vid transporten genom magen. Magsyran är nämligen annars en mycket effektiv barriär mot salmonella. Skyddet kan vara att salmonellan ligger inbäddad i fett som varit fallet i flera utbrott som orsakats av chokladkakor, se fallbeskrivningen *Ett onödigt långvarigt utbrott*. Salmonella i dricksvatten eller andra drycker kan också klara sig genom magen genom att vattnet inte nämnvärt aktiverar magsyran och att stora mängder vätska dessutom späder ut magsyran.

Inkubationstid och symptom

Inkubationstiden vid salmonellos är vanligtvis 12 timmar till 3 dygn, men kan vara så kort som 6 timmar och, i undantagsfall, så lång som 14 dygn. Sjukdomsbilden är varierande, men i regel är insjuknandet häftigt och kännetecknas av voluminös, vattnig diarré och buksmärtor. En åtminstone måttlig feber samt uppkastningar förekommer i många fall. Varaktigheten är 3-7 dygn, mera sällan 2-3 veckor. Antibiotikabehandling sätts inte in på i övrigt friska individer (se fallbeskrivningen *Kanegawa*). Komplikationer är sällsynta hos friska individer, men salmonellos hos människor som är försvagade av hög ålder eller underliggande sjukdomar kan få svåra följder och de drabbade riskerar till och med att dö.

Inkubationstiden för tyfoidfeber är betydligt längre än för salmonellos, oftast 1-2 veckor med en spridning från 3 dygn till 2 månader. I början är symptomen influensaliknande med måttlig feber, huvudvärk, beläggning på tungan, torrhosta och muskelvärk. Ungefär var fjärde smittad klarar sig undan med dessa symptom och tillfrisknar därefter. De flesta av dessa inser aldrig ens att de haft tyfoid utan symptomen förklaras med influensa. Hos tre av fyra stiger febern under andra veckan till uppåt 40°C. Diffusa buksmärtor, hudutslag samt förstorad mjälte och lever är andra vanliga symptom. I takt med att sjukdomen förvärras blir en del förvirrade och apatiska. Barn får ofta diarré medan vuxna tvärtom drabbas av förstoppning. Om sjukdomen inte läker ut under de två första veckorna är risken stor för svåra komplikationer med blödningar i mag-tarmkanalen och perforerad tarm vilket leder vidare till massiva infektioner som kan slå till mot nästan alla inre organ. Drabbar det hjärnan ses ofta psykotiska tillstånd med delirium. Dödligheten för obehandlad tyfoid ligger runt 5 %. Med antibiotika och intensivvård har den kunnat sänkas till under 0.5 %. Ett faromoment är dock att alltfler stammar av *S.* Typhi blir multiresistenta mot antibiotika. Varaktigheten varierar mellan en vecka och två månader, men hos ungefär 5 % uppträder återfallsfeber efter att sjukdomen klingat av. Återfallsfebern är dock lindrigare än den inledande sjukdomsfasen.

Alla salmonellasmittade utsöndrar salmonellabakterier en tid efter att symptomen upphört. Man räknar med att 5-10 % fortfarande utsöndrar bakterierna efter 3 månader och att runt 1 % riskerar att bli friska smittbärare under åratal eller till och med för resten av sitt liv. En svensk man, som aldrig varit utomlands, insjuknade i tyfoidfeber på 1980-talet. Någon förklaring till fallet fick man inte. Två år senare insjuknade en äldre kvinna i hans omgivning i tyfoidfeber. Det visade sig att kvinnan insjuknat redan 60 år tidigare och att hon nu sent omsider fått ett återfall. Under hela denna tid hade hon varit symptomfri bärare av salmonella. Och två år tidigare hade hon lagat mat åt den tidigare insjuknade mannen…

Incidens

I industriländerna är salmonella och campylobacter de två ojämförligt vanligaste orsakerna till livsmedelsburna infektioner. Salmonella är den som ger de flesta stora utbrotten och till skillnad från Campylobacter är salmonella inte begränsad till ett fåtal livsmedel. Som de flesta andra livsmedelspatogener är salmonella kraftigt underrapporterad. I USA registreras till exempel officiellt 40 000 fall per år medan det verkliga antalet beräknas till mellan 1.5 och 4 miljoner: bara en bråkdel av fallen kommer således till myndigheternas

kännedom. Antalet dödsfall i USA till följd av salmonelloserna beräknas av smittskyddsmyndigheterna till omkring 500 per år, men en del forskare menar att det kan vara så många som 3000 som dör. Kostnaderna i USA (då beräknat på 1.5 miljoner fall) uppskattas till runt 30 miljarder SEK.

I Sverige, som har anmälningsplikt på inträffade fall, är det i storleksordningen 4000 människor som årligen drabbas enligt den officiella statistiken. På 1990-talet ansågs 90 % bli smittade utomlands, mestadels i Medelhavsområdet och i Thailand. Men andelen utlandssmittade har faktiskt gått ned under 2000-talet, statistiken för de senaste 10 åren (2002-2011) visar på att i genomsnitt 79 % smittats utomlands. Om det beror på mindre utlandsresande till särskilt utsatta länder, på ökad uppmärksamhet om problemet bland turisterna eller på en rent tillfällig trend går ännu inte att avgöra. De som drabbas av salmonellos inom Sverige är genomgående ungefär 800 per år.

Tyfoid var en vanlig dödsorsak i Europa och USA för hundra år sedan. I den så kallade Göteborgsepidemin 1918-1919 dog 200 av de 1800 som smittades med infekterat vatten. Biologisk rening av avloppsvatten och klorering av dricksvatten minskade drastiskt sjukdomens betydelse och idag är tyfoid ovanligt i industriländerna. I Sverige är det bara 10-25 människor årligen som insjuknar, praktiskt taget alla som följd av utlandsresor. Enstaka fall förekommer där äldre kroniska bärare av serotyp Typhi får återfall många år efter den egentliga smittan.

I utvecklingsländerna är däremot tyfoid trots vaccinationskampanjer fortfarande en brutal realitet. Världshälsoorganisationen beräknar att 16 miljoner människor årligen insjuknar och att 600 000 av dessa dör. Siffrorna är, ska det sägas, tämligen grova uppskattningar och det verkliga antalet insjuknade kan mycket väl ligga 50 % under eller över dessa beräkningar. Värst är situationen i vissa indiska städer, enbart i Delhi insjuknar 170 000 varje år, vilket motsvarar en av hundra invånare.

Salmonellos på cellnivå

När salmonellabakterierna når tunntarmen, penetrerar de det muköса (slemmiga) ytlagret med hjälp av flagellerna. Därefter adherar de till tarmcellerna genom specifika fimbrier. Ett huvudområde för angreppet är den lymfoida vävnad i tunntarmen som kallas Peyers plack. Här är det både M-cellerna och de egentliga epitelcellerna (enterocyterna) som är målet. M-

cellerna har bland annat till uppgift att plocka upp främmande partiklar och transportera dem till underliggande vävnad där de kan förstöras.

Salmonella drar nytta av M-cellernas egen förmåga till endocytos, alltså att bakterierna transporteras in av M-cellen genom att cellmembranet välvs inåt och avsnörps. Att utnyttja M-cellerna är för övrigt ganska vanligt hos invasiva patogener, även andra enterobakterier som *Shigella* och *Yersinia* samt grampositiver som *Listeria* använder sig av denna strategi.

Till skillnad från många andra patogener kan dock salmonella alltså även invadera enterocyterna och då måste de aktivt tvinga epitelcellerna att utföra endocytosen. Det sker genom att bakterierna injicerar en rad proteiner genom cellmembranet. Proteinerna förändrar aktinet (”cellskelettet”) i membranet så att bakterierna kan slinka in. Ett av de injicerade nyckelproteinerna är invasionsproteinet SipC: mutanter som saknar SipC förlorar sin virulensförmåga. Det synliga resultatet är att cellmembranet skrynklas till på ett för salmonella unikt sätt, så kallad *ruffling*. Väl inne i cellerna förändras cellmaskineriets signalsystem så att salmonella inte bara kan överleva utan även förökas. Samtidigt ser salmonella till att cellskelettet återställs till sin normala funktion genom städarproteinet SptP. Nästan alla virulensfaktorer som krävs finns samlade i vad som kallas *salmonella pathogenicity islands* (SPI) och noga räknat i SPI-1.

Kroppens första immunologiska försvar mot salmonella är att skicka iväg neutrofiler och makrofager mot bakterierna. Makrofagerna dödas av salmonella genom inverkan av proteinet SipB, möjligen också genom nekrotiska toxiner. Flera av de invasiva (Sip) och yttre (Sop) proteinerna kan egentligen betraktas som toxiner och de har stor betydelse för sjukdomsbilden. Även enterotoxiner bildas, men de är av allt att döma inte nödvändiga för att diarré ska uppkomma.

Till skillnad från makrofagerna skadas inte neutrofilerna av salmonella. Neutrofilerna migrerar genom epitelcellerna från underliggande vävnader och det är förmodligen den kraftiga inflammatoriska reaktionen med just neutrofiler som gör att epitelceller lossnar och vätska utsöndras – med påföljande diarré – från slemhinnan. Det avskräde som bildas av cellresterna ger sedan salmonellabakterierna ett par extra veckor att tillväxa hos de nu symptomfria bärarna.

Normalt läker sjukdomen spontant utan några komplikationer. Salmonella hjälper för övrigt till med att begränsa sjukdomen: ett speciellt avirulensprotein (AvrA) snabbar på epitelcellernas programmerade celldöd. Därför stoppas spridningen eftersom salmonellabakterierna inte hinner överföras från cell till cell. Att de infekterade epitelcellerna dödas har ingen större betydelse för människan, de ersätts inom några dygn. Att salmonella härigenom uppvisar både patogena och saprofytära drag är gissningsvis till fördel för bakterierna sett i ett evolutionistiskt perspektiv. Att vara strikt patogen är att satsa allt på ett kort, vilket sällan lönar sig i längden, och salmonella har sannolikt utvecklats under lång tid tillsammans med sina värddjur.

I undantagsfall kan dock bakterierna spridas vidare och avancera till blodsystemet. Detta sker oftast hos immunsvaga individer men en del serotyper – som Choleraesuis – är speciellt aggressiva och kan ge komplikationer även hos friska individer. Från blodsystemet kan invasiva former av salmonella sedan utbredas till inre organ med massiv allmäninfektion som följd. Antibiotikabehandling sätts vid salmonellos in först vid eventuella komplikationer.

Tyfoid på cellnivå

De inledande stegen är likartade vid salmonellos och tyfoid. Den stora skillnaden är att när tyfoidbakterierna når Peyers plack så är målet i första hand makrofagerna, inte epitelcellerna. Makrofagerna fagocyterar tyfoidbakterierna och när dessa väl är inne så slår bakterierna på ett komplicerat genbatteri som möjliggör för dem att inte bara överleva utan också föröka sig inuti makrofagerna. Via makrofagerna tar tyfoidbakterierna sig sedan vidare till blodbanorna med en kraftig blodförgiftning som följd (därav den höga febern under andra sjukdomsveckan) och till inre organ, framför allt mjälte och lever. Där kan de fortsätta ett intracellulärt liv tills kroppens tyngre immunologiska försvar kämpar ned bakterierna. Ibland klarar inte kroppen av uppgiften utan den insjuknade dör av den massiva infektionen.

LIVSMEDEL: TILLVÄXT

I de flesta fall krävs en tillväxt av salmonella i livsmedel för att ett utbrott av salmonellos ska inträffa. Det betyder nästan alltid att livsmedlet vid något tillfälle temperaturmisshandlats och förvarats vid rumstemperatur i stället för i kyla. Ett undantag är möjligen hel fågel: i samband med slakten kan fågelns innandöme kontamineras av tarminnehållet och innehåller då lokalt högre

halter salmonella än vad som blir fallet med köttdetaljer från storboskap och gris. Andra undantag är då den kontaminerade produkten på något sätt skyddar salmonellan från kroppens magsyra eller då produkten når ut till ett extremt stort antal människor. Då kan även låga salmonellahalter räcka för att orsaka ett utbrott.

Temperatur

Salmonella är utpräglat mesofil med ett tillväxtintervall på 7-45°C. I de flesta livsmedel kommer salmonella igång först vid 10-12°C och därför stoppar en fungerande kylkedja effektivt tillväxten. Salmonella är värmekänslig och avdödas snabbt vid 60°C under förutsättning att vattenhalten är hög. Även om salmonella inte kan tillväxa i kyltemperaturer medför kyllagring eller infrysning inte heller någon nämnvärd reduktion av salmonella.

Syre

Salmonella är fakultativa anaerober och kan alltså växa i såväl luft som i syrgasfria miljöer. Liksom de flesta andra gramnegativer är de ganska känsliga för koldioxid och därför är tillväxten långsam i vakuumförpackningar eller i modifierad gasatmosfär. Eftersom livsmedlets hållbarhet samtidigt är längre i sådana förpackningar kan dock salmonella ändå tillväxa signifikant om förpackningarna lagras vid för hög temperatur.

pH

Optimalt pH är 6.5-7.5 men salmonella är faktiskt, för att vara en medlem i Enterobacteriaceae, ovanligt tålig mot låga pH. För att vara på den helt säkra sidan finns en internationell rekommendation om att fermenterade produkter bör ha ett pH på högst 4.1 för att omöjliggöra tillväxt.

Saltning och rökning

Salmonella klarar upp till 5 % salthalt i livsmedel vilket är ganska mycket för en medlem av Enterobacteriaceae. Men eftersom sådana livsmedel ändå ska förvaras i kyla innebär de inte någon ökad risk för tillväxt. Saltade produkter som kan förvaras i rumstemperatur är antingen kraftigt rökta eller torkade, åtgärder som effektivt hindrar tillväxt av salmonella.

LIVSMEDEL: PRODUKTER

Tyfoidbakterierna är helt anpassade till människan och smittspridningen sker därför fekalt-oralt mellan människor. Tyfoidsmitta via livsmedel är därför alltid indirekt och en följd av dålig hygien. I princip kan vilket livsmedel som helst sprida smittan vidare. Dricksvatten (inklusive is) är den dominerande smittkällan. Råa ostron som hämtats från förorenat vatten är heller ingen lyckad maträtt. Före pastöriseringens införande var mjölk en vanlig smittväg i Sverige. Sjukdomen spreds då av mjölkerskor som var symptomfria bärare av tyfoidbakterierna.

Även vid salmonellos kan spridningen naturligtvis ske fekalt-oralt och då innefatta livsmedel som annars inte direkt uppfattas som riskfaktorer, till exempel grönsaker. Annars är flertalet salmonelloser kopplade till serotyper som finns hos djur och som via kött eller ägg smittar människor. I den industrialiserade världen är infekterade hönsägg den viktigaste smittkällan.

Tyfoid-Mary

Sommaren 1906 hyrde New York-bankiren Charles Warren ett sommarställe på Long Island. För att laga maten anlitades Mary Mallone, en 37-årig irländska med gott rykte som kock. Under sommaren insjuknade Warrens fru och båda döttrar samt två hembiträden och trädgårdsmästaren i tyfoidfeber. Alla repade sig men någon smittkälla hittades inte i den utredning som följde. Tyfoid var i början av 1900-talet ingen ovanlig sjukdom och den allmänna uppfattningen var att sjukdomen spreds med infekterat vatten. Warren, som gärna ville hyra sommarhuset även nästa säsong, men inte vågade innan smittohärden identifierats, beslöt att anlita tyfoidexperten George Soper.

Sopers utredning gav ett förbluffande resultat: han lyckades spåra den inhyrda och nu entledigade kockan Mary Mallones levnadshistoria och kunde konstatera att tyfoid hade följt i Marys kölvatten på flera av de ställen hon hade arbetat. Totalt 22 personer hade insjuknat varav en ung flicka hade dött. Soper ville att Mary skulle testas för tyfoidbakterier men Mary själv hade ingen förståelse för argumenten och vid mer än ett tillfälle jagade hon, beväpnad med en förskärare, ut Soper och hans assistenter ur sin bostad.

Marys motstånd var förståeligt. Hon hade aldrig haft tyfoid (en del smittade utvecklar bara lätta, diffusa influensasymptom), var frisk som en nötkärna och

såg Sopers påstående att hon skulle ha smittat människor som befängt. Inte ens myndigheterna hade vid denna tid insikt om att människor kunde vara friska bärare av tyfoidbakterierna. Slutligen, med fem polisers hjälp, kunde undersökningen genomföras och man fann att Marys avföring innehöll mängder av tyfoidbakterier.

Mary tvingades utan något domstolsutslag tillbringa de tre närmaste åren i karantän på en liten ö. Mary själv accepterade aldrig provsvaren och menade att hon var utsatt för en komplott som riktades mot henne i egenskap av en fattig irländsk invandrare. Pressen tog upp fallet och den allmänna opinionen stod på Marys sida: hon hade kanske varit orsaken, menade man, men hon hade inget ont uppsåt och var i grunden helt oskyldig. Därför borde hon inte heller interneras. Mary hade under tiden själv anlitat ett eget laboratorium som inte kunde finna bakterierna i hennes avföring, något som naturligtvis stärkte henne i sin uppfattning om att hon var utsatt för en komplott. Efter en våldsam presskampanj frisläppte myndigheterna henne mot löftet att hon aldrig mera skulle ta tjänst i ett kök. Det var dock ett löfte Mary, övertygad som hon var om att hon var oskyldig och ur stånd att hitta något annat arbete, inte skulle hålla.

Fem år senare fördes 25 personer med tyfoid till ett sjukhus på Manhattan. Två av de drabbade dog och misstankarna riktades mot kockan Mrs Brown. Som snart visade sig vara ett alias för Mary Mallone. Den här gången gick folkstormen år andra hållet och Mary skulle till sin död 23 år senare sitta i karantän i samma lilla stuga som tidigare. Vid obduktionen fann man att salmonellabakterierna infekterat och fortfarande förökades i gallblåsan.

Kanadensisk salmonellabuffé

Ett utbrott av salmonellos inträffade sommaren 2004 i Edmonton. Utbrottet var diffust och kunde därför pågå i två veckor innan myndigheterna fick upp ögonen för det. Först när man genom PFGE-mönstret spårat en speciell klon av *S.* Heidelberg hos 32 insjuknade kunde man klarlägga att alla ätit buffé på en asiatisk restaurang i staden. Samtliga insjuknade drabbades av diarré, 93 % hade feber, 85 % hade buksmärtor och kände illamående, 60 % hade uppkastningar och lika många klagade över allmänna smärtor i kroppen. Tjugo procent hade blodig diarré och denna grupp vårdades på sjukhus. Undersökningen visade att inkubationstiden varierade mellan 7 timmar och 3 dygn med en mediantid på 16 timmar. Sjukdomens varaktighet var i genomsnitt drygt 7 dygn. Man kunde vid undersökningstillfället inte påvisa

salmonella i maten och ingen av de anställda på restaurangen hade haft diarré.

Förklaringen visade sig vara att en av de anställda var symptomfri bärare av den aktuella stammen. Fallet är ett typiskt exempel på ett fekalt-oralt utbrott av salmonellos där det inte är livsmedlet utan kocken som är skyldig.

Kött och ägg

Alla typer av kött kan innehålla salmonella härrörande från djuret. Dessutom kan en svårutrotad husflora av salmonella etableras i slakteri- och styckningslokaler.

Fågel

Frekvensen salmonella är högst i kött från fågel som kyckling, anka och kalkon: i många länder hittas faktiskt salmonella hos över 50 % av fåglarna. Samtidigt är halten salmonella genomgående högre hos fågel än i annat kött vilket beror på att fåglarna lättare kontamineras med avföring vid slakten. En tredje faktor som ökar risken för salmonellos är att det ofta är fåglarnas innandöme som är kontaminerat, alltså den del som utsätts för kortast värmebehandling.

Det är därför inte förvånande att kyckling, kalkon och annan fågel överlägset toppar statistiken för utbrott av salmonellos från kött. Kyckling är till följd av sin popularitet den vanligaste orsaken och då handlar det nästan alltid om misstag i hanteringen genom dåligt genomstekta produkter. För den som beställer in sin mat på restaurang är dock den individuella risk man tar nog större med anka eller mer exklusiva fåglar: dessa ska enligt västerländsk kökspraxis serveras *medium rare*, alltså med rosa-rött kött, vilket innebär riskabelt låga innertemperaturer.

Den goa, goa, goa kycklingsåsen

Den 28 juli 2005 informerades det spanska epidemicentret om ett lokalt utbrott av misstänkt salmonellos i Valencia som omfattade åtta hushåll med 25 insjuknade. Ett par likartade smärre utbrott rapporterades samtidigt från två andra regioner och det spanska livsmedelsverket satte igång med sin undersökning för att spåra en gemensam nämnare.

Man fann nästan omedelbart att de insjuknade ätit färdiggrillad kyckling av märkena *Pimpollo* och *Pollo Asado SADA*, båda – visade det sig – tillverkade av

Grupo Sada i Toledo, strax söder om Madrid. Redan den 29 juli stoppade myndigheterna produktion och försäljning samtidigt som man gick ut med en internationell varning på internet. Under de följande dagarna lyckades man även återkalla 150 000 kycklingar från affärerna.

Många av de vakuumförpackade kycklingarna fanns dock redan i hushållens kylskåp och skulle där utgöra en fara ända tills hållbarhetstiden på 3 veckor var över. Så trots återkallelser och publika varningar fortsatte fallen att strömma in. Under augusti kunde man summera att 2700 personer insjuknat och att det var en stam av *S*. Hadar som orsakat utbrottet. Symptomen var lyckligtvis tämligen lindriga. Men, med så många insjuknade blir det ändå alltid kritiskt för några: ett fyrtiotal av de insjuknade fick tillbringa ganska lång tid på sjukhus och en 90-årig man avled.

Vad var det som hade gått snett i produktionen? Ja, företaget hade faktiskt kontrollerats av hälsoskyddet två dagar före utbrottet utan någon som helst anmärkning. Vad företaget dock inte upplyste kontrollanterna om var att man infört en ny rutin. Före förpackandet av de (kontrollerade och godkända) grillade kycklingarna hällde man över en (okontrollerad) skysås från grillningen. Såsen pumpades genom ett rör och det visade sig att röret på ett ställe bucklats till och att gammal sås fastnade i fördjupningen. Det var här som salmonellan fick en grogrund för tillväxt. Företaget fick så småningom böta 6 miljoner SEK för sitt misstag att inte informera om den nya rutinen. Den bad-will företaget utsattes för var dock sannolikt mycket mer kostsam.

Utbrottet visar på åtminstone tre intressanta saker. En är att ett missgrepp i storproduktion och centraliserad försäljning kan leda till mycket stora utbrott över stora områden. Sjutton av Spaniens nitton autonoma regioner rapporterade sjukdomsfall. Värst drabbade var Castilla La Mancha (där produkten tillverkades), Valencia, Murcia och Andalusien; dessa fyra regioner stod för 60 % av fallen. Det andra är att kvalitetssäkring hos stora tillverkare är ytterst viktig. Om en kvalitetsansvarig mikrobiolog hade funnits på företaget, hade rimligtvis den nya tillverkningsproceduren omedelbart identifierats som en hygienrisk som krävde kvalitetssäkring. Det tredje är att det moderna nätbaserade varningssystemet för salmonella inom EU ger en mycket effektiv hjälp för att snabbt lösa och därmed begränsa utbrotten. Det kan kanske låta märkligt med tanke på att nästan tretusen personer ändå drabbades, men omfattningen av Grupo Sadas produktion var sådan att bara någon veckas fördröjning av försäljningsstoppet förmodligen hade resulterat i uppemot

hundratusen fall. Nu lyckades man få till ett produktionsstopp redan 24 timmar efter att de första fallen inrapporterats till den centrala myndigheten.

Gris

Griskött kommer som god tvåa i frekvensstatistiken. Enligt en stor dansk undersökning 2009 var 10 % av det importerade europeiska fläskköttet smittat med salmonella. Samtidigt så var 13 % av det fläskkött som danskarna själva exporterade smittat. Vid tillfället hade danska massmedia och politiker ett mycket stort fokus på importerat salmonellasmittat kött som ansågs drabba de danska konsumenterna hårt. Uppgifterna om att danskt kött faktiskt var ännu värre togs inte särskilt väl emot. Och reaktionerna blev knappast bättre av att en epidemiolog gick ut och rekommenderade danskarna att köpa svenskt fläskkött om de ville slippa salmonella…

Utanför Europa är det ofta ännu värre, två undersökningar visade att 60 % av det mexikanska och 70 % av det vietnamesiska grisköttet i livsmedelsaffärerna var salmonellasmittat!

Det är dock sällan som griskött konsumeras annat än väl genomstekt och det minskar naturligtvis också risken för salmonellos. Tyskland hade visserligen 2004-2005 två utbrott med åtskilliga drabbade som orsakades av fläskfärs, som av för oss obekant anledning faktiskt åts rå, men det hör definitivt till undantagen. När griskött figurerar i större utbrott så är det antingen efter för kort tids tillagning av stora styckningsdetaljer som i fallbeskrivningen *Kanegawa*, eller i form av dåligt grillade korvar. I England, där man gärna grillar fryst eller färsk råkorv, har man upprepade gånger varnat för att till synes välgrillad korv kan vara ljummen inuti. Och med tanke på att ungefär 10 % av de brittiska råkorvarna 2005 innehöll salmonella så verkar varningarna befogade. Även fermenterade korvar som salami kan ibland orsaka salmonella, i Sverige hade vi exempelvis ett sådant fall 2005 då sju svenskar och en familj på sex norrmän insjuknade efter att ha ätit italiensk salami som importerats till Sverige. I det fallet hann smittskyddet med att dra in över ett ton salami från butikerna. I Sverige har annars under 2000-talet de stora utbrotten orsakats av dansk julskinka och *Dansk grisköttskebab* (se fallbeskrivning).

Kanegawa: En kvarts miljon salmonella per gram

I Kanegawa, Japan, inträffade 1993 ett våldsamt utbrott av salmonellos på ett internat med ett drygt hundratal mentalt handikappade elever i åldersgruppen

7-33 år. Inkubationstiden varierade mellan 10 timmar och 5 dygn. Nästan alla eleverna smittades och 85 % insjuknade med diarré, kräkningar och feber. Flertalet insjuknade hade så pass svåra symptom att de togs in på sjukhus där de behandlades med antibiotika. Samtliga insjuknade tillfrisknade utan några komplikationer.

Orsaken till utbrottet var grillat fläskkött som hade levererats av en cateringfirma. Analyser visade att det dåligt värmebehandlade köttet innehöll en kvarts miljon S. Typhimurium per gram. Den ovanligt höga halten salmonella var orsaken till att så många som 85 % av eleverna insjuknade och att flertalet utvecklade mycket kraftiga symptom.

Den noggranna undersökningen, där till exempel alla patienterna följdes upp med avföringsprover under 2 månader, resulterade också i två viktiga slutsatser. Den ena var att de flesta av de 15 % som inte insjuknade faktiskt också hade infekterats med bakterierna och att de under en tid var friska bärare av stammen som utsöndrades med avföringen. Den andra var att de som behandlats med antibiotika utsöndrade bakterierna under mycket längre tid än de som inte antibiotikabehandlats. Undersökningen är en av flera som visar på samma förhållande och numera behandlas sällan salmonelloser med antibiotika annat än under speciella omständigheter.

Dansk grisköttskebab

I juli 2003 får Vårdcentralen i Kallinge strax norr om Ronneby in fem fall av misstänkt salmonellasmitta: en person hade ätit dagens lunch på en lokal restaurang, de fyra andra hade ätit kebabpizza på samma restaurang. Restaurangen inspekteras omgående av miljö- och hälsoskyddskontoret och allt är i god ordning, men restaurangen stängs under tiden som prover från olika matvaror analyseras. Samtidigt informeras massmedia för att få eventuellt andra smittade att höra av sig. Gensvaret är stort, ett hundratal sjuka hör av sig, ett betydande antal i ett litet samhälle som Kallinge. Gemensamt för alla är att de ätit på samma restaurang och kebabköttet hamnar alltmer i fokus för intresset. Det visar sig att kebabköttet importerats från Danmark, att det till kontrollanternas häpnad består av fläskkarré, och att det via en grossist i Jönköping sålts vidare till ett trettiotal orter över hela Götaland. Även på en del av dessa orter drabbas man av salmonellos.

Nu rullas en historia upp med flera förvecklingar. Kan man verkligen använda

vilken köttråvara som helst till kebab? Kommer smittan från Danmark som sydsvenska tidningar hävdar eller har den svenske grossisten kontaminerat köttet som en del danska tidningar är inne på? Fläskkarrén har nämligen enligt exportintyget kontrollerats i Danmark och var då salmonellafri. Det utvecklas under en tid nästan till en massmedial landskamp mellan svenska och danska tidningar där beskyllningar och motbeskyllningar haglar.

Grossisten är på defensiven när det gäller fläskköttet till kebab, men menar att man i Sydsverige gillar det bättre än får- eller nötkött. Sydsvenskarna, som inte haft en aning om att de tycker så, är mera skeptiska och en del känner sig lurade. Men något lagbrott är det inte, kebab är inte någon namnskyddad produkt och kan tillverkas av konserverad gröt om nu någon skulle komma på den idén.

Efter några dagar kommer analyssvaren: såväl patienterna som den undersökta kebabrullen innehåller S. Typhimurium. Alla stammarna fagtypas av Smittskyddsinstitutet till DT 108. På den danska massmediasidan sätter man nu ett triumferande streck över diskussionen. DT 108 är nämligen nästintill okänd i danskarnas annars så digra salmonellasortiment. Köttet hade alltså inte smittats i Danmark.

Så småningom, när både svenska och danska massmedia förlorat allt intresse för affären, visar det sig att köttet faktiskt ändå var smittat redan när det exporterades från Danmark. Men med en annan fagtyp, DT 170, som är mycket vanlig i danskt kött. Svenska Smittskyddsinstitutet hade helt enkelt gjort en feltypning som danskarna med sin större vana vid salmonella rättade till. Detta är i och för sig inget konstigt, fagtypning är delvis en subjektiv bedömning där stor erfarenhet är nödvändig. Det konstiga, kan man tycka, är att danskarna med sin erfarenhet inte ens lyckades hitta salmonellan före exporten…

Nötkött

Kött från nötkreatur, får och getter är mindre infekterat med salmonella än griskött, i regel ligger frekvensen internationellt på 1-5 %. Undantag finns, så är till exempel över 50 % av nötköttet i Mexiko smittat. Trots en alltså vanligtvis förhållandevis låg frekvens finns ändå många utbrott registrerade där nötkött varit orsaken. Anledningen är att nötkött upphettas till lägre innertemperatur än griskött. Risken ökar naturligtvis ju blodigare biffen är.

Råbiff är inte särskilt lyckat att äta utomlands, framför allt inte garnerad med

en rå äggula! Dåligt stekta hamburgare är en annan produkt som ställt till med flera stora utbrott av salmonella.

Ägg

År 1991 gick *S*. Enteritidis om *S*. Typhimurium som den globalt viktigaste orsaken till salmonellos, en tätplats som *S*. Enteritidis sedan dess behållit. *S*. Enteritidis är framför allt kopplad till konsumtion av ägg och följaktligen är ägg också den vanligaste smittkällan till salmonellos.

Före 1970 ansågs ägg annars vara en förhållandevis säker produkt där olika typer av salmonellabakterier huvudsakligen fanns utanpå skalet på grund av kontaminering från hönsens avföring. Efter 1970 skedde i Europa en närmast epidemisk spridning av *S*. Enteritidis som smittar äggen via äggledarna och som därför finns inuti äggen. Det var en speciell klon av fagtyp 4 (PT 4) som spreds och PT 4 blev snart det dominerande problemet även i många länder utanför Europa, undantagandes USA där man i stället fick problem med två inhemska fagtyper, PT 8 och PT 13a. En del forskare menar att tidpunkten för den epidemiska spridningen av serotyp Enteritidis inte var en slump, det skedde samtidigt som man i dessa länder genom vaccinering lyckades utrota serotyp Gallinarum som ställde till med stora bekymmer för uppfödarna. Genom att *S*. Gallinarum (som är ofarlig för människan) försvann, uppstod en nisch för S. Enteritidis, menar man. Om dessa forskare har rätt skulle det vara ett exempel på en ekologisk felsatsning, åtminstone sett ur konsumenternas perspektiv.

I början av 1990-talet hade problemet blivit så stort i Europa att man för första gången (utanför Sverige/Norge/Finland) började införa åtgärder mot salmonella. Det skedde inte utan protester från uppfödarna, bland annat fick en engelsk minister avgå 1988 sedan hon – några år för tidigt – öppet anklagat äggproducenterna för att producera salmonellasmittade ägg. Kontroll av uppfödare och ägg har sedan dess avsevärt förbättrat situationen i några länder: i England innehöll 2003 ”bara” ett sexpack ägg av 290 (0.34 %) salmonella och i Holland har man lyckats sänka frekvensen positiva ägg till 0.03 %.

Något åtgärdsprogram har ännu inte hunnit till de nytillkomna EU-staterna från öst där över 10 % av äggen kan vara smittade och där man som turist inte bör äta löskokta ägg till frukost eller för den delen krämig omelett till lunch. Inte heller i Spanien, med en salmonellafrekvens på 7 % i äggen 2003, är det

rekommendabelt att äta råa ägg. Spanien är Europas största exportör av ägg, men det spanska Jordbruksministeriet har hittills visat liten förståelse för att spanska ägg sprider smitta. Man lovade 2003 att titta på problemet men berömde i samma andetag de spanska äggen som ”världens i särklass bästa”. Britterna, som tröttnat på att fler britter blir sjuka av importerade spanska ägg än av inhemska, drev 2004-2005 en ganska hätsk kampanj mot spanska ägg. Men resultatet blev magert: 2006 har fortfarande ingenting hänt och britterna drabbades detta år bland annat av två utbrott från frysta, sammansatta produkter som var tillverkade av spanska ägg.

Salmonella som sitter utanpå skalet kan oskadliggöras genom att sänka ned ägget någon sekund i kokande vatten och sådana ”pastöriserade skalägg” är en vanlig företeelse utanför Sverige. Däremot är tvätt av ägg avsedda för konsumentmarknaden förbjudet i större delen av EU. En anledning är att man menat att det finns risk för att tvätten skadar skalet och att man då i stället ympar in salmonella i äggen. I Sverige har vi valt en annan linje, här högtryckstvättas äggen med ljummet vatten, något som anses ta bort 99.7 % av alla bakterier och virus. Sveriges undantag skulle egentligen omförhandlas under 2006 men fågelinfluensan hösten 2005 ledde till att EU kovände och att allt fler länder inom EU tar efter den svenska modellen. Även i USA tvättar man för övrigt sedan länge äggen.

Ägg som inuti är infekterade med S. Enteritidis måste naturligtvis kokas ordentligt för att döda salmonella. Utöver att hindra denna serotyp från att invadera äggen finns det dock ett sätt att åtminstone undvika tillväxt, nämligen förvaring i sval temperatur. I kyllagrade ägg växer naturligtvis inte salmonella, men äggen innehåller dessutom så pass många antibakteriella ämnen att salmonella inte utan vidare växer till ens i svaltemperatur. Bakterierna finns normalt i äggvitan där lysozym hämmar tillväxten och bakterierna behöver ta sig över till gulan för att ohämmat kunna växa till. Detta beräknas i normalfallet ta 3 veckor även vid rumstemperatur medan det däremot går på ett fåtal dagar vid 30° C i till exempel varma restaurangkök. När väl en massiv tillväxt skett i gulan kan bakterierna successivt sprida sig tillbaks in i vitan och även tillväxa där.

Råa ägg innebär naturligtvis den största risken men det är trots allt en försvinnande liten del äggulor som konsumeras på en råbiff eller över den svenska varianten av *pasta carbonara*. Löskokta ägg eller mycket krämig omelett eller äggröra är alltför milt värmebehandlade för att döda salmonella, först när

äggen är riktigt hårdkokta går man säker. Är man utomlands kan man med fördel ta de grönmissfärgade ägg som andra ratar, grönmissfärgningen (äggen smakar bättre än de ser ut) består av utfällda metallsulfider som bildas först när proteinerna börjar brytas ned och då är ägget garanterat genomkokt.

Den stora risken utgörs dock av anonyma råa ägg, sådana som inte kan ses. Obetydligt uppvärmda äggsåser som bearnaise eller hollandaise är klassiska salmonellafällor liksom naturligtvis opastöriserad majonnäs eller glass. Och hur många vet att Italiens favoritdessert, tiramisù, innehåller ägg som aldrig ser insidan av en ugn? Är man i likhet med denna boks alla tre författare, galen i tiramisû tar man naturligtvis ändå risken, men kanske bäst mot slutet av Italienresan…

Fågelinfluensan dödade tio holländare

Den massmediala hysterin kring fågelinfluensan hösten 2005 hade faktiskt en föregångare våren 2003 även om vi inte märkte så mycket av den i Sverige. I Holland drabbades fågeluppfödningen däremot hårt vilket bland annat ledde till att många holländare blev utan sina frukostägg.

Under sommaren 2003 skedde en markant uppgång av salmonelloserna i Holland. Uppskattningsvis 7500 fler holländare än normalt insjuknade, en ökning på 50 %, långt över vad som var statistiskt rimligt. Undersökningar av laboratoriekonfirmerade fall visade att hela uppgången kunde tillskrivas *S.* Enteritidis vilket i sin tur pekade på att ägg var den sannolika smittkällan. Holländarna hade lite svårt att förstå det eftersom äggproduktionen ännu inte hämtat sig. Holland hade dessutom på senare år fört en intensiv kampanj mot salmonella i ägg. Man hade fått ned salmonellafrekvensen i äggen till 0.03 %, vilket var bäst inom EU frånsett Sverige och Finland. Sommaren var dock mycket varm och eftersom man visste att tillväxthastigheten hos *S.* Enteritidis var linjärt korrelerad till temperaturen, antog man först att det var värmeböljan som orsakat de många fallen. Undersökningar visade dessutom att det fortfarande fanns gott om salmonella i besättningarna, omkring 6 % av flockarna var infekterade med *S.* Enteritidis, så kanske hade fler infekterade ägg än vanligt kommit ut på marknaden.

Fagtypning av stammarna som isolerats från patienterna visade på PT 1, en fagtyp som är mycket ovanlig i Holland. Antibiotikaresistensmönstret var dessutom annorlunda mot vad man var van vid i Holland. Samtidigt

upptäcktes i England ett utbrott av salmonellos på grund av S. Enteritidis PT 1, med samma resistensmönster som i Holland. Stammarna spårades till spanska ägg. Spanien är ett av flera EU-länder som har en salmonellafrekvens i äggen på mellan 5 % och 10 %, skyhögt över England (0.3 %) och, som sagt, Holland.

Någon importkontroll mellan EU-länder görs ju normalt inte, och i början hade man i Holland inte ens klart för sig att det under bristsituationen sommaren 2003 importerats massor av ägg från Tyskland, Italien och Spanien. När importstatistiken väl stod klar, klarlades ett epidemiologiskt samband med de spanska äggen och den dramatiska ökningen av salmonellosfall. De holländska undersökarna konkluderade att 8-11 holländare sannolikt hade avlidit till följd av salmonellavågen, dödsfall som alltså orsakades av åtgärder mot fågelinfluensan.

Som en direkt följd av importen av de spanska äggen till England och Holland, en import som enligt EU-reglerna inte kan förbjudas, fick man till stånd en nationell märkning av äggen: för ägg märkta ES (=Spanien) rekommenderar man numera i England att de ska hanteras med extra försiktighet, aldrig ätas råa och helst inte användas till mat i dagis eller äldreboende.

Fisk och skaldjur

Den största internationella undersökningen av rå fisk utfördes av amerikanska FDA under 1990-talet. Mer än 10 000 prover undersöktes: 12 % av den importerade och 3 % av den inhemska fisken innehöll salmonella. Frekvensen varierade mellan exportländerna, högst var den från Vietnam (en stor exportör till USA) med 30 %, lägst från Europa med drygt 1 %.

Infektionskällan kan dels vara fisken i sig själv, dels förorenat vatten. För importerad färdigmat (t ex kokta räkor och rökt fisk) var 3 % av importen salmonellasmittad. I dessa fall får man anta att fisk och skaldjur återkontaminerats av människor eller av utrustning. Det finns inga uppgifter på att Smögenräkor eller andra färdiglagade svenska fiskprodukter innehåller salmonella, vilket kan förklaras med att svenska yrkesfiskare och deras utrustning är fria från salmonella. Den fisk Sverige importerar innehåller däremot givetvis lika hög frekvens salmonella som i USA, skillnaden är att i Sverige kontrolleras en hel del importfiskar innan de hamnar i frysdiskarna. I brist på större svenska undersökningar kan man bara spekulera: på goda grunder kan man dock anta att asiatiska råa, frysta jätteräkor som importeras

utan mellanhänder (större kedjor som Ica och Coop har åtminstone viss egenkontroll) till kvartersbutiker runtom i landet har högst salmonellafrekvens.

Hur stora riskerna sedan är kan diskuteras: serotyper som är tydligt anpassade till fiskar figurerar ytterst sällan vid salmonelloser och har förmodligen låg virulens gentemot människan. Ett undantag finns i serotyp Weltevreden som i flera asiatiska länder är mycket vanligt förekommande i fisk och skaldjur samtidigt som den där är en mycket vanlig orsak till salmonellos. Oavsett om Weltevreden i dessa fall härrör från fisken eller från (de mänskliga) fiskarna bör resenärer till Thailand och Malaysia uppmärksamma att det inte bara är gris och kyckling utan också fisk som kan ge salmonellos.

I västvärlden finns en del utbrott av salmonellos som kopplats till fisk, men det rör sig då som regel om fekal kontamination från människor eller, som i fallet med de svenska Livingstone-gratängerna (se nedan i avsnittet om serotyperna), om en smitta som härrör från andra ingredienser.

De fiskprodukter som är mest känsliga för fekal smitta är givetvis de som äts råa. I västvärlden har det ju länge begränsats till ostron som kan innehålla salmonella som ostronen själva har anrikat genom att filtrera förorenat vatten. Med sushi-boomen är det väl snarare den produktkategorin som utgör risken idag och då framför allt de färdigförpackade sushi-paket som exporteras kors och tvärs över Europa.

Mejeriprodukter

Mjölk kan innehålla betydande mängder salmonella av serotyper som finns hos djuret. Opastöriserad mjölk är därför en ganska vanlig orsak till salmonellos medan pastörisering dödar salmonellan. Av mejeriprodukterna är det framför allt opastöriserade dessertostar som ställer till med bekymmer. En anledning är att fettet i osten tycks skydda salmonella genom magsyran så att den infektionsdos som krävs för sjukdom blir lägre.

Bland de kända opastöriserade dessertostar som orsakat utbrott av salmonellos finns naturligtvis både färskostar och mjuka, korttidslagrade ostar som *Brie* och *Camembert*, men även halvhårda ostar som *Cantal* och *Morbier*. Den allra vanligaste orsaken till salmonellos är dock getostar. Många getostar äts färska eller lagras mycket kort tid. Det förmodligen största utbrottet i Europa i modern tid skedde 1993 då flera tusen fransmän smittades av serotyp

Paratyphi. Det orsakades av en storproducent av getost och utbrottet pågick under 3 månader innan myndigheterna fick kännedom om det. Officiellt (laboratoriekonfirmerade fall) insjuknade 273 personer, men enligt franska experter var detta bara en liten topp av isberget.

Många välkända franska, schweiziska eller italienska långtidslagrade ostar som exempelvis *Comté*, *Gruyere*, *Emmenthaler* och *Parmeggiano reggiano* är visserligen också opastöriserade men salmonellan dör under lagringen och risken med sådana ostar är därför närmast obefintlig.

Sverige varnar för den lilla Pyreneiska fästmön

I juli 2005 uppmärksammade Sverige omvärlden om att sex svenskar insjuknat i salmonellos efter att ha ätit fransk opastöriserade getost, *Le Petit Fiancé des Pyrénées*. Både patienter och en bit kvarlämnad ost innehöll den extremt ovanliga serotypen Stourbridge och de svenska myndigheterna ställde helt enkelt frågan om övriga Europa noterat förekomster av den här serotypen.

Det hade man. Tre schweizare hade skickats till sjukhus på grund av Stourbridge, och även schweizarna hade hittat bakterien i en fransk getost, den här gången med namnet *Le Cabri Ariégeois*. Dessutom hade 18 fransmän och ytterligare 15 européer från Tyskland, Österrike, England och Belgien insjuknat.

Franska myndigheter började kontrollera uppgifterna och fann att båda ostarna, som var konsumentförpackade, tillverkades av samma producent, *Fromagerie du Col des Fach*. Denna producent hade dessutom en större, mera lagrad getost kallad *Le Cabrioulet* som också visades innehålla Stoutbridge. Med tanke på att producenten bara hade 260 getter så var han onekligen en aktiv exportör.

Vegetabilier

Grönsaker är en underskattad orsak till salmonellos. Och bland grönsakerna innebär groddar en alldeles speciell risk. Det finns massor med utbrott beskrivna som orsakats av groddar. Bakterier av olika slag finns redan i fröna, normalt tusentals per gram, och under groningen är vattenhalt och temperatur så hög att bakterierna snabbt växer till mycket höga halter. Undersökningar har visat att det finns tillräcklig näring i groddarna för att bakteriehalten ska

överstiga en miljard per gram, fast i det läget är groddarna förstås oätliga. Men upp till 10 miljoner bakterier per gram kan groddarna innehålla utan någon kvalitetsförsämring. Lyckligtvis är det för det mesta fråga om fullständigt ofarliga bakterier, men finns salmonella i fröna så kommer även de att växa till. Som framgår i avsnittet om virulensfaktorer så bildar salmonella speciella fimbrier för att kunna fästa in till vegetabilier.

I USA har den ansvariga myndigheten FDA sedan femton år rekommenderat odlarna att behandla fröna med hypoklorit för att avdöda patogener. Det är dock långtifrån alla odlare som vill använda kemi för att minska patogenrisken. Det krävs dessutom rejält med klor: en 10 minuters behandling med 20 000 ppm aktivt klor behövs för att metoden ska vara riktigt effektiv, och förmodligen är det få groddätare som accepterar en så drastisk kemisk behandling som antagligen lämnar spår efter sig i form av giftiga klororganiska nedbrytningsprodukter. De riskgrupper som är särskilt utsatta för salmonella – eller för den delen EHEC (=STEC) som också orsakat många groddburna utbrott – alltså barn, åldringar och immunsvaga individer bör helt enkelt inte konsumera groddar.

Andra tydliga riskfaktorer är färdigpackade sallatsblandningar och då särskilt färdigrivna varianter där salmonellan har störst möjlighet att hitta näring. Men även tomater, frukter, meloner, kryddväxter och till och med nötter är ganska vanliga orsaker till utbrott av salmonellos. Vegetabilierna kontamineras av: vilda djur och maskar, avföring från tamdjur, smittat vatten eller människor. Även om trots allt förhållandevis få vegetabilier är infekterade med salmonella, så är problemet att de äts råa. I dagens storproduktion kan till exempel sallat från en och samma tillverkare säljas i mycket stora volymer och över hela kontinenter. Däri ligger grunden för stora utbrott av vegetabilier.

Svensk importkontroll har speciellt uppmärksammat Thai-grönsaker: färska bönor, thaibasilika, okra, limeblad, minimajs, mynta och koriander är förhållandevis ofta (ca 5 %) kontaminerade med salmonella.

Ett onödigt långvarigt utbrott

I september 2001 fick det lokala referenslaboratoriet i Hamburg in en salmonellastam från ett privat laboratorium med önskemål om serotypning. Provet var anonymt frånsett en notering om att stammen isolerats från ”konfekt”. Stammen typades till Oranienburg, en i Tyskland ovanlig serotyp

som orsakar ett fall av salmonellos i veckan. En månad senare noterade samma laboratorium i Hamburg en betydande ökning i antalet Oranienburg-isolat från sjukhuspatienter i Nordtyskland. Någon liknande trend sågs inte i övriga Tyskland och det nationella smittskyddet kopplades inte in förrän ytterligare en månad senare. Först då fick patienterna fylla i ett frågeformulär om vilka livsmedel de ätit veckan före insjuknandet. Isolaten DNA-testades och Smittskyddsinstitutet efterlyste via massmedia den konfektyrindustri som lämnat in provet i september.

Först i början av december stod mönstret klart. Samtliga undersökta patienter uppvisade samma PFGE-typ av Oranienburg och konfektyrisolatet var identiskt med patienternas. En epidemiologisk koppling till choklad inköpt på lågpriskedjan *Aldi* stod nu också klar. Samtidigt hade, långt om länge, det stora chokladföretaget *Storck* trätt fram och medgivit att det var de som skickat in salmonellaprovet tre månader tidigare. *Storck* legotillverkade choklad åt *Aldi*, men var mera bekant för ett antal chokladprodukter som exporterades över hela världen. Företaget menade att det parti av choklad som salmonellan hittats i var avsett för export för USA och att hela partiet hade förstörts när salmonellan hittats vid egenkontrollen.

En intensiv jakt på chokladprover över hela Tyskland tog nu sin början. Samtidigt upplystes övriga världen om ett Oranienutbrott orsakat av tysk choklad. Danmark, där *Aldi*-kedjan också finns, svarade omedelbart att 12 danskar under samma period insjuknat och att man redan misstänkte ett samband mellan *Aldis* choklad och utbrottet. Ytterligare ett tiotal länder rapporterade utbrott. Bland dessa fanns flera länder där Aldi-kedjan inte förekom, exempelvis Sverige som rapporterade 18 insjuknade.

Först i mars 2002 upphörde utbrottet och då hade ungefär 500 laboratoriekonfirmerade fall inträffat. Ungefär en tredjedel av dessa krävde sjukhusvård, flertalet hade då insjuknat med blodiga diarréer. Det verkliga antalet insjuknade kan man bara spekulera i, det måste ha rört sig om många tusen. Hälften av de fall som upptäcktes var barn under 10 års ålder vilket inte är särskilt förvånande då orsaken var mjölkchoklad. För man hittade Oranienburg i två typer av *Storcks* produkter: dels de som legotillverkats för *Aldi*, dels de som såldes under det egna varumärket *Merci*. Halterna var genomgående låga, 1-3 bakterier per gram, men eftersom salmonellabakterier i choklad ligger inbäddade i kakaofett anses de skyddas mot magsyran.

Det var egentligen bara under en vecka i augusti som den infekterade chokladen tillverkades men eftersom producenten tillverkade mycket stora volymer och hållbarheten på choklad är lång blev utbrottet långvarigt. Onödigt långvarigt kan man tycka, chokladen borde dragits in långt tidigare än vad som nu blev fallet.

Att choklad orsakar utbrott av salmonellos är ovanligt men händer ändå då och då. Smittan är svår att härleda, men i fallet mjölkchoklad kan det vara ingredienser som kakao eller torrmjölk alternativt en husflora. Man kan tycka att salmonella inte borde överleva i choklad, som vid tillverkningen upphettas till 90°C. Men eftersom vattenaktiviteten i chokladen är mycket låg blir det närmast en fråga om ”torrpastörisering” och under sådana förhållanden överlever ofta såväl salmonella som andra bakterier.

Vatten

Salmonella är så vanligt förekommande hos såväl boskap som vilda djur att ytvattentäkter i många länder (dock inte Sverige) är mer eller mindre kraftigt kontaminerade. Genom att dricksvatten snabbt passerar genom magen utan att sätta igång produktionen av magsyra blir infektionsdosen mycket lägre: utbrott har konstaterats där salmonellahalten varit något tiotal bakterier per mL. Det kan tilläggas att klorering effektivt dödar salmonella, så klorerat dricksvatten är ofarligt. I länder med dålig dricksvattenförsörjning ska man som resenär också undvika istärningar i drinkarna.

Att kontaminera dricksvatten med *S*. Typhi var ett av världens första ”vetenskapliga” biologiska terrorvapen. Det skedde 1939 då den förfärliga japanska ”dödsfabriken” *Enhet 731* kontaminerade kinesiska vattentäkter.

37 serotyper

Det finns 2600 kända serotyper. Men 90 % av alla salmonelloser i Europa – 80 % i USA – orsakas av så få som 15 serotyper. Vilka serotyper som finns på Topp 15-listan varierar från kontinent till kontinent, från land till land och till viss del också från år till år. Nedan listas 36 av de mest kända serotyperna och deras betydelse. De amerikanska uppgifterna, årligen sammanställda av Centers for Disease Control and Prevention (CDC), baseras på över en halv miljon isolat från människor från 1992 och framåt. De europeiska uppgifterna är bearbetade från flera källor: dels nationell statistik från 1990-talet, dels från WHO:s

rapporteringar från år 2000 och framåt. Totalt omfattar det europeiska materialet uppåt en miljon isolat från människor, huvudsakligen från EU.

1. Abortusovis är värdspecialiserad till får hos vilka den, som namnet anger, orsakar abortering. Om Abortusovis introduceras i en besättning riskerar 60-80 % av fostren att aborteras vilket naturligtvis medför svåra ekonomiska konsekvenser. På längre sikt begränsas aborteringarna huvudsakligen till ungdjur eftersom de flesta äldre djur utvecklar immunitet. Smittan kvarstår dock i besättningen. Till skillnad från andra salmonellatyper som sprids via foder eller omgivning, sprids Abortusovis alltid genom direktsmitta mellan fåren. Det förklarar också att sjukdomen kan vara mycket vanlig i en region och helt saknas i andra. Abortusovis är en i huvudsak europeisk serotyp men i norr och väster har man sedan många år i stort sett lyckats radera ut sjukdomen från besättningarna.

Helt säker kan man visserligen inte vara från uppblossande epidemier, bland annat hade Schweiz så sent som 2005 ett ekonomiskt kännbart utbrott och smittan fanns kvar 2010 hos nära 2 % av fåren. Men i övrigt är är Abortusovis huvudsakligen begränsad till Medelhavsländerna (där Sardinien är särskilt utsatt) och Östeuropa. Utanför Europa är Abortusovis egentligen bara vanlig i Mellanöstern där den kopplas till nomadiserande kulturer. Abortusovis kan undantagsvis isoleras från getter och kaniner men dessa saknar betydelse för sjukdomsspridningen. Abortusovis är harmlös för människan men skulle, om den mot förmodan påträffades i Sverige, ändå falla under smittskyddslagarna.

2. Agona rankas hittills under 2000-talet som nr 8 i Europa och nr 13 i USA som orsak till salmonellos. Trenderna på dessa båda kontinenter har faktiskt varit motsatta, i Europa har Agona blivit allt vanligare medan den i USA tappat flera placeringar sedan 1990-talet då den nästan alltid låg på Topp 10-listan. Allra vanligast tycks Agona vara i Mexiko där den står för över 20 % av salmonelloserna och delar förstaplatsen med Typhimurium.

Agona brukar framför allt associeras med kött från gris och fjäderfä och den omfattande europeiska spridningen av Agona till kyckling och grisar på 1970-talet tillskrevs infekterat peruanskt fiskmjöl som importerades i stora kvantiteter som djurfoder. Riktigt så enkelt var det dock inte, Agona har ett brett värdspektrum som omfattar alla köttdjur och kan därför även finnas i till

exempel nöt- och fårkött. Större utbrott har mycket riktigt också orsakats av såväl fågel- som gris-, get- och nötkött. Det hittills största utbrottet orsakat av kött inträffade 1990 då nästan 1000 amerikaner insjuknade av kalkonkött. Agona har också i stor omfattning isolerats från vilda sjöfåglar samt fisk och skaldjur.

I Sverige inträffade 2003 ett utbrott av Agona som omfattade 17 personer. Importerat kebabkött var huvudmisstänkt men kunde inte med säkerhet knytas till utbrottet. I Danmark har Agona under senare år ökat så pass i omfattning att danskarna till sist fann sig tvingade att undersöka saken: det mesta talade för att det var danskt griskött som stod för de sporadiska fallen medan fransk kalkon stått för utbrottsliknande situationer. Svensk salmonellakontroll har funnit Agona i griskött som importerats till Sverige samt i animaliskt foder.

Dawn Farm Foods på Irland, en stor tillverkare av färdig mat och baguettfyllningar, orsakade 2008 ett Agona-utbrott med uppåt 200 konfirmerade fall i sju europeiska länder. Det var bland annat strimlat nötkött som användes i baguetter av den stora kedjan *Subway*, som orsakade utbrottet. Köttet fanns även i den svenska grenen av företaget och minst två svenskar smittades.

Genom att Agona förekommer i så många djurarter finns också stor risk för att vegetariska livsmedel kontamineras. Och mycket riktigt härrör två av de större utbrotten från vegetariska produkter. Rostade havreflingor infekterade 1998 över 200 personer i flera delstater i USA. Det allra största Agona-utbrottet skedde 1995 då ett israeliskt koshergodis med överdrag av jordnötssmör orsakade över 4000 fall av salmonellos hos barn i hemlandet och ytterligare fall då godiset exporterades till Storbritannien och USA. Under 2003 inträffade ett utbrott i Tyskland som drabbade minst 36 spädbarn. Utbrottet var diffust och orsaken kunde spåras först efter en mycket omfattande epidemiologisk studie. De visade sig, något oväntat, vara ett turkiskt örtté innehållande fänkål, kummin och anis som spridit smittan bland barnen.

Agona är påfallande ofta laktospositiv och sådana stammar ger därför avvikande kolonier på många salmonellamedier.

3. Anatum ligger både i amerikansk och i europeisk statistik runt 20:e plats som orsak till salmonellos. Anatum har liksom Agona ett brett värdspektrum och kan därför förekomma i så gott som alla köttprodukter. I väst associeras

serotypen ofta med griskött, men även i det grisfria Tunisien är Anatum en vanlig serotyp: den svarade där för 40 % av alla salmonellaisolat som hittades i en restaurangundersökning. I Sverige kunde vi notera ett utbrott 2003 då ett tiotal personer på en personalmatsal insjuknade, sannolikt som en följd av att ha ätit ett dåligt genomstekt ”kryddigt färsspett”. Köttet var importerat från Tyskland. Men det behöver inte vara kött som är orsaken. Anatum räknas som en ganska vanlig serotyp i fisk och skaldjur som importeras till USA. Och i USA har Anatum-utbrott som berott på opastöriserad apelsinjuice, salsasås, potatissallad och groddar förekommit. Det mest uppmärksammade utbrottet inträffade i England, Frankrike och Belgien 1997 då ett tjugotal spädbarn fick salmonellos av *Milupas* mjölkersättning som såldes över stora delar av Europa (dock inte i Sverige).

4. Blockley är en undanglidande serotyp. I de flesta länder är den mycket ovanlig, i några få är den ständigt närvarande på Topp 10-listan. Vissa år förekommer den i Europa i samband med utbrott som nästan aldrig får någon förklaring. Och som sig bör finns det två livsmedel som är mest misstänkta: fågel eller fisk…

I Västeuropa är Blockley ovanlig, de fall som rapporteras är som regel importerade, oftast av Asienresenärer, men en viss övervikt kan man också se för resande till Ungern och – åtminstone för britter – till Cypern. Just Ungern verkar ha sin alldeles egna endemiska smitta av bakterien, Blockley är där år efter år den fjärde vanligaste orsaken till salmonellos. Någon tillfredsställande förklaring finns egentligen inte. Ungern är i livsmedelssammanhang känt för sin salami och gåslever, men inget tyder på att någon dessa specialiteter skulle vara smittspridaren. Troligen är det hönsfåglar som bär skulden, serotypen förekommer i kyckling, kalkoner och gäss. Under 2005 stoppade för övrigt Finland en import av ungerskt kalkonkött just på grund av smitta med Blockley.

Utanför Ungern är det framför allt i en del asiatiska länder som Thailand, Malaysia och Japan som Blockley isoleras från livsmedel, och då alldeles särskilt från kyckling. Ett speciellt bekymmer med Blockley, och då inte minst med de asiatiska stammarna, är att serotypen ofta är multiresistent mot antibiotika. Utöver fågelkött finns faktiskt också en del som tyder på att bakterien ibland förekommer i fisk och skaldjur.

Trots att det europeiska övervakningssystemet för salmonella flera gånger under senare år observerat tydliga utbrott av Blockley så har sällan någon smittkälla kunnat bindas till utbrotten. Ett notabelt undantag inträffade faktiskt i Sverige 1999 där minst ett tjugotal personer över hela landet smittades av Blockley efter att ha ätit alfalfagroddar. Vidare hade Tyskland ett utbrott med något dussintal insjuknade där man på goda grunder misstänkte rökt italiensk ål. Någon Blockley i ålen kunde dock inte påträffas.

5. Bovismorbificans rankas i Europa runt 10-15:e plats bland orsakerna till salmonellos medan den är mycket ovanlig i USA, det enda kända utbrottet där på senare tid orsakades av hemtillverkad ost. Trots att namnet indikerar en koppling till nötboskap så associeras Bovismorbificans faktiskt oftast med groddar på vilka den tycks kunna föröka sig ovanligt bra. Det finns flera utbrott beskrivna från hela världen orsakade av just groddar. I Sverige och Finland hade vi på mitten av nittiotalet ett utbrott som omfattade 500 personer som hade ätit alfalfagroddar av frön som importerats från Australien. Och ett trettiotal finländare drabbades 2009 av Bovismorbificans efter att ha ätit alfalfagroddar producerade i Finland med frön som importerats från Italien.

I Australien inträffade ett större utbrott som orsakades av centralt hackad isbergssallat som ingrediens i färdigförpackad blandsallat. Skärbladen till en hackmaskin hade infekterats men hur Bovismorbificans kom in i produktionen lyckades man aldrig klarlägga.

Svårigheten med att spåra Bovismorbificans är för övrigt ett återkommande tema. Danmark hade ett betydande utbrott 2001-2002 med flera hundra fall men även om man hittade serotypen i en svinbesättning lyckades man aldrig spåra smittkällan. Vid samma tid smittades i Sverige åtta personer efter ett kafébesök. Inte heller här kunde någon smittkälla identifieras. I Tyskland inträffade ett större utbrott 2005 men Bovismorbificans kunde inte påträffas i någon mat, däremot fanns ett tydligt epidemiologiskt samband med konsumtion av fläskfärs.

6. Braenderup är den 15:e vanligaste orsaken till salmonellos i Europa, i USA den 12:e. Trots sitt danskklingande namn är den däremot ovanlig som salmonellosorsak i Norden. Det närmaste vi i Sverige kommit Braenderup är att den hittats hos vilda fåglar, importerade reptiler samt som enstaka fynd i importerat foder av animaliskt ursprung. Och trots att serotypen internationellt är så pass vanlig är smittkällorna inte helt klarlagda. Kyckling, nötkött, ägg och

sallat är de livsmedel som vid mer än ett tillfälle orsakat utbrott och det antas allmänt att Braenderup, i likhet med praktiskt taget alla andra salmonellor, sprids från kött men detta är faktiskt mycket svårt att leda i bevis. Man har för all del observerat att Braenderup i Etiopien är den vanligaste serotypen i kyckling och den näst vanligaste i kamelkött, men det räcker kanske inte som förklaring till varför européer drabbas av den. Enstaka isolat från den industrialiserade västerländska köttproduktionen är kända, men annars lyser Braenderup faktiskt mest med sin frånvaro när forskarna letar salmonella bland köttdjuren i Europa och USA.

Annat är det med andra djur: Braenderup har frekvent hittats i flugor, kackerlackor och falkar (som kan antas få den från sina bytesdjur bland gnagarna). På den mänskliga sidan visar uppgifter från både Italien och Japan att serotypen hör till Topp 10-listan när personer som arbetar i livsmedelshanteringen undersökts. I livsmedel har Braenderup bland annat hittats i färdigförpackade mixade grönsallater, i ruccolasallat och i klassiska fermenterade Thaiprodukter från fisk och krabba, i samtliga fall livsmedel som man kan förvänta sig kontaminerats av människor.

Större utbrott av Braenderup är ovanliga: på nittiotalet insjuknade över 200 schweizare efter att ha ätit köttpajer som var massivt kontaminerade (mer än en miljon bakterier per gram) med Braenderup. I det fallet konstaterades halva arbetsstyrkan som tillverkat pajerna ha utsöndrat bakterien, så köttet var sannolikt inte smittkällan. År 2003 spred spansk isbergssallat Braenderup bland annat till Storbritannien och minst ett femtiotal människor insjuknade. I flera amerikanska delstater insjuknade 2004 över hundra människor efter att ha ätit tomater som skivats i Florida, även här rörde det sig uppenbart om en kontamination. Det amerikanska fallet är förmodligen det största utbrottet eftersom man menar att endast en bråkdel av de drabbade upptäcktes. Och ett par hundra japaner insjuknade 2009 efter att ha ätit färdigrätter där råa ägg förmodligen spred Braenderup.

7. Brandenburg har varit en vanlig orsak till salmonellos i Europa men dess betydelse har minskat och 2004 försvann den från Topp 20-listan. Vanligast verkar Brandenburg av någon anledning vara i Belgien där den länge rankades som trea och där den fortfarande finns på Topp 10-listan. I USA är serotypen ovanlig. Serotypen är lite gåtfull eftersom den i olika delar av världen associeras med olika livsmedel. De få utbrott som registrerats i USA har gällt sesamfröprodukter medan européerna kopplat Brandenburg till griskött. På

Nya Zeelands Sydö har Brandenburg från en anonym tillvaro skenat upp till den näst viktigaste orsaken till salmonellos under 2000-talet. Orsaken tros vara infekterat fårkött och nyzeeländarna exporterar ju också massor av fårkött, inte minst till Europa. Anledningen tros vara att en speciell klon etablerats bland fåren och denna klon utgör dessutom en allvarlig risk för djuren: utbrott med många döda djur och aborteringar har beskrivits i allt ökande takt.

8. Bredeney pendlar i mellan en 10:e och en 20:e plats i Europa som orsak till salmonellos. Vissa år inträffar något som gör att de kliniska fynden av Bredeney kraftigt ökar i en region, synbarligen utan att något specifikt utbrott ligger bakom. Detta hände bland annat 1988-2000 på Irland då Bredeney från en undangömd position klättrade till den tredje viktigaste orsaken till salmonellos. Liknande oförklarliga toppar i statistiken har rapporterats från andra europeiska länder. I USA är däremot Bredeney mycket ovanlig.

Egentligen borde serotypen vara vanligare än den är i salmonellos-statistiken eftersom den inte sällan hör till Topp 3-listan när det gäller fynd av bakterien i gris- och fågelkött runtom i världen, bland annat i Danmark. Diffusa och svårutredda utbrott ligger nog ofta bakom topparna, så var fallet i till exempel Australien på 1970-talet då en sjumånaders period med hög frekvens Bredeney bland spädbarn till sist kunde spåras till flera mejerier vars mjölk användes för bröstmjölksersättning. Det finns ganska gott om mera tydliga utbrott av Bredeney, de flesta orsakade av kyckling eller griskött, i något fall även av rostbiff.

De två största utbrotten, som båda omfattade närmare 200 personer, skedde i slutet av nittiotalet i USA respektive Australien. I det amerikanska fallet drabbades gästerna i ett litet samhälle efter att ha ätit griskött på en lokal restaurang (vilket var en poäng i sig eftersom hela samhället livnärde sig på kycklinguppfödning). I Australien var det en serie till synes orelaterade fall och här misstänktes på epidemiologiska grunder kycklingkött. I Sverige kan vi efter den numera obefintliga salmonellakontrollen förvänta oss Bredeney-salmonelloser i större utsträckning: de stickprov på importerat kött som tagits på senare år i forskningsprojekt har visat på förekomst av Bredeney i griskött, kyckling och anka. År 2000 drabbades ett tiotal svenskar av Bredeney-salmonellos efter ett restaurangbesök i Kalmar. Ugnsstekt fläskkarré importerad från Danmark misstänktes vara smittkällan. Bredeney är en serotyp som påfallande ofta är multiresistent mot antibiotika.

9. Choleraesuis var den första salmonella som isolerades, den hittades hos svin redan 1885 och som namnet anger trodde man då att den var orsak till ”svinkolera” (svinpest) vilket dock inte alls har med salmonella att göra, det är en virussjukdom. Serotypen är tydligt anpassad till svin hos vilken den förekommer framför allt i Asien. I Europa och Nordamerika är däremot Choleraesuis mycket ovanlig bland svinen. I Europa och USA orsakar serotypen bara 10 respektive 30 laboratoriekonfirmerade fall av salmonellos årligen: det faktiska antalet är troligen 20-100 gånger högre, men det är ändå en försvinnande liten del av salmonelloserna. Asienresenärer löper betydligt större risk, i Thailand och på Taiwan hör Choleraesuis till de 10 vanligaste serotyperna och svarar för 2-3 % av salmonelloserna.

Choleraesuis är extremt invasiv och infektioner leder mycket ofta till blodförgiftning som kräver intensivvård. Antibiotikaresistenta stammar har börjat uppträda alltmer i Asien och 2002 hittades en stam i Taiwan som var resistent mot båda de typer av antibiotika som är förstaval vid behandlingen. Det enda egentliga utbrott av serotypen som rapporterats inträffade 2002 i Texas, det drabbade 33 personer som köpt potatismos med sig hem från en delikatessbutik. De fall som vanligtvis inträffar är sporadiska och associeras helt och hållet med konsumtion av griskött. Som tidigare noterats, använder en del forskare beteckningen Choleraesuis som artnamn (*S.choleraesuis*) i stället för *S. enterica* vilket, om inte annat, kan ställa till med besvär om man söker i databaser.

10. Cubana som isolerades första gången på Cuba 1945, är en ganska ovanlig serotyp både som orsak till salmonelloser och normalt också när det gäller fynd i köttdjur. Det som gör den intressant är att den påtagligt ofta hittas i foder och från fodret kan Cubana spridas och ge akuta, massiva förekomster i grisbesättningar och bland fjäderfän. Något större väldokumenterat utbrott hos människor finns inte men ett trettiotal amerikaner drabbades 1998 av salmonellos efter att ha ätit groddar som innehöll tre ovanliga serotyper av salmonella, däribland Cubana. Vid ett par andra utbrott i USA har Cubana konstaterats men någon säkerställd källa spårades aldrig. Att vi ändå tar med serotypen i sammanställningen beror på att den faktiskt har ett svenskt intresse: den närmast epidemiska spridning av salmonella som skedde hos 30 svinuppfödare i södra Sverige sommaren 2003 och som väckte stort mediaintresse berodde just på Cubana. Det var den största salmonellaspridningen i Sverige i modern tid men den visade samtidigt att

beredskapen inom landet är god: Cubana nådde aldrig konsumenterna. Svinbesättningarna smittades av kontaminerat foder och Cubana kunde vid undersökningen isoleras dels från ett femtiotal importerade vegetabiliska foder, dels från en svensk foderkvarn där Cubana hade förökats efter att ha kommit in med det importerade fodret. Biokemiskt är Cubana lite speciell eftersom det är en av mycket få serotyper som producerar ureas.

11. Derby rankas på 10:e plats i Europa som orsak till salmonelloser medan den i USA intar en mera undanskymd plats en bit bakom de 20 viktigaste serotyperna. Egentligen borde den vara ännu vanligare i Europa eftersom den i nästan alla europeiska länder hör till de tre mest förekommande serotyperna hos svin och fjäderfän. Epidemiologiska studier av stammar från kliniska fall och livsmedel indikerar, som väntat, att gris- och fågelkött utgör smittkällan vid salmonelloserna, men större utbrott är av någon anledning (möjligen krävs hög infektionsdos) ovanliga. I Spanien har Derby ökat under 2000-talet, något som antas ha orsakats av en specifik klon som spridits med griskött. I Sverige har Derby hittats ett fåtal gånger i importerat foder av animaliskt ursprung.

12. Dublin är inte minst en dansk angelägenhet. Dublin är ovanlig som orsak till salmonellos, inom EU ligger snittet på 1 sporadiskt fall per 10 miljoner invånare och år. Men i lilla Danmark redovisas 20-50 fall per år, alltså i storleksordningen 50 till 100 gånger högre än i övriga EU. Dublin är en av de sex serotyper som ofta är invasiv och därför kan orsaka svåra salmonelloser, inte sällan med blodförgiftning som följd. Dödsfall är inte ovanliga. Dublin är värdanpassad till nötkreatur hos vilka serotypen också kan ge dödliga infektioner. Globalt sett varierar förekomsten av Dublin bland nötkreaturen kraftigt, i många länder påträffas den nästan aldrig medan den i Danmark är den klart vanligaste serotypen både i besättningar och i nötkött (2 av 3 salmonellafynd i danskt nötkött är Dublin).

I de flesta länder betraktas opastöriserad mjölk som en viktigare smittkälla än nötkött, men i Danmark anses nötkött och nötlever som de helt dominerande smittkällorna. Dublin kan undantagsvis även förekomma i får-, fågel- och griskött. Ännu så länge har ingen hamburgerkedja drabbats av bakterien så de största utbrotten är kopplade till opastöriserad mjölk och dessertost gjord på opastöriserad mjölk. Även Sverige hade ett utbrott 1995 då en grupp gårdsbesökare bjöds på opastöriserad mjölk från en ko som bara några timmar senare dog av Dublin-infektion. Av de 18 som drack av mjölken drabbades 17

av salmonellos. Mer som kuriosa kan nämnas att man för några år sedan upptäckte ett par gråsälar i Sverige som var smittade med Dublin.

13. Enteritidis är den i särklass viktigaste serotypen i Europa där den står för 75-80 % av alla salmonellosfall. I USA, som har en betydligt mera spridd serotypsfördelning, svarar den för 15-20 % av salmonelloserna vilket ger den en andraplats strax efter Typhimurium. Enteritidis kan förekomma i alla typer av livsmedel men mest problematiskt i det globala perspektivet har spridningen från infekterade ägg varit. Det speciella med den här serotypen är att den kan infektera hönornas äggledare/äggstock. Det innebär att äggen blir salmonellasmittade inuti (för de flesta andra värphönsrelaterade serotyperna gäller att det enbart är utsidan av skalen som är smittade). Det är bara vissa fagtyper av Enteritidis som infekterar äggen och det var när dessa började spridas som den stora ökningen av Enteritidis-fallen började. I Europa skedde detta på åttiotalet, i USA nästan ett decennium senare. Många länder, däribland USA, har infört regler som åtminstone begränsat förekomsten av Enteritidis i ägg men ägg kommer under överskådlig framtid fortsätta vara den viktigaste enskilda smittkällan för Enteritidis. I Europa är det framför allt fagtyp 4 (PT 4) som infekterar äggen, i USA är även PT 8 viktig. I Sverige, som inte har några inhemska problem med äggproduktionen, svarar Enteritidis precis som i USA för 15-20 % av fallen, medan Typhimurium står för ungefär en tredjedel.

Globalt finns tusentals stora utbrott beskrivna. Det allra största, som av amerikanska epidemiologer beräknats ha infekterat en kvarts miljon människor, spreds av glass tillverkad av opastöriserade ägg. Men i princip alla livsmedel som kött, fisk, mejeriprodukter, vatten, grönsaker, frukt och nötter har varit orsak till stora utbrott av Enteritidis. Vårt största inhemska Enteritidis-utbrott skedde 1977 då 3000 elever och deras lärare på ett trettital skolor insjuknade efter att ha ätit majonnäs på skolmatsbespisningen. Ett centralkök i Tensta lagade maten åt alla skolorna. Massor av svenskar insjuknade också vid en charterresa hem från Kanarieöarna då flygbolaget serverade Enteritidis i en chokladkaka med spansk äggkräm.

För en svensk, van vid att betrakta ägg som en ofarlig råvara, kan det annars vara svårt att ens begripa det internationella problemet: när den danska *Imerco*-koncernen (som numera inte längre finns på den svenska marknaden) för några år sedan översatte ett danskt tårtrecept till sitt svenska nyhetsblad stod det ordagrant: ”ta fyra hela ägg och pastörisera dem”. Hur många svenskar begrep att det Imerco menade var att äggen skulle sänkas ned några sekunder i

kokande vatten? (Metoden är effektiv mot salmonella på skalen men skyddar naturligtvis inte mot Enteritidis-stammar inuti äggen.)

Hundraprocentigt fria från serotypen är vi dock inte ens i Sverige vilket visade sig 1991 då en enda smittad värphönsbesättning gav upphov till åtminstone 10 småutbrott och många sporadiska fall av Enteriditidis-salmonellos. Och 2003 blev ett tiotal människor sjuka av en annan infekterad värphönsbesättning. Risken för svenskar att bli sjuka av inhemska produkter är dock mycket liten jämfört med risken med importerade ägg och kycklingar eftersom dessa mycket ofta är smittade med Enteritidis (utöver Sverige är det egentligen bara Norge och Finland som kan betraktas som ”säkra” i sammanhanget).

De flesta Enteritidis ger ganska beskedliga salmonelloser men det förefaller finnas några högvirulenta kloner som ger blodförgiftning, särskilt hos äldre personer. Något sätt att skilja ut dessa kloner på förhand finns dock inte.

14. Gallinarum kan, om man så vill, indelas i två biotyper och ibland skiljer man ut den andra biotypen under namnet Pullorum. Gallinarum och Pullorum är orsaken till ”hönstyfus”, en svår sjukdom hos framför allt kyckling och kalkoner. Sjukdomen har bekämpats i över 50 år och är numera ovanlig i industrialiserade länder men har ökat i betydelse i Sydamerika, Asien och Afrika. Serotypen anses i princip ofarlig för människa men enstaka infektioner hos människor med dåligt immunförsvar förekommer. I Sverige är sjukdomen i stort sett utrotad (en flock hos en ”hobbyuppfödare” smittades dock under 1990-talet).

15. Hadar isolerades första gången 1951 i Israel och var under många år den tredje vanligaste orsaken till salmonellos i Europa. Den verkar nu vara på tillbakagång och har sedan 2002 backat till en sjätteplats. I USA är nedgången ännu kraftigare, från en femteplats 1995 till nedåt en tjugondeplats under 2000-talet. Utbrott av Hadar-salmonellos är oftast orsakat av kött från kalkon och kyckling, men däremot inte av ägg. I Storbritannien tror man att Hadar kom in på 1970-talet genom import av smittat foder till en storuppfödare av kalkon. Utbrott orsakade av gris- och nötkött samt fisk, vaktelägg, kanin och grönsallat finns också rapporterade. Det största Hadar-utbrottet inträffade 2005 då över 2000 spanjorer insjuknade efter att ha ätit färdiggrillade kycklingar från en storproducent (se fallbeskrivningen *Den goa, goa, goa såsen*).

I Norden är det, på grund av vårt konsumtionsmönster, kyckling som är den helt dominerande smittkällan och i Sverige har flera större utbrott skett med dålig stekt kyckling. Det största ”inhemska” utbrottet (det räknas så i den officiella statistiken) inträffade 2002 då över 250 svenskar drabbades av Hadar-salmonellos efter att ha ätit ”kinesisk buffé” på en Polenfärja. Polsk kyckling infekterad med Hadar var boven i dramat. Året därpå smittades drygt 50 personer av importerad kyckling (eller noga räknat: ”köttberedning av kyckling”) och under 2004 stoppades ett parti med 3 ton importerad kyckling som var infekterad med Hadar men åtgärden kom först då 12 ton av partiet redan nått konsumenterna. I Danmark förekommer Hadar bara undantagsvis i kött från danska fjäderfän medan den toppar listan av serotyper i importerad kalkon och är den fjärde vanligaste i importerad kyckling. Hadar är inte ovanlig i foder för köttdjur på den europeiska kontinenten men det är trots det ovanligt att serotypen förekommer annat än hos fjäderfä. Hadar är ibland multipelresistent.

16. Heidelberg kan trots sitt namn nästan betraktas som en nordamerikansk serotyp: det är den näst vanligaste orsaken till salmonellos i Kanada och den fjärde vanligaste i USA medan den i Europa återfinns först runt tionde plats. Heidelberg är mycket vanlig i fjäderfä, särskilt då i Nordamerika men även i till exempel Danmark där den rankas som den vanligaste serotypen i kalkoner. Utbrott har huvudsakligen förknippats med ägg och det finns misstanke om att vissa kloner av Heidelberg i likhet med Enteritidis kan infektera hönornas äggledare och därför finnas inuti äggen. Utöver ägg är köttprodukter den vanligaste orsaken till Heidelberg-utbrott. Det största utbrottet orsakades dock av ost 1976 och enligt amerikanska epidemiologer infekterades 30 000 människor trots att halten Heidelberg uppgick till mindre än en bakterie per gram ost. I Sverige finns inga utbrott av Heidelberg rapporterade. Vissa kloner av Heidelberg betraktas som högvirulenta och dessa kan då ge blodförgiftning som följd.

17. Infantis är en mycket vanlig orsak till salmonellos både i Europa, där den intar en femte plats, och i USA där den rankas som tia. De allra flesta fall är sporadiska och riktigt stora utbrott är sällsynta. Infantis förekommer särskilt hos fjäderfä och då inte sällan hos ungdjuren. Men via smittat foder kan den överföras till andra köttdjur som nötboskap och gris och då bli svår att bli kvitt. Det hände i Finland 1995 då man fick in serotypen bland nötkreatur och inom loppet av några månader hade Infantis spritts till 250 gårdar. I just Finland inträffade ett betydande utbrott redan på åttiotalet då över 200 flyg- och

tågresenärer smittades av cateringmat som hade kontaminerats av en symptomfri kock som utsöndrade Infantis. Kökspersonal har även i flera andra utbrott varit smittkällan, medan ägg, alla typer av kött, opastöriserad mjölk och grönsaker varit orsaken till andra utbrott. Ett ovanligt utbrott i USA orsakades faktiskt av grisöron avsedda för hundar. Både hundarna och deras hussar och mattar blev sjuka, ägarna får man förmoda genom kontakten med hundarna och inget annat. Sverige har varit förskonat från större utbrott men Infantis har vid enstaka tillfällen hittats i svinbesättningar och serotypen är ganska vanlig i importerad kyckling.

18. Javiana är en amerikansk serotyp: den är den femte vanligaste orsaken till salmonellos i USA och ligger på Topp 10-listan även i Sydamerika medan den är nästan frånvarande i Europa. Javiana har orsakat flera utbrott från frukt och vegetabilier, särskilt i USA. Framför allt tomater, men även meloner och paprika har varit orsak till större utbrott. Tomaterna misstänks ha sköljts med kontaminerat vatten och halten salmonella på dem har genomgående varit låg. Det kan tolkas som att Javiana har låg infektionsdos, men en kanske rimligare förklaring är att tomaterna sålts över stora områden och att kanske hundratusentals människor ätit av dem och att ”endast” ett par hundra av de mest känsliga individerna insjuknat. Amerikansk mozzarellaost har också orsakat ett större utbrott. Serotypen har isolerats från grisar i en del länder, annars verkar Javiana framför allt hittas hos vildlevande djur av många olika slag samt hos hundar. I Sverige har Javiana hittats i importerat vegetabiliskt foder. Observera att Javiana inte är samma serotyp som ”Java” (se Paratyphi).

19. Livingstone är ovanlig som orsak till salmonelloser och det finns ganska få utbrott beskrivna. Att vi ändå tar med den beror på att det största kända utbrottet faktiskt inträffade i Sverige 2001. Då insjuknade 60 svenskar och norrmän efter att ha ätit fiskgratänger tillverkade i Sverige. Det var mestadels äldre människor som drabbades och tre av de smittade dog. Den kontaminerade ingrediensen var importerat äggpulver. Och det är just ägg och fjäderfä som Livingstone kopplas till, i flera länder är serotypen en av de vanligast förekommande bland kycklingar och värphöns. Även i grisbesättningar kan dock Livingstone ganska ofta hittas, förmodligen via smittat foder. Två år efter utbrottet hittades Livingstone i den svenska slaktkontrollen av kycklingar, men man lyckades då undvika spridning till konsumenterna.

20. Mbandaka ligger strax under Topp 20 i USA medan den är mera ovanlig som salmonellosorsak i Europa. Mbandaka påvisas ganska ofta i köttdjur. Allra vanligast är serotypen hos nötkreatur, men även fjäderfä (i Polen rankas Mbandaka som den näst vanligaste serotypen hos kycklingar) och i viss mån grisar kan vara smittade. Mbandaka förekommer dessutom hos vilda djur och insekter och isoleras ofta från sjöar och kustnära vatten. De flesta utbrott härrör från kött och ägg, men från USA finns ett fall där nästan hundra personer smittades av groddar och i Australien drabbades drygt 50 personer av infekterat jordnötssmör. I det fallet kom bakterierna från jordnötterna. Mbandaka påvisas ofta i foder importerat till Sverige men Sverige klarade sig från djursmitta fram 2002 då en grisbesättning smittades. Två år senare infekterades en skånsk mjölkkobesättning. Inte i något av fallen nådde Mbandaka konsumenterna. Mbandaka är fenotypiskt lite speciell genom att den fermenterar sukros, något som ger kolonierna en avvikande färg i vissa medier.

21. Montevideo är en vanlig orsak till salmonellos speciellt i USA där den år efter år ligger fast förankrad på en sjätteplats. I Europa ligger den runt femtonde plats. Montevideo är en extremt spridd serotyp som hittas i många vilda djur, framför allt reptiler, fåglar och insekter. Bland köttdjuren är det nötkreatur och fjäderfän som oftast innehåller Montevideo och från dessa djur kan bakterien sedan spridas till mjölk och ägg. Foder av animaliskt ursprung, inte sällan fiskmjöl, är en vanlig källa till smittspridning. Större utbrott har orsakats av bland annat tomater, grönsallat, röd- och svartpeppar, groddar, och sesampasta medan det i övrigt har varit nöt- och fågelkött samt ägg som stått för smittspridning. Ett ovanligt utbrott skedde i Tyskland 2010 då minst 15 personer insjuknade efter att ha ätit torkat mjöl av hampfrön (tydligen ett näringstillskott) importerat från Holland. I Sverige är Montevideo mindre vanlig, men en kycklingbesättning spärrades 2003 efter fynd av serotypen i avelsdjur som hade införts från ett annat EU-land (konsumenterna drabbades inte).

22. Muenchen är den sjunde vanligaste orsaken till salmonellos i USA medan den är tämligen ovanlig i Europa. De största utbrotten av Muenchen har orsakats av groddar, meloner samt opastöriserad apelsinjuice. I det senare fallet drabbades minst 400 i USA och Kanada och den förmodade smittkällan var smält is som, av någon obekant anledning, hade tillförts juicen. Ett minst sagt ovanligt utbrott inträffade i USA 1981 då nära 100 personer konstaterades sjuka

i Muenchen-salmonellos. Efter en noggrann studie hittade man ”livsmedlet”: marijuana som innehöll 10 miljoner Muenchen per gram! I övrigt är det griskött, kyckling och kalkon som varit aktuellt som smittkälla. Muenchen är vanlig bland svin i stora delar av världen. Som så många andra salmonellor har den också hittats hos reptiler och i en del fall också hos rovfåglar. I Sverige hade vi ett mindre utbrott 2001 då sex personer insjuknade efter en restaurangmåltid.

23. Newport är en mycket vanlig orsak till salmonellos. I USA ligger den på tredje plats, medan den i Europa stadigt har klättrat, från en tiondeplats på 1990-talet till en fjärdeplats några år in på 2000-talet. I USA rapporteras åtminstone ett tjog Newport-utbrott årligen och över hälften handlar om vegetabilier: bönor, kryddor, frukter, groddar, tomater och sallat. Ett av de större utbrotten orsakades av tomater och omfattade över 500 personer. Men även alla typer av kött samt fisk och ägg har förekommit och av dessa är det framför allt nötfärs som varit aktuellt. Något riktigt stort utbrott orsakat av någon hamburgerkedja har dock ännu inte inträffat. Newport-utbrott i Sverige är ovanliga, man stöter här hemma mest på bakterien i samband med salmonellakontroll av reptiler. Newport som sprids från kött är påtagligt ofta multipelresistent mot antibiotika.

24. Oranienburg är mycket ovanlig i Europa medan den däremot betraktas som den åttonde vanligaste orsaken till salmonellos i USA. Allra vanligast är Oranienburg i Japan där den intar en tredje plats. Att den är sällsynt i Europa hindrar dock inte att den orsakat en del större utbrott: det tyska chokladutbrottet 2001 (se fallbeskrivningen *Ett onödigt långvarigt utbrott*) som smittade minst 500 personer i Europa med salmonella orsakades av just Oranienburg. I Norge orsakade Oranienburg ett betydande utbrott på åttiotalet med över 100 laboratoriekonfirmerade fall. Smittan spreds med svartpeppar och norrmännen hade också ett udda fall 2002 då en container med 13 ton paraguyanskt nötkött konstaterades vara smittat med Oranienburg. Det var inte tänkt att partiet skulle ut på marknaden men tjuvar la beslag på 700 kg som förmodligen såldes vidare till mindre nogräknade restauranger. Om tjuvarna eller någon annan insjuknade är inte känt, något utbrott skedde tydligen inte.

Just nötkött är förmodligen en vanlig orsak till sporadiska fall eftersom nötkreatur i många länder är smittade med serotypen. Internationellt finns ganska många utbrott registrerade av Oranienburg och utöver de redan nämnda livsmedlen har ost, fisk, meloner, mango, kyckling och kalkoner spritt

serotypen. I Sverige, som drabbades av ett dussintal fall av den tyska chokladen, har vi också haft ett mindre utbrott som orsakades av kebab. För jämviktens skull kan vi tillägga att även falafel varit infekterade med serotypen i malmöitiska kebabvagnar. Japan har haft en del spektakulära utbrott, det största omfattade 1500 laboratoriekonfirmerade fall och spreds med torkad bläckfisk. En del stammar av Oranienburg är laktospositiva och ger därför avvikande kolonier i laktosmedier.

25. Panama är ganska ovanlig i Europa och USA men utgör en betydande del av salmonellosfallen på andra håll, särskilt i Chile och Thailand. I lilla Martinique är Panama till och med den vanligaste serotypen. I Chile har flera utbrott orsakats av getost medan man i Thailand inte kunnat knyta serotypen till något särskilt livsmedel. Panama isoleras framför allt från kyckling och gris. I Storbritannien anses att spridningen till svinbesättningar skedde på fyrtiotalet genom infekterat äggpulver som användes vid fodertillverkningen.

Utbrott i USA har orsakats av kyckling, lammkött och bönor medan utbrott i Spanien tillskrivits gräddtårta, fiskpudding och bläckfisk. I just Spanien har Panama för övrigt isolerats från vatten och bläckfisk. En del kloner är multiresistenta mot antibiotika och Panama-salmonelloser kan vara ganska otäcka med en ovanligt hög andel som sprids vidare till blodet, särskilt hos barn.

År 2008 smittades 33 holländare med Panama efter att ha druckit fruktjuice. Den klon som isolerades visade sig vara påtagligt resistent mot syra.

26. Paratyphi orsakar paratyfoidfeber, en invasiv sjukdom med lite mildare symptom än tyfoidfeber. Det finns fyra serotyper som orsakar paratyfoid, tre av dem har numera sammanförts under beteckningarna Paratyphi A (klassisk Paratyphi), Paratyphi B (tidigare ” Schottmuelleri”) och Paratyphi C (tidigare ”Hirschfeldii”). Den fjärde serotypen, den mycket ovanliga Sendai, har däremot inte överförts till Paratyphi trots att även denna orsakar paratyfoid.

När det gäller Paratyphi B finns det två biotyper, en tartratnegativ och en tartratpositiv. Distinktionen är viktig eftersom det enbart är de tartratnegativa stammarna som orsakar ”paratyfoid”. De tartratpositiva stammarna, som tidigare kallades ”Java” men som numera listas under beteckningen Paratyphi B var. tartrat+, orsakar en ganska mild salmonellos (enterit). De tartratpositiva stammarna har till skillnad från de övriga i gruppen heller inte människan som

värd: de finns hos fjäderfä och nötkreatur och sprids till människan via fågel- och nötkött.

I Sverige insjuknar årligen ca 20-30 personer i paratyfoid varav bara tre-fyra smittas i Sverige, resten utomlands och då nästan uteslutande vid resor utanför Europa. Normalt är samtliga fall sporadiska, ett undantag var 1999 då 80 svenskar smittades vid ett utbrott under en semesterresa till Turkiet. Ett annat undantag inträffade 2007 då 180 svenskar drabbades och senare också ett åttital personer från andra europeiska länder. Importerad babyspenat misstänktes vara källan.

Paratyphi B var. tartrat+, som ofta är multipelresistent mot antibiotika, ligger runt 15:e plats både i USA och i Europa som orsak till salmonellos. I Europa är det framför allt kyckling som sprider serotypen.

27. Poona är ganska vanlig i Sydamerika och har länge också legat på Topp 20-listan i USA som orsak till salmonellos. Den är dock på nedgång i USA och ramlade 2003 för första gången nedanför de 20 vanligaste serotyperna. I Europa är Poona ovanlig och i Sverige har vi inte haft något utbrott. I USA har Poona under en följd av år orsakat flera utbrott som spårats till mexikanska meloner, 1991 infekterades över 400 människor. Att meloner och även andra vegetabilier är orsak till utbrott kan möjligen bero på att Poona är vanligt förekommande i vissa jordlevande nematoder.

28. Reading är inte särskilt vanlig som orsak till utbrott, på senare tid har det noterats ett fall i Finland 2011 orsakat av isbergssallat. Anledningen till att vi har med serotypen är att den sedan 2007 fått fäste på flera gårdar i Skåne hos såväl nötkreatursbesättningar och hästar och att den varit svår att få bukt med.

29. Saintpaul är en ganska vanlig orsak till salmonelloser. I USA är den på uppgång sedan flera år och rankas nu som nr 7, i Europa ligger den vanligtvis runt 15:e plats. Allra vanligast är serotypen i en del sydamerikanska länder och i Venezuela toppar den faktiskt statistiken. Saintpaul förekommer mest hos fjäderfä och särskilt kalkoner anses orsaka många sporadiska fall. Utbrott har annars mest observerats med frukt och grönsaker som mango, paprika, groddar och apelsinjuice. Även kakor och barnmat har figurerat i utbrottsstatistiken. I Sverige hade vi ett utbrott över hela landet år 2002 som kopplades till groddar, nära 100 personer laboratoriekonfirmerades som smittade. Ett vattenburet utbrott i Australien ansågs ha spridits av möss eller

grodor. En del stammar, mest från kalkoner, är multipelresistenta mot antibiotika.

30. Schwarzengrund (*inte* "Schwartzengrund"!) är närmast en asiatisk serotyp. Den är mycket vanlig som orsak till salmonellos i bland annat Thailand. Där är den med rätta fruktad eftersom den ofta är högvirulent och medför en svår infektion. Den är dessutom inte sällan multipelresistent mot antibiotika. I USA och Europa är Schwarzengrund ovanlig. Smitta sker vanligtvis från kött av fjäderfä.

31. Senftenberg är en ovanlig orsak till salmonelloser i USA och Europa men den har sitt speciella intresse eftersom den ofta används som referensorganism för salmonella vid bedömning av desinfektionsmedel eller värmebehandlingar. Serotypen anses ha en ovanligt god förmåga att motstå torrvärme vilket är aktuellt för feta och torra livsmedelsprodukter samt för kryddor och foder. Större utbrott har orsakats av bland annat mjölkchoklad, cerealier och kalkon.

Senftenberg är den näst vanligaste orsaken till salmonellos i Brasilien där serotypen kopplas till griskött. I andra delar av världen har Senftenberg hittats i fjäderfä, nötkreatur och ägg. I Spanien rankas den som den vanligaste serotypen i skaldjur och i en stor amerikansk undersökning på importerad fisk och skaldjur hamnade Senftenberg på andra plats efter Weltevreden. I Sverige är Senftenberg en vanlig serotyp i importerat vegetariskt foder medan norrmännen i stället hittar den i fiskfoder. I Norge påträffades serotypen i en grisbesättning 2003 och norrmännen har i sin importkontroll också påvisat den i curry och koriander.

32. Stanley – Finns det en Livingstone så finns det naturligtvis en Stanley. Stanley är en ganska vanlig orsak till salmonellos, i USA ligger den runt tjugonde plats medan den i Europa har klättrat från denna position på 1990-talet till en sjundeplats under 2000-talet. Groddar samt kyckling och kalkon har varit återkommande teman vid utbrott. Fast 2001 drabbades över 100 personer av serotypen efter att ha ätit kinesiska jordnötter som exporterades över nästan hela klotet. I Sverige hade vi ett smärre utbrott av Stanley-salmonellos då tio personer insjuknade efter att ha ätit lunchbuffé. Någon smittkälla hittades inte.

33. Thompson har fram till 2002 ständigt varit med på USA:s Topp 10 över salmonellosorsaker, men har sedan dess backat några platser. I Europa förekommer den endast sporadiskt på Topp 20 medan den är betydligt

vanligare i Japan där den rankas som nummer 3. Smittkällor är framför allt kyckling och kalkon, men även nötkött och grönsaker har flera gånger orsakat utbrott. I Sverige och Norge förekom ett utbrott hösten 2004 då minst 25 personer insjuknade efter att ha ätit färdigförpackad ruccolasallat från Italien.

34. Typhi är ovanlig i västvärlden men serotypen ligger ändå på 10:e plats i Europa och 15:e i USA som orsak till salmonellasjukdomar: anledningen är turistresor och att Typhi genom sin svåra karaktär mycket oftare upptäcks än övriga serotyper. Smittspridning sker från människa till människa, antingen direkt eller indirekt via ett livsmedel. Frånsett livsmedel som kontamineras av kökspersonal finns det tre typer av livsmedel som orsakat utbrott via kontaminering av avloppsvatten: dricksvatten, frukter och råa ostron. I Sverige smittas mellan 10 och 25 personer årligen, flertalet efter resor i Asien. De flesta är unga och ovaccinerade.

35. Typhimurium är efter Enteritidis den vanligaste orsaken salmonellos i hela Europa. I USA ligger den till och med före Enteritidis och svarar där för drygt 20 % av alla salmonelloser. I Sverige är den också den vanligaste och står för en tredjedel av alla fall. Som namnet indikerar orsakar den en tyfoidliknande, dödlig sjukdom hos möss. Typhimurium är vitt spridd bland köttdjuren: i stora delar av världen är serotypen den överlägset vanligaste hos svin, medan den intar andraplatsen efter Dublin hos nötkreatur och ofta är trea hos kyckling efter Enteritidis och Infantis.

Kött av olika slag samt mjölk och dessertostar gjorda av opastöriserad mjölk är den vanliga orsaken till stora utbrott av Typhimurium-salmonellos, men i princip alla livsmedel har varit involverade. I Sverige förekommer som regel flera utbrott av Typhimurium-salmonellos varje år. I ungefär hälften av fallen lyckas man hitta smittkällan som de senaste åren varit bland annat fläskkarré (se fallbeskrivningen *Dansk grisköttskebab*), rostbiff, korv, sesamdessert (helva) sesampasta (tahini) och importerat kryddgrönt.

Under 1990-talet skedde en närmast explosiv spridning av fagtyp DT 104 över Europa och USA. DT 104 är multiresistent mot antibiotika och den omfattande spridningen oroar åtskilliga experter. DT står för *Definitive (phage) Type* och omfattar egentligen flera likartade fagtyper (104, 104a, 104b, 104c och U302).

36. Virchow är inte minst en europeisk angelägenhet, serotypen har sakta men säkert klättrat upp till en tredjeplats på listan över orsaker till salmonellos.

Även i många asiatiska länder är Virchow vanlig medan den i USA däremot är mycket ovanlig.

Virchow är huvudsakligen associerad med kyckling. Utbrott orsakade av ägg, mjölk, nötkött, färsk vitlök och tomater finns dock också registrerade. Vissa kloner är påtagligt invasiva och kan medföra blodförgiftning. En del stammar är laktospositiva och ger därför ett atypiskt utseende på vissa salmonellamedier. I Sverige fick vi vårt första utbrott 2006 då minst 115 personer insjuknade efter att ha ätit mungbönor på en restaurang i Stockholm.

37. Weltevreden är en serotyp som framför allt asienresenärer kan stöta på. Serotypen är den vanligaste orsaken till salmonellos i Thailand och Malaysia medan den är mycket ovanlig i Europa och USA. Weltewreden är speciell på det sättet att det är fisk och skaldjur som orsakar de flesta utbrotten. I Sverige har serotypen inte påträffats i livsmedel, men i Danmark, Norge och Finland inträffade ett utbrott 2007 orsakat av alfalfagroddar.

VIRULENSFAKTORER

På senare tid har man börjat ana att salmonella har en otrolig mängd gener som är aktiva vid infektion. En del forskare menar att så mycket som en fjärdedel av genomet (över 1000 gener) aktiveras först när salmonella invaderar en cell. Särskilt många gener tycks engageras när serotyp Typhi etableras i makrofager. Generna för patogenitet hos salmonella är samlade i fem ”patogenitetsöar” på kromosomen, *Salmonella Pathogenicity Islands.* De betecknas SPI-1 till SPI-5. Vid salmonellos är huvudsakligen SPI-1 aktivt, vid tyfoid SPI-2.

1. Virulensfaktorer främst verksamma vid salmonellos

Vid en salmonellos är effekterna att makrofager omedelbart dödas; att epitelceller invaderas för att sedan dödas; och att infektionen snabbt begränsas, dels av neutrofiler, dels förmodligen också av bakterierna själva. Nästan alla viktiga virulensfaktorer injiceras från bakterien till värdcellen genom ett typ III sekretionssystem (T3SS). Flertalet virulensfaktorer finns samlade på kromosomen, de flesta i SPI-1.

Adhesionsfimbrier

Tunna utskott som aktivt binder in till receptorer hos värdcellen är vanliga hos Enterobacteriaceae. De har avgörande betydelse för bakteriernas förmåga att effektivt adhera till cellerna. Hos salmonella finns åtminstone fyra klasser: de bland enterobakterierna vanliga typ 1-fimbrierna som fäster in till mannosreceptorer; LP (*Long, Polar*)-fimbrier som verkar vara särskilt aktiva i Peyers plack; de så kallade *curli* som är tunna, aggregativa fimbrier som medför att salmonella autoaggregerar; samt de plasmidkodade fimbrier som troligen är mest intressanta för tyfoid-bakterier.

Dessa adhesionsfimbrier finns sedan i massor av närmast serotypsspecifika varianter. Ur livsmedelssynpunkt är det extra intressant att fimbrier även används för att fästa in till växtceller: i detta sammanhang behövs de för att salmonella ska kunna förökas på till exempel groddar. Tillväxt på groddar är en vanlig orsak till utbrott av salmonellos.

AvrA = Avirulensprotein A

Visst är det en motsägelse att ett avirulensprotein räknas till virulensfaktorerna men AvrA har sin tydliga nisch vid infektionen. Salmonella har system både för att aktivera och motverka den naturliga programmerade celldöden hos värdcellerna, allt för att underlätta bakteriernas överlevnad under olika förhållanden. AvrA accelererar celldöden hos epitelceller. Resultatet är gynnsamt för människan eftersom salmonellas spridning från cell till cell försvåras och sjukdomen därmed begränsas. Förmodligen är det i det långa loppet också gynnsamt för bakterierna som annars sannolikt skulle dödas av kroppens tyngre artilleri i ett mera utdraget infektionsförlopp. Nu kan bakterierna förökas någon tid i relativ obemärkthet för att under tiden ta den naturliga vägen ut. AvrA tillhör de proteiner som tidigt i infektionsförloppet injiceras i värdcellen (se T3SS).

Sip = *Salmonella invasion protein*

De kanske viktigaste virulensfaktorerna vid salmonellos utgörs av fyra invasiva proteiner, SipA-SipD. Såväl SipA som SipC fäster till och modifierar värdcellens ”cellskelett” som består av aktin. De typiska skador i cellmembranet, *ruffling*, som är följden av en salmonella-attack på epitelceller beror huvudsakligen på SipC som kraftigt modifierar aktinet för att bakterierna ska kunna upptas av värdcellen. SipA samverkar med SipC genom att stabilisera och förstärka aktinförändringarna. När bakterierna väl kommit inuti cellen återställs cellmembranet genom SptP (se nedan).

SipA är det enda av de invasiva proteinerna som tycks ha betydelse för den diarré som förknippas med salmonellos. Vid diarré agerar SipA tillsammans med proteinerna (toxinerna) i Sop-klassen. Hos serotyp Typhi och andra invasiva former verkar det tvärtom finnas någon mekanism som undertrycker aktiviteten hos SipA och tyfoid orsakar ju också sällan diarré hos vuxna individer.

Salmonella har en uttalad förmåga att döda makrofager och här är det SipB som är aktivt. Sedan länge har det varit känt att SipB kan aktivera makrofagernas kaspasaktivitet och därmed sätta igång en programmerad celldöd. SipB verkar dessutom ha en alternativ möjlighet för att döda makrofager: genom att förstöra deras mitokondrier. SipB dödar makrofager så effektivt att dess aktivitet måste begränsas av tyfoidbakterier, annars hinner dessa inte med att föröka sig inne i makrofagerna. SipB och Sip C har också visats kunna fungera som porbildande toxiner som bland annat hemolyserar röda blodkroppar.

Om SipD vet man inte mycket mer än att dess närvaro krävs för att övriga Sip ska kunna injiceras. Det har spekulerats i om det fungerar som en slags portvakt vid överföringen av proteiner i typ III sekretionssystem (T3SS). Samtliga Sip exporteras nämligen till värdcellen genom T3SS. Generna finns på kromosomen, i SPI-1. De invasiva salmonellaproteinerna har för övrigt en tydlig molekylärgenetisk likhet med shigellabakteriernas *invasion plasmid antigens* (Ipa) och man har därför valt analoga beteckningar så att SipA motsvarar IpaA, SipB motsvarar IpaB och så vidare.

Sop = *Salmonella outer protein*

Sop-klassen omfattar sex proteiner betecknade SopA, SopB, SopD, SopD2, SopE1 och SopE2. De fungerar i stor utsträckning som toxiner. Åtminstone fyra av dem (SopA, SopB, SopD och SopE2) anses ha en stor betydelse för invasionsprocessen i epitelceller vid salmonellos. De har också satts i samband med den diarré som uppträder vid salmonellos.

SopA attackerar värdcellens mitokondrier medan SopB, som har fosfatasaktivitet, satts i samband med blockering av programmerad celldöd. SopB verkar alltså delvis kunna motverka effekten av invasionsproteinet SipB, vilket antagligen är nödvändigt för att invasiva tyfoid-bakterier som hinna föröka sig inuti cellerna. Vid tyfoidliknande tillstånd verkar SopB dessutom

påverka cellens kväveoxidproduktion. Även SopD och SopD2 tycks ha betydelse vid tyfoidliknande sjukdomar även om det är oklart hur.

Generna för SopA-SopD finns på kromosomen (SopB i SPI-5) medan generna för SopE1 och SopE2 däremot kodas av bakteriofager. SopE1 finns bara hos en del av salmonellastammarna. Uppenbarligen är proteinet inte nödvändigt för virulensen men en undersökning gör gällande att SopE1 finns hos stammar som oftare än andra orsakar salmonellos och det skulle kunna betyda att SopE1 på något sätt förstärker virulensen.

SptP = *Salmonella protein tyrosine Phosphatase*

Även detta protein injiceras genom Typ III sekretionssystemet (T3SS). Dess viktigaste roll tycks vara att återställa cellskelettet hos värdcellen när bakterierna väl är inne. Därmed minskar risken för att epitelcellerna dör redan vid injektionen.

SSpH1 = *Salmonella secreted protein H1*

Detta protein tillhör de som injiceras genom T3SS men det är oklart vilken betydelse det har. Proteinet är analogt med IpaH hos shigella.

T3SS = Typ III sekretionssystem

T3SS finns hos många gramnegativa patogener och då inte enbart djurpatogener, även hos växtpatogener finns ofta ett typ III sekretionssystem. Hos salmonella finns till och med två, ett som används vid salmonellos och ett annat som aktiveras vid tyfoid.

T3SS vid salmonellos omfattar ett batteri med över 20 samverkande proteiner. I den första fasen bildas en injektionsnål som är 100 nanometer lång och 20-40 nanometer bred. Den har betydande likhet med bakteriernas flageller. Genom nålen injiceras åtminstone ett drygt dussin kända proteiner som är nödvändiga för infektionsförmågan: samtliga Sip och Sop, plus AvrA, SptP och SSpH1.

2. Virulensfaktorer främst verksamma vid tyfoid

Tyfoidliknande sjukdomar förekommer hos många djurarter. Hos människan orsakas de av serotyperna Typhi och Paratyphi, hos nötboskap av serotyp Dublin, hos svin av serotyp Choleraesuis, hos hönsfåglar av serotyp Gallinarum samt hos möss av serotyp Typhimurium. Serotyperna Dublin,

Choleraesuis och Typhimurium kan även infektera människan men ger då salmonellos, inte tyfoid. Serotyp Gallinarum är ofarlig för människan.

Vid tyfoidliknande sjukdomar är det makrofagerna som är huvudmålet. De dödas inte som vid salmonellos utan används för intracellulär förökning av tyfoidbakterierna. Salmonella förekommer då inuti fagocyterna i membraninneslutna hålrum (fagosomer) som brukar benämnas SCV (*salmonella containing vacuoles*). Efter tillväxten migrerar bakterierna ut i blodbanan och sedan vidare till inre organ, särskilt mjälte och lever där bakterierna kan fortsätta att förökas.

Precis som vid salmonellos injiceras tyfoidbakteriernas virulensfaktorer genom – i det här fallet vakuolmembranet – ett typ III sekretionssystem (T3SS) som är helt skilt från det T3SS som används vid salmonellos. Vid salmonellos är det i första hand proteiner som kodas av SPI-1 som injiceras, vid tyfoid är det i stället proteiner kodade av SPI-2.

Men även tyfoidbakterierna har tillgång till SPI-1-T3SS och inledningsvis kan även detta användas (till exempel när tyfoidbakterier invaderar epitelceller) men i det senare infektionsstadiet, när tyfoidbakterierna tillväxer intracellulärt, måste det däremot undertryckas. En rad proteiner som inverkar på makrofagernas signalsystem är kända, men deras verkan är mycket sämre kartlagd än vid salmonellos. Man har exempelvis ännu inte klart för sig hur salmonella överlever inuti makrofager: kan de ta sig ut ur fagosomerna och in i cytosolen (som *Listeria*), kan de avstyra fusionen mellan fagosomer och lysosomer (som *Mycobacterium*) eller undviker de eller är till och med resistenta mot surgörningen av fagosomerna? Ingen vet med säkerhet. Bland de proteiner som man vet används finns ett som också utsöndras vid salmonellos, SspH1, men dess effekt är oklar även vid tyfoid. Andra proteiner som tros ha en viktig roll är SseB, SseC, SseD och SpiC.

Serotyp Typhi bildar en slags kapsel utanför cellväggen som gör bakterierna resistenta mot neutrofiler. Kapseln används för serotypsbestämningen och kallas då Vi-antigen.

PÅVISNING

Selektiva medier

Salmonella har genom alla år påvisats med metoder som bygger på anrikning i en selektiv buljong för senare utstrykning till fasta selektiva medier. Generellt sett är medierna svagt selektiva och kräver därför ett ganska omfattande efterarbete. Ett stort antal medier har utvecklats under åren och de senaste 15 åren har utvecklingen resulterat i ett antal så kallade kromogena medier.

Isolering av salmonella från livsmedel

Varianter av Rappaport-medium har länge använts över hela världen för att påvisa salmonella i livsmedel. Metoden är inte lämplig för *S*. Typhi. Metoden används kvalitativt, alltså enbart för att *påvisa* salmonella i ett livsmedel, inte att bestämma antalet.

Metoden omfattar 3 isoleringssteg:
1. Peptonbuffert
2. Anrikning i Rappaport-Vassiliadis (RV)-buljong
3. Utstryk till Xylos Lysin Deoxykolat (XLD)-agar plus ett valfritt medium
Samtliga dessa medier finns kommersiellt tillhandhållna från många olika tillverkare av bakteriologiska medier. RV-buljongen kan hos olika tillverkare ha varierande koncentration av magnesiumklorid. XLD-agar innehåller i den svenska referenstekniken NaCl vilket inte alla tillverkare använder i sina färdigblandade medier.

Peptonbufferten med pH 7.0 används för att reaktivera salmonella som fortfarande lever men som kan ha blivit skadade genom till exempel en värmebehandling. I peptonbufferten får salmonella en chans att återhämta sig och att tillväxa utan att hämmas av selektiva ämnen. Peptonbufferten innehåller (gram per liter): pepton 10, NaCl 5.0, Na_2HPO_4 3.6 och KH_2PO_4 1.5. Livsmedelsprovet tillsätts vanligtvis i förhållandet 1:10 (25 gram prov till 225 ml peptonbuffert) och inkuberas aerobt 37°C 18 timmar.

I det andra steget sker anrikningen i den selektiva RV-buljongen som innehåller (gram per liter): sojapepton 5.0, NaCl 8.0, KH_2PO_4 1.4, K_2HPO_4 0.2. Till 1 liter av detta grundmedium tillsätts 100 mL magnesiumkloridlösning (400 gram $MgCl_2$ x 6 H_2O i 1 liter vatten) samt 10 mL malakitgrönlösning (0.4 gram malakitgrönt

till 1 liter vatten). Mediet är surt med ett pH på 5.2. Från peptonbufferten överförs ett prov på 0.1 mL till 10 mL RV-buljong i ett provrör som inkuberas aerobt 42°C i 24 timmar. RV-buljongen är en modifiering av Rappaports 50 år gamla substrat, har använts i över 20 år och fortsätter att hålla senare konstruerade medier stångna. Den selektiva effekten beror på tre faktorer, salmonellas:
1. förhållandevis goda förmåga att tillväxa vid lågt pH,
2. resistens mot malakitgrönt, och
3. resistens mot högt osmotiskt tryck.

I det tredje steget sker utstryk på XLD-agar som inkuberas aerobt 37°C 24 timmar. XLD har ett pH på 7.4 och innehåller (gram per liter): jästextrakt 3.0, NaCl 5.0, xylos 3.75, laktos 7.5, sackaros 7.5, L-lysin HCl 5.0, natriumtiosulfat 6.8, järn (III)-ammoniumcitrat 0.8, natriumdeoxykolat 1.0, fenolrött 0.08 och agar 15.0. Novobiocin (15 mg/L) kan eventuellt tillsättas för att undertrycka växt av grampositiva bakterier.

XLD är ett litet egenartat medium med sina tre sockerarter. Shigella är ett av mycket få släkten inom Ebterobacteriaceae som inte fermenterar något av dem och XLD konstruerades från början just med avseende att isolera shigella. Salmonella fermenterar i likhet med nästan alla medlemmar ur Enterobacteriaceae xylos, däremot inte sackaros eller laktos. Genom att hålla xyloshalten låg blir salmonellas syrabildning måttlig och den kommer att neutraliseras av den alkalibildning som sker då salmonella dekarboxylerar lysin. Följden blir att salmonellakolonierna blir röda medan nästan alla andra Enterobacteriaceae som växer på mediet bildar gula kolonier. Eftersom salmonella bildar svavelväte från tiosulfaten har kolonierna dessutom en svart kärna av utfälld järnsulfid.

Det finns trots allt en del salmonella som ger atypiska kolonier därför att de inte bildar svavelväte (ger röda kolonier utan svart kärna) eller fermenterar sackaros/laktos (ger gula kolonier som dessutom kan sakna svart kärna eftersom syrabildningen hämmar sulfidutfällningen). Därför rekommenderas att utstryk även sker till ett alternativt medium.

Bland traditionella och väl beprövade alternativ finns briljantgrönagar (BGA) som bygger på fermentation av sackaros/laktos och som finns i flera modifikationer (Kaufmann agar, Edel-Kampelmacher agar) beroende på vilka selektiva ämnen som ingår. Detta medium är speciellt lämpligt för

salmonellastammar som inte producerar svavelväte. För stammar som fermenterar laktos eller sackaros är MLCB (mannitol lysin kristallviolett briljantgrön-agar) att föredra eftersom detta medium inte innehåller sackaros/laktos utan istället bygger på svavelvätebildning. Salmonella fermenterar mannitol under syrabildning men denna sockeralkohol finns i så låg koncentration att lysindekarboxyleringen motverkar färgomslag.

I USA används ofta hektoenagar som förstaval vid isolering. Hektoenagar är dock inget alternativ till XLD eftersom båda medierna bygger på samma princip, skillnaden är bara att i hektoenagar är xylos utbytt mot salicin.

Bland nyare, kommersiellt tillhandahållna medier, finns bland annat XLT-4 som Oxoid saluför. Det är egentligen en variant av XLD som kompletterats med tensiden ”tergitol-4” (Na-tetradekylsulfat). XLT-4 anses vara ett mera selektivt alternativ men då mediet testades av amerikanska myndigheten FDA kunde man inte finna några uppenbara fördelar. Inte heller det av Neogen Corporation salufördа EF-18, som bygger på samma princip som XLD men har en annorlunda sammansättning, rönte någon större uppskattning hos FDA.

De flesta moderna salmonellamedier bygger annars som regel på specifik påvisning av enzymer med hjälp av färgämnen, så kallade kromogena medier. Det finns numera en uppsjö av kommersiellt tillhandahållna sådana: de bäst studerade är ABC agar (Lab M. Ltd), ASAP agar (AES Laboratoires), CHROMagar salmonella (BBL), Compass salmonella agar (Biokar Diagnostics), CSE agar (PPR Diagnostics), Rambach agar (Merck) och SM ID2 agar (bioMerieux). Det enda som var tillgängligt då FDA gjorde sin undersökning var Rambach agar: FDA ansåg inte att mediet tillförde några fördelar jämfört med de äldre, konventionella medierna.

Det finns få studier som jämför medierna på ett för livsmedelsanalys adekvat sätt. Medierna är ofta utvecklade för att påvisa salmonella i avföring vilket kräver hög selektivitet. De kromatiska medierna har därför ofta låg känslighet (många falskt negativa prov) men däremot hög specificitet (få falskt positiva prov). Sammantaget bör detta innebära att en kromogen agar kan vara ett bra alternativ till XLD vid utstrykning. Av de ovan nämnda är det kanske framför allt CHROMagar som är intressant. Men tekniken att koppla enzym till färgreagens är ganska enkel och därför kan vi förvänta oss många fler kromatogena medier de närmaste åren.

Identifiering

De misstänkta salmonellaisolaten identifieras till serogruppsnivå med hjälp av polyvalenta antisera. I den svenska referensmetoden görs en biokemisk uppdelning eftersom de sex underarterna kan indelas med biokemiska metoder. En biokemisk uppdelning underlättar det vidare arbetet, men är egentligen inte nödvändig. För att identifiera den exakta serotypen krävs ett omfattande batteri av antisera och sådana analyser utförs enbart av referenslaboratorier.

Påvisning med alternativa metoder

Isolering och identifiering av salmonella med referensmetoderna är en tidsödande och arbetskrävande process som tar flera dygn, i värsta fall en hel vecka, i anspråk. Det finns därför ett stort behov av snabbmetoder för att analysera livsmedel. Många tillverkare har därför satsat på mer eller mindre automatiska system för att kunna påvisa salmonella. Metoderna bygger som regel på antingen immunologiska eller molekylärgenetiska principer. Själva analysen sker ofta på någon timme, men det krävs fortfarande ett anrikningssteg för att salmonella ska hinna förökas till de halter som behövs vid påvisningen och därför tar även snabbmetoderna 1-2 dygn.

Flera av dessa snabbmetoder har visat sig korrelera mycket bra med standardmetodik och därför har de accepterats som alternativ vid salmonellakontroll i många länder. En del är manuella men flertalet är automatiserade. Fem av dem bygger på immunologisk teknik: de säljs av Bioline (*Optima* och *Selecta*), bioMerieux (*Vidas*), Diffchamb (*Transia*), DuPont Qualicon (*Bax*) samt Foss Analytical (*EiaFoss*). Tre baseras på molekylärgenetik: de säljs av DuPont Qualicon (*Bax-PCR*), Ipa (*Gene Disc Cycler*) och Roche Diagnostics (*Light Cycler*). Av dessa är det framför allt *Bax* och *Vidas* som fått stort genomslag.

Identifiering med alternativa metoder

Oftast utförs serologisk identifiering med hjälp av manuella metoder, det är den gamla pålitliga och resurssnåla latexagglutineringen som då står i centrum. Men givetvis kan andra immunologiska metoder som diffusionstek, EIA och ELISA användas. För dessa finns till och med helt automatiserade system tillgängliga men för att dessa ska bli användbara krävs onekligen en hel del

positiva salmonellafynd att arbeta med.

Molekylärgenetiska metoder kan också användas för att konfirmera salmonella, men då snarast som screeningmetoder eftersom man ändå till sist måste ta till specifika antiserum för att serotypa isolaten. Med molekylärgenetisk metodik kan man särskilja de sex biokemiska underarterna och även en del serotyper, men att ta fram en molekylärgenetisk metodik som korrelerar med alla 2600 serotyperna är inte rimligt och knappast heller särskilt önskvärt.

Epidemiologi

Referensmetodiken är sedan många år serologisk: med Kauffmann-White-schemat kan salmonella för närvarande indelas i över 2600 serotyper. Varje år tillförs ett tjog nya serotyper som publiceras i *Research in Microbiology* som supplement.

När det gäller vanligt förekommande serotyper som S. Enteritidis och S. Typhimurium räcker serotypning inte till för epidemiologiska ändamål. Serotypningen kompletteras då med fagtypning. Båda metoderna är ju tämligen ålderstigna men fungerar förvånansvärt bra tack vare den enorma kunskapsbas som under åren byggts upp.

För att få riktiga ”fingeravtryck” av isolaten används PFGE och internationella databaser för PFGE-mönster finns inom PulseNet och PulseNet Europa.

Shigella

– Den röda dysenterin –

ÖVERSIKT

I Kina och Japan kallades sjukdomen i gamla tider ”den röda diarrén”, i Sverige ”rödsot”. Den röda färgen av färskt blod i avföringen har alltid varit följeslagaren till vad som idag kallas shigellos eller bakteriell dysenteri (vid amöbadysenteri är blodet brunfärgat). Sjukdomen i sin tur är en följeslagare till trångboddhet och dåliga hygieniska förhållanden. I Sverige fanns rödsot ständigt närvarande under medeltiden och ända långt inpå 1900-talet. Man beräknar att 5 % av alla dödsfall under hela 1700-talet kunde tillskrivas rödsot. Vissa decennier var värre än andra, runt 1780 grasserade rödsoten så intensivt att 150 000 svenskar dog under en tioårsperiod.

Ännu värre var situationen för soldaterna, flertalet som skrevs ut till krigstjänst kom aldrig tillbaka och det berodde mindre på själva krigen än på infektionssjukdomar. Och bland dessa var det rödsoten som skördade de flesta offren. Med tanke på den höga dödligheten var det sannolikt den bakterie vi idag kallar *S. dysenteriae* serotyp 1 (Sd1) som orsakade gamla tiders dödliga rödsot. Denna bakterie finns fortfarande kvar i många utvecklingsländer i Afrika och delar av Asien. Den orsakar numera epidemiska utbrott av shigellos framför allt i flyktingförläggningar, som till exempel den som inträffade i Zaire 1994 då 20 000 rwandiska flyktingar dog inom loppet av fyra veckor. Världshälsoorganisationen räknar med att de olika shigellabakterierna sammanlagt orsakar 160 miljoner fall av shigellos i utvecklingsländerna, 70 % drabbar barn under 5 års ålder. Omkring en miljon människor dör, flertalet som en följd av infektion med Sd1.

Även i den industrialiserade världen förekommer shigellabakterier, men då rör det sig inte om Sd1 utan om någon av det femtiotal andra serotyper som är kända. Dessa kan också ge shigellos med blodblandad avföring men sjukdomen är betydligt lindrigare än vid Sd1 och självläker normalt inom en vecka. Omkring 500 svenskar insjuknar årligen och av dessa har 80 % dragit på sig sjukdomen i utomeuropeiska länder. De ca 15 % som smittas hemma i

Sverige blir antingen smittade genom direktkontakt med någon insjuknad, eller via någon som hanterat och smittat ett livsmedel, alternativt råkar ut för ett livsmedelsburet utbrott som orsakats av importerade grönsaker vilka kontaminerats med avloppsvatten.

BAKTERIERNA

Som vi redan varit inne på i kapitlet om *Escherichia coli*, är hela släktet *Shigella* med sina fyra erkända arter ingenting annat än en variant av just *E. coli*. Det har man vetat länge men när taxonomerna hade frågan uppe för ett par decennier sedan bestämde man sig ändå för att behålla släktet *Shigella*. Anledningen var att man inte ville ha de livsfarliga shigellorna sammanslagna med de i stort sett harmlösa kolibakterierna. Sedan dess har kolibakterierna visat sig ha många ansikten som bildar ett kontinuum från de saprofytära stammarna över flera patogena undergrupper, däribland de som bildar shigatoxiner (STEC), fram till de invasiva formerna (EIEC) som är nästan identiska med shigellorna. Idag finns det därför inte längre någon anledning att särskilja shigella och koli men taxonomerna har ännu tagit detta steg.

Formellt behåller man därför fortfarande släktet *Shigella*, som indelas i fyra arter: *S. boydii*, *S. dysenteriae*, *S. flexneri* och *S. sonnei*. Arterna är helt och hållet konstruerade med utgångspunkt från serologisk typning. *Shigella* ingår i familjen Enterobacteriaceae och omfattar alltså gramnegativa, oxidasnegativa stavar som kan växa både aerobt och anaerobt. *Shigella* skiljer sig från merparten av familjens övriga släkten genom att vara orörliga. De kännetecknas vidare av att de är biokemiskt tämligen inerta. Bland annat är de vanligtvis laktosnegativa vilket gör att koliformtestet utfaller negativt. Bakterierna är värdanpassade till människor och en del andra primater hos vilka de i huvudsak lever intracellulärt. Släktnamnet är tillägnat den japanske bakteriologen Shiga som isolerade *S. dysenteriae* 1896 under en pågående dysenteriepidemi där tjugotusen japaner avled.

SJUKDOMEN

Bakteriell (=bacillär) dysenteri och shigellos är samma sjukdom. Men begreppet dysenteri är närmast en diagnos av en diarré med tydligt inslag av färskt, rött blod. Denna diagnos brukar stämma mycket väl överens med förekomsten av shigella i avföringen. Shigellos kan dock också yttra sig som en tämlig mild sjukdom med vattnig diarré.

Infektionsdos

Infektionsdosen för shigella är extremt låg, för Sd1 beräknas den till 10 bakterier, för de övriga serotyperna kanske 100 bakterier. Den låga infektionsdosen medför att kontaktsmitta mellan människor är vanlig. Shigellorna är påfallande syraresistenta vilket medför att de ganska lätt klarar av människans magsyra som annars brukar vara en pålitlig barriär mot medlemmar av Enterobacteriaceae.

Inkubationstid och symptom

Vid utbrott av livsmedelsburen shigellos är inkubationstiden vanligtvis 1-2 dygn med en spridning från 12 timmar till 5 dygn. Vid den epidemiska formen (Sd1) kan inkubationstiden vara längre, upp till 8 dygn.

Det klassiska symptomet på shigellos är blodig diarré. Vid turistdiarré inleds dock oftast sjukdomen med en vattnig diarré som brukar tillskrivas enterotoxiner. Två av tre västerlänningar infekteras med *S. sonnei* och i dessa fall är det mycket vanligt att sjukdomsförloppet faktiskt stannar vid den vattniga diarrén. I andra fall går sjukdomsförloppet vidare, diarrén blir tätare i takt med att bakterierna etablerar sig i tjocktarmens epitelceller och avföringen innehåller såväl blod som varbildningar och slem. Andra vanliga symptom är uppkastningar, feber samt buksmärtor som kan vara mycket svåra om sjukdomen får ett häftigt förlopp.

Vid epidemisk shigellos, som orsakas av Sd1, kan antalet diarréer uppgå till 20 per dygn. Krampanfall är ett vanligt symptom hos barn. Komplikationer är vanliga om de drabbade inte i tidigt stadium behandlas med antibiotika. En fruktad komplikation är hemolytiskt uremiskt syndrom (HUS), det vill säga en sjukdomsbild med sprängda röda blodkroppar och njursvikt. Blodförgiftning är vanligt hos undernärda barn men ses däremot sällan hos vuxna. Världshälsoorganisationen uppger en dödlighet på 5-15 % vid epidemisk shigellos. Vid de fyra senaste större utbrotten, som alla skett i Afrika under 2000-talet, har dödligheten dock varit lägre: 0.8-1.5 % i två av utbrotten, 4-6 % i två. Några uppgifter om i vilken utsträckning de drabbade i dessa fyra utbrott behandlats med antibiotika finns inte.

En mellansvår form av shigellos orsakas av *S. dysenteriae* serotyp 2-15, av *S. flexneri* och ibland av *S. sonnei* och *S. boydii.* Symptomen är likartade de som ses vid epidemisk shigellos men livshotande komplikationer förekommer nästan aldrig. Däremot drabbas ungefär 3 % av Reiters syndrom, där

sjukdomsbilden är mycket varierande: den omfattar smärtor i alla större leder, betydande ögonirritation, eksem och svårigheter att urinera. Komplikationen är långvarig och pågår i månader och till och med år och kan i värsta fall leda till kronisk artrit. Reiters syndrom har i huvudsak associerats till shigelloser orsakade av *S. flexneri* serotyp 2a och särskilt hos människor med ett speciellt genetiskt anlag, HLA-B27 (*human lymphocyte antigen* B27), det viss säga samma anlag som associeras med artrit som följd av campylobacter-infektioner. Men en finsk studie har påvisat en betydande mängd artritfall även hos människor som infekterats med *S. sonnei*.

Shigellos i sin milda och mellansvåra form är självläkande och sjukdomen klingar av på 5-7 dygn. Svåra fall av shigellos behandlas med antibiotika men särskilt Sd1 är genomgående multiresistent och då endast behandlingsbar med något enstaka, och i tredje världen ofta alltför dyrt, antibiotikum. Symptomfria bärare kan i vissa fall utsöndra shigellabakterier i flera månader vilket bidrar till sjukdomens utbredning. En genomgången sjukdom ger immunitet, men endast mot den aktuella serotypen. Det har försvårat utvecklingen av vaccin som Världshälsoorganisationen annars prioriterar högt. De vaccin som testats har som bäst gett ett skydd på 60 %, vilket bara är obetydligt mer än det skydd på 50 % som probiotika i form av aktiva laktobaciller anses ge vid turistresor.

Incidens

Världshälsoorganisationen beräknar att omkring 160 miljoner människor i utvecklingsländerna varje år drabbas av shigellos. Beräkningarna om antalet döda varierar mellan 600 000 och 1 100 000. I tredje världen är *S. flexneri* den vanligaste sjukdomsorsaken (60 % av fallen) medan *S. dysenteriae* serotyp 1 (Sd1) står för de epidemiska utbrotten. Sd1 förändras över tiden och den klon som för närvarande sprids över världen upptäcktes första gången år 2002. I den industrialiserade världen är det i storleksordningen en miljon människor som årligen drabbas av shigellos. Enbart i USA räknar man med 450 000 fall vilket ska jämföras med den officiella statistiken på ca 15 000 laboratoriekonfirmerade fall. I västvärlden är *S. sonnei* den övervägande orsaken (70 %) till shigellos medan *S. flexneri* står för ca 25 % av fallen. I västvärlden är turistresor den främsta anledningen till insjuknande.

Svenska resenärer som insjuknar i shigellos har framför allt besökt Egypten men även Indien, Turkiet och Brasilien förekommer ofta i statistiken. Nu är ju antalet resor till Turkiet långt flera än till exempelvis Zaire, och en omfattande studie från Smittskyddsinstitutet visar att störst risk löper de som reser till

Indien och angränsande länder, följt av resor till Östafrika, Västafrika samt på fjärde plats Nordafrika. I Sverige drabbas enligt konfirmerade laboratorieuppgifter ungefär 500 personer per år vilket gör shigellos till den tredje vanligaste livsmedelsburna sjukdomen enligt den officiella statistiken (där dock bara en del ”matförgiftare” räknas in).

Shigellos på cellnivå

Symptomen vid shigellos härrör egentligen från tre olika infektionsställen. Den vattniga diarré som ofta föregår den klassiska dysenterin, orsakas av invasion av tunntarmens epitelceller och förstärks sannolikt av enterotoxiner. Dysenterins svårare symptom, med slemmig och blodblandad avföring uppstår däremot först då tjocktarmens epitelceller invaderas. Här är det fråga om en allvarlig inflammation där kroppens försvarsmekanismer mot shigellan är en väsentlig del av sjukdomsbilden. Vid epidemisk dysenteri kan sedan komplikationer som hemolytiskt uremiskt syndrom (HUS) förekomma som en följd av produktion av shigatoxiner.

Oavsett var i tarmen som shigella etableras, sker invasionen på samma sätt. De första celler som shigella stöter på är de M-celler som är belägna i den ytligaste delen av slemhinnan. Dessa har som uppgift att plocka upp främmande partiklar och presentera resultatet för immunsystemet. M-cellerna tar följaktligen hand om shigella och transporterar dem vidare till makrofager, men shigella inte bara överlever inuti makrofagerna utan till och med dödar dessa genom att sätta igång makrofagernas programmerade celldöd. Från makrofagerna kan shigella sedan spridas till de underliggande epitelcellerna.

Shigella ombildar aktinet i epitelcellernas membranskelett så att bakterierna kan upptas genom endocytos, en strategi som ju många andra invasiva bakterier använder sig av. Inne i immuncellerna kommer shigella att vara innesluten i en så kallad fagosom, ett hålrum som omges av värdcellens membran. Bildningen av fagosomer aktiverar cellens försvar mot inkräktare och fagosomen ska enligt försvarsstrategin nu sammansmältas med en lysosom varvid bakterierna oskadliggörs. Shigella undviker detta genom att demolera membranet. Såväl modifieringen av aktin som ödeläggelsen av membraner utförs av en grupp proteiner som kallas Ipa, en sammandragning av *Invasion Plasmid-coded Antigens*.

Väl ute i cellvätskan förökas bakterierna. För att spridas till andra celler måste bakterierna sedan förflytta sig ut mot cellmembranet. Shigella saknar flageller,

eller ska man kanske hellre säga, de gener som kodar för flageller är ständigt undertryckta hos shigella. Förmodligen är detta en anpassning till ett invasivt liv, för kroppens försvar är ofta inriktad på de antigena strukturer som finns just på flageller. Shigella minskar på så sätt sin synlighet för antikroppsförsvaret.

Men avsaknaden av flageller betyder inte att de är orörliga. Det finns gott om lösligt aktin i värdcellen och ett speciellt membranprotein, IcsA, hos shigella polymeriserar aktinet i ena änden av bakterien. Aktinmolekyler adderas till aktinmolekyler i en ständigt ökande kolonn som likt en reamotor knuffar shigella i andra riktningen. När bakterien når cellmembranet buktas detta ut så kraftigt att det bildas en inbuktning i den angränsande cellen. Bakterien, nu omgiven av ett dubbelt cellmembran, avsnörps inne i den nya cellen. Finessen är att bakterien spritts från cell till cell utan att ha behövt lämna den skyddade miljön inne i cellerna.

Kroppens försvar omfattar huvudsakligen PMN-leukocyter och massiv utsöndring av mukus (slem) för att förhindra spridningen. Det är i samband med detta, plus att de invaderade cellerna dödas, som ger den kraftiga inflammation som orsakar variga skador på tarmslemhinnan. Varbildningar och blod transporteras sedan ut i avföringen tillsammans med slemmet.

LIVSMEDEL: TILLVÄXT

På grund av den extremt låga infektionsdosen behöver shigella inte tillväxa i ett livsmedel för att orsaka utbrott. Därför är det kanske snarare *överlevnaden* under olika förhållanden som bör uppmärksammas. Det hävdas ibland att shigella är en ömtålig bakterie som dåligt klarar sig utanför tarmkanalen, men såväl *S. sonnei* som *S. flexneri* tillväxer faktiskt i många livsmedel om de lagras vid rumstemperatur.

Temperatur

Data från labförsök visar att åtminstone *S. sonnei* kan växa i intervallet 7-45°C. Men det gäller under absolut optimala förhållanden och i livsmedel är det knappast någon risk för tillväxt under 12°C. Liksom andra gramnegativer är shigella känslig för värmebehandling och dör snabbt vid temperaturer över 65°C. Eftersom tillväxt av shigella ofta inte är nödvändig i livsmedel kan det vara intressant att notera att i livsmedel där shigella av någon anledning inte kan tillväxa (exempelvis fermenterade korvar) är överlevnaden betydligt längre

vid kyltemperatur än vid rumstemperatur.

Syre

Shigella är fakultativt anaerob och kan således växa både i luftlagrade och i vakuumförpackade livsmedel. Några data på shigellas koldioxidresistens har vi inte kunnat finna, men sannolikt beter de sig som praktiskt alla andra medlemmar i Enterobacteriaceae: de hämmas i så fall av höga koldioxidhalter (ofta runt 50 %), sådana som finns i förpackningar med modifierad gasatmosfär. Däremot finns ingen anledning tro att koldioxiden skulle döda bakterierna utan shigella bör kunna överleva i alla typer av förpackningar.

pH

Shigella kan växa vid pH-värden mellan 4.5 och 9. Men det som egentligen är intressantare är att shigella uppvisar en betydande syraresistens. Bakterierna klarar en pH-chock på 2.5 under flera timmar, vilket är ovanligt hos gramnegativer och en viktig anledning till att infektionsdosen är så låg: magsyran förmår inte att döda bakterierna. Vid lagring av livsmedel med pH runt 4.0 överlever shigella under lång tid om livsmedlet lagras i kyltemperatur. Vid högre temperaturer sker däremot en ganska snabb avdödning.

Saltning och rökning

Shigella är påfallande saltresistens och kan till och med växa i 5-6 % NaCl. Saltade produkter påverkar därför inte överlevnaden utan det krävs en ordentlig rökning och torkning för att döda bakterierna.

LIVSMEDEL: PRODUKTER

Shigella sprids *enbart* genom mänsklig avföring. Smittvägen är alltså fekal-oral och spridningen sker på två sätt: direktkontakt mellan människor (det vanligaste sättet i tredje världen) eller genom att livsmedel utsatts för fekal smitta. Detta kan ske på tre sätt: från den som hanterar livsmedlet, via flugor som förökas i smittad avföring eller via vatten som kontaminerats av avloppsvatten. Trots den extremt låga infektionsdosen är större livsmedelsburna utbrott ganska sällsynta, de allra flesta sjukdomsfall är sporadiska.

Att större sjukdomsutbrott är sällsynta kan dock delvis bero på att det är svårt att isolera bakterien från livsmedel och att mildare former av shigellos ofta förblir oupptäckta. Ett bra exempel inträffade 1988 då 21 amerikanska

fotbollsspelare från *Minnesota Vikings* insjuknade i shigellos när de skulle spela en match i Miami. Orsaken stod snabbt klar eftersom den enda gemensamma måltiden för idrottsmännen var kalla köttsmörgåsar som hade serverats på flyget till Miami. Matförgiftningen tilldrog sig ett stort massmedialt intresse och plötsligt började hundratals människor ringa in till Minnesotas hälsoskydd och klaga över liknade erfarenheter. Undersökningen som följde visade att shigellosutbrottet inte bara hade drabbat fotbollsspelarna. Smörgåsarna från samma cateringfirma hade serverats på 219 andra flygrutter och minst 35 000 människor hade insjuknat! Det visade sig att en enda anställd var smittspridaren. Han hade intensiv diarré, men eftersom han inte fick någon sjuklön så hade han ändå släpat sig till jobbet…

Kött, fisk, och ägg

Denna kategori är den som är säkrast från smittosynpunkt, helt enkelt därför att produkterna vanligtvis är värmebehandlade och inte heller utsätts för vattensköljning. Men för köttprodukter av typen färdigmat finns naturligtvis ingen shigella-garanti. I Sverige hade vi till exempel ett utbrott orsakat av gäddpaté 2001 där produkten kontaminerades efter tillagningen. I tropiska länder ska man framför allt undvika isade räkor och andra skaldjur.

Mejeriprodukter

Mjölkprodukter ingår ofta i blandade livsmedel och sådana är ofta inblandade vid utbrott av shigellos. Det är i sin tur en följd av att ju fler ingredienser en produkt har, desto flera möjligheter finns det till kontamination. Dessertostar har vidare figurerat i utbrott av shigellos vilket visar på bakteriernas resistens mot lågt pH.

The Five Layer Fiesta Dip

Vintern år 2000 sökte 400 amerikaner över hela USA läkare för en besvärlig magsjuka. *S. sonnei* av en specifik PFGE-typ konstaterades och den epidemiologiska studie som gjordes visade ett tydligt samband till konsumtion av dipsåser tillverkade av *Senior Felix Gourmet Mexican Food* i Kalifornien. Tillverkaren drog föredömligt snabbt in produkterna från marknaden trots att man aldrig hittade shigellan i själva livsmedlet.

Hälften av de insjuknade hade blodig diarré, 96 % hade magsmärtor och 92 % feber. Sjukdomen varade i genomsnitt 7 dygn med en spridning på 2-21 dygn.

Fyra av fem fick antibiotika vid läkarbesöket. Samtliga insjuknade överlevde. Hur många som verkligen insjuknade kan man bara spekulera i. I USA beräknar man att högst 1 av 30 shigelloser kommer till CDC:s kännedom och det kan alltså ha rört sig om tiotusen fall.

Dipsåsen ja, den bestod av fem lager: kokta bönor, färsk salsa, färsk guacamole, färskost samt creme fraiche. Alla lagren behandlades för övrigt med bensoat som konserveringsmedel, något som uppenbarligen inte nämnvärt påverkade bakteriernas överlevnad. Någon smittkälla lyckades man inte spåra, shigella är mycket svår att isolera från livsmedel, men på goda grunder misstänkte man att osten var den råvara som infekterats. Osten bröts för hand i bitar innan den maldes i en kvarn som inte rengjordes särskilt ofta, den var kraftigt infekterad med tarmbakterier. En enda person hanterade osten och kvarnen och denne hade varit hemma en dag för diarrésjukdom strax före utbrottet…

Vegetabilier

Grönsallat som sköljs eller kryddväxter som isas med infekterat vatten är de livsmedelsprodukter som oftast är inblandade vid utbrott av shigellos. För svenska förhållanden utgör inhemska produkter knappast någon risk. Inte heller importerade grönsaker är det någon större fara med, de flesta importeras från Sydeuropa och även där är shigellabakterierna tämligen ovanliga. Undantag förekommer dock, ett par stora utbrott som grasserat över stora delar av Europa har orsakats av spansk grönsallat. I de fallen har grönsakerna varit så extremt kraftigt infekterade av avloppsvatten att shigella bara varit en av många patogener (se *Den spanska isbergssallaten* i kapitlet om *Campylobacter*).

Idag importeras däremot en hel del färska kryddväxter från asiatiska länder som har hög frekvens shigella: gissningsvis kommer också ett svenskt utbrott som orsakats av sådana produkter. I Nordamerika har flera utbrott tillskrivits manuellt hanterade tomater, ett av de största omfattande nästan tusen restaurangbesökare.

Det mexikanska spåret

I augusti 1998 isolerades *S. sonnei* från två patienter som hade ätit middag på olika restauranger i Minnesota. En undersökning sattes igång och som vanligt visade det sig att de fall som kommit till Smittskyddets kännedom bara var toppen av ett isberg. Minst 200 restauranggäster hade smittats och minst åtta restauranganställda bar på shigellabakterier. Det första, högst rimliga

antagandet, var att någon av dessa var upphovet till smittspridningen. Sen kom överraskningen: PFGE-mönstret visade att samtliga insjuknade bar på exakt samma stam och att denna dessutom var helt ny för epidemiologerna. Det förelåg alltså ett samband mellan restaurangerna och det sambandet kunde rimligen bara vara ett livsmedel.

Det gjorde undersökarna något förbryllade för det fanns ingen uppenbar koppling mellan restaurangerna. Den ena låg på Fina Gatan och serverade minimala, svindyra portioner av typen korslagda sparrisar; den andra var ett förortshak som serverade gigantiska portioner till en helt annan målgrupp. Epidemiologerna fick bokstavligt talat bryta ned alla menyer i sina beståndsdelar. När man äntligen fick napp, så var det inget egentligt livsmedel som var den gemensamma nämnaren utan snarare en dekoration: rå, hackad persilja.

Minnesotas hälsoskydd gick via nätet ut och informerade om den speciella shigellastammen: hade någon annan stat erfarenhet av den?
– Det hade man. I Los Angeles hittade man identiska stammar från restauranggäster som antingen ätit pasta i en italiensk krog eller falafel i en Mellanösternrestaurang. Massachusetts rapporterade likaledes identiska stammar från personer som hade ätit grillade kycklingklubbor på en lokal sylta. Och ja, i samtliga fall var maten rikligt garnerad med rå, hackad persilja.

Florida anmälde ytterligare fall och det räckte inte ens med USA: från Kanada ringde representanter från två delstater. Ett av fallen gällde 35 personer som insjuknat efter att ha ätit pasta garnerad med persilja vid ett besök på en livsmedelsmässa i Ontario. En av de insjuknade var ett dagisbarn som i sin tur smittade fem andra barn på dagiset. Totalt spårade epidemiologerna upp och laboratoriekonfirmerade 500 fall vid åtta olika utbrott. Fast enbart i Minnesota räknade man i slutrapporten med minst 600 insjuknade.

Spåret ledde till en storproducent i Baja California, Mexiko. Här odlades ungefär 30 hektar persilja som vid skörden isades med vatten från det kommunala vattenverket. De amerikanska epidemiologerna stötte direkt på svårigheter: de mexikanska ägarna vägrade att samarbeta med motiveringen att CDC inte hade ”*absoluta bevis*” för att smittan kom från gården. Det var i och för sig riktigt eftersom man inte lyckats isolera shigellan från persiljan. ”*Det var som att prata med en vägg*” klagade en av epidemiologerna. Först sex veckor senare, när smittan för länge sedan upphört, fick CDC möjlighet att göra en

undersökning på plats. Innan persiljan isades för transport, cirkulerades kallt vatten genom förpackningarna för att ge persiljan fräschör. Att vattnet var huvudmisstänkt var närmast självklart. Efter att ha inspekterat de närmast obefintliga sanitära förhållanden – arbetarna på fältet hade visserligen tillgång till mobila toaletter men dessa saknade toalettpapper – var huvudmisstanken att någon shigellasmittad arbetare hade kontaminerat vattnet. Men efter att ha intervjuat arbetarna kom man fram till en alternativ hypotes. Arbetarna höll sig nämligen till buteljerat dricksvatten och vägrade dricka det kommunala vattnet som man tyckte gav orolig mage. Persiljeproducenten menade att vattnet var klorerat och därför säkert. CDC upptäckte dock att det lokala buset brukade roa sig med att vandalisera kloranläggningen och att klordoseringen inte varit i gång på flera månader efter att någon gått lös på anläggningen med automatgevär.

Senare undersökningar visade att shigella överlever länge i kyld persilja och att den sedan kunde förökas tre tiologaritmer (tusenfalt) om den hackade persiljan förvarades i rumstemperatur på restaurangerna under ett dygn.

Nästan samtidigt som utredningen pågick höll andra epidemiologer på att spåra ett utbrott av ETEC. Samma persilja från samma gård visade sig vara anledningen. Och kort därefter insjuknade minst 300 matgäster i Kalifornien i shigellos efter ett besök på en mexikansk restaurang. Återigen var det samma stam som figurerade, men den här gången var det färsk koriander som spred smittan. Gissa var koriandern odlades…

Vatten

Dricksvatten som infekterats med kontaminerat avloppsvatten utgör den största risken. I en liten spansk stad på 6000 invånare drabbades minst 800, förmodligen ännu fler, av shigellos 2002 efter att ha druckit av det lokala dricksvattnet. Shigella dör av klorering så i Sverige är det normalt bara egna grävda brunnar som innebär någon risk, som i fallet *Farliga bekanta*. I omvärlden, där renat avloppsvatten ofta används till odlingarna och där kontaminerat dricksvatten ibland används för att skölja vegetabilier eller till isbitar, kan risken vara betydande i länder med bristfällig rening av avloppsvatten.

Farliga bekanta

Midsommaren 2005 insjuknade fem personer i shigellos efter att ha firat midsommarafton hos bekanta i Bohuslän. Paret som anordnade festen hade hög besöksfrekvens: veckan efter var det en vän som kom på besök och denne insjuknade två dagar senare. Veckan därpå var det dags för ett nytt besök: fyra släktingar till paret gästade stugan och mycket riktigt insjuknade tre av dem i shigellos. Efter tre sådana pärser kunde man tycka att det gästfria paret skulle drabbas av några misstankar om att allt inte stod rätt till: men nej, veckan därpå var det dags för ett nytt hembesök med sju gäster. Samtliga insjuknade.

Nu fick i alla fall Miljöförvaltningen tydligen nog och förbjöd paret att använda den grävda brunnen till dess den åtgärdats: man hittade visserligen inga shigellor i vattnet men gott om andra bakterier som tydde på en kraftig fekal förorening från avloppssystemet. Några fler insjuknade rapporterades därefter inte: om det berodde på att brunnsvattnet inte längre användes eller att presumtiva gäster drog öronen åt sig och backade ut, framgår dock inte. Det gästfria paret hade varit på Kuba veckorna före midsommar och där insjuknat i shigellos. Väl hemma hade de tydligen fortsatt utsöndra bakterierna som antagligen nått brunnsvattnet via avloppsvattnet. Man kan ifrågasätta om det verkligen skulle behövas fyra utbrott under en hel månads tid innan någon ansvarig myndighet reagerade. Men det kanske berodde på semesterledigheter.

VIRULENSFAKTORER

De flesta av shigellas virulensfaktorer finns samlade på en invasionsplasmid. Denna styr ett typ 3-sekretionssystem (T3SS) som injicerar en rad proteiner till epitelcellerna. Proteinerna modifierar epitelcellernas membran så att shigella kan invadera. Vidare förhindrar de att cellen dödar inkräktaren och de möjliggör också intracellulär förökning samt spridning från cell till cell. Mekanismen finns även hos enteroinvasiva *E. coli* (EIEC).

Ics-proteiner = InterCellular Spread

IcsA (som kallas VirG av många forskarlag) är ett stort yttre membranprotein på 120 kDa som aktiveras efter det att shigella kommit in värdcellen och membranet som omsluter fagosomen förstörts. Proteinet polymeriserar aktin i ena änden av bakterien. Resultatet blir ett slags aktinmotor som trycker bakterien framåt och så småningom ut mot cellmembranet. IcsA gör att shigella kan förflytta sig inuti värdcellen, men framför allt att den kan spridas från cell

till cell utan att behöva lämna den skyddande miljön i cellerna. När bakterien kommer fram till cellmembranet buktas detta nämligen ut varpå det blir en inbuktning i nästa cell. Processen går vidare med att bakterien avsnörps inne i granncellen, då omgivet av ett dubbelmembran som senare lyseras av ett annat Ics-protein, IcsB. Denna typ av intracellulär spridning gör att shigella undviker kroppens försvarsmekanismer. Ics-proteinerna är plasmidbundna.

Inv-plasmiden = Invasionsplasmiden

Hela Inv-plasmiden är på 220 kbp, men det är ett område som omfattar ungefär 30 kbp som är intressant för virulensen. Denna del av plasmiden kodar för två strukturer: en omfattar åtta gener, däribland de som kodar för de så kallade Ipa-proteinerna, det andra omfattar 20 gener i ett Typ 3-sekretionssystem (T3SS). Shigellastammar som förlorat inv-plasmiden saknar virulensförmåga.

Ipa = Invasions-Plasmid-kodade Antigen-proteiner

De fyra Ipa-proteinerna IpaA-IpaD är de första virulensfaktorer som överförs genom typ 3-sekretionssystemet (T3SS). Vid kontakten mellan shigella och epitelceller bildar de hydrofoba proteinerna IpaB och IpaC ett rör in till epitelcellernas membran vilket sätter igång den förändring av membranets aktinskelett som gör att shigella kan slinka in i epitelcellerna genom endocytos. Förmågan hos IpaB och IpaC att bilda rör används sedan också inuti cellen för att förstöra det cellmembran som omger fagosomen. IpaB och IpaC initierar också den programmerade celldöden hos makrofager. IpaD är en likaledes nödvändig virulensfaktor som utgör själva spetsen på T3SS-röret och som också har betydelse för att förstöra cellmembranet.

ShEt = Shigella Enterotoxiner

Ungefär 80 % av alla shigella samt EIEC producerar det plasmidkodade enterotoxinet ShEt2. Det kromosomalt kodade ShEt1 produceras däremot i huvudsak av *S. flexneri* 2a. Enterotoxin tros ha betydelse för den vattniga diarré som ofta inleder dysenterisymptomen men de har ingen betydelse för den blodiga diarren. Båda toxinerna är enkla proteiner med en molvikt runt 60 kDa.

Stx = Shigatoxin

Shigatoxinet är ett protein som ger flera konsekvenser. Det är ett enterotoxin som orsakar diarré när det fäster in till receptorer i tarmcellerna och det är ett neurotoxin som orsakar kramper och feber. Men framför allt är det ett celltoxin som dödar celler genom att klyva deras ribosomala RNA och därmed förhindra proteinsyntes. Det produceras enbart av *S. dysenteriae* serotyp 1 (Sd1) och bidrar

till den mycket svåra diarrén vid epidemisk dysenteri och är den direkta orsaken till de fall av hemolytiskt uremiskt syndrom (HUS) som förekommer som komplikation vid epidemisk dysenteri. Shigatoxinet är ett A-B protein på 68 kDa där A-delen på 32 kDa utgör själva toxinet medan de fem små B-delarna binder in till speciella receptorer. Det kodas av kromosomen och produceras också av STEC-stammar av *E. coli*.

T3SS = Typ Tre Sekretions System

Typ 3-sekretionssystemet är vitt spridd bland patogena Enterobacteriaceae och används för att genom värdcellens membran injicera virulensproteiner direkt in i cellvätskan. I shigellas fall bildas en nål som sträcker sig ungefär 60 nm ut från bakterien.

PÅVISNING

Selektiva medier

Det är svårt att isolera shigella från livsmedel eller vatten. En anledning är att bakterierna oftast förekommer i mycket låga halter. En annan är att de selektiva medier som länge funnits är urusla, många av dem är egentligen primärt utvecklade för salmonella.

Oftast har man försökt anrika shigella i buljong varefter man strukit ut anrikningen till flera mer eller mindre selektiva substrat som XLD, Hektoen Enteric agar (båda är beskrivna i kapitlet om salmonella) och Salmonella-Shigella (SS)-agar med 0.85 % gallsalter (en modifierad, mindre hämmande SS-agar med 0.5 % finns också kommersiellt tillgänglig). I USA använder man anrikning i en svagt selektiv novobiocinbuljong följt av utstryk på MacConkey-agar, alltså ett allmänt substrat för hela familjen Enterobacteriaceae.

Metoderna fungerar som sagt dåligt. På senare år har kromogena medier utvecklats även för shigella. Food and Drug Administration (FDA) testade *Chromogenic Shigella Plating Medium* (CSPM) men fann att det inte hade några fördelar jämfört med SS-agar vid isolering av bakterierna från tomater.

Identifiering

Vid shigellos förekommer shigella i mycket höga halter i avföringen från de insjuknade och härifrån kan shigella någorlunda lätt isoleras. Shigella omfattar fyra arter som dock inte är lätta att indela vare sig med biokemiska eller

molekylärgenetiska metoder. Arterna är nämligen *definierade* utifrån serologiska kriterier.

Serogrupp A motsvarar *S. dysenteriae* och indelas i 15 serotyper.
Serogrupp B motsvarar *S. flexneri* och indelas i 8 serotyper (plus undertyper).
Serogrupp C motsvarar *S. boydii* och indelas i 20 serotyper.
Serogrupp D motsvarar *S. sonnei* och omfattar bara en serotyp.

För identifiering används därför immunologisk teknik och polyvalenta/ monovalenta antisera finns kommersiellt tillhandahållna från flera tillverkare.

Av serogrupperna är det bara D som lätt skiljs ut biokemiskt då bara denna ger ett positivt utslag på ornitindekarboxylas. Det ska påpekas att vissa enteroinvasiva kolistammar (EIEC) har ett biokemiskt mönster som är närmast identiskt med shigella och dessutom agglutinerar med vissa antisera för shigella.

Övrig påvisning

Den metod som idag rekommenderas för påvisning av shigella i livsmedel i Sverige är en PCR-metod som utvecklats av Livsmedelsverket. Den bygger på påvisning av de gener som kodar för IpaH, en gen som finns hos alla shigella samt hos EIEC. Ett protokoll baserat på PCR-RFLP som medger både påvisning och viss identifiering av shigella i livsmedel har också publicerats.

Epidemiologi

För att säkert spåra en smittkälla är indelningen i serotyper inte tillräcklig. Visserligen finns det ett femtiotal serotyper, men den vanligaste arten i den industrialiserade världen är *S. sonnei* som bara omfattar en enda serotyp. Referensmetoden för epidemiologisk påvisning är PFGE för vilken det finns en överenskommen standard som också kan hittas på nätet på adress CDC.gov/pulsenet/

Staphylococcus aureus

– Den gula stafylokocken –

ÖVERSIKT

På 1800-talet innebar större kirurgiska ingrepp närmast en dödsdom. Om patienten mot förmodan överlevde ingreppet, var risken överhängande att han i stället dog av sårinfektioner. Typexemplet var en varig inflammation i operationssåret som spreds vidare till blodet. Läkarna stod maktlösa när patienten antingen dog av blodförgiftningen eller av att något inre organ kollapsade. Det var en skotsk kirurg, Alexander Ogston, som 1880 fann förklaringen: en bakterie som bildade varbölder i såren. Han gav den namnet *Staphylococcus aureus*. *Aureus* betyder ”guldgul”, och alltsedan Ogstons tid har *S. aureus* bland medicinare varit känd som ”den gula stafylokocken”.

Med penicillinets upptäckt på 1940-talet fick man äntligen tillgång till ett effektivt botemedel. Strax efter andra världskriget användes penicillin i enorma kvantiteter: inte bara som botemedel utan också som ett förebyggande mirakelmedel som utnyttjades i alltifrån kosmetika till halstabletter. Bakterierna svarade med att snabbt utveckla resistens och idag är praktiskt taget alla stammar av *S. aureus* penicillinresistenta. Modifierade penicilliner (betalaktamer) började användas 1960 men även om dessa skrevs ut under mer kontrollerade former, kunde man inte förhindra att stafylokocker så småningom blev resistenta även mot dessa. MRSA (meticillin-resistenta *S. aureus*) dominerar idag i sjukhusmiljöerna i många länder. Stammarna är oftast multiresistenta, alltså inte enbart mot meticillin utan mot en lång rad antibiotika. Värst är situationen i Japan där en del sjukhus har 90 % MRSA-andel bland stammarna. Sydeuropas och USA:s sjukhus har en andel på ungefär 50 % medan Sverige genom ett tålmodigt hygieniskt arbete och hushållande med antibiotika har världens lägsta frekvens.

Smittskyddet har sedan 2001 screenat isolat för antibiotikaresistens och även om ökningen är oroväckande även i Sverige så var det först under 2011 som andelen MRSA-isolat översteg 1 % (för blodprover är andelen ca 3 %).

Kostnaderna för att kontrollera MRSA är redan nu mycket höga och någonstans går smärtgränsen. Om inte andra effektiva och billiga antibiotika utvecklas får vi antagligen ge upp kampen på 2020-talet. MRSA är globalt sett ett gigantiskt medicinskt problem idag eftersom *S. aureus* följt i spåren av reservdels-människan: bakterien kommer in i kroppen samtidigt med implantat och katetrar och orsakar svårbehandlade och ibland dödliga infektioner. MRSA är behandlingsbara men ibland bara med ett fåtal mycket dyra och ganska otrevliga antibiotika som exempelvis vancomycin. Även vancomycinresistenta *S. aureus* har hittats, men de är fortfarande mycket ovanliga.

Att *S. aureus* också kunde orsaka matförgiftning fick man klart för sig på 1930-talet då det visades att bakterien bildade toxiner vid tillväxt i livsmedel. Fem enterotoxin (A-E) har varit kända sedan länge. Efter upptäckten att enterotoxinen även fungerar som superantigen vid sårinfektioner har intresset för dem blommat upp och i kölvattnet har man på senare tid upptäckt ytterligare femton enterotoxin: G-R samt U1, U2 och V.

Som matförgiftare är *S. aureus* mycket vanlig, bakterien orsakar miljontals matförgiftningar varje år enbart i västvärlden. Och för en gångs skull rör det sig om äkta matförgiftning, det vill säga att bakterierna producerar gift i maten. Giftet är värmestabilt och finns därför kvar i värmebehandlade livsmedel även om bakterierna avdödats.

BAKTERIERNA

Staphylococcus är ett grampositivt släkte som omfattar ett femtiotal arter av orörliga, katalaspositiva kocker. De kan växa både i aerob och i anaerob miljö. *Staphyle* betyder vindruvsklase men det ska inte tas alltför bokstavligt, förmodligen hade Alexander Ogston en poetisk ådra. Vill man hitta bakterierna i mikroskopet ska man snarare ställa in siktet efter oregelbundna klumpar. Utvecklingsmässigt hör stafylokockerna hemma i en grampositiv linje där även de aeroba sporbildarna, *Bacillus*, ingår.

Den helt dominerande patogenen inom släktet är *S. aureus* som också brukar kallas den gula eller den koagulaspositiva stafylokocken. Att den är gul beror på att den bildar pigment vid växt på agarplattor. Mängden kan variera: från en kraftig och ilsket gul, gyllene eller ibland orange färg till en så svag nyans att det är först då man tagit upp kulturen med en platinös som man ser en gul

skiftning. Hur mycket pigment som bildas växlar mellan olika stammar men också i hög grad med miljön: hög salthalt och rumstemperatur ökar på pigmentbildningen. Pigmentet, staphyloxanthin, är en karotenoid som egentligen har en orange färg, men eftersom det samtidigt bildas uppåt ett tjugotal delprodukter blir resultatet i regel "guldgult". Enstaka stammar bildar för övrigt inget pigment alls.

Koagulas är ett protein som koagulerar plasma, eller noga räknat: omvandlar lösligt fibrinogen i plasma till olösligt fibrin. Trots att ”koagulaspositiva stafylokocker” oftast betraktas som synonymt med *S. aureus* finns det faktiskt ytterligare sju stafylokockarter som producerar koagulas, se tabell 19.1.

Tabell 19.1. Arter av koagulaspositiva stafylocker utöver *S. aureus* (2012).

Art	Isolerad från	Matförgiftningsrisk
S. agnetis	Nötkreatur	Okänt, arten beskrevs 2012
S. delphini	Delfiner	Nej
S. hyicus	Gris, kyckling, nötkreatur	Troligen mycket låg risk
S. intermedius	Katt, hund, köttdjur	Ett utbrott är känt
S. lutrae	Uttrar	Nej
S. pseudintermedius	Katt, hund, häst, fåglar	Troligen mycket låg risk
S. schleiferi	Hundar	Nej

De stammar av *S. aureus* som orsakar livsmedelsförgiftning har nästan alltid sin nisch hos människor. Omkring 20 % av alla människor bär ständigt omkring på en eller flera stammar av *S. aureus*, framför allt i näsan men ibland även på fuktig hud som i armhålorna eller i ljumskarna. Från näsan sprids bakterierna ofta vidare till nagelbanden. Hos kockar, sjukvårdspersonal och personer med psoriasis och en del andra eksemsjukdomar är frekvensen *S. aureus* högre än hos genomsnittet. Bakterierna tillhör normalfloran hos dessa människor och så länge huden inte skadas är de ofarliga för sin värd. Däremot kan de snabbt orsaka varbildning i till exempel en skärskada på ett finger, en vanlig yrkesåkomma hos kockar.

Ungefär 60 % av befolkningen bär på bakterierna då och då medan 20 % av någon anledning aldrig tycks infekteras. Nästan alla humana stammar av *S. aureus* producerar en eller flera enterotoxiner (tidigare uppgifter att endast hälften av stammarna bildar enterotoxin har fått revideras vid upptäckten av alla de nya enterotoxinerna där särskilt enterotoxin H tycks vara allmänt

förekommande).

Även andra däggdjur samt fåglar bär ofta på *S. aureus* men dessa stammar skiljer sig biokemiskt och genetiskt från de humana stammarna och är sällan orsak till utbrott av livsmedelsförgiftning. Ofta producerar de animala stammarna speciella varianter av enterotoxinen, möjligen är dessa varianter mindre giftiga för just människor. Det fåtal utbrott som orsakats av animala stammar har mest kopplats till mastitfall hos kor, getter och får: i de fallen har mycket stora mängder bakterier utsöndrats med mjölken.

Hos köttdjur är det för övrigt ofta andra koagulaspositiva arter än *S. aureus* som dominerar: särskilt *S. intermedius* är vanligt förekommande och det finns ett större utbrott registrerat som orsakats av just denna art. Hos gris, nötboskap och kyckling hittas även *S. hyicus* och troligen kan även *S. pseudintermedius* förekomma hos köttdjuren.

SJUKDOMEN

Infektionsdos

Det krävs ungefär 100 nanogram enterotoxin för att framkalla matförgiftning. Den exakta giftdosen varierar förmodligen mellan olika enterotoxin och den individuella mottagligheten varierar också. Det finns utbrott där personer som fått i sig så lite som 20 nanogram insjuknat, men de uppgifterna är lite osäkra eftersom de konstaterades i en tid då man bara kände till fem enterotoxiner. Det kan ju samtidigt ha funnits högre halter av de senare upptäckta enterotoxinerna i livsmedlet. Vid andra utbrott har man kunnat konstatera att en del människor fått i sig 500 nanogram enterotoxin utan att insjukna.

För att producera 100 nanogram enterotoxin krävs under optimala förhållanden ungefär 10 miljoner stafylokocker och det är alltså denna mängd som är själva infektionsdosen. Det innebär en halt på runt 100 000 per gram livsmedel. Nu är förhållandena för enterotoxinproduktion sällan optimala i livsmedel och i praktiken brukar man konstatera ännu högre bakteriehalter. Medianhalten vid utbrott är faktiskt så hög som 10 miljoner stafylokocker per gram livsmedel.

Inkubationstid och symptom

Inkubationstiden är oftast 1-5 timmar, sällan över 8 timmar och kan i extrema fall vara så kort som 15 minuter. Det mest framträdande draget är häftiga

uppkastningar, uttrycket ”projektil-uppkastning” svarar ganska väl mot vad som händer. Diarré och kväljningskänslor är också vanligt förekommande. I svårare förgiftningsfall uppträder huvudvärk, muskelkramp, feber eller frossa, sänkt blodtryck och njurstensliknande smärtor. Nio av tio drabbade återhämtar sig helt inom ett eller möjligen två dygn. Dödsfall är mycket ovanliga men kan förekomma då åldringar med sviktande hälsa drabbas.

Den vanliga uppfattningen att stafylokock-förgiftning alltid är en mild sjukdom stämmer dock inte in på alla insjuknade. En av tio drabbas hårdare, blir totalt utpumpad och måste läggas in på sjukhus under flera dygn. Det visar bland annat en fransk studie på ett par tusen insjuknade där 9 % behövde sjukhusvård, en dubbelt så hög frekvens som vid salmonellos. Vid en prästvigning i Brasilien 1998 insjuknade 4 000 gäster varav 2 000 blev så sjuka att de uppsökte sjukhus. Sjukhusen kunde inte ta emot alla och tvingades gallra: 400 togs in varav 81 var så illa däran att de fick vårdas på intensivkliniker. Det brasilianska fallet var ovanligt så till vida att 16 personer (0.4 %) avled. Om detta berodde på att det fanns många åldringar bland de drabbade framgår inte av rapporten.

Incidens

Stafylokocker är en vanlig orsak till matförgiftningsutbrott. I olika delar av världen svarar stafylokockerna för 1-15 % av antalet registrerade utbrott. Sannolikt sker miljontals intoxikationer varje år enbart i den industrialiserade världen. För utvecklingsländerna finns få data och de har ju betydligt värre saker att bekymra sig om.

Enterotoxinen på cellnivå

Idag finns ganska goda kunskaper om hur enterotoxinen fungerar som superantigen vid sårinfektioner. Däremot vet man nästan inget om hur eller var enterotoxinet binder in och varför det resulterar i uppkastningar vid matförgiftning. Inte heller vet man varför en del människor drabbas av diarré i samband med stafylokockförgiftning. En anledning är att det i huvudsak är primater som reagerar på toxinerna och därför har det varit svårt att hitta lämpliga djurförsöksmodeller.

LIVSMEDEL: TILLVÄXT

Det krävs miljontals stafylokocker för att orsaka matförgiftning och eftersom bakterierna är utpräglat mesofila betyder det att livsmedlet måste

temperaturmisshandlas. Å andra sidan tillväxer stafylokocker snabbt vid rumstemperatur och särskilt om temperaturen börjar gå uppåt 30°C. Vid optimal temperatur delar sig stafylokockerna två gånger i timmen.

Konkurrensförmåga

I livsmedelsråvaror som kött, fisk och opastöriserad mjölk kan stafylokockerna inte konkurrera med förskämningsbakterierna och sådana livsmedel är därför i princip riskfria. Enda undantaget är då mjölkproducerande djur drabbas av stafylokockmastit, då kan miljontals stafylokocker invadera mjölken. Men sådan mjölk ska egentligen inte kunna nå konsumenten i länder med utbyggd livsmedelskontroll.

Temperatur

Stafylokockerna är utpräglade mesofiler. Tillväxtintervallet är 7-45°C men enterotoxin produceras aldrig vid temperaturer under 10°C och därför innebär kyllagring ett hundraprocentigt skydd mot matförgiftning. I praktiken krävs en temperatur över 15°C för att enterotoxin ska bildas i livsmedel. Snabbast går tillväxt och enterotoxinbildning vid temperaturer över 30°C.

Syre

Stafylokockerna är fakultativa anaerober och kan alltså växa både med och utan syrgas. Trots det ger vakuumförpackning eller förpackningar med modifierad gasatmosfär ändå ett visst skydd eftersom enterotoxinproduktionen är betydligt lägre i anaeroba miljöer.

pH

Tillväxt kan ske inom pH-intervallet 4.0 till 9.5. Enterotoxinproduktion i livsmedel kan teoretiskt ske vid pH 4.6 men i praktiken är risken mycket liten vid pH under 5.0. Sker dessutom tillväxten under anaeroba förhållanden (till exempel inuti en ost eller korv) stoppas enterotoxinproduktion oftast redan vid pH 5.7.

Saltning och rökning

Stafylokockerna är extremt resistenta mot salt och såväl tillväxt som enterotoxinproduktion kan ske i saltlake som innehåller upp till 15 % salt. En del köttprodukter (som gammaldags producerad rimmad skinka) och vissa ostar (som saltlakelagrad *fetaost*) kan alltså orsaka stafylokockförgiftning om inte andra hämmande faktorer (temperatur, syrgasförhållande) tillkommer. Lättrökta produkter ger heller inget skydd mot bakterierna.

LIVSMEDEL: PRODUKTER

S. aureus som är involverade vid utbrott av matförgiftning härrör nästan alltid från de människor som haft hand om maten. Tillväxt av bakterierna och enterotoxinproduktion förutsätter nästan undantagslöst att livsmedlet värmebehandlats så att den vanliga förskämningsfloran dödats, samt att det lagrats vid för hög temperatur. I många restaurangkök världen över kan temperaturen bli väldigt hög, 30°C är inget ovanligt, och under sådana förhållanden kan *S. aureus* tillväxa och producera enterotoxin mycket snabbt.

Kött

I Europa och USA är värmebehandlade köttprodukter inblandade i 50-75 % av förgiftningsfallen. Enterotoxinproducerande, koagulaspositiva stafylokocker som *S. aureus*, *S. hyicus*, *S. intermedius* och möjligen även *S. pseudintermedius* förekommer hos köttdjur och kan från djuret självt spridas till köttet. Trots det är det mycket ovanligt att djurstammar kunnat verifieras som orsaken till matförgiftning. Orsaken är dels att djurstammarna som redan finns på köttet dör vid värmebehandlingen, dels att djurstammarna verkar vara mycket mindre riskabla för människor. I praktiken härrör nästan alltid de matförgiftande stammarna från de människor som haft hand om maten, livsmedlet blir då bara en vektor för bakterierna.

De klassiska matförgiftningsprodukterna är skivade charkuterier eller kall färdigmat som köttpatéer, kycklingsallad och liknande produkter som förvarats vid för hög temperatur. Pizza förekommer också ganska ofta i statistiken och här är det de saltade eller värmebehandlade råvarorna som förvarats vid för hög temperatur. Värmen vid gräddningen av pizzorna räcker sedan inte till för att inaktivera enterotoxinen. Alltför långsam avkylning av stora köttdetaljer som rostbiff och skinka är heller inte ovanligt som orsak till matförgiftning. Däremot är råa köttprodukter samt fermenterade eller kraftigt torkade korvar och skinkor utan ytskikt av mögel i det närmaste riskfria. Ett ytskikt av mögel höjer däremot lokalt pH-värdet och ger stafylokockerna en chans att växa till.

Anledningen till varför piloter inte bör äta samma mat

Stafylokockförgiftning ombord på flygplan är ingen ovanlig företeelse. Brickor med kyld cateringmat som förvaras vid för hög temperatur är ett ständigt hygieniskt bekymmer på flygresor och just stafylokocker är den viktigaste

anledningen till regeln att förste- och andrepilot inte får äta samma mat. Ett typexempel skedde på en långresa mellan Tokyo och Paris 1975. Flygplanet mellanlandade i Anchorage på Alaska där frukost lastades in. Kocken i Anchorage hade ett infekterat finger och spred sina stafylokocker till frukostskinkan. Bakterierna hade haft många timmar på sig att tillväxa i ”kökstemperatur” (hög rumstemperatur) och när passagerarna väl fick maten så förgiftades 60 % av dem mycket snabbt, inom 0.5-2.5 timmar. På väg till Paris blev det fullständigt kaos på flygplanet då 197 passagerare spydde våldsamt och hade svåra buksmärtor. Planet tvingades mellanlanda i Köpenhamn där ambulanserna i skytteltrafik körde 142 personer till olika sjukhus. Lyckligtvis fick piloterna annan mat…

Cateringskinka

Vid en fest för en nybliven pensionär i Florida klagade många av gästerna på illamående och troppade av i förtid. Sju av dem mådde så dåligt att de fick ambulanshjälp till närmaste sjukhus. Totalt var det 18 personer som efter i genomsnitt 3 timmars inkubationstid blev matförgiftade. En kartläggning visade att nästan alla blev illamående, att 94 % kräktes, och att två av tre klagade på diarré, trötthet och kraftig svettning. Hälften fick frossa och en av tre hade muskelvärk, medan bara enstaka klagade på feber och huvudvärk. Inkubationstiden varierade mellan 1 och 7 timmar och sjukdomens varaktighet var i genomsnitt 24 timmar med en spridning på 2-72 timmar. Två personer (10 %) behövde sjukhusvård över natten.

En cateringfirma hade anlitats för middagen som uppenbarligen var god eftersom allt redan var uppätet när utredarna började sitt arbete. I just detta fall fanns en uppenbar epidemiologisk koppling till konsumtion av kokt skinka. Cateringfirman hade kokt en skinka på 8 kg i ugn 200°C under en och en halv timme. För alla som kokt julskinka kan koktiden tyckas vara i kortaste laget, men det har nog mindre betydelse i fallet eftersom eventuella skink-stafylokocker rimligtvis fanns på utsidan. Cateringfirman hade efter ugnsbakningen omedelbart skivat upp skinkan och därefter packat skivorna i ett litet tråg som sattes i kylskåp.

Om bakterierna kom från kockan som tillverkade skinkan eller ifrån en dåligt rengjord skärmaskin kunde man inte klarlägga. Men man antog att skinkan infekterats av stafylokocker från människor och avsvalnats alldeles för långsamt och att stafylokockerna haft gott om tid att tillväxa. Just

cateringfirmor är ett återkommande problem vid alla typer av livsmedelsutbrott i USA, beräkningar tyder på att cateringfirmor och restauranger står för drygt 80 % av alla livsmedelsrelaterade sjukdomsfall i USA.

Fisk och skaldjur

Fisk och skaldjur är ingen naturlig nisch för *S. aureus* men även dessa livsmedel kan naturligtvis bli kontaminerade av människor. Färsk fisk som steks eller kokas är helt riskfria och även färska räkor och andra skaldjur är nästintill riskfria trots att de ju faktiskt är kokta. Skaldjurens ömtålighet gör att det är mycket osannolikt att någon skulle vilja äta dem om stafylokocker fått full frihet att växa till, de skulle lukta förfärligt långt innan enterotoxinhalten blivit riskabel. Däremot är fiskgratänger, laxpuddingar, skaldjurssallad med majonnäs och liknande produkter inte ovanliga som orsak till stafylokockförgiftning, 5-10 % av utbrotten kan kopplas till sådana produkter.

Mejeriprodukter

Mejeriprodukter står för 10-20 % av matförgiftningsfallen där stafylokocker är inblandade. Till skillnad från andra livsmedelsråvaror kan opastöriserad mjölk vara en direkt orsak till förgiftningar. Det sker då mjölken kommer från mastitsjuka djur. *S. aureus* är en mycket vanlig orsak till mastit hos kor, får och getter och de sjuka djuren kan utsöndra hundratusentals stafylokocker per mL mjölk och det krävs då bara en ganska liten tillväxt för att enterotoxin ska bildas.

Särskilt i Frankrike har färsk getost tillverkad av opastöriserad och kraftigt infekterad mjölk flera gånger orsakat utbrott. I de fallen har det oftast gällt små producenter med stort inslag av manuellt arbete. Ett fall inträffade också i Norge där ett tiotal personer insjuknade efter att ha köpt olagligt saluförd, opastöriserad lokal getost på en höstmarknad. För två av de drabbade blev situationen dramatisk, de hittades medvetslösa i sitt hem tre timmar efter att de ätit getosten. Den ena personen fick ett mycket allvarligt blodtrycksfall och fick behandlas för akut fysiologisk chock.

Vid mera normala halter av *S. aureus* i mjölken (under 100 per mL) är risken däremot liten eftersom mjölkens normala flora konkurrerar ut stafylokockerna och antingen syrar mjölken eller gör den odrickbar innan stafylokockerna nått riskabla halter. Däremot kan opastöriserad mjölk som blandas med andra värmebehandlade och kanske saltade produkter ge en tillräcklig ymp för att

stafylokockerna ska växa till. Det drabbade ett norskt hushåll som gjort potatismos med opastöriserad mjölk och sedan ställt undan moset i rumstemperatur.

Risken är egentligen större med pastöriserad mjölk där den naturliga floran till största delen tagits bort. Men eftersom pastöriserad mjölk i industrialiserade länder tillverkas på ett sådant sätt att stafylokocker knappast kan kontaminera mjölken efter pastöriseringen, är sådana utbrott mycket ovanliga. En fransman lyckades dock med konststycket att förgifta sig själv. I det fallet rörde det sig om steriliserad mjölk som dracks direkt ur flaskan. En överbliven skvätt fick stå i rumstemperatur tills nästa dag då törsten åter gjorde sig påmind. Några timmar senare intogs mannen på sjukhus...

Vid den efterföljande bakteriologiska utredningen visades att den stam av *S. aureus* som mannen normalt hade i munhålan var identisk med den stam som hade förgiftat honom. Sensmoralen för den uppenbart roade läkare som rapporterade om fallet var att låta bli att halsa mjölk direkt ur flaskan. En livsmedelsbakteriolog skulle annars peka på just det faktum att det rörde sig om steriliserad mjölk där alla mjölkens naturliga bakterier hade avdödats så att stafylokockerna fick härja fritt under natten.

Det fall då stafylokockerna annars verkligen får tillfälle att tillväxa i en mjölkprodukt är vispad grädde. Genom att luft vispas in i grädden blir miljön dessutom aerob vilket ökar enterotoxinproduktionen. Gräddbakelser som förvarats i rumstemperatur är därför en återkommande orsak till utbrott. Grädden har då nästan alltid blivit kontaminerad av personen med vispen.

Ost har uppmärksammats som en viktig källa till utbrott, särskilt i Frankrike och i Sydamerika. De ovan nämnda opastöriserade getostarna är ett specialfall, i övriga fall härrör stafylokockerna snarast från ostproducenten och därför kan såväl opastöriserad som pastöriserad ost vara boven. Problemet är dock i huvudsak begränsat till färsk- eller dessertost som tillverkas av små producenter som förlitar sig på naturliga mjölksyrabakterier. Det är nämligen då syrabildningen uteblir som stafylokockerna har en chans att växa till. Används startkulturer faller pH snabbt under 5.0 och då är risken obefintlig.

Som vanligt finns det några undantag, det gäller dessertostar som har ett kraftigt yttre skikt av mögelsvampar eller kittostbakterier. Här kan pH-värdet lokalt stiga kraftigt och undantagsvis ge en tillväxtmöjlighet för stafylokocker.

Även fetaost, som i princip är en färskost lagrad i saltlake, har orsakat en del utbrott till följd av stafylokockernas motståndskraft mot salt. I Sydamerika tillverkas speciella färsk- och dessertostar med relativt högt pH-värde. Om sådana ostar temperaturmisshandlas får stafylokockerna fältet fritt för tillväxt. En undersökning visade att 50 % av en viss brasiliansk färskost innehöll *S. aureus* med en genomsnittshalt på 100 000 per g! Det är därför inte att undra på att sådana ostar är en mycket vanlig orsak till stafylokockförgiftning i Sydamerika.

Skandalen i Japan

Sommaren 2000 inträffade Japans största matförgiftningsfall då nära 15 000 människor i Hokkaido drabbades av stafylokock-intoxikation efter att ha druckit antingen lättmjölk eller en yoghurtdrink från Japans största mejeri, *Snow Brand Milk*. Båda produkterna var tillverkade av mjölkpulver. Företaget förklarade händelsen med ett strömavbrott som lett till att bakterierna tillväxte i mjölken. Den utredning som följde spårade dock upp även andra och för företaget mycket besvärande uppgifter. Hygienen på företaget var minst sagt eftersatt och det visade sig att *Snow Brand Milk* hade innovativa lösningar på gammal osåld och förskämd mjölk som returnerades från butikerna. Man gjorde mjölkpulver av den. Just sådant mjölkpulver som använts för att tillverka produkterna som orsakade utbrottet. Fallet blev en första klassens skandal där flera chefer åtalades för brott mot livsmedelslagen och flera av de drabbade stämde företaget på ungefär en halv miljon kronor vardera. Företaget förlorade miljardtals dollar genom att samtliga 21 fabriker fick stängas och genomgå omfattande hygienförbättringar.

Den bakteriologiska historien slutar här men efterspelet kan vara värt att berätta. Skandalerna fortsatte nämligen att regna över *Snow Brand Milk* i ytterligare två år. Företaget hade tappat stora delar av sin mjölkförsäljning under år 2000 och tillverkade då i stället smör av överskottet. Ett halvår senare stod man därför med ett gigantiskt smörberg där bäst-före-datum snabbt närmade sig. Företagskulturen visade sig vara densamma som tidigare trots att flera chefer sparkats: lösningen var att stämpla fram hållbarhetsdatum ett halvår. Naturligtvis upptäcktes det och skandal nummer två var ett faktum. Något senare upptäcktes Japans första fall av BSE (galna ko-sjukan) just i Hokkaido och försäljningen av nötköttet därifrån störtdök på den japanska marknaden. *Snow Brand Milk* hade intressen också i köttproduktionen genom dotterbolaget *Snow Brand Food* och – kanske inte helt förvånande – deras

lösning var att märka om Hokkaido-köttet så att det såg ut att komma från andra delar av Japan. Även detta upptäcktes, liksom en serie andra oegentligheter med importerat nötkött och griskött som sålts av företaget som japanskt. Det slutade med likvidation av dotterföretaget och *Snow Brand Milk* lär fortfarande ha problem med sin image i Japan.

Vegetabilier

Grönsaker i sig är sällan tillräckligt bra proteinkällor för stafylokockerna för att stimulera tillräcklig enterotoxinproduktion. Men proteinrika produkter som kokta bönor och ris är en av de vanligaste orsakerna till stafylokock-intoxikation i Asien. I Sverige hade vi ett fall där över hundra matgäster på ett ålderdomshem insjuknade efter att ha ätit ris som kokats dagen före och förvarats i rumstemperatur över natten, innan det blandades med apelsiner och grädde. Mer än en miljon stafylokocker konstaterades per gram apelsinris.

Det är alltså inte bara *B. cereus* som kan tillväxa i överblivit ris som förvaras i rumstemperatur utan även *S. aureus*, låt vara att det i det senare fallet krävs en infekterad kock.

Ett osannolikt fall

Våren 1989 inträffade en serie matförgiftningsutbrott i USA där de drabbade hade ätit allt ifrån hamburgare och pizza till omeletter och gratänger. Någon smittkälla bland personalen på de olika restaurangerna kunde inte hittas, däremot fann man efter ett tag en gemensam nämnare: alla produkterna innehöll konserverade champinjoner som importerats från Kina. Så småningom visades att konserverna gått ut över hela världen och att de orsakat förgiftning i många länder. Kontroller visade att värmesteriliseringen fungerat som den skulle. Men kunde det verkligen finnas kvar tillräckligt med enterotoxin för att orsaka en förgiftning från en helkonserv?
– Ja, om toxinhalten är mycket hög i utgångsläget så är det faktiskt möjligt, enterotoxinen inaktiveras visserligen vid 121°C men det sker med måttlig hastighet och i ett extremfall kan helkonserver utgöra en risk.

Vatten

Dricksvatten i alla dess former är garanterat ofarligt.

VIRULENSFAKTORER

Staphylococcus aureus producerar en otrolig mängd toxiner och andra virulensfaktorer som spelar en stor roll vid infektioner. Men i just matförgiftningsfall så är det bara en virulensfaktor som har betydelse, enterotoxinen.

Enterotoxiner

I dagsläget (2012) finns 21 huvudtyper av *S. aureus* enterotoxin (SE) beskrivna: de är betecknade med bokstäver enligt SEA-SEE (de fem klassiska enterotoxinen) samt SEG-SEV (de 16 nya enterotoxinen). Dessutom finns SEC i tre varianter (C1, C2 och C3) och SEU i två (U1 och U2).

Enterotoxinen är enkla, kompakta och ganska små proteiner på 25-29 kDa som har betydande värmeresistens. De förstörs inte av kokning och kan till och med klara några minuter vid autoklaveringstemperatur, 121°C. Av de klassiska fem enterotoxinen är SEA vanligast vid matförgiftningsfall. Av de nyare är det SEH som är vanligast. Det ska påpekas det hittills bara är SEG, SEH, SER, SES och SET av de nyare toxinerna som verkligen dokumenterats som äkta enterotoxiner. Det finns frågetecken för SEI som inte verkar ha någon cysteinloop och för SEL och SEQ som inte har någon emetisk effekt. De övriga nya toxinerna har ännu inte undersökts.

Den tydligaste följden av stafylokockernas enterotoxin är dess emetiska (kräkningsframkallande) effekt vilken åtminstone delvis kan kopplas till en speciell cysteinloop i proteinet. Men vad som egentligen sker vid matförgiftning är okänt, man vet inte vilka receptorer enterotoxinen binder in till i magen eller den övre delen av tarmen, och inte heller hur dessa signaler sedan stimulerar hjärnan så att kräkreflexen utlöses. Okänt är också varför en del insjuknade drabbas av diarré. Den främsta anledningen till okunskapen är att det saknats lämpliga djurförsöksmodeller. Det är nämligen i huvudsak primater som reagerar med uppkastningar på toxinen. På senare tid har man dock hittat näbbmusarter som reagerar på det emetiska toxinet, så forskningen kan vara på väg att intensifieras.

Bättre känt är verkningsmekanismen vid infektioner i sår. Enterotoxinen binder in till det som kallas klass II MHC molekyler (*Major Histocompability Complex*) som finns hos ett fåtal antigen-presenterande celler. Följden blir att aktiviteten hos T-cellerna (som ska ta hand om inkräktaren) provoceras långt över vad som

är bra för kroppen. Resultatet kan bli en fullständigt okontrollerad och livshotande kaskad av immunreaktioner. Här fungerar alltså enterotoxinen som så kallade superantigen. Men vid matförgiftning fungerar enterotoxinen lyckligtvis inte som superantigen.

Ett par av de enterotoxin som hittats på senare tid får man sätta ett frågetecken för, de betraktas som enterotoxin helt enkelt därför att de följer samma biokemiska och genetiska mall som de övriga. SEI, SEK, SEL och SEQ innehåller dock inte någon cysteinloop och de båda sistnämnda har inte heller någon emetisk effekt. Därför kanske det går för dessa som för ett långt tidigare beskrivet enterotoxin, ”SEF”: inte heller detta visade sig ha någon emetisk effekt eller disulfidloop och ”SEF” klassificerades redan på åttiotalet om till TSST-1, som står för *Toxic Shock Syndrome Toxin*.

I och för sig kan man ju fråga sig varför toxinen överhuvudtaget kallas *enterotoxin* eftersom effekten i första hand är emetisk och toxinen dessutom inte uppfyller något av de krav man idag ställer på ett enterotoxin. Men beteckningen har behållits av historiska skäl.

En del av de 18 generna är lokaliserade till kromosomen, andra kodas av plasmider. Gener för enterotoxinproduktion har hittats hos samtliga livsmedelsassocierade koagulaspositiva arter, men också hos enstaka stammar tillhörande 15 koagulasnegativa arter. Men att en stam har den genetiska kapaciteten att producera ett enterotoxin betyder inte nödvändigtvis att den producerar tillräckliga mängder för att orsaka förgiftning. Särskilt hos de koagulasnegativa arterna är produktionen i regel så låg att det är helt osannolikt att de utgör någon fara. Däremot är det odiskutabelt så att vissa stammar av *S. intermedius* kan orsaka matförgiftning.

PÅVISNING

Isolering av *S. aureus* från livsmedel

Baird-Parker konstruerade sitt klassiska medium för koagulaspositiva stafylokocker redan 1962 och Baird-Parker eller ETGPA (*Egg yolk Tellurite Glycine Pyruvate Agar*) som det också kallas, har hängt med som referensmedium alltsedan dess.

Baird-Parker innehåller (gram per liter): pepton 10, köttextrakt 5, jästextrakt 1, Na-pyruvat 10, L-glycin 12, LiCl 5 och agar 20. Efter autoklavering och avsvalning tillsätts per liter substrat: 10 mL 1 % K-tellurit samt 50 mL 20 % äggguleemulsion. Baird-Parker bör ytodlas för att underlätta efterarbetet och mediet inkuberas aerobt vid 37°C och avläses efter 24 timmar respektive 48 timmar.

S. aureus bildar (vid ytodling) svarta, konvexa och lite fuktiga kolonier som i kanten ofta har en ljus rand. På en platta utan alltför kraftig växt blir kolonierna ganska stora, 2-3 mm i diameter. Runt kolonierna bildas i regel två zoner, en grumlig utfällning och en uppklarnande zon som beror på proteolytisk respektive lipolytisk aktivitet gentemot äggulan. Ungefär 5 % av stammarna bildar inte någon uppklarnande zon och enstaka stammar ger inte heller någon utfällning. Majoriteten av stammarna ger ett typiskt utseende redan efter 24 timmar, men en del är långsamma och kräver 48 timmar. Nackdelen med att vänta 48 timmar är att en del andra bakterier i livsmedel kan ge svarta kolonier: kanske oftast andra stafylokocker (fast Baird-Parker är ganska selektivt just gentemot koagulasnegativa stafylokocker), *Bacillus*, Enterobacteriaceae och enterokocker.

Den svarta färgen på kolonierna beror på att telluritsaltet reduceras till tellur. Telluriten är hämmande mot många grampositiver och har i själva verket också en viss negativ inverkan också mot *S. aureus*, något som i mediet ska motverkas av pyruvaten. Glycin, den enklaste av alla aminosyror, är en utmärkt kolkälla för *S. aureus* som behöver mängder av just glycin i sin cellvägg, däremot är den faktiskt inte särskilt lättillgänglig för flertalet andra bakterier. Litiumkloriden finns med för att hämma gramnegativer.

Även de övriga koagulaspositiva arterna kan bilda svarta kolonier på Baird-Parkers medium, men zonerna runt kolonierna kan i vissa fall helt utebli.

Andra medier

Mannitol-saltagar bygger på en hög salthalt (7.5 %) kombinerat med *S. aureus* förmåga att bilda syra från mannitol. Mannitol är dock inte något särskilt effektivt sätt att skilja ut *S. aureus* från koagulasnegativa stafylokocker så mediet har fått ganska liten användning för livsmedelskontroll där det framför allt i köttvaror kan förekomma många andra stafylokockarter. Däremot är mediet populärt inom den kliniska verksamheten, från exempelvis tarmkanalen kan även ganska få stafylokocker isoleras fram eftersom nästan alla andra

tarmbakterier är saltkänsliga. En fördel med att använda mannitolbaserade medier är att enbart *S. aureus* av de koagulaspositiva arterna fermenterar mannitol.

Staphylococcal medium no 110 är en variation på temat. Pigmentering framträder ganska bra på detta medium (observera dock att pigmentet blir orange snarare än gult) av det enkla skälet att färgindikator för syrabildningen från mannitol saknas (för att kontrollera syrabildningen får man istället droppa på indikatorn efteråt).

Vogel-Johnsons medium, populärt i en del länder, bygger på ungefär samma princip som Baird-Parker, men innehåller dessutom mannitol. Mediet är lite hårdare, såväl mot *S. aureus* som mot konkurrerande bakterier. Det kan sammanfattas som så, att det som växer oftare är koagulaspositiva stafylokocker än på något annat medium, men att å andra sidan inte alla *S. aureus* klarar mediet.

Kranep-agar har också en likartad sammansättning men telluriten är utbytt mot tiocyanat vilket gör att även koagulasnegativa stafylokocker växer fram. Det är mindre selektivt än Baird-Parkers medium.

Identifiering

Biokemisk identifiering

Om kolonierna på Baird-Parker är typiska, nöjer man sig ofta med ett koagulastest. Testet innebär att man i ett rör blandar en kraftig bakterieymp med kaninplasma, som finns kommersiellt tillgänglig från flera tillverkare. Koagulas är ett protein som binder till fibrinogen i plasma och fäller ut det som fibrin. Det synliga resultatet är att plasman koagulerar. Röret inkuberas vid 37°C och avläses efter 4-6 timmar. Rör som är negativa efter denna tid avläses också efter 24 timmar. Att man inte nöjer sig med att endast avläsa efter 24 timmar beror på att vissa stammar bildar ett stafylokinas som fungerar åt andra hållet, alltså löser upp koaglet igen. Sådana stammar är positiva efter 4-6 timmar, men kan vara negativa efter 24 timmar.

Koagulaspositiva stafylokocker har traditionellt varit liktydigt med *S. aureus* men det finns som tidigare nämnts faktiskt ytterligare sju koagulaspositiva arter varav fyra kan finnas i animala livsmedel: *S. agnetis*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, och *S. pseudintermedius*; medan de övriga tre är av mer perifert

intresse: *S. delphini*, *S. lutrae* samt *S. schleiferi* ssp. *coagulans*.

Vill man säkerställa att det rör sig om *S. aureus* får man från Baird-Parker kompletta med mannitoljäsning och test av klumpningsfaktor (CF). Av de koagulaspositiva arterna är det bara *S. aureus* som är positiv för båda dessa tester. Observera dock att dessa båda tester inte kan ersätta koagulastestet eftersom det finns koagulasnegativa arter som både är CF-positiva och fermenterar mannitol.

Klumpningsfaktorn i sitt enklaste utförande innebär att en del av kolonin blandas med fysiologisk (0.9 %) NaCl-lösning på ett objektglas. Därefter tillsätts en droppe kaninplasma under fortsatt omrörning. CF-positiva stammar agglutinerar, d v s bildar korniga utfällningar, inom en minut beroende på att fibrinogenet i plasmat binds in till cellerna och får dem att klumpa samman. En negativ kontroll med bakterie plus vatten men utan plasma ska dessutom användas eftersom falskt positiva utfall (autoagglutination) kan förekomma. Dessa är speciellt vanliga vid höga salthalter och därför bör kolonier inte tas från selektiva medier som är baserade på höga salthalter typ Mannitol-saltagar. I övrigt kan vilka medier som helst användas. Det finns kommersiellt tillhandahållna produkter som tydliggör effekten: till exempel latexkulor eller röda blodkroppar som är utvändigt fodrade med fibrinogen. Plasma behöver då inte tillsättas. CF kallas ofta för "bundet koagulas" men det är ett uttryck om bör undvikas eftersom det är två helt olika mekanismer som aktiveras vid koagulastest respektive CF-test.

Om de koagulaspositiva kolonierna är gulpigmenterade är detta ett tydligt tecken på *S. aureus* eftersom de andra arterna är opigmenterade. Ofta testas hemolys på blodagar men detta test har inget värde för koagulaspositiva arter eftersom samtliga koagulaspositiva arter kan vara hemolytiska.

Annan påvisning och identifiering av bakterierna

Eftersom *S. aureus* tämligen enkelt och effektivt kan kvantifieras med klassiska metoder har det inte funnits något större behov av alternativa metoder. Givetvis kan bakterierna påvisas och identifieras med molekylärgenetiska metoder, men eftersom betydande halter av *S. aureus* kan accepteras i ett livsmedel, är det nödvändigt att även dessa metoder är kvantitativa. Sådana metoder finns beskrivna.

Påvisning av enterotoxinen

Sedan många år har det funnits kommersiellt tillhandahållna reagenser för immunologisk påvisning (latexagglutinering, ELISA, med flera) av SEA-SEE. Ofta kan dessa metoder även indela SEC i sina tre varianter, SEC_1-SEC_3. Enstaka tillverkare som Creative Diagnostics säljer även reagens för SEG, SEH och SEI. För övriga enterotoxiner finns immunologiska analyser ännu bara i forskningsvärlden. En del kommersiella kits är ganska osäkra med många falskt positiva svar.

De flesta av metoderna har en detektionsnivå i livsmedel på ca 1 nanogram enterotoxin per mL. En del av metoderna är automatiska och ger svar på någon timme.

Om immunologiska metoder kombineras med PCR förbättras både säkerheten och noggrannheten, immunokvantitav PCR kan klara av att detektera 10 pikogram enterotoxin.

Epidemiologi

PFGE har varit standard vid epidemiologiska undersökningar av *S. aureus* ända sedan slutet av 1980-talet.

Vibrio cholerae

– Tågluffaren från Bangladesh –

ÖVERSIKT

Epidemisk kolera dödar snabbt. Kolera orsakar en kopiös, vattnig diarré där den smittade förlorar mängder med vätska och redan efter ett par timmar riskerar att dö av uttorkning. Kolera har existerat i Gangesdeltat i Bangladesh i åtminstone 2500 år, men sjukdomen lyckades aldrig ta sig från den asiatiska kontinenten så länge hästar, kameler och segelfartyg var de enda transportmedlen. De resenärer som insjuknade hann helt enkelt dö på vägen. Först med ångfartyg och järnvägar fick koleran chansen att breda ut sig över andra kontinenter. Det gjorde den omedelbart, under 1800-talet spreds sex pandemier från Indien och Bangladesh till omvärlden. En sjunde pandemi pågår för fullt i Asien och Afrika.

När koleran för första gången lamslog Europa på 1830-talet, så blev det inledningen till en ständig närvaro. Dåliga hygieniska förhållanden medförde att koleran bet sig fast och även om pandemierna avlöste varandra under 1800-talet, var det som regel inhemska smittohärdar som låg bakom epidemiutbrotten. I Sverige noterades 11 epidemier under åren 1834-1874 vilka krävde 50 000 dödsoffer. I Europa som helhet räknades dödsoffren i miljoner. Att en helt frisk person kunde dö inom loppet av några timmar av den kopiösa diarrén ledde till en ofantlig rädsla för den smittsamma sjukdomen. I Sverige, som i många andra länder, vågade man ofta inte ens begrava offren på kyrkogårdarna utan inrättade särskilda kolerakyrkogårdar.

Läkaren John Snow klarlade redan 1854 att koleran smittade genom mänsklig avföring i dricksvatten. Hans utredning av kolerautbrottet på Broad Street i London, där 500 människor dog inom loppet av 10 dygn, och där epidemin upphörde när han stängde av en brunn med infekterat vatten, är dock mer berömd idag än den var under hans samtid. Snows slutsatser accepterades långtifrån överallt och först framåt sekelskiftet hade dricksvattenförsörjningen säkrats över större delen av Europa. Det räddade européerna från den sjätte pandemin som började utbredas 1899.

Den gamla klassiska kolerabakterien har sedan 1961, då den sjunde pandemin började, ersatts av en närbesläktad variant som kallas El Tor. Den tros ha spritts i åtminstone tre olika vågor från Bengaliska Viken över stora delar av planeten.

Men dessutom har en helt ny stam, Bengal, sedan 1992 spridits över den asiatiska kontinenten, möjligen är det inledningen till en åttonde pandemi vi nu ser i Asien. El Tor och Bengal är idag de enda stammarna som orsakar epidemisk kolera, som den svåraste koleraformen kallas. Utöver dessa två finns 200 andra serogrupper av *V. cholerae* som orsakar förhållandevis milda diarrésjukdomar. En del av dessa så kallade non O1/O139-stammar lever även i Östersjön. Infektioner i sår i samband med bad kan också förekomma vilket hände i Blekinge under den osannolikt varma sommaren 2006. Två personer insjuknade i en allvarlig infektion med *V. cholerae* non O1/O139.

BAKTERIEN

Släktet *Vibrio* består av böjda, gramnegativa, oxidaspositiva stavar som är mycket aktivt rörliga med hjälp av en polär flagell. De har både respirativ och fermentativ kapacitet och kan alltså leva i såväl aerob som anaerob miljö. Släktet är stort, det innehåller ett åttiotal arter som alla är naturligt förekommande i söt- och/eller saltvatten.

V. cholerae, som finns i söt- och bräckvatten, indelas i över 200 serogrupper på basis av cellväggens polysackarider (O-antigener). Det är endast två av serogrupperna, O1 och O139, som kan orsaka *epidemisk kolera*, den livshotande kolera som Världshälsoorganisationen försöker hålla kontroll på. Även en del av de övriga serogrupperna, som brukar sammanföras under beteckningen ”non-O1/O139”, kan orsaka diarrésjukdomar, men dessa är som regel milda och ska, enligt smittskyddsorganisationerna, inte betecknas som kolera i statistiken. Många av non-O1/O139-serogrupperna är för övrigt fullständigt harmlösa.

Serogrupp O1 omfattar två biotyper: dels den *klassiska* typen som troligtvis orsakade alla de sex första pandemierna, dels efterträdaren *El Tor* som är aktuell i den nu pågående sjunde epidemin. Den klassiska biotypen har inte påträffats sedan 1993 och verkar närmast utraderad. El Tor är mycket nära besläktad med den klassiska biotypen och båda biotyperna omfattar tre serotyper som betecknas *Ogawa*, *Inaba* och *Hikojima*. El Tor verkar vara något

mindre virulent än den klassiska typen, men tycks å andra sidan utsöndras under längre tid. Biotypen har fått sitt namn efter den plats där den 1905 först hittades, vid gränsstationen El Tor i Egypten som utgjorde en karantänsplats för pilgrimer på väg till Mecka.

Den sjunde pandemin började 1961, för en gångs skull inte i Indien eller Bangladesh, utan i Sulawesi i östra Asien. Därifrån spreds koleran under sextiotalet över den asiatiska kontinenten till Sovjetunionen, för att 1970 ta språnget över till Afrika. Från Nordafrika gjorde El Tor tillfälliga avstickare till Spanien 1970 och Italien 1973, men försvann därefter från EU. I östra Europa slår koleran däremot till då och då med flera hundra insjuknade. Det inträffade i Ukraina 1994-1995 och i Turkmenistan 2001-2002. I Afrika har den däremot blivit kvar och är idag endemisk i många länder. År 1991 tog sig El Tor över till Syd- och Centralamerika där den härjade under fyra år och även om den officiellt förklarades utrotad i Centralamerika 2003, så kan bakterien fortfarande hittas i kustvatten i stora delar av den amerikanska kontinenten ända upp till Mexikanska Golfen.

O139 uppträdde för första gången i Bangladesh 1992 och har nu spritts österut till ett tiotal asiatiska länder. Serogrupp O139 kallas också för *Bengal*-stammen. O1 och O139 sprids ganska ofta till nya kustområden då oceangående fartyg blåser sina ballasttankar, men det verkar som att de har svårt att få fäste i sådana nya miljöer. Man kan spekulera i att de möjligen utkonkurreras av inhemska stammar om de inte får chansen att explosivt förökas i människor.

Samtliga drygt 200 serogrupper av *V. cholerae* hör hemma i sötvatten eller i bräckvatten. Arten kan visserligen tolerera 4 % salthalt, men den är inte marin på det sätt som de övriga patogena vibrionerna som behandlas i nästa kapitel. I vattnet lever bakterierna tillsammans med cyanobakterier samt växt- och djurplankton. Särskilt hos copepoder (mikroskopiska kräftdjur) har höga halter kolerabakterier påträffats. Det har visats att O1-stammar mellan kolerautbrotten kan leva i en VNC (*Viable Not Culturable*)-form i plankton för att därefter övergå i en odlingsbar och virulent form, inte sällan efter tillväxt i djurplankton.

Olika serogrupper av non-O1/O139 kan påträffas över i stort sett hela världen, bland annat i Östersjön. Även om sådana stammar nästan aldrig producerar koleratoxin kan de undantagsvis orsaka svåra infektioner. Det kan tilläggas att inte heller alla O1/O139-stammar producerar koleratoxin, så är till exempel

den klon av El Tor som idag oftast isoleras i Japans kustvatten inte toxinproducerande och därför inte heller särskilt farlig. Att äta sushi i Japan är alltså tämligen riskfritt, åtminstone ur kolerasynpunkt.

Vibrio betyder egentligen ”vibrerande”, något som syftade på rörligheten hos de först upptäckta vibrionerna, men har numera fått en överförd betydelse som ”den böjda staven”. När Robert Koch isolerade *V. cholerae* 1883 tyckte han att bakterien såg ut som ett kommatecken och kallade den ”Kommabacillus”.

SJUKDOMEN

De flesta som får i sig O1 eller O139 blir faktiskt inte sjuka, trots att man ofta kan isolera bakterierna från de smittades avföring. Av dem som blir sjuka, utvecklar 9 av 10 en mild diarrésjukdom som spontanläker utan problem. Bara var tionde insjuknad utvecklar alltså de svåra och livshotande symtom som förknippas med kolera. I de asiatiska länder där kolerabakterierna nästan ständigt är närvarande, är det framför allt barn mellan 1 och 5 års ålder som drabbas. En genomgången infektion ger flerårig immunitet mot den aktuella serogruppen. När nya geografiska områden drabbas av en epidemi är åldersfördelningen jämnare och vuxna insjuknar lika ofta som barn.

Infektionsdos

Som vanligt är det lite vanskligt att ange en infektionsdos eftersom den kan variera kolossalt mellan olika individer och även med hur bakterierna intas. De flesta vuxna, friska individer med aktiv magsyra klarar av miljontals O1/O139 utan att insjukna. Den viktigaste barriären är just magsyran eftersom kolerabakterier är extremt känsliga för lågt pH och snabbt dör redan vid pH 5. Det innebär att individer som tar syrahämmande medicin är mycket mera mottagliga för infektion. Hos försökspersoner som getts bikarbonat har infektionsdosen varit så låg som 100 bakterier.

Dricksvatten är den vanligaste smittvägen i utvecklingsländer. Vid konsumtion av stora mängder vatten späds magsyran ut, vilket minskar infektionsdosen. Motståndskraften minskar också kraftigt vid undernäring, något som många i riskområdena lider av. Dessutom finns det faktiskt också en genetisk skillnad: personer med blodgrupp O drabbas mycket hårdare av såväl O1-El Tor- som O139-kolera (däremot inte av O1-klassisk kolera). Varför vet man inte, märkligt nog verkar det som att personer med blodgrupp O är *mindre* mottagliga (kräver högre infektionsdos) för El Tor-bakterierna.

Infektionsdosen för non-O1/O139-stammar är inte klarlagd, men antas vara hög, miljontals bakterier.

Inkubationstid och symptom

Inkubationstiden vid kolera är vanligtvis 1-3 dygn, men kan variera från 3-4 timmar till 5 dygn. Inkubationstiden vid infektioner med non-O1/O139 är vanligtvis 12-24 timmar. Dock har vissa serotyper en längre inkubationstid, ca 2 dygn med en spridning på 1-6 dygn.

Kolera kännetecknas av en vattnig diarré som varierar i intensitet, alltifrån en mild och snabbt övergående sjukdom till en våldsam diarré med stora vätskeförluster. Illamående och uppkastningar är andra vanliga symptom. Obehandlad kan den svåra formen leda till uttorkningssymptom med blodtrycksfall, muskelkramper, svag puls och inledningsvis extrem törst. Om ingen vätskeersättning snabbt ges blir patienten apatisk, förlorar medvetandet och kan dö som en följd av cirkulationskollaps, som regel under det första dygnet. Är vätskeförlusten mindre dramatisk pågår sjukdomen under ungefär en vecka varefter patienten oftast tillfrisknar. Behandling är i första hand vätskeersättning, vid mycket svåra symptom även antibiotika, framför allt tetracykliner mot vilka dock många kloner av bakterierna numera är resistenta. Klinisk, obehandlad kolera kan ha en dödlighet på 50 % men även med ganska små medel (oral vätske- och saltersättning) kan dödligheten sänkas till 1 %. Med modern sjukhusvård sänks dödligheten till långt under 1 %.

Infektioner med non-O1/O139 kännetecknas för det mesta av relativt milda, vattniga diarréer som spontanläker inom en vecka. Undantagsvis kan blodblandade diarréer förekomma och hos människor med nedsatt immunförsvar kan infektionen övergå i blodförgiftning och då i sällsynta fall vara dödlig.

Incidens

Koleran är ”naturligt” endemisk bara i Indien och Bangladesh. För närvarande (2012) finns dock smitta i mycket stora delar av både Asien, Afrika och Karibien. Varje år inträffar flera större utbrott av kolera och i den officiella statistiken drabbas varje år åtminstone 100 000 människor varav 3 000 dör. Som vanligt är mörkertalet betydande och det verkliga antalet beräknas till i storleksordningen 5 miljoner fall per år med kanske 100 000 döda. Behandlingen med vätskeersättning har ändå lett till en dramatisk förbättring

jämfört med situationen för 25 år sedan, då runt 3 miljoner dog varje år.

I Afrika började koleran få ett större fotfäste 2006 och under 2-4 år hade de fem hårdast drabbade länderna; Angola, Etiopien, Kongo, Nigeria och Zimbabwe, vardera över 100 000 fall registrerade fall. Dödstalen var strax under 3 %. Afrika har fortfarande problem men de är mindre akuta 2012.

I oktober 2010 kom nästa stora utbrott. Det drabbade Haiti som på 15 månader inregistrerade över en halv miljon kolerafall. Koleran spreds under vintern/våren 2012 även till grannlandet, Dominikanska Republiken, som ligger på samma ö (Hispaniola).

Inom EU förekommer kolera huvudsakligen som importfall från resor till exotiska länder. I Sverige har Smittskyddsinstitutet de senaste tio åren (2002-juni 2012) registrerat 6 fall. I södra Italien och Spanien förekommer enstaka inhemska fall till följd av konsumtion av skaldjur eftersom serogrupp O1 i viss utsträckning förekommer i Medelhavet.

Infektioner med non-O1/O139 anses utgöra 2-3% av det totala antalet infektioner med *V. cholerae*. De leder sällan till några allvarligare komplikationer, men en svensk kvinna insjuknade för några år sedan i en allvarlig infektion efter att ha badat i en pool fylld med Östersjövatten. Tre finländare drabbades också för några år sedan av en mycket allvarlig non-O1/O139-infektion. En av de insjuknade dog.

Kolera på cellnivå

Om kolerabakterierna lyckas ta sig igenom magsyran möts de av en god tillväxtmiljö i tunntarmen. Kolerabakterierna är påtagligt resistenta mot gallsalter, de verkar till och med aktiveras av gallsalterna. Genom sin aktiva rörlighet når de snabbt genom mukuslagret, möjligen med hjälp av mukusnedbrytande enzymer. Vid kontakten med epitelcellerna adherar bakterierna, dels genom långa knippe-bildande fimbrier som kallas *TCP-pili*, dels genom yttre membranproteiner kallade *acf*. Efter adhesionen till epitelcellerna frigörs neuramidas, ett enzym som modifierar en hormonreceptor på värdcellen till en specifik koleratoxinreceptor, GM1. Till GM1 binder en del av *koleratoxinet* (B-delen) varefter själva toxinet (A1-delen) frisläpps in i värdcellen. Här aktiverar koleratoxinet värdcellens egna adenylatcyklaser, enzym som sätter igång en kedjereaktion som slutar med att stora mängder vatten och elektrolyter frigörs från cellerna ut i tarmkanalen. Det

är den kraftiga förlusten av vätska och elektrolyter som utgör själva diarrén.

LIVSMEDEL: TILLVÄXT

V. cholerae sprids till livsmedel huvudsakligen genom mänsklig avföring (vatten, grönsaker) eller genom anrikning i levande fisk och skaldjur. Det är däremot mycket sällsynt att kolerabakterierna tillväxer i själva livsmedlet.

Temperatur

Kolerabakterierna är utpräglat mesofila och tillväxer bara inom området 15 till 42°C.

Syre

Kolerabakterierna har både respirativ och fermentativ kapacitet och kan därför åtminstone teoretiskt förökas även i vakuumförpackad fisk och skaldjur.

pH

Kolerabakterierna är extremt känsliga för låga pH-värden och fermenterade livsmedelsprodukter, med pH under 4.5, är därför helt säkra att äta.

Saltning och rökning

Kolerabakterierna tål salt men är extremt känsliga för uttorkning. Rökta och torkade livsmedel är därför helt säkra.

LIVSMEDEL: PRODUKTER

Kolerabakterier är vattenburna och det finns två smittvägar: avföring från smittade människor till dricksvatten, samt naturligt förekommande kolerabakterier i sjö- och havsvatten som sprids till fisk och skaldjur.

Kött

Kött och ägg är inte utsatta för någon av de två smittvägarna och betraktas därför som säkra livsmedel.

Fisk och skaldjur

Fisk och skaldjur kan smittas av i vatten naturligt förekommande kolerabakterier. I industrialiserade länder som har O1 utanför kusterna (till exempel södra USA och Medelhavsländerna) är råa eller dåligt kokta skaldjur den dominerande orsaken till kolera. Särskilt ostron är en riskfaktor men det

ska samtidigt poängteras att sådana fall, som alltid drabbar enskilda hushåll, är mycket ovanliga. Infektioner med non-O1/O139 i västvärlden är nästan uteslutande orsakade av fisk och skaldjur. Till och med i Norge har non-O1/O139 påträffats i omkring 1 % av de odlade musslorna.

Mejeriprodukter

Liksom kött och ägg är mejeriprodukter helt ofarliga.

Vegetabilier

Grönsaker och frukt som sköljts i avloppsförorenat dricksvatten är avgjort en riskfaktor i länder med grasserande epidemisk kolera. Att västlänningar skulle få epidemisk kolera till följd av importerade vegetabilier är däremot extremt osannolikt även om det har förekommit: frusen kokosmjölk från Thailand och fruktberedning från Ecuador har orsakat smärre utbrott i USA.

Vatten

Förorenat dricksvatten är den helt dominerande orsaken till epidemisk kolera. För att en epidemi ska utvecklas krävs dock mycket dåliga sanitära förhållanden med kontaminering av dricksvatten från avloppsvatten och dessutom bristfällig klorering av dricksvattnet.

Ett skepp kommer lastat?

Den 23 januari 1991 insjuknade flera personer i Chancay, en liten hamnstad på 20 000 invånare några mil norr om Lima, i en voluminös diarré som åtföljdes av uppkastningar och en kraftig muskelvärk. Från deras avföring konstaterades *V. cholerae*, biotyp El Tor, serotyp Inaba. Nyheten slog ned som en bomb. Smittskyddet i Lima larmades och kom till platsen 31 januari.

Inledningsvis hade myndigheterna svårt att ta till sig informationen, eftersom Sydamerika hade varit fritt från kolera i över hundra år. Men uppgifterna om bakteriernas identitet bekräftades av amerikanska Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Nya utbrott kunde konstateras i fyra andra peruanska kuststäder och den 9 februari började man ana att man fått ett gigantiskt problem på halsen. Då hade 1859 människor insjuknat varav 66 avlidit. Myndigheterna försökte stoppa spridningen genom massmedia: i fortsättningen måste allt dricksvatten kokas, frukter måste skalas och grönsaker tvättas i kokt vatten, skaldjur fick inte ätas råa, och så vidare.

Men epidemin gick inte att hejda. Den skulle under loppet av ett par år spridas över i stort sett hela Syd- och Centralamerika och drabba över 1.3 miljoner människor. Epidemin satte fokus på fattigdom och dåliga hygieniska förhållanden i många av länderna. Att epidemin fick en så explosiv utveckling var delvis en följd av bristfällig eller obefintlig rening av avloppsvattnet. Avloppsvattnet kontaminerade ytvattentäkter som användes som dricksvattenkällor. Många av dessa låg utanför myndigheternas kontroll eftersom ett av problemen var att dricksvattenförsörjningen ofta var groteskt underdimensionerad. Lima, med sina 8 miljoner invånare, hade till exempel en dricksvattenförsörjning avsedd för en kvarts miljon människor. Men inte ens kommunala dricksvattentäkter fungerade alltid som de skulle, under resans gång upptäcktes att många orter i strid med lagen inte klorerade sitt dricksvatten.

Epidemin satte fokus på problemen och kanske inte helt oväntat försvarade sig politikerna med att koleran på ett eller annat sätt var följden av utomståendes misstag. En teori som lanserades, och som fortfarande är mycket gångbar i Sydamerika, var att kolerabakterierna hade följt med ett kinesiskt fraktskepp som olagligt hade blåst sina ballasttankar i Limas hamn och därmed gett upphov till epidemin.

Att epidemin i själva verket startat på fem olika platser nästan samtidigt gör teorin mindre sannolik. En mer sannolik teori går ut på att bakterierna förts in av *El Nino*, den gigantiska vattenström som med några års mellanrum länkas av från ekvatorn ned över Sydamerika. Ett par veckor före det första utbrottet hade *El Nino* nått Peru och det varma vattnet hade gett upphov till kraftiga blomningar av cyanobakterier.

Oavsett hur bakterierna nått Sydamerikas kust så var det den dåligt fungerande infrastrukturen som gav epidemin tillfälle att blossa upp. Det enda positiva inslaget var att man på de flesta håll kunde ge effektiv vätskeersättning och antalet döda stannade därför på omkring 10 000, det vill säga mindre än en procent av de kolerasjuka.

VIRULENSFAKTORER

Det finns självfallet flera faktorer som påverkar O1/O139-stammarnas virulensförmåga, men för ovanlighetens skull kan man kondensera de absolut nödvändiga till två: kolera-enterotoxin och de adhesionspili som kallas TCP.

Utan dessa två blir bakterierna ofarliga.

Adhesionsförmågan är inte bara kopplad till TCP, men även om många tror att en rad yttre membranproteiner (OMP = *Outer Membrane Proteins*) spelar roll för inbindningen till värdcellerna, är mekanismen inte känd.

Non-O1/O139 bildar inte koleratoxin och varför de ändå i vissa fall kan framkalla diarré är inte klarlagt. Två misstänkta toxiner, Ace (*Accessory cholera enterotoxin*) och Zot (*Zonula occludens toxin*), som även bildas av non-O1/O139-stammar, verkar numera ha avförts ur diskussionen.

Kolera enterotoxin

Koleratoxinet är ett sammansatt protein (AB_5-protein) på totalt 84 kDa. A-delen omfattar dels det egentliga toxinet (A1) på ca 23 kDa, dels ett litet protein på 5 kDa (A2) som förbinder A1 med de 5 B-enheterna på drygt 11 kDa vardera. Liknande AB_5-toxiner finns hos *E. coli* (LT-toxin och Shiga-toxin) och *Bordetella pertussis* (kikhostetoxin).

Det är B-proteinet som binder in till de av *neuramidaset* modifierade gangliosidreceptorerna. Därefter splittras en disulfidbindning mellan A1 och A2 varefter det frigjorda A1 kan passera in i epitelcellen. Där aktiverar A1 enzymet adenylatcyklas i tunntarmens epitelceller. Resultatet blir en svår diarré genom en kraftig utsöndring av vatten samt natrium-, kalium-, klorid- och karbonatjoner. Koleratoxinet är nästan identiskt med kolibakteriernas LT1-toxin och de vaccin som finns tillgängliga är verksamma mot båda. Koleratoxinet kodas av en bakteriofag som är lokaliserad i den stora kromosomen hos bakterien (kolerabakterierna har två kromosomer). Under vissa omständigheter kan bakteriofagen exporteras och finnas i fri form utanför bakterien. Sådana koleratoxin-bakteriofager kan sedan infektera andra stammar av *V. cholerae*, men endast om dessa bildar TCP.

Neuramidas = invasin

Under koloniseringsfasen bildar kolerabakterierna enzymet neuramidas som ibland går under beteckningen *invasin*. Neuramidaset bryter delvis ned de gangliosider som finns på ytan av tunntarmens epitelceller och som bland annat fungerar som receptorer för hormoner. Gangliosiderna övergår i en enklare form, monosialosyl-gangliosid (GM1-gangliosid) och det är denna form som utgör receptorn för koleratoxinets B-del.

TCP = Toxin Coregulated Pili

Kolerabakterierna producerar pili som är helt nödvändiga för virulensen. Dessa pili bildar knippen (*bundles*) och de är strukturellt mycket lika de "*bundle forming pili*" som bildas av enteropatogena *E. coli*.

Hos kolera kallas de TCP eftersom de regleras samtidigt med koleratoxinet. Utöver att de har betydelse för adhesionen så är de en förutsättning för att kolerabakterierna ska bilda mikrokolonier på epitelcellerna. Dessutom tjänstgör TCP även som en specifik receptor för den bakteriofag som kodar för koleratoxinet. Koleratoxinet kan därför enbart spridas mellan TCP-positiva stammar.

Samtidigt med att TCP bildas, överförs en rad lösliga proteiner och åtminstone ett av dem, kallat Tcpf, tycks ha betydelse för adhesion. I naturliga, akvatiska system har det nyligen visats att såväl TCP och Tcpf är absolut nödvändiga för kolerabakteriernas förmåga att bilda biofilmer och därmed kunna tillväxa.

PÅVISNING

Isolering av *V. cholerae*

Det klassiska referensmediet är TCBS. Vid kvalitativ analys anrikas bakterierna i alkaliskt peptonvatten vid 42°C under 18 timmar. Mediet innehåller (gram per liter): pepton 10, jästextrakt 3, NaCl 20 och pH justeras till 8.6. Därefter stryks material ut på en selektiv agar, TCBS (*Thiosulfate Citrate Bile Sucrose*) som inkuberas aerobt vid 37°C under 24 timmar. Kvantitativ bestämning sker genom ytodling direkt på TCBS som inkuberas aerobt vid 37°C under 48 timmar. Avläsning bör ske efter både ett och två dygn.

TCBS innehåller bland annat torkad oxgalla, en produkt med varierande sammansättning. Mediet bör därför köpas direkt från en större tillverkare som har bättre möjlighet att upprätthålla en jämn kvalitet. TCBS från olika tillverkare har en något varierande sammansättning då en del tillverkare ersätter en del av oxgallan med deoxykolat. TCBS från Oxoid innehåller (gram per liter): pepton 10, jästextrakt 5, Na-citrat 10, Na-tiosulfat 10, oxgalla 8, sukros 20, NaCl 10, Fe-citrat 1, tymolblått 0.04, bromtymolblått 0.04, agar 14. Efter kokning av mediet ställs pH till 8.6.

V. cholerae och även många andra vibrio växer bra på mediet och bildar 2-3 mm stora, gula kolonier. De flesta andra bakterier som kan växa bildar som regel mindre eller blåaktiga kolonier.

Identifiering

Biokemisk identifiering

Oxidastest (*V. cholerae* är kraftigt positiv inom 10 sekunder) är standardtest vid kontroll av kolonier från TCBS. Före oxidastestet måste kolonierna strykas om på exempelvis nutrientagar eftersom ett oxidastest direkt från TCBS kan ge felaktigt resultat.

Vid kontroll av fisk och skaldjur är det vanligt att andra vibrio-arter samt aeromonas växer på TCBS. *V. cholerae* kan skiljas från marina patogena vibrio-arter (nästa kapitel) genom saltbehovet: *V. cholerae* behöver ingen salt alls och klarar inte att växa i 6 % NaCl, medan de marina arterna inte kan växa utan salt men klarar att växa i 6 % NaCl. Differentiering gentemot aeromonas bygger vanligtvis på det så kallade 0129 vibriostatikum (2,4-diamino-6,7-di-isopropylpteridinfosfat). Aeromonas är resistent mot åtminstone 150 μg av detta ämne medan vibrio är känsligt, oftast faktiskt mot så låg halt som 10 μg. Färdigberedda antibiotikadiskar med 10 respektive 150 μg 0129 finns tillgängliga från Oxoid. Det ska dock påpekas att enstaka stammar av El Tor faktiskt visats sig vara resistenta mot 150 μg 0129.

Isolat som är biokemiskt identifierade som *V. cholerae* testas för antiserum mot serogrupperna O1 och O139. Agglutinering bör inte utföras från direkt TCBS-agar eftersom denna tenderar att ge upphov till autoagglutinering. Antiserum finns kommersiellt tillhandahållet för såväl latexagglutinering som ELISA.

Vidare arbete bör utföras av referenslaboratorium och det omfattar dels biotypning och dels noggrannare serotypning. Biotypning är bara aktuellt med serogrupp O1 och omfattar vanligtvis resistens mot polymyxin, Vogues-Proskauer-test samt hemagglutinering av röda blodkroppar från kyckling. El Tor är positiv för samtliga dessa tester medan den klassiska biotypen är negativ. Hemolys, som tidigare användes, är däremot inte någon bra test eftersom de nyare klonerna av El Tor har tappat sin hemolysförmåga.

Det kan tyckas onödigt att biotypa O1 om nu den klassiska biotypen anses

utdöd. Men dels är det nödvändigt att observera förändringar som kan uppkomma, dels finns det faktiskt stammar som uppvisar ett avvikande biokemiskt mönster. Dessa så kallade Matlab-stammar (efter den provins i Bangladesh där de först upptäcktes) har dock ännu inte hittats utanför Asien.

De isolerade stammarna kan sedan serotypas vidare genom sina antikroppar mot tre specifika O1-antigen, och på så sätt indelas i serotyperna Ogawa, Inaba och – mycket sällsynt – Hikojama.

Molekylärgenetiska metoder

Toxinproducerande *V. cholerae* kan påvisas direkt i livsmedel och vatten genom PCR-metoder, varav det finns en uppsjö beskrivna i litteraturen. De flesta riktas mot de gener som kodar AB-toxinet, men det finns även metoder som följder biotyperna.

Epidemiologi

V. cholerae indelas i över 206 serogrupper, men eftersom bara två av dem är aktuella vid epidemisk kolera, så är serologin ingen användbar epidemiologisk metodik. För O1 finns ett fagtypningsschema omfattande 150 fagtyper, medan O139 ännu så länge bara omfattar sex varianter. Fagtypning har på senare år kompletterats och delvis ersatts med ribotypning. PFGE har hittills använts ganska sparsamt, men har i kolerautbrott visats kunna särskilja stammar som vid ribotypning uppfattats som kloner och har också framgångsrikt använts för att studera Matlab-stammar. En standard för PFGE-typning av *V. cholerae* inom PulseNet-programmet finns.

Vibrio: de marina arterna

– Ostronförgiftarna –

ÖVERSIKT

Två marina vibrio-arter är betydande livsmedelspatogener: *V. parahaemolyticus* och *V. vulnificus*. Parahaemolyticus-enterit innebär en smärtsam, men ändå ganska beskedlig och kortvarig diarré. Sjukdomen orsakas av ett enterotoxin som bakterien producerar i tarmen.

Vulnificus-enterit är den mest dödliga livsmedelsinfektion som existerar. Bakterien producerar inget enterotoxin, det är i stället själva cellväggen (”endotoxinet”) som gör det möjligt för bakterien att invadera och orsaka sjukdom.

Den värmekrävande *V. parahaemolyticus* är oerhört vanlig i kustområdena i Indiska Oceanen och ganska vanlig även i de övriga oceanerna, förutsatt att vattentemperaturen ligger över 15°C. Den största risken för svenskar att drabbas av parahaemolyticus-enterit är att äta råa blötdjur, skaldjur eller fisk på turistresor i Asien. Även kokta räkor och krabba kan vara riskabelt i Asien, visserligen dör *V. parahaemolyticus* snabbt vid kokning, men i synnerhet jätteräkor blir lätt underkokta eller återkontaminerade. På hemmaplan har vi haft ett par större utbrott där importerade asiatiska flodkräftor varit orsaken. I de fallen tros vattnet som kräftorna kylts i varit infekterat.

I USA och Sydeuropa orsakas parahaemolyticus-enterit nästan alltid av råa ostron. År 1996 uppträdde i Asien en helt ny stam av bakterien, serotyp O3:K6. Denna stam har sedan dess spritts över i stort sett hela världen och orsakat en betydande uppgång av antalet parahaemolyticus-enteriter.

V. vulnificus är ännu mera värmekrävande och behöver minst 20°C för att tillväxa. Vulnificus-enterit är fruktad på grund av sitt aggressiva förlopp som ofta slutar i en svårbehandlad blodförgiftning. I den mest utsatta gruppen, människor med leversjukdomar, dör hälften av de insjuknade. Trots att

vulnificus-enterit är mycket ovanlig, dör fler amerikaner i de fem delstaterna längs mexikanska golfen av sjukdomen än av någon annan form av matförgiftning. Vulnificus-enterit är närmast uteslutande kopplad till konsumtion av råa ostron. Sjukdomen är extremt ovanlig i Europa men bakterierna förekommer i Medelhavet under somrarna.
På grund av sina temperaturkrav förekommer bakterierna normalt inte längs den svenska kusten. Såväl *V. parahaemolyticus* som *V. vulnificus* har dock vid enstaka tillfällen hittats i svenskt kustvatten under varma somrar. De har då troligtvis förts hit av oceangående fartyg som blåst sina ballasttankar här.

BAKTERIERNA

Släktet *Vibrio* har redan beskrivits i det föregående kapitlet. Släktet omfattar såväl sötvattensarter som marina arter. Släktet har till skillnad från de flesta andra bakterier sitt DNA fördelat på två kromosomer, en större och en mindre. Många sötvattensarter, som till exempel kolerabakterierna, kan mycket väl klara sig i havsvatten, men de har inget behov av salt. De marina arterna har däremot ett absolut krav på salt och kan inte leva i sötvatten. Det finns ett tiotal marina vibrio som anses potentiellt patogena, men det är bara två som man med säkerhet vet orsakar enteriter: *V. parahaemolyticus* och *V. vulnificus*. Båda arterna är värmekrävande och finns framför allt i kusttrakter med varmt vatten. Ett problem vid påvisning av framför allt *V. parahaemolyticus* är att 98-99 % av stammarna är fullständigt ofarliga. Vid kvantifiering är det därför nödvändigt att påvisa de kända virulensfaktorerna.

V. parahemolyticus kräver en vattentemperatur på 15°C för att tillväxa, *V. vulnificus* 20°C. Det betyder att de inte normalt hör hemma i nordiska vatten, men de sprids över jordklotet med fartygens ballasttankar. Om bakterierna släpps ut i svenska farvatten under sommarmånaderna är det inget som hindrar att de förökar sig och båda bakterierna har påträffats i Hallands, Skånes och Blekinges kustvatten. De förökar sig bäst i filtrerande blötdjur som ostron och musslor, men de förekommer också i kräftor, krabbor, räkor och ibland även i fisk. En alternativ förklaring har förts fram, nämligen att bakterierna överlever vintern genom att tas upp i tarmen hos sjöfåglar som lever på fisk.

SJUKDOMARNA

Infektionsdos

I USA har Food and Drug Administration (FDA) uppfattningen att det krävs minst en miljon *V. parahaemolyticus* för att orsaka diarré. Men som framgår av fallbeskrivningen *En ovanligt varm sommar* har sjukdomsfall satts i samband med betydligt lägre halter än så. Som vanligt, är man frestad att säga, verkar infektionsdosen variera.

För *V. vulnificus* är infektionsdosen hos friska individer inte känd, men hos personer i riskgruppen kan ett tiotal bakterier vara tillräckligt för att orsaka enterit. Riskgruppen är framför allt individer med mycket höga järnvärden i blodet, till följd av kroniska leversjukdomar. Dessa löper enligt FDA 80 gånger större risk att insjukna och 200 gånger större risk att dö än friska individer. Även immunförsvagade människor och diabetessjuka löper en större risk att insjukna. Däremot verkar östrogen i viss mån skydda mot bakteriernas endotoxin och fertila kvinnor är därför mera resistenta mot bakterien.

Inkubationstid och symptom

De flesta som insjuknar i parahaemolyticus-enterit får symptom redan inom det första dygnet: genomsnittstiden enligt en stor undersökning är 16 timmar med en spridning från 12 till 96 timmar. I undantagsfall kan inkubationstiden vara så kort som 2-4 timmar. Symptomen är en vattnig diarré som bara i undantagsfall är blodblandad. Till skillnad från vad som är fallet vid kolera är diarrén smärtsam, nästan alla insjuknade drabbas av magsmärtor. Ungefär hälften blir illamående och kräks och nästan lika många får huvudvärk. En lätt feber kan också förekomma. Komplikationer är sällsynta, men de som har blodblandad diarré kan utveckla en blodförgiftning som dock sällan är farlig.

Även vid vulnificus-enterit är inkubationstiden i genomsnitt 16 timmar. Sjukdomen börjar som en enterit, men bakterierna sprids sedan ofta till blodet varifrån bakterierna ger upphov till typiska, missfärgade svullnader på huden. Ungefär 70 % av de infekterade får sådana svullnader. Blodförgiftning som följs av fysiologisk chock med organkollaps är en del av den kliniska bilden. Amerikansk statistik visar att 90 % av samtliga som drabbas av vulnificus-diarré behöver sjukhusvård och att 35 % dör. Samtidigt kan man konstatera att hos personer i riskgruppen är antalet döda 55 %.

Bryter vi ned siffrorna så förefaller det som att risken för i övrigt fullt friska individer att *smittas* av *V. vulnificus* är mycket liten, men att risken att dö om man väl insjuknat är hög: uppemot 20 %. Det är visserligen betydligt lägre risk än för människorna i riskzonen, men fortfarande en långt högre dödlighet än för någon annan livsmedelsassocierad sjukdom. Även om man överlever infektionen kan komplikationerna bli förfärliga, amputationer av armar eller ben är inte sällan nödvändiga, och angriper bakterierna ögonen kan följden bli blindhet. Om tung antibiotika sätts in i ett tidigt skede kan infektionen hävas, men om infektionen har nått ett visst stadium kan patienten inte räddas ens med intensivvård.

En del av dem som insjuknar av vulnificus-blodförgiftning blir infekterade via sår, ofta genom bad eller simning i kontaminerade vatten.

Incidens

Parahaemolyticus-enterit är mycket vanlig i Asien. Flera av de industrialiserade länderna där uppger att närmare hälften av alla livsmedelsburna infektioner orsakas av *V. parahaemolyticus*. Allra vanligast tycks bakterien vara i Taiwan: enligt en studie som omfattade 100 000 laboratoriebekräftade fall orsakade *V. parahaemolyticus* 86 % av enteriterna. I dessa länder är det ofta återinfekterade kokta skaldjur som är orsak till infektionerna och det rör sig nästan alltid om sporadiska fall.

Före spridningen av den pandemiska O3:K6-stammen var *V. parahaemolyticus* ovanlig utanför Asien. I USA har O3:K6 medfört att *V. parahaemolyticus* på kort tid gått från en undanskymd plats i statistiken till att vara den vanligaste enteriten som orsakas av skaldjur. I USA är det huvudsakligen råa ostron som orsakar utbrotten. O3:K6 förekommer numera även på södra halvklotet där *V. parahaemolyticus* tidigare aldrig varit något problem. Särskilt i Sydamerika och då främst Chile tycks den pandemiska stammen ha etablerats och orsakar där vissa år tiotusentals sjukdomsfall.

Även i Afrika tros O3:K6 orsaka många sporadiska fall som dock vanligtvis går obemärkta förbi. Konsumtion av råa, torkade räkor anses där vara den kanske vanligaste spridningsvägen. I Europa har *V. parahaemolyticus* tidigare nästan helt lyst med sin frånvaro, men O3:K6 tycks ha etablerats i åtminstone Frankrike där ostron har blivit den vanligaste orsaken till enteritfall. Även Spanien och Italien har haft enstaka utbrott. I Sverige har vi aldrig haft något

inhemskt fall. Vattentemperaturen är i regel för låg vilket anses skydda oss, men att vi inte kan gå säkra visar ett fall med många insjuknade på ett kryssningsfartyg där ostronen var skördade i Alaska. Just vid skördetillfället var vattentemperaturen över 15°C.

Vulnificus-enterit är ovanlig även i Asien, i Japan beräknar man att ungefär 500 människor insjuknar varje år men då är även sårinfektioner medräknade. Utanför Asien är vulnificus-enterit mycket ovanligt, men trots det så dör 20-25 amerikaner varje år av sjukdomen i de fem stater som omges av Mexikanska Golfen. Till detta kommer en del dödsfall från Atlanten och Stillahavskusten. Nästan alla insjuknade har ätit råa ostron och nästan alla har kroniska leversjukdomar, vilket Food and Drug Administration (FDA) beräknar att 10 % av befolkningen har.

Sjukdomarna på cellnivå

Parahaemolyticus-enterit orsakas av att bakterierna adherar till tarmcellerna och där utsöndrar ett enterotoxin, vanligtvis antingen TDH eller TRH, som orsakar en vattnig diarré genom att påverka kloridbalansen hos värdcellerna. Förmodligen finns även andra virulensfaktorer, åtminstone vissa stammar kan döda tarmcellerna genom att specifika, ännu okända, proteiner injiceras i cellerna genom ett typ tre-sekretionssystem (T3SS).

Mekanismen vid vulnificus-enterit är okänd. Man vet att bakterierna adherar till tarmcellerna, men inte varför diarrén uppkommer. Hur bakterierna sedan tar sig igenom tarmbarriären och når blodbanorna är inte heller känt. Den svåra blodförgiftning som ofta blir följden av en enterit har sannolikt samband att kroppen reagerar på bakteriens cellvägg, de så kallade endotoxinerna. Såväl de vanliga lipopolysackariderna i cellväggen och, kanske framför allt, de kapsulära lipopolysackariderna som en del stammar producerar, verkar fungera som potenta endotoxiner.

LIVSMEDEL: TILLVÄXT

Eftersom båda arterna kräver betydande mängder salt och dessutom är utpräglat mesofila, är tillväxt i livsmedel ganska osannolik. I råa ostron och musslor sker normalt i stället en avdödning av bakterierna under lagringen.

Temperatur

På laboratoriet tillväxer *V. parahaemolyticus* inom temperaturintervallet 10-43°C, men i livsmedel är tillväxt under 15°C knappast möjlig. *V. vulnificus* tillväxer inom området 20-43°C.

Syre

Båda arterna är fakultativa anaerober och kan alltså växa både med och utan syre, men som de flesta gramnegativer är de koldioxidkänsliga och tillväxt i vakuumförpackade livsmedel är därför osannolik.

pH

Båda arterna är tämligen syrakänsliga och växer bäst inom pH-området 6-8. Fermenterade livsmedel, med pH nedåt 4.5, är därför helt säkra vad gäller tillväxt.

Saltning och rökning

Bakterierna är ovanliga såtillvida att de kräver salt för att tillväxa, helst flera procent. *V. parahaemolyticus* växer vid 0.5-9 % salthalt, *V. vulnificus* vid 0.5-6 % salthalt.

LIVSMEDEL: PRODUKTER

V. parahaemolyticus och *V. vulnificus* förekommer bara i havslevande fisk och skaldjur. Samtliga andra livsmedelsprodukter är ofarliga. Frekvensen positiva fynd i fisk och skaldjur beror på havsvattnets temperatur, ju högre temperatur desto högre frekvens. I princip går gränsen vid 15°C för *V. parahaemolyticus* och vid 20°C för *V. vulnificus*. Det betyder att båda bakterierna kan förekomma även i svenska vatten under högsommaren. Hittills har dock inga kända sjukdomsfall orsakats av svenska skaldjur.

Fisk och skaldjur

V. parahaemolyticus är mycket vanliga i fisk och skaldjur i varma vatten. Över 90 % av de skaldjur som fångas i Indien och på många andra håll i Asien innehåller bakterien. I USA och Chile är frekvensen 50-80 % medan den är 10 % i Medelhavet. Kanske mera överraskande är att även 10 % av de norska blåmusslorna innehåller *V. parahaemolyticus* enligt en studie. Ser vi enbart till andelen virulenta stammar sjunker siffrorna snabbt; i såväl Indien som USA och Chile innehåller omkring 10 % av skaldjuren (20 % av ostronen) THD vilket

delvis reflekterar att dessa länder i huvudsak härbärgerar den pandemiska stammen O3:K6. I Norge innehöll 0.5 % av blåmusslorna virulenta stammar, samtliga dessa producerade TRH.

För *V. vulnificus* är förhållandet ungefär detsamma, i Asien är det mycket vanligt att över 50 % av musslorna och ostronen innehåller bakterien. Ibland kan halterna dessutom vara mycket höga, över 100 000 per gram. I USA har i vissa undersökningar 100 % av ostronen i Mexikanska Golfen innehållit små mängder av bakterien. I Italien har två undersökningar visat på 3 % respektive 18 % förekomst av bakterien i musslor. Den norska blåmusselundersökningen påvisade *V. vulnificus* i 1 fall av 885 (0.1 %).

En ovanligt varm sommar

I juli 1997 noterades en ovanlig topp i parahaemolyticus-enteriter i British Columbia på den kanadensiska västkusten. Intervjuer med ett femtiotal insjuknade visade att ungefär 90 % hade ätit råa ostron och resten hade ätit andra typer av skaldjur, bland annat krabba. De kanadensiska myndigheterna förbjöd restaurangerna att servera råa ostron och stängde också allt kustfiske på ostron. Söder om gränsen, i amerikanska delstaten Washington, upptäcktes också ett femtiotal fall och även här stängdes ostronbankarna efter att man konstaterat att 90 % av de insjuknade hade ätit råa ostron.

Med ytterligare data från Oregon och Kalifornien fick man ihop över 200 laboratoriekonfirmerade fall. Samtliga fall var sporadiska och härrörde från infektioner från olika källor och med många olika stammar av *V. parahemolyticus*. Eftersom ostronätande till övervägande del är en manlig sysselsättning, var det föga förvånande att två av tre insjuknande var män. Alla insjuknade drabbades av diarré, nio av tio hade magsmärtor och ungefär hälften uppgav att de mådde illa och/eller kräktes. En tredjedel fick feber och 12 % drabbades av en blodblandad diarré. En av de senare fick blodförgiftning som komplikation och hans liv gick inte att rädda. Endast en av tio rapporterades ha en allvarlig underliggande sjukdom, vilket ungefärligen motsvarar normalfördelningen: det var således i stort sett friska individer som drabbades.

Undersökningen ledde till tre viktiga slutsatser. Den första var att parahaemolyticus-enteriter, som så många andra bakteriella matinfektioner, är

kraftigt underrepresenterade i den officiella statistiken. Högst ett fall av tjugo upptäcks vilket skulle innebära att 4 000 ostronätare drabbades på västkusten under den varma sommaren 1997.

Den andra slutsatsen är att de amerikanska normerna för *V. parahaemolyticus* i ostron är otillfredsställande. I USA räknar man med en infektionsdos på runt en miljon bakterier vilket har lett till en bestämmelse att ostron högst får innehålla 10 000 *V. parahaemolyticus* per gram ostronkött. En omfattande undersökning av ostronen detta år visade att få ostron höll en halt på över 200 per gram och att endast ett undersökt ostron uppnådde gränsvärdet. Bedömningen blev att gränsvärdet borde sänkas (vilket dock inte har skett).

Slutsats tre är att vattentemperaturen faktiskt är en bättre indikator på ostronens farlighet än kvantitativa bakteriologiska analyser. Sedan tidigare är det känt att *V. parahaemolyticus* utgör en risk först när vattentemperaturen överstiger 15°C och mätningar i Washingtons kustvatten detta år visade på sommartemperaturer upp till 19°C, vilket kan jämföras med en topptemperatur på 14°C året innan.

Ett dussin ostron

En 68-årig man från Alabama tog sin fru med på en veckas semester till ett hotell i Mississippi, välkänt för sin spelhall och för sin ostronrestaurang. Mannen led av en kronisk leversjukdom och var därför mycket medveten om sin livsföring, som bland annat innebar fullständig avhållsamhet från alkohol och en lång katalog på maträtter som skulle undvikas. Han hade dock aldrig hört talas om *V. vulnificus* och såg ingen risk i att äta ostron.

Dagen efter att han ätit ett dussin ostron fick han magbesvär och svåra krampkänningar och bestämde sig för att avbryta semestern och i stället åka hem. När paret väl kommit tillbaks till Alabama hade han så svåra smärtor att han inte kunde stödja på benet. Morgonen därpå hade benet blivit violettfärgat och svarta blåsor hade bildats över stora delar av kroppen. Först denna dag uppsökte mannen sjukhus där han omedelbart fick intensivvård med stora doser antibiotika mot blodförgiftning. Benet gick dock inte att rädda och amputerades. Samtidigt fick man bokstavligt skala av 20 % av mannens hud i ett försök att stoppa infektionen. Men det var för sent, trots amputation också av det andra benet dog mannen efter 10 dygns intensivvård.

Fallbeskrivningen kan tyckas onödigt brutal, men den speglar en grym verklighet. Mer än hälften av leversjuka människor dör om de insjuknar i vulnificus-enterit. Enda chansen att överleva är att komma mycket snabbt till en läkare som ställer rätt diagnos och ger stora mängder verksam antibiotika. Och även om man överlever är risken mycket stor för amputationer till följd av den aggressiva blodförgiftningen. Personer med leversjukdomar bör definitivt inte äta ostron som är skördade i varma vatten. ”Vi hade aldrig ens hört talas om bakterien” klagade mannens svärdotter och utan information om riskerna kan man naturligtvis inte göra något.

VIRULENSFAKTORER

Runt 95 % av de kliniska stammarna av *V. parahaemolyticus* producerar TDH eller TRH som båda är hemolysiner med enterotoxisk effekt. Bland miljöstammarna är det däremot bara 1-2 % som producerar TDH eller TRH, så hemolysinerna är starkt sammankopplade med parahamolyticus-enterit. Om de kliniska stammar som vare sig producerar TDH eller TRH kan producera andra, okända toxiner än inte känt. Sannolikt är det så, eftersom mutanter där TDH-produktionen tagits bort fortfarande, låt vara begränsat, verkar bilda enterotoxin.

En del stammar tycks kunna förstöra skiljeväggarna (*tight junctions*) mellan tarmcellerna utan att producera toxiner, men om detta verkligen har betydelse för den vattniga diarré som ses vid parahaemolyticus-enterit är mera oklart (det borde kanske snarare leda till en blodig diarré).

TDH = Termostabilt Direkt Hemolysin

Det första hemolysin som upptäcktes hos *V. parahaemolyticus* var TDH. Det är ett tvådelat, porbildande protein med hemolytisk och celltoxisk effekt som även fungerar som enterotoxin mot epitelceller i tarmen. Den lite egenartade beteckningen har sitt ursprung i att hemolysinet kunde kokas vid 100°C i 10 minuter utan att förlora aktiviteten, samt att det inte behövde aktiveras av lecitin eller liknande för att orsaka hemolys, TDH fungerade så att säga ”direkt” på de röda blodkropparna.

På röda blodkroppar och många andra celler binder TDH in till speciella receptorer, gangliosider av samma typ (GT1b) som botulinum typ B-toxin

binder till. Efter inbindning bildar TDH smala kanaler (porer) in genom blodkropparnas cellmembran vilket får dem till att lysera. När TDH fungerar som enterotoxin är diarrén följden av att TDH åstadkommer ett läckage av kloridjoner från tarmcellerna. Produktionen av TDH i tunntarmen stimuleras av gallsalter.

Värmeresistensen hos TDH är värt ett eget avsnitt eftersom den minst sagt är lite speciell. En måttlig värmebehandling till 60-70°C leder faktiskt till att TDH inaktiveras! Men ökas värmebehandlingen till >80°C och värmebehandlingen sedan följs av en snabb nedkylning så reaktiveras TDH igen. Det som händer är att proteinet vid 60°C fälls ut som fibriller, men dessa reorganiseras vid ännu högre temperaturer varefter proteinet kan återfå sin ursprungliga form efter nedkylning. TDH är det vanligaste hemolysinet hos kliniska stammar. Också den nya pandemiska stammen, O3:K6, producerar TDH.

TRH = Tdh-Relaterat Hemolysin

Ursprungligen detekterades TDH genom hemolys i en speciell blodagar: reaktionen kallades Kanagawa-fenomenet (se avsnittet ”Påvisning”). I slutet av 1980-talet upptäckte man att även en del KP-negativa stammar producerade enterotoxin. Det nya toxinet kallades TRH på grund av sina uppenbara likheter med TDH: det är ett sammansatt protein bestående av två delar, det fungerar som hemolysin, cytoxin och enterotoxin. Däremot är det värmekänsligt och förstörs redan vid 60°C under 10 minuter. Idag räknar man med två separata toxin, TRH1 och TRH2.

Det är globalt sett färre kliniska stammar som producerar TRH än som producerar TDH. En ungefärlig uppskattning är att 6 av 10 kliniska stammar producerar TDH, 3 av 10 producerar TRH medan 1 av 10 producerar båda hemolysinerna. Bland miljöstammar är TDH-produktion extremt ovanligt medan någon procent producerar TRH.

T3SS

Som så många andra patogena bakterier använder sig *V. parahaemolyticus* av ett typ tre-sekretionssystem (T3SS) för att injicera proteiner från bakterien till värdcellen. *V. parahaemolyticus* har faktiskt två T3SS, ett som kodas i den stora kromosomen och ett annat som kodas i den lilla kromosomen. T3SS1 har betydelse vid infektionen av värdcellerna medan T3SS2 har samband med enterotoxinens aktivitet.

V. vulnificus
Varför *V. vulnificus* orsakar diarré är höljt i dunkel. Virulensfaktorerna för själva enteriten är okända. De virulensfaktorer man hittills intresserat sig mest för är de som inverkar vid blodförgiftning. Bakterierna kan föröka sig oerhört snabbt i kroppen och man tror att endotoxinen (lipopolysackariderna) i cellväggen har stor betydelse för bakteriernas förmåga att undkomma kroppens försvarsmekanismer. Särskilt de kapslar en del stammar bildar anses som viktiga virulensfaktorer. Även hemolysiner betraktas som virulensfaktorer vid tillväxt i blodet.

PÅVISNING

Isolering av marina vibrio-arter

Metoderna för *V. cholerae* kan också användas för att isolera *V. parahaemolyticus* och *V. vulnificus*. Dessa båda bildar blågröna eller gröna, stora kolonier på TCBS-agar. Under åren har en rad selektiva substrat utvecklats framför allt för *V. vulnificus* men ingen av dem har visat sig särskilt lyckade.

Identifiering

V. parahaemolyticus
V. parahaemolyticus och *V. vulnificus* är förhållandevis lätta att identifiera med hjälp av kommersiella biokemiska testkits som API. Men särskilt för *V. parahaemolyticus* gäller att kanske 98 % av miljöstammarna är fullständigt ofarliga. Att enbart kvantifiera bakterierna i fisk, skaldjur och havsvatten är därför inte särskilt lyckat. Det kan noteras att *V. parahaemolyticus* till skillnad från nästan alla andra vibrio-arter inte är böjd utan ses som en rak stav i mikroskopet.

För att screena fram virulenta stammar har isolat av *V. parahaemolyticus* i flera decennier testats för det så kallade Kanagawa-fenomenet (KP). Det utförs på ett medium (Wagatsumaagar) med 7 % salthalt och förutsätter tillgång på helt färskt blod, tappat senast ett dygn före försöken. Ursprungligen användes humant blod, numera även får- eller kaninblod. KP-positiva stammar ger

kraftig hemolys på detta medium och det föreligger en mycket god korrelans mellan KP-positiva stammar och produktionen av TDH, den kanske viktigaste virulensfaktorn hos *V. parahaemolyticus*.

Om stammen är KP-negativ kan den ändå vara virulent genom att producera TRH, det andra av de båda viktiga hemolysinerna. För att screena TRH kan man utnyttja ureasproduktion: praktiskt taget alla TRH-producenter bildar ureas medan ureasproduktion däremot är ovanligt hos ofarliga miljöstammar.

Eftersom isoleringsarbetet är ganska arbetsamt, utarbetade man tidigt alternativ PCR-metodik. I princip kan PCR-påvisning ske på tre nivåer. Nivå ett är att påvisa och kvantifiera *V. parahaemolyticus* i livsmedel. Den vanligaste metoden är att påvisa generna för det värmelabila hemolysin, TLH, som finns hos praktiskt taget alla stammar, farliga som ofarliga. Påvisningsnivå 2 gäller den pandemiska stammen O3:K6, som innehåller en speciell fag. En ORF (*Open Reading Frame*) hos denna fag, betecknad ORF8, visades korrelera med just denna stam och har använts flitigt för att spåra O3:K6 och dess dotterkloner. Det ska dock påpekas att det finns dotterkloner som saknar ORF8.

Påvisningsnivå 3 innebär naturligtvis direkt påvisning av virulensfaktorerna TDH, THR1 och THR2. Detta kan idag ske med ett otal PCR-metoder, tyvärr finns dock ännu inga kommersiellt tillhandahållna snabbmetoder. Molekylär påvisning av virulensfaktorerna är definitivt att föredra eftersom de biokemiska screeningmetoderna långtifrån ger ett hundraprocentigt säkert resultat.

V. vulnificus

För *V. vulnificus* finns inga kända virulensfaktorer utan man är hänvisad till att påvisa bakterien i sig. Tre biotyper är kända: praktiskt taget alla infektioner utanför Israel orsakas av biotyp 1 som i huvudsak omfattar indolnegativa stammar. Biotyp 2 är som regel indolpositiv och mycket sällan orsak till humana infektioner, däremot är denna biotyp dödligt giftig för ål. Biotyp 3, slutligen, är en biotyp som närmast kan beskrivas som en hybrid som uppkom i Israel 1995 och som där är den vanligaste orsaken till infektioner, då huvudsakligen i form av sårinfektioner som drabbar fiskhandlare men som sedan också kan spridas till konsumenter. Biotyp 3 har hittills inte påvisats utanför Israel.

I USA är gränsvärdet för *V. vulnificus* tre bakterier per gram ostronkött och det kan vara svårt att påvisa så låga halter av *V. vulnificus* mot en bakgrund av kanske tusentals andra vibrio-stammar. Idag är därför PCR-påvisning av bakterierna den kanske vanligaste metoden och det finns tekniker som kan påvisa ned till 1 bakterie per gram.

Epidemiologi

V. parahaemolyticus indelas i 13 somatiska (O-antigen) och hela 75 kapselantigen (K). Den serologiska indelningen visade sig vara betydelsefull då det gällde att spåra den nya stam som 1996 upptäcktes i Calcutta, och som sedan spreds över stora delar av världen. Samtidigt har uppföljningen av denna pandemiska O3:K6-stam också visat på de påtagliga bristerna med den serologiska indelningen. Den ursprungliga klonen har numera utvecklats till en rad dotterkloner och dessa är närmast slumpmässigt spridda i ett dussintal serologiska typer. Idag undersöks därför stammarna allt oftare med PFGE-teknik som inte bara kan särskilja enskilda kloner utan också ge ett mått på deras släktskap.

PFGE-studier på *V. vulnificus* har visat att denna art är mycket heterogen (och därmed möjlig att epidemiologiskt spåra) men på grund av att vulnificus-enterit är så ovanlig har några egentliga epidemiologiska undersökningar inte genomförts.

Yersinia enterocolitica

– Den frostbitna bakterien –

ÖVERSIKT

På 1970-talet började danska mikrobiologer att varna för yersinios, en diarrésjukdom som spreds med griskött och som danskarna efter blodprovsundersökningar menade att var och varannan dansk hade drabbats av. Riktigt så illa var det nu inte, men yersinios var länge den tredje vanligaste bakteriella matförgiftaren i Norden, Belgien och på Nya Zeeland. Däremot är den tämligen ovanlig på de flesta andra håll i världen. Varför det är så har ingen ännu gett någon rimlig förklaring till.

Yersinios orsakas framför allt av *Yersinia enterocolitica*, som är ovanlig på så vis att den kan tillväxa ända ned till fryspunkten. För en gångs skull ger kylskåpet alltså inget skydd mot tillväxt av otrevliga bakterier. Även den i Sverige mycket sällsynta arten *Y. pseudotuberculosis* kan orsaka sjukdomen. Globalt har yersinios minskat i betydelse, allra mest i Danmark där man sedan 1985 lyckats få ned antalet fall med nästan 90 %, något som tillskrivs förbättrad slaktteknik av svin. Sverige införde liknande hygienregler vid svinslakten för 25 år sedan och även här såg vi en nedgång av yersinios under 1990-talet, en trend som dock bröts 2001 då kurvan vände uppåt igen. Det föranledde Livsmedelsverket att varna för *Yersinia enterocolitica* och att rekommendera allmänheten att vara lika försiktig med att hantera griskött som man är med rå kyckling. Pressen hakade villigt på och flera tidningar hotade oss med att vi riskerade digerdöden om vi åt griskött (den något skruvade anledningen var att även pestbakterien hör till släktet *Yersinia*). Som mest noterades officiellt ca 800 fall per år, en siffra som numera (2010-2012) har mer än halverats.

Den mest utsatta gruppen är barn under 10 år som drabbas av diarré, låg feber och kräkningar. Trots massmediernas hotbild är yersinios hos barn normalt inte någon särskilt allvarlig sjukdom. Tonåringar får inte alltid diarré utan i stället kraftiga buksmärtor som kan misstolkas som blindtarmsinflammation. Hos vuxna kan de inledande symptomen följas av värk i många leder, patienterna

upplever ofta att smärtorna vandrar runt i kroppen. Ungefär 10 % av den vuxna befolkningen drabbas av ledvärken som kan pågå i månader, i värsta fall i åratal. Fyra av fem som drabbas av denna reaktiva artrit har en tydlig genetisk disposition för det i form av ett speciellt lymfocytantigen.

BAKTERIERNA

Släktet *Yersinia* tillhör, som så många andra livsmedelspatogener, familjen Enterobacteriaceae och omfattar alltså gramnegativa, oxidasnegativa, stavformiga bakterier som är rörliga med hjälp av peritrika flageller och som kan växa såväl aerobt som anaerobt.

Yersinia omfattar 2012 arton arter varav tre är humanpatogener, och bland dessa är naturligtvis pestbakterien den mest fruktade.

1. Yersinia pestis

Pestbakterien hör inte till detta kapitel eftersom den sprids med flugor och inte med livsmedel. Med ett litet undantag, kameler kan nämligen bära på *Y. pestis* och konsumtion av kött och lever från kameler har faktiskt varit orsak till sporadiska pestfall.

Pesten har varit så förknippad med mänsklighetens historia att kamelköttet får tjäna som alibi för en kort resumé här. Pestens ursprung är Kina. Därifrån har den spridits till omvärlden i minst två, troligen tre pandemier. Då räknar vi inte med den allra först beskrivna pestepidemin, som drabbade Aten för nästan 2500 år sedan. En DNA-studie på skeletten i en massgrav visade nämligen att atenarnas ”pest” i själva verket var ett massivt utbrott av tyfoid. Så den epidemin är avförd.

Tusen år senare kom den första riktiga pandemin. Det var den Justinianska pesten som från Kina via Egypten spreds till Europa år 541. Den höll sig kvar i 200 år och i många länder halverades befolkningen under dessa år. Globalt tros 25 miljoner människor ha dödats i den Justinianska pesten. Det finns indikationer men inga *säkra* molekylärgenetiska bevis för att *Y. pestis* verkligen var orsaken. Inte oväntat har det gett upphov till en flora av spekulationer om andra orsaker.

Digerdöden, som tros ha dödat 100 miljoner människor runtom i världen, kom

från Kina och tog sig via Kaspiska Havet in i Europa 1347. Den dödade var tredje europé och skulle hålla sig kvar på kontinenten i 400 år, till 1750. Därefter försvann sjukdomen. Till och med digerdöden har ifrågasatts. Två Liverpoolforskare, Duncan & Scott, menar att orsaken inte alls var pestbakterier utan i stället ett dödligt hemorragiskt virus, alltså någonting i stil med Ebola. Andra har framfört andra teorier. För att försöka få ett svar på frågan gjordes därför 2010 en multinationell, ganska omfattande DNA-undersökning av digerdödens offer i olika länder. Den leddes från universitetet i Mainz av Stephanie Haensch och forskargruppen anser sig ha definitivt bevisat att digerdöden orsakades av *Y. pestis*.

Den senaste pandemin kom från Kina på 1850-talet och spreds över världen från Hongkong 1894 genom skeppsfrakter. Det var också då som pestbakterien, *Y. pestis*, isolerades av den schweizisk-franske bakteriologen Alexandre Yersin. Man är säker på att dagens pestbakterie tillhör en annan klon än de två som orsakade digerdöden. Klonen finns fortfarande kvar i framför allt Asien och Afrika. Smärre utbrott av pest förekommer fortfarande, senast i Kina 2009 och i Peru 2010. Utbrotten utvecklas däremot inte längre till epidemier, eftersom såväl vaccin som framför allt effektiva antibiotika idag finns tillgängliga och från 2007 har Världshälsoorganisationen (WHO) därför slutat med att följa upp sjukdomen.

2. Yersinia enterocolitica

Att *Y. enterocolitica* kunde orsaka enterit misstänkte man redan på 1930-talet men det skulle dröja fyra decennier innan främst danska och norska bakteriologer började inse omfattningen av yersinios. När så ett större utbrott inträffade i USA 1976 blev bakterien snabbt ett populärt forskningsobjekt. *Y. enterocolitica* är mycket vanlig i naturen, särskilt i områden med kyligt klimat som i Norden och Kanada. Bakterierna finns i tarmkanalen, och inte sällan även i svalget, hos många däggdjur, fåglar och kallblodiga djur. Från djuren sprids bakterien till jord och vatten där de överlever länge. Dock måste det påpekas att de allra flesta stammarna är avirulenta och därför ofarliga ur smittosynpunkt. I Sverige finns i den vetenskapliga litteraturen endast en modern undersökning utförd på vilda djur, nämligen på flyttfåglar vars avföring kontrollerades under en vårflyttning till Sverige. Ofarliga stammar hittades hos ganska många fåglar, men av 57 undersökta fågelarter återfanns virulenta stammar endast hos prutgäss och då bara hos färre än 2 % av individerna.

Även i de fall då djur härbärgerar virulenta stammar så är djuren vanligtvis friska bärare av bakterierna. Ibland kan djuren dock infekteras av stammar som är virulenta också mot djuren och då kan en hjord av till exempel hjort eller getter drabbas av ett dödligt utbrott som oftast orsakats av att bakterierna spritts till inre organ som lever och lungor.

Av någon anledning har svin, särskilt i Nord- och Centraleuropa, till skillnad från andra djur i mycket hög utsträckning humanpatogena stammar i tarm och i svalg. Humanpatogenerna tillhör nästan alltid ett fåtal ”bioserotyper”, en klassificering som är lite speciell för yersinia och som innebär att man slår samman biotypning och serotypning. I Sverige är det nästan uteslutande 4/O:3 (biotyp 4, serotyp O:3) som orsakar yersinios.

En del taxonomer vill dela in *Y. enterocolitica* i tre underarter eftersom man menar att det finns tydliga skillnader i virulens mellan dem: underarterna skulle följa den biotypning som används idag och omfatta biotyp 1A (ofarliga stammar), biotyp 1B (högvirulenta stammar) samt biotyp 2-5 (stammar med låg eller måttlig virulens).

Det märkliga med *Y. enterocolitica* är att den klarar av att växa inom ett så brett temperaturintervall, från –2°C upp till 42-44°C. Andra tydligt köldanpassade bakterier med ett temperaturoptimum runt 28°C, som till exempel livsmedelsförskämmande *Pseudomonas fragi*, klarar nästan aldrig av att växa vid högre temperaturer än 34°C. Anpassningen till kyla är lätt att observera i laboratoriet, många egenskaper som *Y. enterocolitica* uppvisar vid rumstemperatur saknas vid 37°C. Rörlighet är ett exempel, flageller är annars ofta en virulensfaktor för patogener, men *Y. enterocolitica* kan inte använda sig av flageller vid människans kroppstemperatur. Det verkar som att det är närvaron av en plasmid som kompenserar bakterien för dess oförmåga att fungera optimalt vid kroppstemperatur. Saknas plasmiden blir stammen ofarlig.

3. Yersinia pseudotuberculosis

Den tredje patogenen i sällskapet är den likaledes köldanpassade *Y. pseudotuberculosis* som också den kan orsaka livsmedelsburen yersinios. Även *Y. pseudotuberculosis* kan förekomma hos djur – särskilt vilda – men den är sällsynt som orsak till yersinios hos människan, möjligen på grund av att den

inte i någon nämnvärd utsträckning förekommer hos svin. I Sverige har enstaka virulenta fynd av *Y. pseudotuberculosis* gjorts hos på våren anländande rödvingetrastar och taltrastar. Vad trastarna har ätit på sina vinterplatser är okänt, men flugor har konstaterats bära på *Y. pseudotuberculosis*, så möjligen har fåglarna infekterats av insekter.

Trots att *Y. pseudotuberculosis* orsakar samma sjukdom som *Y. enterocolitica* så är de båda bakterierna inte särskilt nära besläktade, det gemensamma arvet finns mest i virulensfaktorerna. Däremot är *Y. pseudotuberculosis* mycket nära besläktad med *Y. pestis*, faktiskt utgör dessa båda en gemensam genetisk art. Evolutionsmodeller indikerar att pestbakterien utvecklats ur *Y. pseudotuberculosis* för mellan 1 500 och 20 000 år sedan.

SJUKDOMEN

Yersinios orsakas huvudsakligen av vissa kloner av *Y. enterocolitica*, men särskilt i Asien förekommer också fall orsakade av *Y. pseudotuberculosis*. Om inget annat anges, gäller uppgifterna nedan för *Y. enterocolitica*.

Infektionsdos

Amerikanska experiment med friska försökspersoner anger en infektionsdos för vuxna på en miljard bakterier. Det låter i mesta laget, eftersom det betyder en halt på omkring 10 miljoner yersinia per gram livsmedel, vilket i praktiken är gränsen för förskämning: man skulle alltså kunna lukta sig till riskabla livsmedel! Men det räcker med att vi sänker halten i livsmedel till en miljon per gram – som då motsvarar en infektionsdos på 100 miljoner bakterier – för att livsmedlet ska vara sensoriskt fullt acceptabelt. Troligen är infektionsdosen lägre för barn eftersom barn mellan 1-5 års ålder har sex gånger högre incidens av sjukdomen än andra åldersgrupper. Hos barn har man också observerat smitta från person till person, samt smitta som överförts genom kontakt med djurorgan, vilket i båda fallen indikerar en betydligt lägre infektionsdos.

För att med säkerhet kunna bestämma infektionsdosen bör man ha rikligt med data från livsmedel som orsakat utbrott av yersinios. Men utbrott är mycket sällsynta och sådana data saknas helt. Om vi jämför med andra syrakänsliga bakterier så spelar förmodligen magsyran en viktig roll för att förhindra att yersinia når tarmkanalen. Då kommer också livsmedlet i sig att påverka infektionsdosen. Yersiniabakterier som är inbäddade i fett tar sig lättare igenom

magsyrabarriären och allra lägst infektionsdos kan man förvänta med stora mängder dricksvatten: vattnet sätter inte igång någon produktion av magsyra och den magsyra som redan finns späds ut.

Inkubationstid och symptom

Inkubationstiden för *Y. enterocolitica* är normalt 3-7 dygn och varierar mellan 1 och 10 dygn. Symptomen hos barn är diarré, feber och inte sällan kräkningar. Halsont förekommer i en mindre del av fallen. Diarrén är nästan alltid vattnig, möjligen kan det finnas spår av blod. Klassiskt blodiga diarréer är däremot sällsynta och när de förekommer följs de ytterst sällan av blodförgiftning. I de få fall av blodförgiftning som rapporterats, nästan enbart hos äldre människor med svåra underliggande sjukdomar, är dock dödligheten hög. Febern vid infektion med bioserotyp 4/O:3 är låg eller måttlig, medan den kan rusa upp till över 40°C vid infektion med bioserotyp 1B/O:8 som är vanlig i Nordmerika. Hos tonåringar och unga vuxna är blindtarmsliknande buksmärtor det vanligaste symptomet och diarré behöver inte ens förekomma. Hos äldre vuxna är diarré och buksmärtor de vanligaste symptomen. Varaktigheten är starkt varierande, många barn klarar av diarrén på ett par dagar medan andra, såväl barn som vuxna, kan dras med symptomen i upp till 4-5 veckor.

Inkubationstiden för *Y. pseudotuberculosis* är 5-10 dygn med en spridning på 2-20 dygn. Generellt sett kännetecknas en *Y. pseudotuberculosis*-infektion mer av buksmärtor och feber än av diarré. I övrigt är förlopp och eventuella komplikationer desamma som vid *Y. enterocolitica*-infektion.

Tre ganska vanliga komplikationer kan noteras vid yersinios. Såväl barn som vuxna kan drabbas av knölros; det vill säga ömmande, blåröda knölar som i synnerhet uppträder på benen. Framför allt vuxna kan 1-3 veckor efter de inledande symptomen drabbas av polyartriter, det vill säga värk i många leder samtidigt. Ungefär 10 % av de vuxna drabbas av denna komplikation som kan pågå allt från någon månad till flera år. Åttio procent av dem som drabbas är positiva för det humana lymfocytantigenet HLA-B27, samma genetiska disposition som ställer till med problem vid infektion av shigella och campylobacter. Den tredje komplikationen som framför allt drabbar tonåringar är felaktig diagnos: läkarna opererar bort blindtarmen hos ungefär 5 % av dem som hamnar på sjukhus!

Incidens

I Sverige var yersinios länge den tredje vanligaste laboratoriekonfirmerade livsmedelsburna bakteriella sjukdomen (efter campylobacter och salmonella). Sedan några år har antalet fall minskat kraftigt och yersinios har fallit till femte plats (nu även passerade av shigella och EHEC). För närvarande (2010-2012) drabbas omkring 300 personer per år enligt laboratoriekonfirmerade uppgifter. Nästan tre av fyra smittas inom landet och det rör sig nästan undantagslöst om sporadiska fall. Beräknat på laboratoriekonfirmerade uppgifter är incidensen per miljon invånare ca 100 i Belgien och på Nya Zeeland. Merparten av övriga världen ligger klart under 10, medan Danmark, Sverige, Norge, Finland, England, Tyskland, Japan, Kanada och delar av USA ligger någonstans mittemellan. I Danmark har incidensen från 1985 till idag gått ned från 300 till 40 fall per miljon.

Alla åldersgrupper är representerade, men barnen är definitivt överrepresenterade: i Sverige är incidensen bland åldersgruppen 1-5 år sex gånger högre än för den övriga befolkningen. I inledningen nämndes att danska forskare omkring 1980 efter blodprovsundersökningar menade att varannan dansk hade insjuknat i yersinios. Även i helt färska undersökningar från Ungern, USA och Österrike har det visats att människor bär på antikroppar mot yersinia i oväntat hög utsträckning. Vad det sedan egentligen betyder är mera tveksamt, kanske vi helt enkelt utsätts för avirulenta 1A-stammar så ofta att kroppen reagerar mot dem.

Incidensen för yersinios orsakad av *Y. pseudotuberculosis* är generellt sett mycket låg, i Sverige 0.1 fall per miljon invånare. Undantagen finns i Asien och särskilt då i Japan där bakterien inte bara orsakar yersinios utan också utbrott av så kallad Izumi-feber som yttrar sig ungefär som scharlakansfeber.

Yersinios på cellnivå

Redan när yersinia kommer i kontakt med mukuslagret i nedre delen av tunntarmen, aktiveras en gen – *yadA* – som producerar stavformade proteiner över hela bakterien. Proteinerna gör att bakterierna autoaggregerar och växer till som kolonier i mukuskiktet. Bakterierna sprids sedan vidare till epitelceller och lymfatisk vävnad i Peyers plack. Där används såväl YadA-proteinet som två membranproteiner för att binda in till specifika receptorer i epitelceller samt i de M-celler i epitelskiktet som har som uppgift att ta hand om främmande partiklar och presentera dem för antikroppsförsvaret. Genom ett typ tre

sekretionssystem injiceras en stor mängd virulensproteiner (Yops) in i cellerna vilka möjliggör för yersinia att förökas intracellulärt. Strategin liknar den som shigella använder sig av, men yersinia kan liksom listeria även migrera genom epitelbarriären och föröka sig i den lymfatiska vävnaden i Peyers plack. Infektionen framkallar ett våldsamt immunologiskt svar i form av fagocyter vilket leder till inflammationer och skador på epitelskiktet. Det är delvis genom dessa skador som yersinia sedan kan spridas vidare till bland annat lymfkörtlar, särskilt de som finns i den nedre, högra delen av buken. Tillväxten i just dessa lymfkörtlar ger en inflammation med intensiva buksmärtor som kan misstas för blindtarmsinflammation. Vidare spridning till mjälten förekommer, annars är det ovanligt att yersinia invaderar organ.

Särskilt virulenta stammar kan också förökas inuti makrofager och här verkar *Y. enterocolitica* klara sig undan makrofagernas kemiska arsenal genom att förhindra kväveoxidbildning medan *Y. pseudotuberculosis* i stället undkommer angrepp genom att förhindra sammansmältningen av fagosom och lysosom.

LIVSMEDEL: TILLVÄXT

Nästan alla uppgifterna om tillväxt i livsmedel gäller *Y. enterocolitica*, men det finns inga skäl anta att *Y. pseudotuberculosis* uppför sig på ett annorlunda sätt.

Temperatur

Y. enterocolitica kan tillväxa inom temperaturintervallet –2°C till 42°C, vissa stammar ända upp till 44°C. Det innebär att de kan tillväxa på kyllagrat, färskt luftlagrat kött, men de har samtidigt dålig konkurrensförmåga gentemot de aeroba pseudomonasbakterier som normalt förskämmer styckat, luftlagrat kött. Om uppgifterna om de höga infektionsdoserna stämmer, borde det inte vara någon större risk för yersinios från produkter som exempelvis kotlett eller fläskfilé. Risken ökar i fläskfärs eftersom pseudomonasbakterier inte trivs med den låga syrgashalten i färsen medan yersinia knappast påverkas alls. Å andra sidan begränsas yersinias framfart av att fläskfärs normalt bara har ett dygns hållbarhet. Fläskfärs som gasförpackas har lång hållbarhet men koldioxiden skyddar mot yersinia.

Optimal temperatur är oftast ca 28°C men kan, beroende på stam, variera från 22°C till 35°C. Att vissa stammar har rumstemperatur som sin optimala temperatur gör att temperaturmisshandlade produkter kanske trots allt är en

viktigare anledning till yersinios än kylförvarade produkter.

Redan vid 60°C dör yersinia mycket snabbt, så bakterierna har ingen som helst chans att överleva en pastörisering. Men, i en köttprodukt som värmebehandlats och sedan återinfekterats med yersinia kan bakterierna få en mycket bättre tillväxtmiljö än på nystyckat kött. I flera länder har kokta korvar som wienerkorv och liknande epidemiologiskt satts i samband med yersinios.

Syre

Yersinia kan växa både med syrgas och utan. Vakuumförpackning av färskt griskött har därför av några setts som en riskfaktor. Detta därför att frånvaron av syrgas i vakuumförpackningen effektivt tar bort den konkurrerande aeroba mikrofloran. Men, risken är trots allt ganska liten. En vakuumförpackad styckningsdetalj omges redan efter ett par dygn av en koldioxidmiljö och koldioxid är en starkt hämmande gas för yersinia, liksom för de flesta andra gramnegativer. Praktiska försök har visat att köttdetaljer som förpackats i modifierad gasmiljö (med hög koncentration koldioxid) är närmast säkrade för yersiniatillväxt vid låg temperatur, under 4°C. Tyvärr så hålls dessvärre inte alltid kylkedjorna och vid 15°C kan yersinia tillväxa även i sådana förpackningar.

pH

Yersinia är tämligen syrakänsliga, i ett livsmedel växer de inte under pH 5.5 och fermenterade produkter är därför riskfria.

Saltning och rökning

Yersinia är tämligen saltkänslig och tål inte salthalter över 3 % i ett livsmedel.

LIVSMEDEL: PRODUKTER

Yersinios är nästan uteslutande en sporadisk sjukdom, alltså en som drabbar enstaka personer. Just därför är smittovägarna nästan omöjliga att säkert kartlägga. Griskött är det livsmedel som antas orsaka majoriteten av yersiniosfallen. Som nummer två misstänks oklorerat dricksvatten, särskilt från privata brunnar.

Ser vi däremot till det tjugotal utbrott av yersinios som är någorlunda dokumenterade, får vi en helt annan bild.

Mjölk svarar för hälften av utbrotten, medan dricksvatten och vegetabilier står för vardera en fjärdedel.

När det gäller att bedöma olika studier av förekomsten av yersinia i livsmedel måste man särskilt uppmärksamma metodologin. Att undersöka frekvensen virulenta yersinia med selektiva medier är närmast hopplöst eftersom de existerande medierna är undermåliga. Det behövs PCR-teknik för att få rättvisande resultat, men en nackdel med PCR är att det är svårt att utvärdera yersiniaförekomst i värmebehandlade livsmedel: det går inte utan vidare att skilja på DNA från döda yersinia från råvaran och DNA från levande yersinia som återkontaminerat produkten.

Kött

Y. enterocolitica är i många länder vanligt förekommande i tarmen och munhålan hos svin. Man kan utgå ifrån att 10-50 % av slaktsvinen i många länder, inklusive Sverige, bär på virulenta yersinia. I Sverige rör det sig nästan alltid om bioserotyp 4/O:3. Lättast att isolera bakterierna är det från tonsillerna, eftersom de där förekommer i relativt höga halter. På slaktkropparna är det svårt att påvisa bakterierna med selektiva medier, men med hjälp av PCR-teknik hittade Livsmedelsverket år 2005 virulenta yersinia på 16 % av de svenska slaktsvinen.

Ännu svårare har det varit att hitta bakterierna på styckningsdetaljer eftersom harmlösa yersinia-stammar tenderar att konkurrera ut de virulenta stammarna i de anrikningsmedier som används. Egentligen är det bara på gristunga som man framgångsrikt kunnat isolera bakterierna, detta därför att halterna virulenta bakterier är högre i munhålan. Med PCR-teknik hittade Livsmedelsverket dock virulenta *Y. enterocolitica* i 10 % av det svenska grisköttet 2004. Däremot hittades inte bakterierna i färdig-mat från grisköttet.

De åtgärder som införts under senare år har som målsättning att förhindra spridning av yersinia från munhålan och tarminnehåll till köttet. Åtgärderna har dock inte genomförts konsekvent, en del slakterier täcker exempelvis inte anus på slaktkropparna vilket ökar risken för spridning med avföring.

Det är sällan som grisköttt kunnat kopplas till utbrott. I ett norskt utbrott julen

2005 drabbades dock 11 norrmän av yersinios (2/O:9) efter att ha ätit julsylta tillverkad av kött från grishuvud. Två av de insjuknade dog. Även i Sverige har grissylta misstänkts vid ett utbrott, och i USA har hemgjord inälvskorv (*chitterlings*) vid två tillfällen varit orsaken till utbrott, men i båda dessa fall har det rört sig om kontaktsmitta i samband med rengöring av tjocktarmen från gris som använts som fjälster för korven.

Att griskött ändå så starkt kopplas till yersinios beror på att de bioserotyper (i Europa 4/O:3, i USA även 1B/ O:8) som främst drabbar människor även i stor utsträckning finns hos gris. Här finns en tydlig skillnad gentemot andra djurslag, för även om *Y. enterocolitica* förekommer i tarmkanalen hos 1-10 % av nötkreatur, får, getter och fåglar, så är bioserotyp 4/O:3 ovanlig hos dessa djur. Den patogena serotyp som i stället verkar dominera hos dessa köttdjur i Europa är O:5,27. Denna serotyp förekommer ibland som orsak till yersinios, dock praktiskt taget aldrig i Sverige.

Höns som är bärare av *Y. enterocolitica* i tarmkanalen kan via avföringen givetvis smitta äggskalen och i länder där äggen inte tvättas har patogena serotyper, inklusive O:9, kunnat isoleras från äggskalen.

Fisk och skaldjur

Det finns inga tecken på att yersinios skulle spridas via fisk eller skaldjur.

Mejeriprodukter

Nötboskap härbärgerar inte sällan yersinia i tarmen och även om nötkött aldrig direkt kunnat kopplas till något fall av yersinios, så har mjölk faktiskt varit den vanligaste orsaken till utbrott av yersinios. Opastöriserad mjölk kan innehålla yersinia från korna och teoretiskt sett kan bakterierna förökas vid kylförvaring av opastöriserad mjölk. Om de verkligen kan uppnå riskabelt höga halter i konkurrens med mjölkens normalflora är däremot mycket tveksamt.
De mjölkprodukter som förekommit vid utbrott har alla varit värmebehandlade och därefter återkontaminerade. Så även om mjölkprodukter varit inblandade i hälften av de (fåtaliga) utbrott som registrerats, är det ändå osannolikt att mejeriprodukter utgör någon större fara. Å andra sidan, om yersinia väl kommer in i mjölken och får tillfälle att tillväxa, så innebär produktionssättet att många människor samtidigt kan komma i farozonen, vilket visas av utbrott

där över 1000 människor har insjuknat i yersinios.

Yersinia kan även tillväxa i färskost under förutsättning att pH är relativt högt. I syrade färskostar är risken däremot minimal och i lagrade ostar klarar yersinia inte av konkurrensen från mjölksyrabakterier och andra ostbakterier.

Hygienproblem i Vermont

Hösten 1995 upptäcktes tre fall av yersinios i den amerikanska delstaten Vermont. Från samtliga isolerades bioserotyp 1B/O:8 och efter ytterligare utredning, där stammarna typades med PFGE-teknik, kunde ytterligare sju insjuknade spåras. De flesta var barn med en medianålder på 9 år. Samtliga insjuknade hade magsmärtor och hög feber, i genomsnitt 40°C (just bioserotyp 1B/O:8 tenderar att till skillnad från övriga serotyper orsaka hög feber). Åttio procent hade diarré (hos 60 % var den vattnig och hos 20 % blodig), medan 60 % uppgav att de mådde illa och/eller hade huvudvärk. Ytterligare 20 % hade ont i svalget. Sjukdomen pågick i 6 dygn (medianvärde), med en spridning på 4-25 dygn. Den enda komplikationen var att två patienter av misstag fick sin blindtarm bortopererad.

Epidemiologiskt konstaterades ett samband med konsumtionsmjölk som hade framställts på ett litet lokalt mejeri. Mjölken var pastöriserad och det fanns inga tecken på att pastöriseringen varit otillfredsställande. Desto mera otillfredsställande var hygienen runt fyllningen av mjölkflaskorna, som det faktiskt rörde sig om. Flaskorna steriliserades inte före påfyllning utan sköljdes bara med oklorerat brunnsvatten! Det skulle kunna räcka som förklaring till utbrottet, men av någon anledning togs aldrig några prover på vattnet. Vad man däremot kunde konstatera var att det i samma byggnad som mejeriet fanns ett grisstall och att den person som skötte grisarna också hanterade mjölkflaskorna före påfyllning av mjölken. Från en av grisarna isolerades 1B/O:8 och utredningens slutsats var att mjölken efter pastörisering hade kontaminerats med bakterier från grisarna. En kanske lite förutfattad slutsats eftersom just den PFGE-typ som orsakat utbrottet inte kunde återfinnas hos grisarna. Det oklorerade vattnet borde rimligtvis ha varit minst lika misstänkt.

Vegetabilier

Det är knappast rimligt att tro att grönsaker och andra vegetabilier normalt utgör någon egentlig risk, men en fjärdedel av de kända yersiniosutbrotten har

faktiskt orsakats av sallat, groddar och tofu. Det är dock inte grönsakerna själva som härbärgerat yersinia utan de har smittats eller sköljts med infekterat, oklorerat vatten. I Norge inträffade 2011 ett utbrott där 21 norrmän insjuknade efter att ha ätit färdigförpackad sallatsblandning. Förmodligen hade den sköljts med infekterat vatten. Liksom i fallet med julsyltan ovan var det för ovanlighetens skull 2/O:9 som stod för utbrottet. Annars står serotyp O:3 för 98 % av fallen i Norge. Båda typerna finns hos gris.

Ett mycket ovanligt fall

I Finland upptäckte man under senhösten 1998 ett fyrtiotal fall av yersinios som ovanligt nog var orsakad av den sällsynta arten *Y. pseudotuberculosis*. Praktiskt taget alla insjuknade drabbades av kraftiga buksmärtor, medan tre av fyra hade låg eller måttlig feber och ungefär hälften diarré. Mediantiden för diarrén var 5 dygn (variation 1-38 dygn) medan mediantiden för buksmärtorna var betydligt längre, 14 dygn (variation 3-25 dygn). Var tredje patient upplevde ledbesvär och hos 12 % konstaterades reaktiv artrit. Samtliga artritdrabbade var vuxna och samtliga bar på HLA-B27, det lymfocytantigen som predisponerar för reaktiv artrit efter infektioner. Artriten var aggressiv och långvarig, mer än sex månader hos de personer som följdes upp. Epidemiologiskt hittades ett tydligt samband med finsk isbergssallat som sannolikt sköljts med kontaminerat vatten.

Vatten

Ytvatten och vatten i borrade brunnar kan kontamineras med yersinia, antingen från djurspillning eller från avloppsvatten. Dricksvatten står för en dryg fjärdedel av de kända yersiniosutbrotten och lägger vi till de utbrott som orsakats av sallat som sköljts med infekterat vatten, svarar vatten för nästan hälften av utbrotten. Till skillnad från mjölk och grönsaker – som visserligen förekommer frekvent i utbrottsstatistiken men som inte tros vara särskilt betydelsefulla vid de sporadiska fallen – står dricksvatten från privata brunnar högt upp på listan över misstänkta orsaker till de sporadiska fallen. Kommunalt, klorerat vatten är däremot riskfritt eftersom yersinia är känsliga för klor.

VIRULENSFAKTORER

För att *Y. enterocolitica* och *Y. pseudotuberculosis* ska kunna orsaka sjukdom hos friska människor krävs ett antal virulensfaktorer som finns samlade på en ca 70 kb plasmid, pYV (*plasmid Yersinia Virulence*). Stammar som saknar denna plasmid är avirulenta. Det räcker dock inte med enbart plasmiden för att orsaka sjukdom hos friska människor, det krävs även virulensfaktorer som finns på bakteriernas kromosom. Det verkar också som att vissa stammar har ”extra” besvärliga virulensfaktorer i sin kromosomuppsättning, det gäller särskilt för *Y. enterocolitica* bioserotyp 1B/O:8 och *Y. pseudotuberculosis*.

Ail = Attachment invasion locus protein (kromosomkodat)
Produkten av *ail*-genen är ett 17 kDa yttre membranprotein som har stor betydelse både för adhesion och för invasion av en del epitelceller. Dessutom försenar ail-proteinet kroppens aktivering av serumkomplementreaktionen, ett viktigt försvar i kampen mot inkräktare. Ail-proteinet hos högvirulenta stammar i biotyp 1B skiljer sig signifikant från Ail-proteinet i de måttligt virulenta stammar som finns i biotyp 2-5. Möjligen är detta förklaringen till de mer aggressiva infektioner som i synnerhet bioserotyp 1B/O:8 ger. Avirulenta stammar bär inte på *ail*-genen.

Inv = Invasionsprotein (kromosomkodat)
Invasionsproteinet hos yersinia är ett mycket stort – nästan 100 kDa – membranprotein som fungerar som en fysisk länk som binder bakterierna mycket hårt till värdcellerna. Invasionsproteinet påminner starkt om det intimin-protein som finns hos enteropatogena *E. coli*. Inv-proteinet är mera generellt i sin adhesion än ail-proteinet och adherar till praktiskt taget alla celltyper. Som namnet anger är inv-proteinet även involverat vid själva invasionen av cellerna: inv-proteinet förändrar cellernas aktinskelett varefter bakterierna tar sig genom cellmembranet. Inv-genen kan finnas hos enstaka avirulenta stammar, men hos dessa uttrycks inte proteinet. Invasinet är viktigt i det första invasionsstadiet och har en tydlig effekt också på immunförsvaret: kroppens stora produktion av cytokiner vid yersinios är till stor del ett svar på inv-proteinet. Cytokinerna ger upphov till att fagocyter i stor mängd rekryteras till angreppsstället vilket ger inflammatoriska skador i epitelskiktet. Dessa skador tros ha en gynnsam betydelse för yersinias möjlighet att tränga vidare in i vävnaderna.

LcRV = Low Calcium Response Protein V (plasmidkodat)
Protein V, som *in vitro* stimuleras av kalciumbrist och därför fått den något märkliga beteckningen LcRV, verkar utgöra själva nålsudden i T3SS-maskineriet och har därför central betydelse vid överföringen av Yops. Det är också välkänt att LcRV har stor betydelse för bakteriernas förmåga att undvika kroppens immunförsvar.

T3SS = Typ tre sekretionssystem (plasmid- och kromosomkodade)
Hos Enterobacteriaceae är det mycket vanligt att patogener vid kontakt med en värdcell kan bilda en injektionsnål med vilken bakterierna injicerar proteiner och toxiner rakt in i värdcellen genom dess cellmembran. Injektionssystemet hör oftast till klassen typ 3 sekretionssystem, T3SS. Yersina har faktiskt två sådana system. Ett finns på virulensplasmiden och genom en 2-3 nanometer bred nål överför denna minst 25 proteiner till värdcellen, framför allt de så kallade Yops-proteinerna. Ett annat T3SS finns – åtminstone bland biotyp 1B-stammar – kodat i kromosomen och detta överför en rad kromosomkodade proteiner.

YadA = Yersinia adhesin A (plasmidkodat)
Virulenta yersinia producerar ett yttre membranprotein kallat YadA som när det aktiveras bildar ett slags stavar över hela bakterien. Stavarna ger dels upphov till autoaggregation, dels binder de bakterierna till specifika receptorer. Trots att de YadA som bildas av *Y. enterocolitica* (YadA-ent) och *Y. pseudotuberculosis* (YadA-pse) är nära nog identiska, så är de små skillnader som finns tillräckliga för att helt ändra egenskaperna. YadA-ent binder till kollagen och har betydelse både för bakteriernas förmåga att kolonisera tarmens mukuslager och för att adhera till epitelceller. YadA-ent medverkar inte vid bakteriernas invasion av celler. Yad-pse binder till fibronektin och har däremot stor betydelse för bakteriernas förmåga att invadera celler. YadA är också den mest kraftfulla hämmaren av serumkomplementreaktionen som yersinia har tillgång till.

Yops (plasmidkodade)
Virulenta yersinia producerar minst ett tiotal ”yttre” proteiner (*Yops = Yersinia outer proteins*) som injiceras i epitelceller eller makrofager via T3SS. Dessa är direkt avgörande för bakteriernas virulensförmåga. De påverkar aktinskelettet hos epitelceller och de är avgörande för bakteriernas förmåga att överleva och föröka sig inuti makrofager och lymfatisk vävnad. En viktig roll för Yops är att

undertrycka kroppens primära immunologiska reaktioner. Beroende på vilken celltyp som invaderas har olika Yops mer eller mindre framträdande roller.

YST = Yersina Stable Toxin (kromosomalt kodat).
Yersinia enterocolitica producerar tre varianter (ystA, ystB och ystC) av ett värmestabilt enterotoxin som i viss mån påminner om de värmestabila enterotoxinen hos *E. coli*. Om enterotoxinen har betydelse för diarrén vid yersinios är dock mycket tveksamt. Den variant som oftast hittas, ystB, kan i alla fall uteslutas. Den förekommer nämligen i huvudsak hos de avirulenta stammarna i biotyp 1B samt i viss mån hos *Y. frederiksenii* och *Y. intermedia*. Däremot hittas ystB nästan aldrig hos de patogena stammarna.

För ystA är det i och för sig annorlunda, i den mån den förekommer hos *Y. enterocolitica* är det hos virulenta stammar, men å andra sidan är enterotoxinet mycket ovanligt och kan därför inte ha någon avgörande betydelse vid yersinios. YstA har för övrigt även hittats hos *Y. intermedia*. För ystC finns nästan inga data alls frånsett att enterotoxinet förefaller vara ovanligt. Enterotoxiner med, om inte identisk så i alla fall likartad uppbyggnad som yst, har för övrigt hittats även hos *Y. aleksiciae*, *Y. bercovieri* och *Y. kristensenii*.

PÅVISNING

Selektiva medier

Livsmedelsverket gjorde för några år sedan en större undersökning på slaktsvin där inte ett enda fynd av virulenta *Y. enterocolitica* hittades med odlingsmetodik, medan man samtidigt hittade virulenta *Y. enterocolitica* i 85 slaktkroppar (16 %) med PCR-teknik. Undersökningen borde ju diskvalificera selektiva medier – och de är undermåliga när yersiniahalten är låg – men samtidigt är det naturligtvis ett önskemål att kunna isolera de aktuella stammarna.

Isolering av yersinia från livsmedel

Den klassiska referensmetoden bygger på anrikning i fosfatbuffert, pH 7.6, oftast med tillsats av 2 % sorbitol, 0.85 % NaCl och 0.15 % gallsalter. Från denna anrikningsbuljong tas prov ut vid tre tillfällen. Första tillfället är efter 3 timmars inkubering vid rumstemperatur då provet sätts ut på CIN-agar. Därefter

anrikas buljongen vid 4°C och prov tas ut efter 8 dygn (till MRB anrikningsbuljong) och 21 dygn (till CIN-agar). MRB anrikas vid rumstemperatur 4 dygn varefter prov tas till CIN-agar.

MRB står för modifierad Rappaport-buljong och utgångspunkten är alltså den klassiska salmonella-buljongen som modifierats genom att halten magnesiumklorid fördubblats till 80 g/L, att halten malakitgrönts sänkts till 0.13 g/L och att pH höjts.

CIN uttyds Cefsulodin Irgasan Novobiocin-agar. Det är ett över 30 år gammalt substrat som alltifrån dess tillkomst varit standardmediet för selektiv isolering av *Y. enterocolitica*. Mediet finns kommersiellt tillgängligt från Oxoid under sammansättningen (g/L): specialpepton 20, jästextrakt 2, mannitol 20, natriumpyruvat 2, NaCl 1, Na-deoxikolat 0.5, $MgSO_4$ x $7H_2O$ 0.01, neutralrött 0.03, kristallviolett 0.01, agar 12.5. Till en liter grundmedium tillsätts två ampuller ”yersinia selective supplement” (Oxoid) som innehåller (mg/L): cefsulodin 15, irgasan 4 och novobiocin 2.5.

CIN-agar inkuberas aerobt 30-32°C i 18-24 timmar. Typiska kolonier av *Y. enterocolitica* är ca 2 mm stora med ett djuprött centrum omgivet av en genomskinlig yttre zon. Erfarenhetsmässigt är flertalet yersinia från livsmedel avirulenta vilket innebär att det trots extremt mycket manuellt arbete är mycket svårt att hitta virulenta stammar bland en bakgrundsflora av avirulenta stammar.

Identifiering

Biokemisk och serologisk identifiering

Typiska kolonier på CIN-agar plockas och testas i första hand för ureasproduktion (*Y. enterocolitica* producerar ureas) och vidaretestas sedan som regel med kommersiella kits för Enterobacteraceae eller med riktade tester. Eftersom merparten av stammarna från livsmedel är avirulenta, blir detta tyvärr en dyr och extremt arbetskrävande metod som dessutom mycket sällan ger fynd av virulenta stammar.

Efter att arten *Y. enterocolitica* identifierats vidtar biotypning som i yersinias fall alltid bör kombineras med serotypning. Resultatet blir en ”bioserotyp” av vilka

det finns en hel del eftersom de sex-sju biotyperna kan kombineras med ett 70-tal serotyper.

Vanligtvis räknar man med sex biotyper enligt tabell 22.

Tabell 22. Biotypning (BT) av *Y. enterocolitica*.

Test	BT 1A	BT 1B	BT 2	BT 3	BT 4	BT 5
Lipas	+	+	–	–	–	–
Pyrazimidas	+	–	–	–	–	–
Indol	+	+	(+)	–	–	–
Trehalos	+	+	+	+	+	–
Xylos	+	+	+	+	–	V

(+) = sent positiv, V = varierar.

Det finns även en mycket ovanlig biotyp 6, som liksom biotyp 1A är positiv för pyrazimidas, men som till skillnad från IA är negativ för lipas och indol.

De kombinationer av biotyp och serotyp som innehåller virulenta stammar är:
Biotyp 1A: inga
Biotyp 1B: O:4, O:8, O:13a, O:13b, O:18, O:20 och O:21
Biotyp 2: O:5,27 och O:9
Biotyp 3: O:1,2,3 samt O:5,27 och O:9
Biotyp 4: O:3
Biotyp 5: O:2,3
Biotyp 6: sannolikt inga

Globalt orsakas 80-90 % av yersiniosfallen av 4/O:3, medan 2/O:9 och i viss mån O:5,27 förekommer i Europa och 1B/O:8 främst i Nordamerika. Att stammarna i den mycket vanligt förekommande biotyp 1A betraktas som avirulenta beror på att de inte innehåller några av de virulensfaktorer som associeras med yersinios. Dock ska det påpekas att biotyp 1A då och då förekommer vid humana infektioner och det har föreslagits att de har andra virulensfaktorer. Möjligen är det personer med nedsatt immunförsvar som främst drabbas.

Det måste understrykas att det normalt är *kombinationen* av en biotyp och en serotyp (bioserotyp) som indikerar virulensförmåga. Enbart serotyp betyder inget. De i Europa viktigaste serotyperna (O:3 och O:9) kan förekomma i såväl biotyp 1A som i flera andra yersina-arter som *Y. aleksiciae*, *Y. bercovieri*,

Y. intermedia och *Y. kristensenii* och är då harmlösa. Serotyp O:9 kan för övrigt också korsreagera med antisera för *Brucella*.
Förekomsten av virulensplasmiden korrelerar till bland annat autoagglutination (närvaro av YadA-protein) samt bindning till kristallviolett. Vanligtvis testas MR-VP vid identifiering av yersinia och i MR-VP-rören kan autoagglutination efter 24 timmars inkubationstid ses som små klumpar av bakterier längs provrörets väggar i det rör som inkuberats vid 37°C, men däremot *inte* i röret som inkuberats vid 25°C. Det är enbart detta utfall som indikerar närvaron av virulensplasmiden, om däremot klumpar även ses i röret vid 25°C bedöms testet som negativt. Inbindning till kristallviolett tar lite mer tid att testa: stammen odlas i skakkolv i till exempel BHI-buljong vid 25°C i 18 timmar. Kulturen späds till ca 1000 celler/mL i 0.9 % NaCl-lösning. Av denna spädda kultur sprids 0.1 mL på ytan av två BHI-agarplattor, den ena inkuberas 30 timmar vid 25°C och den andra 30 timmar vid 37°C. Plattorna flödas sedan med 8 ml kristallviolettlösning (85 mg/L) i två minuter varefter kristallvioletten dekanteras av. Om kolonierna vid 37°C binder kristallviolett men kolonierna vid 25°C *inte* binder kristallviolett indikerar detta närvaron av virulensplasmiden.

Molekylärgenetisk påvisning och identifiering

Även om bioserotypen mycket väl korrelerar med virulens så är det naturligtvis säkrare att direkt påvisa virulensfaktorerna. Det finns en uppsjö molekylärgenetiska metoder för att påvisa de vanligaste virulensfaktorerna som *ail*, *inv*, *yadA*, *yops* (se ovan) samt *virF*, en gen som reglerar produktionen av Yop-proteinerna.

Dessa metoder kan dels användas för att testa kolonier, och i många fall också för att påvisa virulenta yersinia i livsmedelsråvaror. Många PCR-protokoll finns beskrivna, men man bör observera att en del har dålig känslighet.

Eftersom halten yersina som regel är mycket låg i köttråvaror, bör en PCR-metod kunna påvisa enstaka bakterier, vilket exempelvis tvåstegsmetoden i Nordisk Metodikkommittes (NMK) nr 163 uppges kunna. PCR-metoder kan också inriktas på att hitta en speciell serotyp, biotyp eller olika kombinationer av virulenta *Y. enterocolitica*/*Y. pseudotuberculosis*.

Epidemiologi

Eftersom nästan alla yersiniosfall är sporadiska, har man sällan haft behov att använda sig av epidemiologiska metoder för att spåra bakterierna. Tidigare användes kombinationen av bioserotyp och fagtypning för att spåra stammar, idag är PFGE standardmetoden.