

# Vibrio-arter i sydsvenska vatten orsakade badsårsfeber

## Ökande frekvens av bakterierna, visar studier på musslor



**ANN-SOFI REHNSTAM-HOLM,**  
docent i mikrobiologi, institutio-  
nen för matematik och naturvet-  
enskap, Högskolan Kristianstad  
ann-sofi.rehnstam-holm@hkr.se

**BETTY COLLIN,**  
doktorand i mikrobiologi, Klinisk  
bakteriologi, Sahlgrenska aka-  
demien, Göteborgs universitet  
samt Högskolan Kristianstad

Under sommaren 2006 uppmärksammades ett antal fall av sårinfektioner som drabbade badare i svenska och danska vatten. I Sverige kom denna infektion att kallas »badsårsfeber«, en sårinfektion som orsakas av bakterier tillhörande släktet *Vibrio* [1, 2]. *Vibrio* kopplas oftast samman med diarré-sjukdomar, som vanligen smittar via skaldjur eller dricksvat-  
ten, men det har visat sig att de också kan leda till andra mer eller mindre allvarliga infektioner. Sjukdomsförloppen hos olika åldersgrupper skiljer sig markant åt. I de yngre åldrarna handlar det framför allt om ögoninfektioner och externa otiter, medan den äldre patientgruppen får sårinfektioner, ibland med sepsis som följd. Patienter som drabbas värst av dessa infektioner är generellt i dålig kondition med nedsatt immunför-  
svar eller leversjukdom. Till den senare gruppen hörde patienten som avled 2006. *Vibrio*-infektioner, förutom tarminfektio-  
ner, behandlas vanligen med doxycyklin eller ceftazidim, men även kinoloner kan användas.

Det första väldokumenterade fallet av en *Vibrio*-relaterad sårinfektion inträffade i slutet av 1980-talet [3], och 2004 drab-  
bades bl a en kvinna av en allvarlig infektion efter att ha badat i ett träbadkar med uppvärmt (38 °C) vatten från Östersjön. Den bakterie som isolerades bestämdes till en icke-agglutinerande och icke-toxinproducerande *V cholerae*. Skåne och Blekinge hade elva fall av badsårsfeber under sommaren 2006. Totalt insjuknade 41 personer i Sverige, varav 23 troligen smittades inom Sverige [2]. Detta var en betydande ökning mot året innan, då totalt 25 personer insjuknade. Sommaren 2007, som var betydligt kallare, insjuknade 22 personer, varav endast två i Skåne/Blekinge. I dag råder Smittskyddsinstitutet speciellt äldre personer med sår att undvika bad utomhus då vattentemperaturen överstiger 20 °C i mer än en vecka.

### Vibrios taxonomi och naturliga habitat

*Vibrio* är gramnegativa, oftast rörliga, 1 µm × 2–3 µm långa stavar. De flesta är uteslutande marina, men vissa viktiga arter kan klara sig utmärkt vid låga salthalter eller i sötvatten. Bland de senare finns *V cholerae*, med ett salthaltsoptimum på 0,4–1,7 procent. Humanpatogena *Vibrio*-arter växer generellt dåligt vid temperaturer under 17 °C och dör snabbt vid temperaturer över 45 °C. Taxonomiskt tillhör *Vibrio* gammaproteobakteri-  
erna [4], och de tillhör den normala bakteriefloran i akvatiska system. Man hittar dem som frilevande i vattenmassan, fastsittande på partiklar, som t ex levande eller döda alger, och som associerade till fisk och skaldjur. *Vibrio* är viktiga nedbrytare av organiskt material och har betydande exoenzymaktiviteter, t ex i form av kinaser som behövs för nedbrytning av små

kräftdjur (zooplankton). Det finns *Vibrio*-arter som är patogena för såväl människa som marint levande djur. Ett exempel är fiskpatogena *V anguillarum*, som kan orsaka problem för fiskodlare. Motsatsen finns också: *Vibrio*-arter som lever i symbios med t ex musslor eller bläckfisk [5].

### *Vibrio cholerae* och andra humanpatogena *Vibrio*

Epidemiska stammar av *V cholerae* är starkt kopplade till förekomsten av koleratoxin och koleratoxinrelaterade pili. Genen som kodar för koleratoxinet ligger i en bakteriofag (bakterievirus) och kan därför spridas mellan olika stammar. Toxinrelaterade pili är receptor för bakteriofagen och avgörande för spridningen av toxingenen. Vad som är extra intressant är den evolution som skett av *V cholerae*. Pandemi fem och sex orsakades av serotyp O1, klassisk biotyp. Den sjunde pandemin, som startade 1961, orsakades av serotyp O1, biotyp El Tor. I dag vet man att klassisk och El Tor-biotyp skiljer sig åt genotypiskt [6]. Det kolerautbrott som startade 1992 i Bangladesh och Indien orsakades av serotyp O139. Detta visade för första gången att non-O1-serotyper kunde orsaka pandemisk kolera. Ibland refereras detta utbrott som den åttonde pandemin, men både serotyp O139 och O1 El Tor samexisterar ännu i dag. Non-O1/O139-serotyper av *V cholerae* kan också orsaka human diarré, men dessa stammar saknar det virulensgenpaket som är associerat med pandemiska kolerastammar. Det är ofta dessa stammar som kan ge extraintestinala infektioner. Non-O1/O139 är vanliga i alla vatten världen över, så även i svenska.

*V vulnificus* och *V parahaemolyticus* är förutom *V cholerae* de viktigaste humanpatogenerna inom släktet *Vibrio*. Dessa arter kan orsaka varierande grad av infektion hos människa efter exponering via vatten eller föda. Virulensen mellan art och stam varierar betydligt. Den vanligaste arten som isolerats från

»Skåne och Blekinge hade elva fall av badsårsfeber under sommaren 2006. Totalt insjuknade 41 personer i Sverige ...«

### SAMMANFATTAT

**Under sommaren 2006** analyserades förekomsten av *V cholerae*, *V vulnificus* och *V parahaemolyticus* i musslor från Skånes kust med hjälp av PCR-teknik.

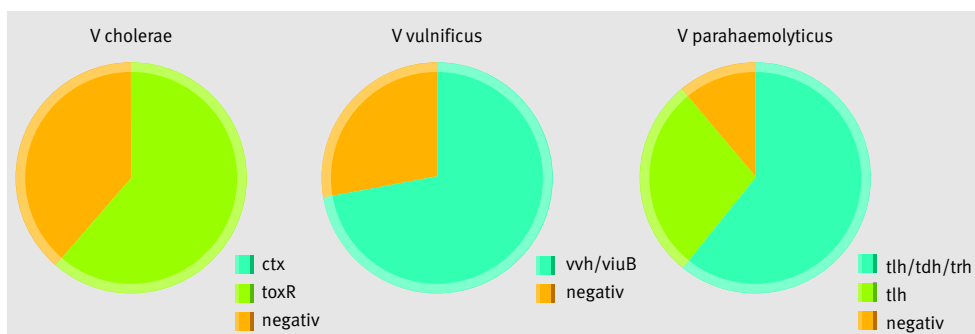
**Totalt 61 procent** av musselproven var under perioden positiva för *V cholerae*, men koleratoxingenen detekterades inte.

***V parahaemolyticus*** hittades i 89 procent av musselproven, varav 61 procent var positiva för virulensgener.

***V vulnificus*** detekterades i 72 procent av musselproven. **Den relativt höga** förekomsten och lättheten att detektera *Vibrio* spp-DNA i musslor tyder på att koncentrationen av bakterier var hög i vattnet.

**TABELL I. Amplifierade gener och använda oligonukleotidprimer.**

Vibrio spp	Gen	Genprodukt	Primersekvens 5'-3'	Referens
V cholerae	toxR	Transkriptionsfaktor	CCT TCG ATC CCC TAA GCA ATA C AGG GTT AGC AAC GAT GCG TAA G	Panicker G et al [14]
	ctx	Koleratoxin	CTC AGA CGG GAT TTG TTA GGC ACG TCT ATC TCT GTA GCC GGT ATT ACG	Lee CY et al [15]
V parahaemolyticus	tlh	Hemolysin	AAA GCG GAT TAT GCA GAA GCA CTG GCT ACT TTC TAG CAT TTT CTC TGC	Panicker G et al [14]
	tdh	Termostabilt direkt hemolysin	GTA AAG GTC TCT GAC TTT TGG AC TGG AAT AGA ACC TTC ATC TTC ACC	Panicker G et al [14]
	trh	tdh-relaterat hemolysin	TTG GCT TCG ATA TTT TCA GTA TCT CAT AAC AAA CAT ATG CCC ATT TCC G	Panicker G et al [14]
V vulnificus	vvh	Cytolysin/hemolysin	TTC CAA CTT CAA ACC GAA CTA TGA C ATT CCA GTC GAT GCG AAT ACG TTG	Panicker G et al [14]
	viuB	Metalloproteas	GGT TGG GCA CTA AAG GCA GAT ATA CGG CAG TGG ACT AAT ACG CAG C	Panicker G et al [14]



**Figur 1.** Procentuell förekomst av *Vibrio* spp vid provtagning av musslor sommaren 2006. Artspecifika gener markerade med grönt, virulensgener med blått och negativa prov med gult.

akvatiska områden världen över är *V parahaemolyticus*. Den orsakar främst gastrointestinala problem. Bland isolerade fältprov ligger virulensen på ca 2 procent men kan variera signifikant beroende på årstid och geografiskt område [7, 8]. Vanligast är att man infekteras efter konsumtion av kontaminerade skaldjur, som musslor eller ostron. I Sverige har två utbrott förekommit associerade till konsumtion av kinesiska kräftor. I det ena fallet var orsaken förvaring av kokta kräftor i förorenat vatten, i det andra gick den inte att spåra.

*V vulnificus* anses alltid vara virulent. Arten kan ge allvarliga sårinfektioner med efterföljande sepsis, men ännu svårare infektioner kan drabba dem som fått i sig bakterien via födan. Högriskgruppen utgörs av äldre personer med leversjukdomar, hematologiska sjukdomar eller med generellt nedsatt immunförsvar. Hos denna patientgrupp är mortaliteten hög, ca 50 procent. Vanligaste smittkälla är även i detta fall skaldjur.

Andra *Vibrio*-arter som *V mimicus* och *V fluvialis* kan orsaka gastroenterit och har bl a noterats som orsak till barndiarré. *V alginolyticus*, *Grimontia (Vibrio) hollisae* m fl är alltid lågvirulenta men kan hos mottagliga personer sporadiskt orsaka gastrointestinala eller extraintestinala infektioner. Speciellt vanligt är externa otiter. *Photobacterium (Vibrio) damsela* är i stor utsträckning lik *V vulnificus* och orsakar enbart infektioner i sår efter bad i bräckt vatten eller vid skada orsakad av djur i saltvatten. Infektioner är ovanliga, men hos de drabbade är dödligheten 25 procent.

## Vibrio och algblomning

Distributionen av *Vibrio* i tid och rum är dynamisk och beroende av en mängd direkta och indirekta faktorer. Parametrar som temperatur, salthalt, närsalter och planktonbiomassa har upprepade gånger rapporterats som viktiga och kan ibland användas som varningssystem för koleraepidemier [9]. Detta ty-

der på att födovävarna i vattensystemen spelar en viktig roll för smittspridningen. I ett framtidsscenario med ökad global uppvärmning kommer troligen *Vibrio*-relaterade problem att öka [9, 10]. Detta beror på att högre temperatur medför mer nederbörd, som i sin tur ökar avrinningen från land. Med vattnet förs näringsämnen som gynnar *Vibrio*-tillväxt direkt men också indirekt genom ökad frekvens av algblomningar.

Det är okänt hur naturligt förekommande, lågvirulenta *Vibrio* förändras till virulenta och epidemioröskande stammar. Inte heller vet vi hur virulenta *Vibrio* anpassar sig när de återgår till sin naturliga vattenmiljö. Sekvensanalys av hela genom från olika *Vibrio*-arter har visat att patogena stammar innehåller s k patogena öar (PAI) [11]. Liknande ansamlingar av gener i lågpatoena stammar kallas »fitness-öar« eller ekologiska öar. Alla dessa »genpaketsöar« antas kunna transporteras mellan olika *Vibrio*-stammar. Starka selektionskrafter driver på denna mikroevolution, eftersom *Vibrio* konstant måste anpassa sig till olika omvärldsförhållanden för att överleva och konkurrera framgångsrikt med andra organismer i vattenmassan. För att få inblick i denna mikroevolution måste man veta vad som händer med *Vibrio* i naturliga vattensystem.

## Studiens syfte

Vi studerar därför hur *Vibrio* interagerar med andra mikroorganismer och hur kliniska isolat aklimatiserar sig när de återkommer till vattensystemet. Genom dessa studier har vi t ex indikationer på att *Vibrio* gynnas av vissa alger men missgynnas av andra i ett marint system [12]. Andra försök som pågår inkluderar analys av överlevnaden av kliniska isolat i vatten vid olika temperatur och i naturliga sediment vid vintertemperaturer.

Sommaren-hösten 2006 genomförde vi ett provtagningsprogram för att påvisa patogena *Vibrio*-arter i vatten vid den

skånska västkusten. Vi valde att analysera förekomst av *Vibrio* i vatten via blåmusslor, då musslor fungerar som naturliga biofilter och därför ger en integrerad bild av förekomsten vid varje provtagningsstillfälle. DNA extraherat från musselhomogenat analyserades med avseende på innehåll av gener specifika för *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* och *V. vulnificus* med hjälp av PCR-teknik. Strax efter starten av provtagningsprogrammet rapporterades de första fallen av non-O1/O139-*V. cholerae*-associerade sårinfektioner från Karlskrona i Blekinge.

## MATERIAL OCH METOD

I Öresund utgörs ytvattnet av brackvatten från Östersjön, och djupare finns en sydgående ström av saltare vatten från Kattegatt. På grund av strömmarna med vatten av olika ursprung varierar salthalten, och under perioden juni–september 2006 låg den mellan 9,1 och 17,4 practical salinity units (PSU), med ett medelvärde på 12,6. Medeltemperaturen i vattnet var 22,5 °C i juli, med en toppnotering på 24,1 °C den 25 juni i Råå. I augusti var medeltemperaturen 20,5 °C och sjönk sedan ytterligare till 15,6 °C vid provtagning i september. Blåmusslor (*Mytilus edulis*) samlades in vid två lokaler, Domsten (56°06'58"N 12°36'12"E) 11 kilometer norr om Helsingborg och Råå (55°59'31"N 12°44'30"E) 7 kilometer söder om Helsingborg. Vid Domsten plockades musslor vid vattenbrynet, medan musslorna från Råå plockades en bit ut från stranden på ett djup av ca 0,5 m.

## Preparation av musslor och analyser

Insamling av musslor gjordes 17 gånger under sommaren 2006, mellan den 4 juli och 25 september. Minst tolv musslor (medelvikt musselkött per mussla är  $1,25 \pm 0,8$  g) plockades vid varje tillfälle och förvarades kallt fram till dess att analysen påbörjades. Musslorna skrubades och sköljdes i destillerat vatten. De öppnades sedan aseptiskt, och musselkött tillsammans med eventuell vätska homogeniserades i två minuter i en steril mixer. Från musselhomogenat odlades *Vibrio* spp fram enligt anrikningsmetod: preanrikning i alkaliskt peptonvatten (pH 8,0–8,5) och utstryk på *Vibrio*-specifika TCBS-agarplattor (thiosulfate citrate bile salts sucrose, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) [13]. För kvalitativ undersökning av musslornas innehåll extraherades totalt DNA från musselhomogenat med ett extraktionskit (QIAamp DNA Stool Mini Kit, Qiagen). Kvalitativa analyser av *Vibrio*-specifika gener gjordes sedan med PCR-teknik (Tabell I).

## RESULTAT

I vårt material kunde vi redan från starten av provtagningen den 4 juli detektera *Vibrio*-specifika gener och virulensgener (Figur 1). Det sista positiva provet detekterades den 25 augusti, och därefter var alla prov negativa. Vi kunde inte heller isolera *Vibrio* genom anrikning. Totalt under provtagningsperioden var 61 procent av musselproven positiva för non-O1/O139-*V. cholerae* (toxR). Alla prov var negativa för *ctx*-genen (kolera-toxingenen). 89 procent av musselproven var positiva för *V. parahaemolyticus* (*tlh*), varav 61 procent var positiva även för virulensgenerna *tdh* och *trh*. *V. vulnificus* detekterades i 72 procent av musselproven (*vvh* och/eller *viuB*).

## DISKUSSION

Ett kilo blåmusslor kan filtrera upp till 90 liter havsvatten per timme och samlar under filtreringen upp partiklar ned till virusstorlek på sina gälar. Analys av *Vibrio*-förekomst med hjälp av musslor ger därigenom en integrerad bild av förekomsten av *Vibrio* i ett vattensystem. *Vibrio* tillväxer heller inte i musslor så länge vattentemperaturen inte är så hög att musslorna stressas (>25 °C). Vi har valt att använda molekylär identifiering av

## »Badsårsfeber och andra *Vibrio*-relaterade infektioner är med andra ord här för att stanna.«

*Vibrio*, eftersom dessa bakterier kan förekomma i både odlingsbart och icke-odlingsbart tillstånd (»culturable« eller »viable but non culturable«). Det betyder att odling med eller utan anrikning ger missvisande resultat. Nackdelen med att detektera förekomst av *Vibrio* via konventionell PCR-teknik är att det svar man får inte är kvantitativt. Därför håller vi på att utveckla och förfinna kvantitativa PCR-metoder för detektion av totala antalet av såväl *Vibrio* som *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* och *V. vulnificus*.

Med kvalitativ PCR-teknik har vi kunnat visa att 89 procent av de musselprov vi analyserat innehöll *V. parahaemolyticus* och att 61 procent av dessa bar på en virulensgen. Detta är en vid internationell jämförelse hög siffra [7, 8, 14]. Förklaringen till denna diskrepans är att andra studier alltid analyserat musslor tänkta för konsumtion. Vi har inte använt oss av repodlade musslor som hänger fritt i vattenmassan utan genomgående analyserat musslor insamlade vid strandkanten nära botten, eftersom syftet med vår studie var att följa förekomsten av potentiellt humanpatogena *Vibrio*-arter i vattenmassan och inte, som är fallet med andra studier, att påvisa att musslor odlade för konsumtion inte innehåller patogena *Vibrio*-arter.

Studier av isolerade stammar och kliniska isolat pågår, och vi tittar bl a på överlevnaden av olika kliniska *V. cholerae*-isolat vid olika salthalter och vattentemperaturer. Preliminära resultat visar att överlevnaden är lika bra för kliniska isolat som för isolat från naturen vid 20 °C och 6 °C. Vi studerar även musslors upptag av kliniska isolat respektive isolat från naturen, och resultaten visar att musslor tenderar att ta upp isolat från naturen i större utsträckning än kliniska isolat. Detta kan tyda på att musslor kan skilja på virulenta och icke-virulenta stammar. Tidigare studier på musslors upptag av *Salmonella* har klart visat att musslor har förmåga att skilja mellan patogena och icke-patogena bakteriestammar [16].

## KONKLUSION

Ett slående resultat av våra analyser var att vi så enkelt kunde hitta och isolera *Vibrio* från de sydsvenska vattnen under sommarperioden. Salthalterna i Östersjöregionen är idealiska för framför allt *V. cholerae* och *V. vulnificus*, och med ökad årlig vattentemperatur kan vi troligen räkna med att koncentrationerna av dessa bakteriearter kommer att öka. Ökad avrinning från land innebär ökande övergödning, som i sin tur också gynnar *Vibrio*. Detta sker både direkt, eftersom *Vibrio*-tillväxt gynnas av mycket organiskt material i vattenmassan, och indirekt genom att övergödning leder till mer frekventa och kraftigare algbloomningar, som i sin tur genererar ökad mängd organiskt material. Badsårsfeber och andra *Vibrio*-relaterade infektioner är med andra ord här för att stanna.

■ *Potentiella bindningar eller jävsförhållanden: Inga uppgivna.*

■ *Överläkare Johan Rydberg har granskat fakta, personal vid avdelningen för klinisk bakteriologi, Centralsjukhuset, Kristianstad, har utfört biokemiska analyser. Jim Collin, Ellen Jönsson och Nina Linné har hjälpt till med provtagningen.*

## REFERENSER

- Eitrem R. Badsårsfeber! *Vibriosis*? Läkartidningen. 2006;103(45): 3545.
- Andersson Y, Ekdahl K. Wound infections due to *Vibrio cholerae* in Sweden after swimming in the Baltic Sea, summer 2006. Eurosurveil-

- lance. 2006;11:(31). ViewArticle.aspx?ArticleId=3013 <http://www.eurosurveillance.org>
3. Wiström J. A case of non:O:1 *Vibrio cholerae* bacteremia from northern Europe. *J Infect Dis.* 1989; 160(4):732.
  4. <http://www.bergeys.org> [cited 2007 Sept 13].
  5. Thompson FL, Austin B, Swings J, editors. *The biology of Vibrios.* Washington DC: ASM Press; 2006.
  6. Dziejman M, Balon E, Boyd D, Fraser CM, Heidelberg JF, Mekalanos JJ. Comparative genomic analysis of *Vibrio cholerae* genes that correlate with cholera endemic and pandemic disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:1556-61.
  7. DePaola A, Nordstrom JL, Bowers JC, Wells JG, Cook DW. Seasonal abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Alabama oysters. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(3):1521-6.
  8. Deepanjali A, Kumar HS, Karunasagar I, Karunasagar I. Seasonal variation in abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters along the southwest coast of India. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(7):3575-80.
  9. Lobitz B, Beck L, Huq A, Wood B, Fuchs G, Faruque AS, et al. Climate and infectious disease: use of remote sensing for detection of *Vibrio cholerae* by indirect measurement. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:1438-43.
  10. Colwell RR. Global microbial ecology of *Vibrio cholerae*. In: Belkin S, Colwell RR, editors. *Oceans and health: pathogens in the marine environment.* New York: Springer; 2005. p. 297-306.
  11. Iida T, Park KS, Honda T. *Vibrio parahaemolyticus*. In: Thompson FL, Austin B, Swings J, editors. *The biology of Vibrios.* Washington DC: ASM Press; 2006. p. 340-8.
  12. Rehnstam-Holm AS, Godhe A, Härnström K, Raghunath P, Saravanan V, Collin B, et al. Association between phytoplankton and *Vibrio* spp. along the south west coast of India – a mesocosm experiment. *Aquat Microb Ecol.* In revision 2008.
  13. Kobayashi T, Enomoto S, Sakazaki R, Kuwahara S. A new selective isolation medium for the *Vibrio* group; on a modified Nakanishi's medium (TCBS agar medium). *Nippon Saikingaku Zasshi.* 1963;18:387-92.
  14. Panicker G, Call DR, Krug MJ, Bej AK. Detection of pathogenic *Vibrio* spp in shellfish by using multiplex-PCR and DNA microarrays. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70:7436-44.
  15. Lee CY, Panicker G, Bej AK. Detection of pathogenic bacteria in shellfish using multiplex-PCR followed by Covalink NH microwell plate sandwich hybridization. *J Microbiol Methods.* 2003;53:199-209.
  16. Hernroth B. Factors influencing bactericidal activity of blue mussel (*Mytilus edulis*) haemocytes against *Salmonella typhimurium*. *Fish Shellfish Immunol.* 2003;14:93-104.

**Dela med dig av dina erfarenheter**  
Kommentera artiklarna i Läkartidningen direkt på [lakartidningen.se](http://lakartidningen.se)

Utmanande saklig

**Läkartidningen**