

Kartläggning av shigatoxin- producerande *E.coli* (STEC) på nötkött och bladgrönsaker

av Maria Egervärn och Catarina Flink

Projektgrupp

Maria Egervärn	Risk- och nyttovärderare, Risk- och nyttovärderingsenheten
Catarina Flink	Mikrobiolog, Mikrobiologienheten
Maria Hellmér	Laboratorieingenjör, Mikrobiologienheten
Sara Johansson	Kommunikationsstrateg, Kommunikationsenheten
Caroline Kaipe	Laboratorieingenjör, Mikrobiologienheten
Mats Lindblad	Smittskyddssamordnare, Kontrollstödsenheten
Malin Lindqvist	Laboratorieingenjör, Mikrobiologienheten
Ingela Tillander	Laboratorieingenjör, Mikrobiologienheten
Paula Ågren	Laboratorieingenjör, Mikrobiologienheten

Innehåll

Projektgrupp	1
Summary.....	3
Sammanfattning.....	4
Inledning.....	5
Syfte.....	5
Bakgrundsfakta om shigatoxinproducerande <i>E. coli</i> (STEC)	5
Smittämnet och spridningsvägar	5
Sjukdom hos människa samt epidemiologi	6
Utbrott och tidigare undersökningar av förekomsten på nötkött och grönsaker	7
Lagstiftning och vägledning	8
Utförande.....	9
Valet av produkter	9
Provinsamling.....	9
Analyser.....	11
Detektion och isolering av STEC från livsmedel	11
Serotypning av STEC från livsmedel.....	13
Detektion och haltbestämning av <i>E. coli</i> på bladgrönsaker	13
Resultat.....	14
Förekomst av STEC på nötkött	14
Misstänkta STEC.....	14
Bekräftade STEC.....	14
Serotyper.....	15
Förekomst av STEC i bladgrönsaker.....	16
Misstänkta STEC.....	16
Förekomst och halter av <i>E. coli</i> i bladgrönsaker	17
Diskussion	18
Finansiering	21
Tack	21
Referenser.....	22
Bilaga 1.....	26

Summary

This study investigated the occurrence of shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) in beef and leafy greens available on the Swedish market. New data are required for assessing the public health risk of STEC in food, which could be used for developing risk management strategies. Food samples were collected at retail stores, importers, outlets and in markets. Samples of minced or whole meat from cattle were collected fresh or frozen from 2010 to 2011. The beef sample collection included products from the most common countries or regions exporting beef to Sweden. The collection of leafy greens consisted of domestic and imported products that were available on the Swedish market from 2012 to 2013.

Detection of virulence genes (*stx1*, *stx2*, *eae*) and genes specific for different serogroups (O26, O103, O111, O145 and O157) was performed by real-time PCR followed by isolation of bacteria from the *stx*-positive enriched samples by use of immunomagnetic separation. STEC bacteria were also isolated by an immunoblotting method. All STEC isolated from the food samples were serotyped.

STEC was isolated from 23 (13 percent) of the 177 imported beef samples tested. Approximately 3 percent of the beef samples contained STEC positive for *stx2* and *eae*, both of which are important markers for the ability of the bacteria to cause severe disease. In total, 27 STEC were isolated, belonging to 14 different serogroups. STEC O26 was most common (approximately 2 percent of the beef samples), whereas STEC O157, frequently implicated in STEC-related foodborne outbreaks in Sweden, was found in two (1 percent) of the beef samples.

The enrichment broth of 11 (approximately 2 percent) of the 630 samples from leafy greens were tested positive for *stx1* and/or *stx2* by PCR analysis; however, no bacteria were isolated. Presumptive STEC was detected in enriched samples from both domestic and imported products. *E. coli* was found in 68 (39 percent) out of 174 and 14 (30 percent) out of 46 samples of imported and Swedish leafy greens, respectively, indicating that the proportion of *stx*-positive *E. coli* in the samples was low.

Sammanfattning

Syftet med kartläggningen var att öka kunskapen om förekomsten av shigatoxinproducerande *E. coli* (STEC) i nötkött och bladgrönsaker på den svenska marknaden. Det behövs nya data till underlaget för riskvärdering av STEC i livsmedel, vilket ger möjlighet att utarbeta vetenskapligt baserade riskhanteringsåtgärder som till exempel råd. Insamlingen av nötkött omfattade hela styckningsdetaljer eller köttberedningar som hade förts in till Sverige från andra EU-länder eller importerats från Sydamerika. Insamlingen baserades på de länder och områden som stod för den största delen av det införda och importerade nötköttet vid tiden för kartläggningen, 2010–2011. Både fryst, kylförvarat och kött som inte hade värmebehandlats samlades in för analys. Insamlingen av bladgrönsaker omfattade prov från inhemska, införda och importerade produkter och baserades på vilka produkter som fanns tillgängliga på den svenska marknaden under provtagningsperioden, 2012–2013. Livsmedelsproverna samlades in hos grossister, köttimportörer, vid torghandel (bladgrönsaker), på stormarknader och i mindre butiker.

Förekomsten av STEC undersöktes med Realtids-PCR, en metod som baseras på detektion av virulensgener (*stx1*, *stx2*, *eae*) och gener som är specifika för olika serogrupper (O26, O103, O111, O145 och O157), och isolering av bakterier med hjälp av immunomagnetisk separation från *stx*-positiva odlingsbuljonger. Isolering av STEC gjordes också med en immunoblotmetod. Samtliga STEC som isolerades från livsmedelsproven serotypades.

STEC isolerades från 23 (13 procent) av de 177 analyserade proven från infört och importerat nötkött. *Stx2* tillsammans med *eae* är viktiga markörer för bakteriens förmåga att orsaka allvarlig sjukdom. I drygt 3 procent av köttproven påvisades STEC med båda dessa virulensgener. I vissa prov isolerades två eller tre STEC. De totalt 27 isolaten tillhörde 14 olika serogrupper. Av dessa var STEC O26 den vanligaste serogruppen och påvisades i drygt 2 procent av köttproven. STEC O157, som är vanligast i utbrottssammanhang i Sverige, påvisades i två (1 procent) av köttproven.

Av de totalt 630 analyserade proven från bladgrönsaker var 11 (cirka 2 procent) misstänkt positiva för STEC, men några STEC kunde inte isoleras. Misstänkta STEC detekterades i odlingsbuljonger från prov av både svenska, införda och importerade bladgrönsaker. *E. coli*-bakterier förekom i 68 (39 procent) av 174 analyserade prov från införda eller importerade bladgrönsaker och i 14 (30 procent) av 46 prov från svenska bladgrönsaker. Det tyder på att andelen *E. coli* med *stx*-gener i proven var låg.

Inledning

Infektion med shigatoxinproducerande *E. coli* (STEC) utgör ett betydande hälso-
problem eftersom det kan orsaka allvarlig sjukdom hos människa och framför allt
att små barn drabbas. Idag är STEC, tillsammans med salmonella, det smittämne
som orsakat flest utbrott i världen med nötkött som smittkälla (Greig et al. 2009).
I Sverige började STEC att spridas på allvar under mitten av 90-talet och sedan
dess har flera sjukdomsutbrott orsakade av STEC inträffat. Livsmedelsverket har
under de senaste åren deltagit i flera utbrottsutredningar kopplade till STEC i
livsmedel såsom understekt köttfärs, opastöriserad mjölk och bladgrönsaker.

Syfte

Syftet med kartläggningen var att öka kunskapen om förekomsten av olika typer
av STEC på nötkött och bladgrönsaker på den svenska marknaden¹. Kartlägg-
ningen utgör underlag för riskvärdering och därmed möjlighet till utarbetande av
vetenskapligt baserade riskhanteringsåtgärder som till exempel råd.

Bakgrundsfakta om shigatoxinproducerande *E. coli* (STEC)

Smittämnet och spridningsvägar

STEC är ett samlingsbegrepp för de typer av *E. coli* som producerar shigatoxin,
ett gift som kan orsaka allvarlig sjukdom hos människa (Sandvig 2001). Tarmin-
fektion med STEC framkallar ibland blodiga diarréer och bakterien benämns där-
för enterohemorragisk *E. coli* (EHEC) inom sjukvården. En annan vanlig benäm-
ning som används synonymt med STEC är verocytotoxinbildande *E. coli* (VTEC).
EFSA (2013) rekommenderade nyligen benämningen STEC istället för VTEC
i syfte att harmonisera nomenklaturen. I detta dokument används genomgående
benämningen STEC.

Det finns två undergrupper av shigatoxin, Stx1 som kodas av genen *stx1* och
Stx2 som kodas av *stx2*. Shigatoxinerna är direkt nödvändiga för att sjukdoms-
symtom ska uppkomma vid infektion med STEC men även andra virulensgener
bidrar. Stx2 är mer frekvent förknippad med sjukdom hos människa än Stx1.
Stammar som producerar Stx2 orsakar vanligen också allvarligare symtom (Mat-
husa et al. 2010; Efsa 2013). En annan bidragande virulensgen är *eae*, som kodar
för proteinet intimin och som är viktigt för att STEC ska kunna fästa vid tarmepi-
telet. Vissa kombinationer av virulensgener hos STEC såsom *stx2* och *eae* bedöms

¹ Kartläggning av förekomsten av STEC på svenskt nötkött ingick dock inte.

utgöra högre risk att orsaka allvarligare sjukdom (Caprioli et al. 2004; Andersson et al. 2011; Efsa 2013).

STEC kan delas in i olika serogrupper och serotyper, vilka bestäms utifrån vilka antigener (ytstrukturer) som bakterien har. Serogrupp avser antigen, benämnda O-typer, som sitter i bakteriens cellvägg. Serotyp avser förutom O-typen även antigen benämnda H-typer, som finns på bakteriens rörelseorgan (flagell). Dessa varianter är i sig inte direkt bidragande till en STEC-bakteries virulens, men kan fungera som en indirekt markör för att identifiera sjukdomsframkallande STEC (Andersson et al. 2011; Efsa 2013).

STEC har hittats i tarmen hos människor och djur, särskilt nötkreatur och får, men även andra idisslare. Bakterien är zoonotisk, vilket innebär att den kan spridas mellan djur och människor. Djur som bär på STEC i sin tarm blir dock oftast inte själva sjuka. Bakterien sprids till människor den fekal-orala vägen (tarmbakterier som når munnen), till exempel genom direkt kontakt med djur, indirekt via förorenade livsmedel eller via djurens närmiljö. Även smitta från person till person förekommer (Pennington 2010).

Sjukdom hos människa samt epidemiologi

De klassiska symtomen hos människa är magsmärtor och oblodiga eller blodiga diarréer som uppträder efter 1-8 dagar (Nataro et al. 1998). Symtombilden varierar dock alltifrån symtomfrihet till livshotande tarmsymtom. STEC kan också skada andra organ, främst njurarna i form av njursvikt, så kallad hemolytiskt uremiskt syndrom (HUS). Små barn är särskilt känsliga och löper exempelvis större risk än vuxna att insjukna i HUS. I vissa fall med HUS ses neurologiska störningar och även dödsfall förekommer (Nataro et al. 1998; Pennington 2010). Det behövs mycket få bakterier för att bli sjuk, 10-100 st kan räcka (Willshaw et al. 1994; Haas et al. 1999), och bakterien behöver således inte växa till i ett livsmedel för att orsaka sjukdom.

Infektion med STEC klassas som en allmänfarlig och smittspåringspliktig sjukdom i Sverige enligt smittskyddslagen. År 2013 rapporterades totalt 550 fall i Sverige, varav 253 fall smittats i Sverige (Folkhälsomyndigheten 2014). Barn under fem år utgjorde 21 procent av de inhemska fallen år 2013. De flesta av sjukdomsfallen är sporadiska, dvs. förekommer vid enstaka tillfällen och klassas inte som utbrott, och inträffar under sommaren och tidig höst. Under de senaste fem åren har både antalet inhemskt smittade och utlandssmittade ökat, vilket kan spegla en reell förändring men också kan bero på frikostigare provtagning och förbättrad diagnostik (Myndighetsrapport 2014). Den rapporterade förekomsten av STEC-infektioner hos den svenska befolkningen är förhållandevis hög jämfört med andra europeiska länder, men även inom EU ses en ökad trend med totalt 5 671 inrapporterade fall av STEC under 2012 (Efsa/ECDC 2014).

STEC tillhörande serogruppen O157 och serotypen O157:H7 är vanligast förekommande hos personer smittade både i och utanför Sverige. Sedan 2009 har dock andelen sjukdomsfall av STEC tillhörande andra serogrupper ökat årligen i Sverige. År 2013 stod STEC O157 för 36 procent av de inhemska fallen, medan

den resterande andelen dominerades av O26, O103, O-icke typningsbara och O121 (Myndighetsrapport 2014).

Utbrott och tidigare undersökningar av förekomsten på nötkött och grönsaker

I Sverige har livsmedelsburna utbrott med STEC förekommit i samband med föräring av otillräckligt upphettad nötfärs, opastöriserad mjölk, bladgrönsaker samt dricksvatten från egen brunn. Det största livsmedelsburna utbrottet i Sverige inträffade 2005 då 135 personer smittades med STEC O157, varav 11 patienter utvecklade HUS. Smittkällan var sannolikt isbergssallad odlad i Halland som bevattnats med åvatten som förorenats med gödsel från nötkreatur på en gård uppströms från odlingen (Söderström et al. 2008). År 2002 smittades 28 personer i Skåne med STEC O157 efter att ha ätit kallrökt korv. Av dessa utvecklade nio personer HUS (Sartz et al. 2008). Ett annat exempel där nötkött identifierats som smittkälla är ett utbrott med STEC O157 år 2013 då fem personer i Västmanland, varav två barn, insjuknade efter att ha ätit ej genomstekta hamburgare (Smittskyddsinstitutet 2013).

Nyare data över förekomsten av STEC i livsmedel på den svenska marknaden är begränsade då bara ett fåtal kartläggningar har gjorts och ingen systematisk övervakning av STEC i livsmedel görs i Sverige. Data över förekomsten av STEC i grönsaker på den svenska marknaden saknas helt. Förekomsten av STEC i grönsaker i andra europeiska länder varierade från 0,5 till 6,5 procent enligt en sammanställning av kartläggningar mellan 2007 och 2011 inom EUs zoonosövervakning med resultat från 12 inrapporterande medlemsländer (Efsa/ECDC 2012; 2013).

I Livsmedelsverkets baslinjestudie 2006-2007 på slaktkroppar av nöt i Sverige påvisades STEC O157 i 0,3-0,7 procent (beroende på analysmetod) av 800 analyserade svabbprover (Lindblad 2008). I en svensk kartläggning av STEC O157 på helt nötkött (avsett för malning) gjordes inga fynd i 543 prov av svenskt kött medan bakterien påvisades i 0,3-2,4 procent (beroende på analysmetod) av 368 prov från importerat kött och kött som förts in från andra EU-länder (Lindqvist et al. 1998). Vid det senaste zoonosrapporteringsstillfället inom EU var förekomsten av STEC på helt och malet nötkött i genomsnitt 1,3 procent. Endast nio medlemsländer hade dock inrapporterat data och uppgifter om vilka serogrupper som inkluderats saknades i regel (Efsa/ECDC 2014).

Lagstiftning och vägledning

Livsmedel och livsmedelssäkerhet regleras i stor utsträckning gemensamt inom EU. Målet är att alla livsmedel som släpps ut på marknaden skall vara säkra för konsumenten. Livsmedelsföretaget har enligt (EG) nr 178/2002 det primära ansvaret för att hälsovådliga produkter inte når marknaden. Offentlig kontroll av livsmedelsföretagen ska utföras regelbundet av behöriga myndigheter för att säkerställa att livsmedelslagstiftningen efterföljs ((EG) nr 882/2004).

Ingen specifik lagstiftning eller vägledning finns för närvarande för fynd av STEC på kött och bladgrönsaker. Sedan mars 2013 finns lagstiftning gällande livsmedelsföretag som producerar groddar; EU-kommissionens förordning (EU) nr 209/2013, tillägg till förordning (EG) 2073/2005 gällande mikrobiologiska kriterier för livsmedel. Den ställer specifika krav på livsmedelsföretag som producerar groddar för att minska risken för att deras produkter innehåller STEC när dessa når marknaden. Dessutom arbetar EU-kommissionen för närvarande tillsammans med medlemsländerna med att ta fram en vägledning för hur fynd av STEC i livsmedel ska hanteras. Detta för att få en mer enhetlig hantering vid fynd av STEC i livsmedel inom EU. I Sverige har Livsmedelsverket tillsammans med andra myndigheter nyligen tagit fram en nationell strategi för arbetet med STEC. Detta dokument ersätter den tidigare gemensamma handlingspolicyn avseende kontroll av STEC (Myndighetsrapport 2014).

Utförande

Valet av produkter

Kartläggningen av nötkött omfattade hela styckningsdetaljer eller köttberedningar som förts in till Sverige från andra EU-länder eller importerats från Sydamerika (tabell 1). Både fryst och kylförvarat, icke värmebehandlat, kött samlades in för analys.

Kartläggningen av bladgrönsaker omfattade prov från inhemska, införda och importerade produkter (tabell 1). Till bladgrönsaker räknades alla typer av sallat och spenat samt kålväxter från vilka bladen äts. Krukodlade produkter eller sammansatta livsmedel (till exempel lunchsallader) ingick inte i kartläggningen. De produkter som samlades in för analys var oförpackade eller förpackade med eller utan skyddad atmosfär.

Provinsamling

Insamlingen av prov från nötkött och bladgrönsaker genomfördes som en del i ett större projekt om förekomst av ESBL-bildande tarmbakterier på kött och bladgrönsaker på den svenska marknaden (Egervärn et al. 2011; 2014).

För köttproven togs en översiktlig provtagningsplan fram utgående från de länder och områden som stod för störst del av det införda och importerade nötköttet vid tiden för kartläggningen; Irland 35 procent, andra europeiska länder 57 procent och Sydamerika 7 procent (Egervärn et al. 2011; SJV 2009). Målsättningen var att samla in cirka 40-50 prov av irländskt nötkött, 100 prov av nötkött från andra länder inom EU samt 40-50 prov av sydamerikanskt nötkött. Under undersökningens gång gavs information till provtagare för att styra provtagningen mot länder eller områden med få tagna prov.

Prov av bladgrönsaker samlades in baserat på vilka produkter som fanns tillgängliga på den svenska marknaden under provtagningsperioden. Provtagarna uppmanades att ta prov vid flera tillfällen för att fånga årstidsvariationer. Målet var att samla in 500 prov från bladgrönsaker.

För provtagning av kött och bladgrönsaker nyttjades Livsmedelsverkets sedan tidigare etablerade nätverk för utbrotsanalyser bestående av landets största kommuner. Tio av dessa kommuner deltog i omgångar (Stockholm stad, Göteborg stad, Gävle, Helsingborg, Linköping, Malmö, Norrköping, Uppsala, Västerås och Örebro) med att ta prov hos grossister, vid torghandel (bladgrönsaker), på stormarknader och i mindre butiker. Även ett antal importörer bidrog med prover till köttkartläggningen från sina respektive anläggningar. Prover togs också av Livsmedelsverkets egen personal, både vid gränskontrollstationerna (nötkött) och i butiksledet.

Varje prov omfattade minst 100 gram. Proven packades och skickades kylda till Livsmedelsverket. Köttprodukter och salladspåsar av samma varumärke skulle

ha olika batchnummer eller olika bäst-före-datum. Ifall två identiska prov samlades in och analyserades, inkluderades bara resultaten från det senast inkomna provet i kartläggningen.

Tabell 1. Prover som ingick i kartläggningen

Provtyp	Antal analyserade prov	Ursprung (antal prov)	Typ av produkt (antal prov)	In-samlingsperiod
Nötkött	177	Irland (39), övrigt infört ^a (96), Sydamerika ^b (42)	kylt helt kött (87), fryst helt kött (44), kyld köttfärs (12), fryst köttfärs (34)	Feb 2010- jun 2011
Bladgrönsaker	630	Sverige (147), infört ^c (365), importerat ^d (10), blandat ^e (108)	sallatsmix ^f (138), spenat (92), rucola- sallat (90), kålväxter (70), romansallat (55), isbergssallat (42), mâchesallat (29), huvudsallat (27), mangold (19), övr. sallatstyper (68)	Maj 2012- dec 2013

^aDanmark (3), Estland (1), Italien (3), Litauen (7), Nederländerna (26), Polen (11), Storbritannien (5), Tyskland (35), Österrike (5).

^bArgentina (6), Brasilien (18), Uruguay (18).

^cCypern (1), Danmark (17), Frankrike (22), Italien (141), Nederländerna (42), Norge (1), Polen (3), Portugal (2), Spanien (93), Tyskland (37), Ungern (6).

^dEgypten (2), Laos (1), Thailand (1), Turkiet (3), Vietnam (3).

^esallatsmix med ingredienser från minst två olika EU-länder, inklusive Sverige.

^f innehöll två eller flera sallatstyper.

Analys

Detektion och isolering av STEC från livsmedel

Inkomna livsmedelsprov hanterades enligt Livsmedelsverkets instruktion för provhantering av mikrobiologiska prov. Detektion och isolering av STEC i livsmedelsproven gjordes enligt en metod uppsatt av Livsmedelsverket. Metoden har stora likheter med den tekniska specifikation från ISO för analys av STEC som publicerades hösten 2012 (ISO/TS 13136:2012). Skillnader mellan metoderna är användning av olika anrikningsbuljonger, olika inkuberingstemperatur för anrikning i buljong samt olika PCR-primrar vid detektion av *stx*-generna. Nedan följer en översiktlig beskrivning av analysmetoden, som baseras på detektion av virulensgener med realtids-PCR och immunomagnetisk separation (IMS) av bakterier från odlingsbuljonger.

Prov som testats positiva med PCR för *stx*-gen/er/ bedömdes som misstänkt positiva för STEC, och prov med isolerade *stx*-positiva *E. coli* bedömdes som bekräftat positiva för STEC. Vid fynd av STEC O157 i köttproven kontaktades lokal kontrollmyndighet för vidare åtgärder.

Anrikning

Totalt 25 g av provet blandades med 225 ml Trypton Soja Buljong (TSB) med homogenisator och anrikades vid 41,5°C i 18 till 24 timmar.

Realtids-PCR

Extraktion av genomiskt DNA utfördes genom att ta 200 µl från anrikningbuljongen till ett automatiserat system, BioRobot EZ1 och EZ1 DNA Tissue Kit (Qiagen). Eluering av DNA gjordes i 100 µl elueringsbuffert. Detektion av generna *stx1* och *stx2* (Nielsen och Andersen 2003) utfördes på det extraherade DNAt med realtids-PCR. Vid detektion av en eller båda *stx*-gener utfördes ytterligare en analys med realtids-PCR där detektion av genen *eae* (Nielsen och Andersen 2003), och gener för serogrupperna O157, O26, O103, O111 och O145 (Perelle, Dilasser et al. 2003; Perelle, Dilasser et al. 2005) utfördes.

Immunomagnetisk separation (IMS)

De köttprover som var positiva för en eller båda *stx*-gener samt O157 analyserades med IMS på färsk anrikningsbuljong. På resterande köttprov som var positiva för en eller båda *stx*-gener samt någon av serogrupperna O26, O103, O111 och O145 utfördes IMS på infrysbuljong. IMS utfördes också på färsk anrikningsbuljonger från de grönsaksprov som var positiva för en eller båda *stx*-gener samt någon av de fem serogrupperna.

IMS utfördes på 1 ml av anrikningsbuljongen per detekterad serogrupp. Med IMS selekterades bakterier med specifik serogrupp ut med hjälp av antikroppar kopplade till magnetiska kulor. De magnetiska kulorna spreds sedan ut på selek-

tiva odlingsplattor som är mer eller mindre anpassade till de aktuella serogrupperna (tabell 2). Plattorna inkuberades vid 37°C i 18 till 24 timmar. Misstänkt positiva kolonier verifierades som STEC med realtids-PCR för gener mot *stx* och den aktuella serogruppen.

Tabell 2. Odlingsplattor som användes vid isolering efter IMS

Serogrupp	Odlingsplatta med lägre selektivitet	Odlingsplatta med högre selektivitet
O157	SMAC ^a	CT-SMAC ^a
O26	RMAC ^b	CT-RMAC ^b
O145	MAC ^c	CHROMAGARVTEC ^d
O103	MAC	CHROMAGAR VTEC
O111	MAC	CHROMAGAR VTEC

^a NMKL Nr. 164 2:a utgåvan, 2005.

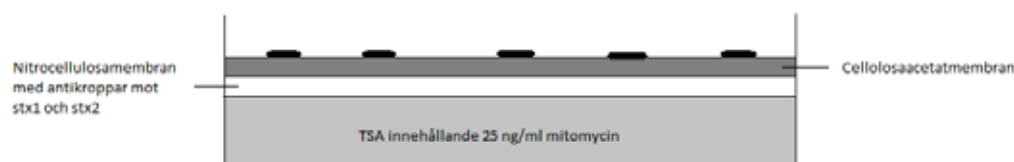
^b ISO/TS 13136:2012.

^c Bacteriological Analytical Manual, Chapter 4A, Diarrheagenic *Escherichia coli*.

^d Possé et al. 2008.

Immunoblot

Vid detektion av en eller båda *stx*-gener men ingen av de aktuella serogrupperna gjordes isoleringen av STEC med hjälp av en antikropps-baserad immunoblotmetod mot toxinerna Stx1 och Stx2 (Atalla et al. 2000). Analys med immunoblot utfördes på infrost anrikningsbuljong för både kött- och grönsaksprov. Analysmetoden innebär i korthet att Stx-toxiner som producerats av bakterier fångas upp och detekteras med antikroppar. Ett nitrocellulosamembran (82 mm; 0,2 µm) som behandlats med kanin-anti stx1 och anti stx2 antikroppar lades på Trypton Soja Agar (TSA)-plattor innehållande 25 ng/ml mitomycin. Över nitrocellulosamembranet lades ett cellulosaaacetatmembran (82 mm; 45 µm). Anrikningsbuljongen späddes och spreds uppe på cellulosaaacetatmembranet (figur 1). Plattorna inkuberades vid 37°C i 18 till 24 timmar.



Figur 1. Schematisk bild på hur de olika membranerna placerades på odlingsplattan

Efter inkuberingen avlägsnades nitrocellulosamembranet och behandlades först med en blandning av monoklonala antikroppar mot Stx1, Stx2/c, Stx2e och Stx2d-varianter följt av en sekundär antikropp kopplad till ett enzymkonjugat. Därefter behandlades nitrocellulosamembranet med en framkallningsvätska för att få fram lila prickar på membranet, vilket indikerar shigatoxinproducerande kolonier på motsvarande plats på celluloacetatmembranet. Misstänkt positiva kolonier från celluloacetatmembranet verifierades som STEC med realtids-PCR för gener mot *stx* som beskrivits tidigare.

Serotypning av STEC från livsmedel

De isolerade STEC-bakterierna analyserades med metoder uppsatta av Livsmedelsverket för serogrupperna O26, O55, O91, O103, O104, O111, O113, O121, O145 och med realtids-PCR och O146 och O128 med konventionell PCR. Alla isolat skickades även vidare till Statens Serum Institut i Danmark för serotypning (Statens Serum Institut, The International Escherichia and Klebsiella Centre, WHO).

Detektion och haltbestämning av *E. coli* på bladgrönsaker

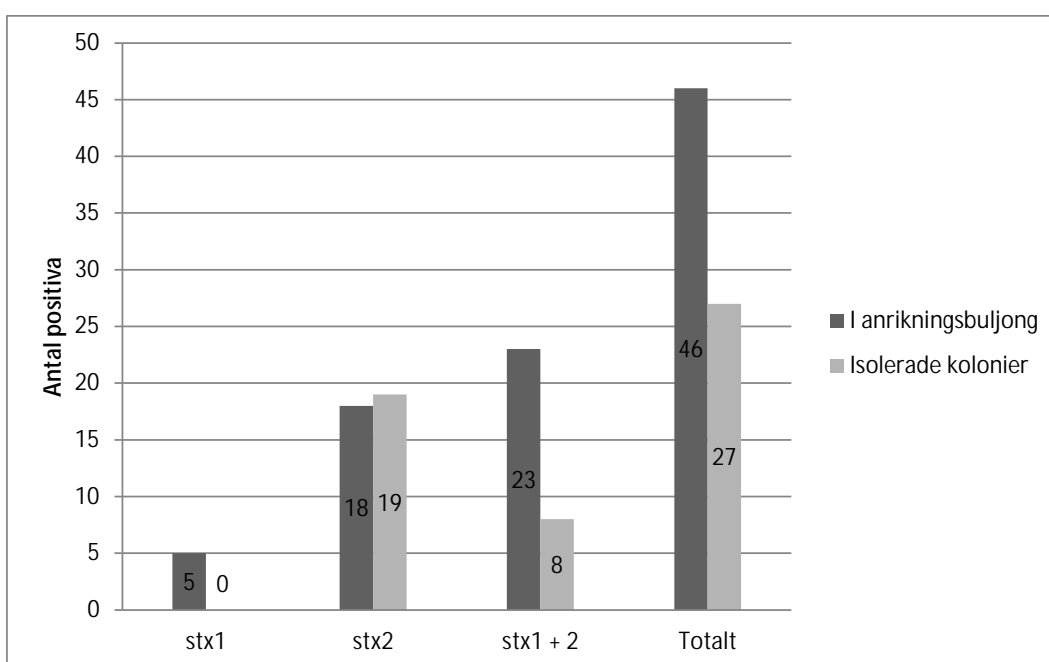
Detektion och haltbestämning av *E. coli* gjordes på ett urval av grönsaksproven. För kvalitativ analys finfördelades 25 gram av provet i 225 ml buffrat peptonvatten, varefter homogenatet anrikades vid 37°C i 18-24 timmar. Cirka 10 µl av anrikningsbuljongen spreds på Chromocult® Coliform Agar och plattorna inkuberas vid 37°C i 18-24 timmar. För kvantitativ analys finfördelades 10 gram av provet i 90 ml peptonvatten, varefter 100 µl av homogenatet och lämpliga spädningar spreds på Chromocult® Coliform Agar. Minst en koloni per platta valdes ut och konfirmerades enligt senaste upplagan av metod nr 125 av Nordisk Metodikkommitté för livsmedel (NMKL).

Resultat

Förekomst av STEC på nötkött

Misstänkta STEC

Sammanlagt analyserades 177 prover från infört och importerat nötkött (tabell 1). Anrikningsbuljongen från 46 (26 procent) av de 177 proven var positiv vid PCR-analys av *stx1* och/eller *stx2*. *Stx2*-genen var mer vanligt förekommande än *stx1* i dessa prov (figur 2, mörkgrå staplar).



Figur 2. Fördelning av *stx*-gener som påvisades i anrikningsbuljonger (mörkgrå staplar) respektive i STEC-isolat (ljusgrå staplar) från prov av nötkött.

Bekräftade STEC

STEC isolerades från 16 (17 procent) av 96 prov av infört kött från andra länder än Irland, 6 (14 procent) av 42 (14 procent) prov från sydamerikanskt kött och ett (3 procent) av 39 prov från irländskt kött (tabell 3). Det innebär att STEC isolerades från 17 (13 procent) av 135 prov av infört kött och 23 (13 procent) av de 177 proven från nötkött totalt. Flest fynd gjordes i kött av nederländskt ursprung (tabell 3). STEC bekräftades i enstaka prov av kött från Danmark, Litauen, Polen, Storbritannien och Österrike. Sammanlagt 9 (20 procent) av de 46 analyserade proven från köttfärs och 14 (11 procent) av de 131 proven från olika stycknings-

delar av helt kött innehöll STEC. Av de STEC-positiva proven var 8 av de 9 köttfärsproven från fryst köttfärs och 6 av de 14 styckningsdetaljproven från fruset helt kött.

Tabell 3. Förekomst av STEC på infört och importerat nötkött

Ursprung	Antal analyserade prov	Antal (%) prov med bekräftade STEC
Irland	39	1 (3)
Nederländerna	26	6
Tyskland	35	3
Övriga ^a	35	7
Totalt övriga EU	96	16 (17)
Argentina	6	3
Brasilien	18	0
Uruguay	18	3
Totalt Sydamerika	42	6 (14)

^a Danmark (3), Estland (1), Italien (3), Litauen (7), Polen (11), Storbritannien (5), Österrike (5).

I två prov från Argentina respektive Österrike återfanns två olika isolat av STEC och i ett prov från Argentina återfanns tre olika isolat av STEC. Detta gav totalt 27 isolerade STEC, varav 19 isolat innehöll *stx2*-genen och resterande 8 isolat innehöll både *stx1* och *stx2* (figur 2, ljusgråa staplar; bilaga 1). Genen *eae* hittades i 6 av de 27 isolaten, varav alla utom ett var både *stx1*- och *stx2*-positiva (bilaga 1). Det innebär att 6 (3,4 procent) av de 177 proven var positiva för STEC med både *stx2*- och *eae*-genen.

Sex av 27 isolat togs fram med IMS och de övriga 21 isolerades med immunoblotteknik. STEC isolerades från 23 (50 procent) av de 46 *stx*-positiva anrikningsbuljongerna. För 11 av de 23 resterande anrikningsbuljongerna som var positiva för en eller båda *stx*-gener utfördes försök till isolering som misslyckades. För övriga 12 buljonger gjordes bedömningen att de innehöll en för låg koncentration av STEC i provet (ct-värde över 34 efter analys med realtids-PCR) för försök till isolering.

Serotyper

De 27 STEC som isolerats från nötkött tillhörde minst 14 olika serogrupper och än fler serotyper (tabell 4). Den vanligast förekommande serogruppen respektive serotypen var STEC O26 (2,3 procent av proven) respektive O26:H11. STEC tillhörande serogruppen O157 påvisades i ett (0,7 procent) av 135 prov av infört kött och två (1,1 procent) av samtliga prov från nötkött. Tre av isolaten kunde inte serogrupperas medan två av isolaten tillhörde eventuellt nya serogrupper (tabell 4). En mer detaljerad information om varje isolat redovisas i bilaga 1.

Tabell 4. Sammanställning av serotypningen av isolerade STEC. Serotyper markerade med fet stil och gråmarkerade har även isolerats hos sjuka människor (Morabito 2014).

Serotyp	Antal
O26:H11	3
O22:H8	2
O113:H21	2
O163:H19	2
O178:H19	2
O8:H16	1
O8:H19	1
O26:H	1
O88:H8	1
O113:H4	1
O148:H8	1
O153:H25	1
O157:H	1
O157:H7	1
O174:H	1
O179:H8	1
OX183:H18 ^a	1
OX185:H7 ^a	1
ONT:H29 ^b	1
ONT:H32 ^b	1
ONT:H4 ^b	1

^a Eventuellt nya serogrupper enligt Statens Serum Institut, The International Escherichia and Klebsiella Centre (WHO) i Danmark.

^b ONT; O-serogrupp not typable; serogruppen kunde inte bestämmas.

Förekomst av STEC i bladgrönsaker

Misstänkta STEC

Sammanlagt analyserades 630 prov av bladgrönsaker från Sverige och länder inom och utanför EU (tabell 1). Av de 630 proven var 11 (1,7 procent) misstänkt positiva för STEC. Fyra av proven från anrikningsbuljong var positiva för *stx1*-genen och resterande sju prov var positiva för *stx2*-genen. Fyra av de *stx*-positiva buljongerna innehöll även genen *eae*. Misstänkta STEC detekterades i anrikningsbuljonger från både svenska och införda/importerade bladgrönsaker. Försök att med IMS eller immunoblot få fram STEC-isolat från en av de *stx2*-positiva anrikningsbuljongerna lyckades inte. För övriga prov gjordes bedömningen att de

innehöll en för låg koncentration av STEC och därför gjordes inga ytterligare isoleringsförsök på de PCR-positiva anrikningsbuljongerna från bladgrönsaker.

Förekomst och halter av *E. coli* i bladgrönsaker

E. coli påvisades i 68 (39 procent) av 174 analyserade prov från införda/importerade bladgrönsaker och 14 (30 procent) av 46 prov från svenska bladgrönsaker. Bland de 39 *E. coli*-positiva prov (3 från Sverige och 36 från andra länder) som haltbestämdes var halten av *E. coli* – lägre än 1,9 log cfu/gram i 29 (74 procent) prov, 2-2,9 log cfu/g i 6 (15 procent) prov och 3 log cfu/gram eller mer i resterande 4 (10 procent) prov. De bladgrönsaker som innehöll högst halter *E. coli* var av typen rucola eller spenat. Inget av de prov som var misstänkt positiva för STEC analyserades för *E. coli*.

Diskussion

Data över förekomsten av sjukdomsframkallande mikroorganismer i livsmedel behövs för att kunna värdera risken att bli sjuk av maten vi äter. Behovet av data rörande STEC på kött och grönsaker har lyfts i utlåtanden från bland annat FAO/WHO (2011) och Efsa (2011). Det gäller även ur ett svenskt perspektiv, eftersom aktuella svenska data är bristfälliga och tidigare undersökningar har fokuserat på STEC tillhörande serogruppen O157. Idag finns bättre analysmetoder för att detektera och isolera även andra typer av STEC än bara STEC O157.

STEC påvisades i 13 procent av de 177 proven från helt eller malet nötkött som importerats från Sydamerika eller införts från andra EU-länder. I vissa prov gjordes flera fynd av STEC, vilket innebar totalt 27 isolerade STEC. Inga fynd av salmonella gjordes i samma prover (Egervärn et al. 2011), vilket tyder på att STEC är vanligare än salmonella på infört och importerat nötkött. Den största andelen fynd av STEC gjordes i prov från köttfärs. Malet kött har kopplats ihop med fler sjukdomsutbrott jämfört med helt kött (Rangel et al. 2005; Hussein 2007). Risken att insjukna i infektion med STEC är dessutom sannolikt större vid konsumtion av köttfärs än kött, eftersom de bakterier som finns på ytan blandas in i köttfärsen vid malningen samt att råvaran som används för produktion av köttfärs kan vara av sämre kvalitet (Lindblad 2013).

Förekomsten av STEC på infört nötkött var tio gånger högre än vad som redovisades vid senaste zoonosrapporteringstillfället inom EU (13 mot 1,3 procent; Efsa/ECDC 2014). Resultaten är dock inte direkt jämförbara, eftersom prov har tagits i olika led av livsmedelskedjan och framförallt har inte alla medlemsländer analyserat för alla serogrupper, vilket gjordes i nuvarande undersökning. De flesta STEC isolerades med immunoblot (isolering av STEC som uttrycker toxinet/toxiner), dels på grund av att IMS inte finns tillgängligt för alla serogrupper och dels för att studier har visat att IMS fungerar sämre på frysta buljonger (Mathusa et al. 2010). Användning av immunoblot som isoleringsmetod är en bidragande orsak till den höga isoleringsfrekvensen (50 procent) av STEC från *stx*-positiva anrikningsbuljonger.

Resultatet över förekomsten av STEC tillhörande serogrupp O157 i proven från infört nötkött stämmer bättre överens med senaste EU-zoonosdata (0,7 mot 0,1 procent; Efsa/ECDC 2014). Det beror sannolikt på att det sedan flera år tillbaka finns en standardiserad analysmetod för att specifikt påvisa *E. coli* O157 samt att man historiskt sett har fokuserat på detektion av O157 och inga andra serogrupper. Förekomsten av STEC O157 i infört och importerat kött (1,1 procent) stämmer också överens med publicerade data från andra internationella undersökningar (sammanfattade av Perelle et al. 2006). Vidare var andelen STEC O157-positiva prov i samma storleksordning som i den tidigare svenska undersökningen av infört och importerat nötkött (0,3-2,4 procent; Lindqvist et al. 1998), vilket tyder på att ingen ökning av förekomsten av STEC tillhörande den serogruppen har skett under de senaste åren.

Ett fynd av STEC, tillhörande serogruppen O163, gjordes i kött från Irland, det land som stod för störst del av nötköttsimporten till Sverige vid tiden för kartläggningen (SJV 2009). Den låga förekomsten av STEC på irländskt kött överensstämmer med resultaten från en större irländsk studie av Murphy et al. (2005), i vilken förekomsten av STEC O26 och STEC O111 i malet inhemskt kött var 0,2 respektive 0 procent. I en annan irländsk studie (Prendergast et al. 2011) var inga prov från inhemskt producerad köttfärs positiva för STEC O157. Flera prov av kött från Nederländerna och Tyskland var förorenade med STEC i nuvarande undersökning och det var också dessa länder som rapporterade in störst andel positiva prov från nötkött vid senaste zoonosrapporteringstillfället inom EU (Efsa/ECDC 2014). STEC var också vanligt förekommande på nötkött från Sydamerika (Brasilien undantaget), vilket har visats i flera liknande undersökningar på området (Bosilevac et al. 2007; Llorente et al. 2014).

Generellt är förekomsten av icke-O157 STEC hos nötkreatur högre än STEC O157 och de flesta bakterietyper innehåller *stx2*- och inte *stx1*-genen samt är negativa för genen *eae* (Mathusa et al. 2010). Detta stämmer väl överens med de isolat som påvisades i denna kartläggning av nötkött. De 27 isolaten tillhörde många olika serogrupper, varav flera såsom O157, O26, O113 och O178 har kopplats ihop med sjukdom hos människa i Sverige (Myndighetsrapport 2014). Det är stor variation i allvarlighetsgraden av sjukdom förknippade med olika serotyper av STEC och det är mer än 120 olika serotyper som har kopplats samman med sjukdom (Mathusa et al. 2010). Känt är att STEC som producerar *Stx2* i större utsträckning är kopplade till allvarlig sjukdom som HUS jämfört med isolat som producerar enbart *Stx1* (Mathusa et al. 2010; Efsa 2013). Enligt Efsas (2013) bedömning utgör fynd av STEC-isolat med virulensgenerna *stx2* och *eae* eller *aaiC/aggR* en potentiellt högre risk för allvarligare sjukdom som HUS. Sex (3,4 procent) av de 177 proven som påvisades i kartläggningen av nötkött uppfyllde dessa kriterier, vilket skulle ha kunnat bli fler om även *aaiC/aggR* analyserats.

O26, den näst vanligaste serogruppen hos STEC isolerade från människor (Myndighetsrapport, 2014), var den vanligast förekommande i kartläggningen. Samtliga fyra STEC O26-isolat innehöll båda toxingenerna och *eae*-genen och återfanns dessutom i prov av kött från fyra olika länder. STEC O26 påvisades däremot inte i Livsmedelsverkets baslinjestudie 2006-2007 på slaktkroppar av nöt i Sverige. Bland de 40 STEC isolerade från 752 svabbprover var istället O113 den vanligast förekommande serogruppen följt av O2, O157 och O171 (opublicerade data från Lindblad 2008).

Vad gäller svenskproducerade, införda och importerade bladgrönsaker, påvisades prov med misstänkta STEC i låg omfattning (knappt 2 procent av de 630 proven), medan däremot inga STEC kunde bekräftas. Data från kartläggningar mellan 2007 och 2011 inom EUs zoonosövervakning visade en varierande förekomst av STEC i grönsaker från i genomsnitt 0,5 till 6,5 procent (Efsa/ECDC 2012; 2013). Precis som för nötkött är våra resultat dock inte direkt jämförbara med Efsas. Salmonella återfanns i fyra av proven (Egervärn et al., pågående undersökning) och var således, till skillnad mot köttproven, mer vanligt förekommande än STEC i proven från bladgrönsaker. Uppskattningsvis en dryg tredjedel

av proven från bladgrönsaker innehöll *E. coli*-bakterier, vilket tyder på att andelen *E. coli* med *stx*-gener var låg. Andelen prov med *E. coli* överensstämde med data från kartläggningen av *E. coli* i färska kryddor och bladgrönsaker från Sydostasien (Karnehed och Lindblad 2010).

Genom att, som i denna kartläggning, serotypa STEC-isolaten och detektera *eae*- och *stx*-gener, erhålls en grov uppskattning av de påvisade bakteriernas sjukdomsframkallande förmåga. Analys av fler specifika virulensgener kan ge ytterligare information om den sjukdomsframkallande förmågan hos enskilda STEC-isolat. Data från nuvarande undersökning tillsammans med analyser av ytterligare virulensgener hos isolaten kan användas för att jämföra köttisolaten med STEC som hittats hos människor. Det är än så länge inte möjligt att fullt ut identifiera markörer för att förutspå ett STEC-isolats sjukdomsframkallande förmåga (Efsa, 2013). Dock har arbete gjorts med att riskklassificera olika typer av STEC hos livsmedel avseende risken att insjukna i blodiga diarréer och/eller HUS (Andersson et al. 2011; 2013).

I denna kartläggning ingick inte provtagning av svenskt nötkött, men kartläggningar på slakterier med provtagning av träck från nötkreatur under perioden 2005-2012 visar att STEC O157 förekom hos 3 procent av djuren (Myndighetsrapport 2014). Vidare visar den ovan nämnda baslinjestudien att STEC förekom på 5,3 procent av slaktkropparna från svenska nötkreatur, varav 4,7 procent av slaktkropparna vid 600 storskaliga slakterier och 7,9 procent av slaktkropparna vid 152 småskaliga slakterier (opublicerade data från Lindblad 2008). För att värdera folkhälsorisken av STEC på kött på den svenska marknaden är det därför angeläget att ta fram aktuella data över förekomsten av STEC på svenskt nötkött. Det behövs också förekomstdata för andra relevanta köttslag såsom lammkött liksom haltdata för kött överlag.

Sammanfattningsvis var STEC mycket ovanligt i bladgrönsaker oavsett ursprung, medan STEC påvisades i mer än vart tionde prov från infört och importerat nötkött. STEC-isolaten från kött tillhörde många olika kombinationer av virulensgener (*stx1*, *stx2* och *eae*) och serotyper. Den variant som är förknippad med en högre risk för allvarligare sjukdom dvs. STEC som innehåller både *stx2*- och *eae*-genen förekom i drygt 3 procent av köttproven. Den vanligast förekommande serogruppen hos STEC isolerade från infört och importerat kött var O26.

Finansiering

Kartläggningen har finansierats av MSB anslag 2:4 krisberedskap som en del i ett större projekt om förekomst av ESBL-bildande tarmbakterier på kött och bladgrönsaker på den svenska marknaden (Egervärn et al. 2011; 2014).

Tack

Ett stort tack riktas till kommuner, gränskontrollen och köttimportörer för deltagande i provtagningen och bidrag av prover.

Referenser

Andersson, T., C. Nilsson et al. (2011). "Modelling gene associations for virulence classification of verocytotoxin-producing *E. coli* (VTEC) from patients and beef." *Virulence* 2(1):41-53.

Andersson, T, S. Ivarsson et al. (2013). Genetisk-molekylär riskklassificering av VTEC. PM. Karlstad: Myndigheten för samhällskydd och beredskap, Livsmedelsverket och Smittskyddsinstitutet; April-13.

Atalla, H. N., R. Johnson et al. (2000). "Use of shiga toxin (Stx)- enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot for detection and isolation of Stx-producing *Escherichia coli* from naturally contaminated beef." *J Food Protect* 63 (9):1167-1172.

Bosilevac, J. M., M. N. Guerini et al. (2007). "Microbiological characterization of imported and domestic boneless beef trim used for ground beef." *J Food Protect* 70(2):440-449.

Caprioli, A., S. Morabito et al. (2004). "Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission." *Vet Res* 36:289-311.

Egervärn, M., S. Englund et al. (2011). "Kartläggning av ESBL-bildande *E. coli* och salmonella på kött på den svenska marknaden." Livsmedelsverket, Statens Veterinärmedicinska Anstalt och Smittskyddsinstitutet. www.slv.se.

Egervärn, M., Å. Rosengren et al. (2014). "ESBL-bildande *E. coli* i vår omgivning – livsmedel som spridningsväg till människa. Slutrapport från ett myndighetsgemensamt projekt – Antibiotikaresistens". Livsmedelsverket, Statens Veterinärmedicinska Anstalt och Folkhälsomyndigheten. www.livsmedelsverket.se.

EFSA, European Food Safety Authority, (2011). "Scientific Report of EFSA – Urgent advice on the public health risk of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* in fresh vegetables." *EFSA Journal* 9(6):2274.

EFSA, European Food Safety Authority (2013). "Scientific Opinion on VTEC-seropathotype and scientific criteria regarding pathogenicity assessment." *EFSA Journal* 11(4):3138.

EFSA/ECDC, European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (2012). "The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010." *EFSA Journal* 10(3):2597.

EFSA/ECDC, European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (2013). "The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011." EFSA Journal 11(4): 3129.

EFSA/ECDC, European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (2014). "The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012." EFSA Journal 12(2):3547.

FAO/WHO (2011). Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. "Enterohaemorrhagic Escherichia coli in raw beef and beef products: approaches for the provision of scientific advice: meeting report." Microbiol Risk Assessment Series No. 18/2011.

Folkhälsomyndigheten (2014).
"http://www.folkhalsomyndigheten.se/amnesomraden/statistik-och-undersokningar/sjukdomsstatistik/enterohemorragisk-e-coli-infektion-ehec/. 2014-08.

Greig, J. D. och A. Ravel (2009). "Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution." Int J Food Microbiol 130:77-87.

Haas, C., J. Rose et al. (1999). "Critically analyzed dose-response curves." QMRA. 396-440.

Hussein, H.S. (2007). "Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing Escherichia coli in beef cattle and their products." Anim Sci 85(13 Suppl):E63-72.

ISO/TS 13136:2012. "Microbiology of food and animal feed – Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens – Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups."

Karnehed, N och M. Lindblad (2010). "Riksprojekt 2009: Salmonella, Campylobacter och E.coli i färska kryddor och bladgrönsaker från Sydostasien." Livsmedelsverkets rapportserie 2010.

Lindblad, M. (2008). "Mikroprofil Nötkreatur - Kartläggning av mikroorganismer på slaktkroppar." Livsmedelsverkets rapport nr 1/2008.

Lindblad M. (2013). "Risker förenade med konsumtion av råbiff och rå eller understekt nötfärs." Livsmedelsverket. Augusti-13.

Lindqvist R., A.K. Antonsson et al. "The prevalence of verocytotoxin producing *Escherichia coli* (VTEC) and *E. coli* O157:H7 in beef in Sweden determined by PCR assays and an immuno-magnetic separation (IMS) method." *Food Microbiol* 15:591-601.

Llorente, P., L. Barnech et al. (2014). "Characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ground beef collected in different socioeconomic strata markets in Buenos Aires, Argentina." Hindawi Publishing Corporation Bio-Med Research International Article ID 795104, 9 pages.

Mathusa, E. C., Y. Chen et al. (2010) "Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Foods." *J Food Protect* 73 (9):1721-1736.

Morabito, S. (2014). "Pathogenic *Escherichia coli* – Molecular and Cellular Microbiology". First edition, April 2014.

Murphy, M., A. Carroll et al. (2005). "Prevalence and characterization of *Escherichia coli* O26 and O111 in retail minced beef in Ireland. *Foodborne Path Dis* 2(4):357-360.

Myndighetsrapport (2014). "Infektion med EHEC/VTEC - Ett nationellt strategidokument". Jordbruksverket, Livsmedelsverket, Folkhälsomyndigheten, Socialstyrelsen och Statens veterinärmedicinska anstalt. Dec-14.

Nataro, J. P., J. B. Kaper et al. (1998). "Diarrheagenic *Escherichia coli*." *Clin Microbiol Rev* 11 (1):142-201.

Nilsen, E. M., M. T. Andersen (2003). "Detection and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* by automated 5' nuclease PCR assay." *J Clin Microbiol* 41(7):2884-2893.

Pennington H. (2010). "*Escherichia coli* O157." *Lancet* 376:1428-1435.

Perelle, S., F. Dilasser et al. (2004). "Detection by 5'-nuclease PCR of shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26, O55, O91, O103, O111, O113, O145 and O157:H7, associated with the world's most frequent clinical cases." *Mol Cell Probes* 18:185-192.

Perelle, S., F. Dilasser et al. (2005). "Detection of *Escherichia coli* serogroups O103 by real-time polymerase chain reaction." *J Appl Microbiol* 98:1162-1168.

Perelle, S., F. Dilasser et al. (2006) "Screening food raw materials for the presence of the world's most frequent clinical cases of shiga toxin-encoding *Escherichia coli* O26, O103, O111, O145 and O157." *Int J Food Microbiol* 113:284-288.

Possé, B., L. De Zutter et al. (2008). "Novel differential and confirmation plating media for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O26, O103, O111, O145 and sorbitol-positive and -negative O157." *FEMS Microbiol Lett.* 2008 May;282(1):124-31

Prendergast, D. M, L. Lendrum et al. (2011). "Verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 in beef and sheep abattoirs in Ireland and characterisation of isolates by pulsed-field gel electrophoresis and multi-locus variable of tandem repeat analysis." *Int J Food Microbiol* 144:519-527.

Rangel, J.M., P.H. Sparling et al. (2005). "Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002." *Emerg Infect Dis* 11(4):603-9.

Sandvig, K. (2001). "Shiga toxins." *Toxicon* 39:1629-1635.

Sartz L., B. de Jong et al. (2008). "An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in southern Sweden associated with consumption of fermented sausage; aspects of sausage production that increase the risk of contamination." *Epidemiol Infect* 136:370-380.

SJV (2009). "Sveriges utrikeshandel med jordbruksvaror och livsmedel 2006-2008." Jordbruksverket. Rapport 2009:18.

Smittskyddsinstitutet (2013). "Epidemiologisk årsrapport 2012."

Söderström A., P. Österberg P et al. (2008). "A large *Escherichia coli* O157 outbreak in Sweden associated with locally produced lettuce." *Foodborne Pathog Dis* 5:339-49.

Willshaw, G. A., J. Thirlwell et al. (1994). "Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in beefburgers linked to an outbreak of diarrhoea, haemorrhagic colitis and haemolytic uraemic syndrome in Britain." *Lett Appl Microbiol* 19:304-307.

Bilaga 1

Sammanställning över de STEC-isolat som påvisades i prov från infört och importerat nötkött.

Kötttyp	Kyld/ fryst	Ursprung	stx1	stx2	eae	serotyp
Färs	F	Nederländerna	Neg	Pos	Neg	OX183:H18 ^a
Färs	F	Nederländerna	Neg	Pos	Neg	ONT:H4 ^b
Färs	F	Nederländerna	Pos	Pos	Pos	O26:H11
Färs	K	Litauen	Neg	Pos	Neg	O148:H8
Färs	F	Tyskland	Neg	Pos	Neg	O8:H19
Färs (cevapcici)	F	Österrike	Neg	Pos	Neg	O174:H-
Färs (cevapcici)	F	Österrike	Neg	Pos	Neg	O22:H8
Färs (cevapcici)	F	Österrike	Pos	Pos	Pos	O26:H11
Färs (cevapcici)	F	Österrike	Pos	Pos	Pos	O157:H-
Färs (hamburgare)	F	Polen	Neg	Pos	Neg	O113:H4
Styckningsdel av helt kött	F	Argentina	Neg	Pos	Neg	O22:H8
Styckningsdel av helt kött	F	Argentina	Neg	Pos	Neg	O157:H7
Styckningsdel av helt kött	F	Argentina	Neg	Pos	Neg	O113:H21
Styckningsdel av helt kött	F	Argentina	Neg	Pos	Pos	O8:H16
Styckningsdel av helt kött	F	Argentina	Pos	Pos	Neg	O113:H21
Styckningsdel av helt kött	F	Argentina	Pos	Pos	Neg	O178:H19
Styckningsdel av helt kött	K	Danmark	Pos	Pos	Neg	O153:H25
Styckningsdel av helt kött	K	Nederländerna	Neg	Pos	Neg	O179:H8
Styckningsdel av helt kött	F	Nederländerna	Neg	Pos	Neg	O178:H19
Styckningsdel av helt kött	F	Nederländerna	Neg	Pos	Neg	ONT:H32 ^b
Styckningsdel av helt kött	K	Irland	Neg	Pos	Neg	O163:H19
Styckningsdel av helt kött	K	Storbritanien	Neg	Pos	Neg	O163:H19
Styckningsdel av helt kött	K	Tyskland	Neg	Pos	Neg	O88:H8
Styckningsdel av helt kött	K	Tyskland	Pos	Pos	Pos	O26:H11
Styckningsdel av helt kött	K	Uruguay	Neg	Pos	Neg	ONT:H29 ^b
Styckningsdel av helt kött	K	Uruguay	Neg	Pos	Neg	OX185:H7 ^a
Styckningsdel av helt kött	F	Uruguay	Pos	Pos	Pos	O26:H-

^a Eventuellt nya serogrupper enligt Statens Serum Institut, The International Escherichia and Klebsiella Centre (WHO) i Danmark.

^b ONT; O-serogrupp not typable; serogruppen kunde inte bestämmas.

1. Contaminants and minerals in foods for infants and young children – analytical results, Part 1, by V Öhrvik, J Engman, B Kollander and B Sundström.
Contaminants and minerals in foods for infants and young children – risk and benefit assessment, Part 2 by G Concha, H Eneroth, H Hallström and S Sand.
Tungmetaller och mineraler i livsmedel för spädbarn och småbarn. Del 3 Risk- och nyttohantering av R Bjerselius, E Halldin Ankarberg, A Jansson, I Lindeberg, J Sanner Färnstrand och C Wanhainen.
Contaminants and minerals in foods for infants and young children – risk and benefit management, Part 3 by R Bjerselius, E Halldin Ankarberg, A Jansson, I Lindeberg, J Sanner Färnstrand and C Wanhainen.
2. Bedömning och dokumentation av näringsriktiga skolluncher – hanteringsrapport av A-K Quetel.
3. Gluten i maltdrycker av Y Sjögren och M Hallgren.
4. Kontroll av bekämpningsmedelsrester i livsmedel 2010 av A Wannberg, A Jansson och B-G Ericsson.
5. Kompetensprovning: Mikrobiologi – Livsmedel, Januari 2013 av L Nachin, C Normark och I Boriak.
6. Från jord till bord – risk- och sårbarhetsanalys. Rapport från nationellt seminarium i Stockholm november 2012.
7. Cryptosporidium i dricksvatten – riskvärdering av R Lindqvist, M Egervärn och T Lindberg.
8. Kompetensprovning: Mikrobiologi – Livsmedel, April 2013 av L Nachin, C Normark, I Boriak och I Tillander.
9. Kompetensprovning: Mikrobiologi – Dricksvatten, 2013:1, mars av T Šlapokas och K Mykkänen.
10. Grönsaker och rotfrukter – analys av näringsämnen av M Pearson, J Engman, B Rundberg, A von Malmborg, S Wretling och V Öhrvik. 11. Riskvärdering av perfluorerade alkylsyror i livsmedel och dricksvatten av A Glynn, T Cantilana och H Bjeremo.
12. Kommuners och Livsmedelsverkets rapportering av livsmedelskontrollen 2012 av L Eskilsson.
13. Kontroll av rests substanser i levande djur och animaliska livsmedel. Resultat 2011 av I Nordlander, B Aspenström-Fagerlund, A Glynn, I Nilsson, A Törnkvist, A Johansson, T Cantillana, K Neil Persson Livsmedelsverket och K Girma, Jordbruksverket.
14. Norovirus i frysta hallon – riskhantering och vetenskapligt underlag av C Lantz, R Bjerselius, M Lindblad och M Simonsson.
15. Riksprojekt 2012 – Uppföljning av de svensk salmonellagarantierna vid införsel av kött från nöt, gris och fjäderfä samt hönsägg från andra EU-länder av A Brådenmark, Å Kjellgren och M Lindblad.
16. Trends in Cadmium and Certain Other Metal in Swedish Household Wheat and Rye Flours 1983-2009 by L Jorhem, B Sundström and J Engman.
17. Miljöpåverkan från animalieprodukter – kött, mjölk och ägg av M Wallman, M Berglund och C Cederberg, SIK.
18. Matlagningsfettets och bordsfettets betydelse för kostens fettkvalitet och vitamin D-innehåll av A Svensson, E Warensjö Lemming, E Amcoff, C Nälsén och A K Lindroos.
19. Mikrobiologiska risker vid dricksvattendistribution – översikt av händelser, driftstörningar, problem och rutiner av M Säve-Söderbergh, A Malm, R Dryselius och J Toljander.
20. Mikrobiologiska dricksvattenrisker. Behovsanalys för svensk dricksvattenförsörjning – sammanställning av intervjuer och workshop av M Säve-Söderbergh, R Dryselius, M Simonsson och J Toljander.
21. Risk and Benefit Assessment of Herring and Salmonid Fish from the Baltic Sea Area by A Glynn, S Sand and W Becker.
22. Synen på bra matvanor och kostråd – en utvärdering av Livsmedelsverkets råd av H Enghardt Barbieri.
23. Revision av Sveriges livsmedelskontroll 2012 – resultat av länsstyrelsernas och Livsmedelsverkets revisioner av kontrollmyndighete av A Rydin, G Engström och Å Eneroth.
24. Kött – analys av näringsämnen: hjort, lamm, nötdjur, ren, rådjur, vildsvin och kalkon av V Öhrvik.
25. Akrylamid i svenska livsmedel – en riktad undersökning 2011 och 2012 av Av K-E Hellenäs, P Foghberg, U Fäger, L Busk, L Abramsson Zetterberg, C Ionescu, J Sanner Färnstrand.
26. Kompetensprovning: Mikrobiologi – Livsmedel, oktober 2013 av L Nachin, C Normark och I Boriak.
27. Kompetensprovning: Mikrobiologi – Dricksvatten, september 2013 av T Šlapokas och K Mykkänen.
28. Sammanställning av analysresultat 2008-2013. Halt av polycykliska aromatiska kolväten (PAH) i livsmedel – matfetter, spannmålsprodukter, kosttillskott, choklad, grillat kött och grönsaker av S Wretling, A Eriksson och L Abramsson Zetterberg.

1. Exponeringsuppskattningar av kemiska ämnen och mikrobiologiska agens – översikt samt rekommendationer om arbetsgång och strategi av S Sand, H Eneroth, B-G Ericsson och M Lindblad.
2. Fusariumsvampar och dess toxiner i svenskodlad vete och havre – rapport från kartlägningsstudie 2009-2011 av E Fredlund och M Lindblad.
3. Colorectal cancer-incidence in relation to consumption of red or precessed meat by PO Darnerud and N-G Ilbäck.
4. Kommunala myndigheters kontroll av dricksvattenanläggningar 2012 av C Svärd, C Forslund och M Eberhardson.
5. Kontroll av bekämpningsmedelsrester i livsmedel 2011 och 2012 av P Fohgelberg, A Jansson och H Omberg.
6. Vad är det som slängs vid utgången hållbarhetsdatum? – en mikrobiologisk kartläggning av utvalda kylvaror av Å Rosengren.
7. Länsstyrelsernas rapportering av livsmedelskontrollen inom primärproduktionen 2012 av L Eskilson och S Sylvén.
8. Riksmaten – vuxna 2010-2011, Livsmedels- och näringsintag bland vuxna i Sverige av E Amcoff, A Edberg, H Enghart Barbieri, A K Lindroos, C Nälsén, M Pearson och E Warensjö Lemming.
9. Matfett och oljor – analys av fettsyror och vitaminer av V Öhrvik, R Grönholm, A Staffas och S Wretling.
10. Revision av Sveriges livsmedelskontroll 2013 – resultat av länsstyrelsernas och Livsmedelsverkets revisioner av kontrollmyndighete av A Rydin, G Engström och Å Eneroth.
11. Kontrollprogrammet för tvåskaliga blötdjur – Årsrapport 2011-2013 – av M Persson, B Karlsson, SMHI, M Hellmér, A Johansson, I Nordlander och M Simonsson.
12. Riskkaraktärisering av exponering för nitrosodimetylamin (NDMA) från kloramin använt vid dricksvattenberedning av K Svensson.
13. Risk- och nyttovärdering av sänkt halt av nitrit och koksalt i charkuteriprodukter – i samband med sänkt temperatur i kylkedjan av P O Darnerud, H Eneroth, A Glynn, N-G Ilbäck, M Lindblad och L Merino.
14. Kommuners och Livsmedelsverkets rapportering av livsmedelskontrollen 2013 av L Eskilsson och M Eberhardson.
15. Rapport från workshop 27-28 november 2013. Risk- och sårbarhetsanalys – från jord till bord. Sammanfattning av presentationer och diskussioner.
16. Risk- och nyttovärdering av nötter – sammanställning av hälsoeffekter av nötkonsumtion av J Bylund, H Eneroth, S Wallin och L Abramsson-Zetterberg.
17. Länsstyrelsernas rapportering av livsmedelskontrollen inom primärproduktionen 2013 av L Eskilson, S Sylvén och M Eberhardson.
18. Halter av bly i blod hos jägarfamiljer i Sverige av K Forsell¹, I Gyllenhammar², J Nilsson Sommar³, N Lundberg-Hallén², T Lundh⁵, N Kotova², I Bergdahl^{3,4}, B Järholm³ och P O Darnerud².
19. Bra livsmedelsval i Sverige baserat på nordiska näringsrekommendationer 2012 av L Björck, Å Brugård Konde och H Eneroth.
20. Konsumtion av rött kött och charkuteriprodukter och samband med tjock- och ändtarmscancer – risk och nyttohanteringsrapport av R Bjerselius, Å Brugård Konde och J Sanner Färnstrand.
21. Kontroll av rests substanser i levande djur och animaliska livsmedel. Resultat 2013 av I Nordlander, B Aspenström-Fagerlund, A Glynn, A Törnkvist, T Cantillana, K Neil Persson, Livsmedelsverket och K Girma, Jordbruksverket.
22. Kartläggning av shigatoxin-producerande *E.coli* (STEC) på nötkött och bladgrönsaker av M Egervärn och C Flink.

