

Förekomst av sjukdomsframkallande bakterier i opastöriserad mjölk

av Catarina Flink och Karin Nyberg



Innehåll

Summary	2
Sammanfattning	3
Inledning	4
Sjukdomsframkallande bakterier	5
Campylobacter	5
STEC	5
Salmonella.....	6
Syfte	6
Utförande.....	7
Urval av gårdar.....	7
Provtagning	7
Analys	8
Hantering av mjölkfiltren vid ankomst till laboratoriet	8
Detektion och isolering av campylobacter	8
Detektion och isolering av STEC.....	8
Detektion och isolering av salmonella	9
Statistik.....	10
Resultat.....	11
Provtagning	11
Termotoleranta campylobacter.....	12
STEC	13
Misstänkta STEC	13
Bekräftade STEC	14
Förekomst av både campylobacter och STEC	17
Salmonella.....	17
Diskussion	18
Campylobacter	18
STEC	19
Salmonella.....	21
Slutsatser	22
Tack.....	22
Referenser	24

Projektgrupp

Catarina Flink	Mikrobiolog, Team mikrobiologi, Biologiavdelningen
Ann Gidlund	Mikrobiolog, Team mikrobiologi, Biologiavdelningen
Celeste D Lind	Laboratorieingenjör, Team laboratorieanalysstöd, Biologiavdelningen
Karin Nyberg	Risk- och nyttovärderare, Team biofaror, Risk-och nyttovärderingsavdelningen
Jimmy Sahlin	Laboratorieingenjör, Team laboratorieanalysstöd, Biologiavdelningen
Paula Ågren	Laboratorieingenjör, Team mikrobiologi, Biologiavdelningen

Sammanfattning

Opastöriserad mjölk innehåller naturligt en mängd olika mikroorganismer varav en del kan ha sjukdomsframkallande egenskaper. *Campylobacter* och STEC (EHEC) är två bakterier som kan finnas i opastöriserad mjölk och som också har kopplats till matförgiftning orsakad av opastöriserad mjölk i Sverige. Internationellt är även salmonella en orsak till matförgiftning som har kopplats till opastöriserad mjölk.

Opastöriserad mjölk får i dag säljas eller överlåtas i små mängder direkt vid mjölkgården. Uppskattningsvis överlåtts ca 5 miljoner liter mjölk på detta sätt varje år i Sverige. För att bättre kunna värdera risken med konsumtion av opastöriserad mjölk behövs kunskap om förekomsten av sjukdomsframkallande mikroorganismer. Därför har Livsmedelsverket undersökt förekomsten av *campylobacter*, STEC och salmonella i opastöriserad mjölk från svenska gårdar i regioner med stor mjölkproduktion.

Mjölksfilter samlades in från 302 mjölkgårdar i Västra Götaland (106 gårdar), Skåne (99 gårdar) och Öland (97 gårdar). Mjölksfiltret har till uppgift att avskilja grövre partiklar innan mjölken hamnar i gårdstanken. Mjölk från en mjölkningsomgång hade passerat filtret innan det samlades in. Ungefär hälften av filteren samlades in under våren och andra hälften under hösten.

Campylobacter och STEC isolerades från 13 respektive 14 procent av mjölksfiltren. Inget filter var positivt för salmonella. Förekomsten av både *campylobacter* och STEC var jämnt fördelad mellan de tre regionerna. Mjölksfiltren från stora mjölkgårdar var signifikant oftare positiva för både *campylobacter* och STEC än filter från mindre gårdar. Karakterisering av de isolerade bakterierna visade att 90 procent av *campylobacter*erna var *Campylobacter jejuni*, den art som dominerar bland patienter med *campylobacterios*. De vanligaste serotyperna av STEC som isolerades från mjölksfiltren har tidigare rapporterats ge allvarlig sjukdom hos människor. De serotyper som ofta rapporteras från patienter med EHEC var dock inte så vanliga bland mjölksfiltren, även om både O157:H7 och O26:H11 som är två av de vanligaste serotyperna hos svenska patienter hittades. Studien visade en lågförekomst av virulensmarkörer (*stx2* och *eae*) som är starkt ihopkopplade med allvarlig sjukdom (0,7 procent).

Sammanfattningsvis visar undersökningen att både *campylobacter* och STEC, men inte salmonella, är vanligt förekommande i svensk opastöriserad mjölk. Karakteriseringen av bakterierna, tillsammans med det faktum att de kan orsaka sjukdom i låga koncentrationer, tyder på att konsumtion av opastöriserad mjölk kan innebära en hälsofara.

Summary

Unpasteurized milk can contain a wide variety of microorganisms, ranging from beneficial lactic acid bacteria to spoilage organisms and disease-causing microorganisms. *Campylobacter* and STEC (EHEC) are two bacterial species that can be present in unpasteurized milk and cause disease in Sweden. In the EU, salmonella has also been reported to cause disease in relation to unpasteurized milk.

In Sweden, small-scale sale of unpasteurized milk directly from farms is permitted and approximately 5 million litres of milk are sold directly from farms. Therefore it is important to have information regarding the possible presence of disease-causing microorganisms in unpasteurized milk. The aim of this study was to investigate the prevalence of campylobacter, STEC and salmonella in unpasteurized milk from high-production areas in Sweden.

In-line milk filters were collected from a total of 302 farms in Västra Götaland (106), Skåne (99) and Öland (97). Approximately half of the filters from each area were collected during spring and the rest during autumn. *Campylobacter* was isolated from 13 percent and STEC from 14 percent of the filters. Salmonella was not isolated from any filter. Characterization of the campylobacter revealed that 90 percent belonged to *Campylobacter jejuni*, which is the species that dominates in patients with campylobacteriosis. The most commonly isolated STEC were serotypes that are known to cause serious disease. However, serotypes previously reported to cause EHEC were not as commonly isolated, although both O157:H7 and O26:H11 were found. In addition, the presence of virulence markers (*stx2* and *eae*) with a strong association to serious disease was low (0.7 percent).

In conclusion, this study showed that campylobacter and STEC can be present in unpasteurized milk from Swedish farms. This, together with the fact that these bacteria have a low infective dose, indicates that consumption of unpasteurized milk can have negative health effects.

Inledning

I Sverige konsumeras närmare 90 liter drickfärdig komjölk per capita och år, vilket placerar oss högt i jämförelse med många andra länder (Jordbruksverket, 2012). Förutom näringsämnen innehåller mjölk också en blandning av mikroorganismer såsom mjölksyrabakterier, förskämningsorganismer och sjukdomsframkallande bakterier (EFSA, 2015; Månsson, 2012; Quigley et al., 2013). Mikroorganismerna når mjölken antingen direkt från juvret eller från den yttre miljön under eller efter mjölkning. Många mikroorganismer tillväxer bra i mjölk eftersom den är näringsrik, har hög vattenaktivitet och ett närare neutralt pH (EFSA, 2015). Utbildning, goda hygienrutiner och kontroll är viktigt för att begränsa mängden mikroorganismer i mjölken (SvenskMjolk, 2007).

En del av de sjukdomsframkallande bakterierna som kan finnas i mjölken har en låg infektionsdos och om dessa bakterier finns i mjölken kan det räcka med att dricka små mängder mjölk för att drabbas av sjukdom. På grund av smittriskan har vi i Sverige pastöriseringskrav på mjölk som ska säljas till konsumenter i butik (LIVSFS, 2005:20). Undantaget från pastöriseringskravet är mjölk som säljs eller skänks bort i liten skala direkt till konsument på gården. Uppskattningsvis en knapp procent av all drickfärdig komjölk som produceras i Sverige överläts på detta sätt (SCB, 2015). Uppgift om hur stor andel av denna mjölk som sedan konsumeras opastöriserad, alternativt hettas upp före konsumtion eller används vidare i matlagning eller förädling saknas. Livsmedelsverket har utarbetat ett förslag till regeländring som förväntas träda i kraft i början på hösten 2016. Ändringen innebär att det ska vara fortsatt tillåtet att sälja små mängder opastöriserad mjölk direkt från gården men att de som säljer opastöriserad mjölk måste registrera sig hos Länsstyrelsen och informera konsumenten om riskerna kopplade till konsumtion av opastöriserad mjölk.

Trots att opastöriserad mjölk i Sverige endast får överlätas till konsumenter i liten skala direkt på mjölkgårdar händer det att människor drabbas av sjukdom som kopplas samman med konsumtion av opastöriserad mjölk. Mellan år 2007 och 2014 har ett drygt 10-tal utbrott, definierat som två eller fler fall med gemensam smittkälla, eller enstaka fall av sjukdom rapporterats från Sverige där opastöriserad mjölk identifierats som trolig smittkälla (Lindblad, 2012). Av dessa var majoriteten orsakade av STEC och campylobacter. Inom EU har det, mellan år 2007 och 2012, rapporterats 24 utbrott som kopplats till konsumtion av opastöriserad komjölk (EFSA, 2015). Av dessa var majoriteten orsakade av *Campylobacter* spp. och resten av STEC eller *Salmonella* Typhimurium. Det saknas information om antalet sporadiska eller enstaka fall inom EU (EFSA, 2015).

Sjukdomsframkallande bakterier

De sjukdomsframkallande mikroorganismerna som kopplats till opastöriserad mjölk inkluderar bakterierna *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., shigatoxinbildande *Escherichia coli* (STEC), *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium bovis*, *Brucella* spp. och *Coxiella burnetti* (EFSA, 2015; Oliver et al., 2009). I Sverige har campylobacter och STEC bedömts vara de mest relevanta farorna (Lindblad, 2012), medan EU även inkluderar salmonella (EFSA, 2015).

Campylobacter

Campylobacter är den vanligaste bakteriella orsaken till magsjuka med ca 9000 registrerade fall per år i Sverige (EFSA and ECDC, 2015). De arter av campylobacter som orsakar sjukdom hos människa kan alla tillväxa vid 42 °C och kallas därför termotoleranta campylobacter. Campylobacterinfektion hos människa orsakas i ca 90 % av fallen av arten *Campylobacter jejuni* och en nästan uteslutande del av de övriga sjukdomsfallen är orsakade av *Campylobacter coli*. Infektion med campylobacter kännetecknas vanligtvis av kraftiga magsmärtor och diarré (FDA, 2012). Förekommande följsjukdomar är ledinflammation, kroniska magsbesvär som överkänslig tarm (IBS) och i sällsynta fall Guillain-Barrés syndrom, en nervsjukdom som kan ge muskelsvaghet och förlamning (Riddle). Infektionsdosen är låg och således behöver bakterien inte tillväxa i ett livsmedel för att orsaka sjukdom (FDA, 2012).

STEC

Vissa stammar av *Escherichia coli* producerar shigatoxin och benämns därför som shigatoxinproducerande *E. coli* (STEC). STEC benämns också VTEC, och då den har isolerats från människa benämns den EHEC (Enterohaemoragisk *E. coli*). STEC är vanligt förekommande bland nötkreatursbesättningar men infekterade djur uppvisar inga sjukdomssymptom (Socialstyrelsen, 2014). Symptomen hos människor varierar från mild diarré till magsmärtor och blodiga diarréer. Komplikationer i form av akut eller kronisk njursjukdom (hemolytiskt uremiskt syndrom, HUS) och i enstaka fall neurologiska störningar (thrombotic thrombocytopenic purpura, TTP) förekommer (FDA, 2012). Den minsta mängd STEC som krävs för att orsaka sjukdom är mycket låg och bakterien behöver inte tillväxa i ett livsmedel för att orsaka sjukdom.

Tidigare dominerade serotypen O157:H7 bland smittade personer både i Sverige och i andra länder, men under senare år har en mängd andra serotyper blivit vanligare och vanligare bland smittade patienter. För att kunna bedöma risken vid fynd av STEC i livsmedel undersöks förekomsten av olika virulensgener. Shigatoxinet, som är nödvändigt för att sjukdomssymptom ska uppkomma, finns i två huvudgrupper Stx1 och Stx2 som kodas av generna *stx1* respektive *stx2*. Inom varje huvudgrupp finns det undergrupper som t.ex. Stx2a (EFSA, 2013). Proteinet intimin, som kodas av genen *eae*, är viktig för bakteriens vidhäftning och kolonisering i tarmen. Den har också setts vara vanligare bland sjukdomsframkallande isolat och är således också en markör för virulens. STEC som bildar toxinet Stx2 och vid-

häftningsproteinet intimin (*eae*) är mer förknippade med allvarlig sjukdom hos människa än STEC som bildar Stx1 (EFSA, 2013). I Sverige förekommer en subtyp av STEC O157:H7 som kallas klad 8 och som nästan alltid bär på genen *stx2a* eller generna *stx2a* och *stx2c* tillsammans. Denna subtyp har orsakat flera utbrott i Sverige och är associerad med allvarlig sjukdom hos människa (Socialstyrelsen, 2014).

Salmonella

Salmonella är en bakterie som är vanligt förekommande hos både människor och djur i hela världen, och en vanlig orsak till magsjuka (FDA, 2012). I Sverige har vi vidtagit kraftfulla åtgärder för att minska förekomsten och infört en omfattande salmonellakontroll (Jordbruksverket, 2004). Därmed är endast en mindre del av all salmonellainfektion hos svenska patienter inhemsk smitta. Vanliga symtom vid salmonellainfektion är diarré, magsmärtor och feber. Följsjukdomar såsom ledinflammation kan förekomma. Det behövs normalt ganska många salmonellabakterier för att orsaka sjukdom, vilket betyder att bakterien vanligtvis måste tillväxa i livsmedlet för att orsaka sjukdom (FDA, 2012).

Syfte

Det har gjorts många kartläggningar av opastöriserad mjölk utanför Sverige och nästan uteslutande har förekomst av sjukdomsframkallande bakterier påvisats (Anonymous, 2015; D'Amico and Donnelly, 2010; Giacometti et al., 2013; Hill et al., 2012; Mohammadi et al., 2013; Murphy et al., 2005; Ruusunen et al., 2013; Schoder et al., 2013; Solomakos et al., 2009; Zastempowska et al., 2016). Kunskapen om förekomst av sjukdomsframkallande mikroorganismer i opastöriserad mjölk i Sverige är dock bristfällig. Bra kunskapsunderlag är nödvändigt för framtagandet av riskvärderingar och för utformandet av vetenskapligt baserade hantlingsåtgärder.

Syftet med studien var att undersöka förekomsten av campylobacter, STEC och salmonella i svensk opastöriserad mjölk för att få ett bättre underlag för framtida riskvärdering och riskhantering.

Utförande

Urval av gårdar

I undersökningen ingick mjölkgårdar från Skåne, Öland och Västra Götaland (exklusive sjuhäradsbygden). Anledningen till att dessa regioner valts ut är att de ingår i de svenska produktionsområden som har högst procentuell andel mjölkkor (Jordbruksverket, 2012). Dessutom har tidigare studier påvisat en jämförelsevis hög förekomst av STEC O157:H7 klad 8 (Albihn et al., 2003; Boqvist et al., 2009; Eriksson et al., 2005) samt till viss del även salmonella (Ågren et al., 2016) i dessa regioner.

Gårdarna som ingick i studien slumpades fram utifrån medlemslistor som tillhandahölls från organisationerna Växa Sverige (Västra Götaland och Öland) och Skånesemin (Skåne). Växa Sverige är en husdjursförening som ägs av sina medlemmar (7 907 medlemmar och 237 000 mjölkkor) och som också är deras kunder. De finns från norra Sverige till Halland i väst, Småland och Blekinge i söder och Öland samt Gotland i öst. Skånesemin är Skånes Husdjursförening och är en ekonomisk förening som ägs av de skånska kött- och mjölkproducenterna (cirka 1 000 medlemmar varav 400 är mjölkproducenter).

Alla sorters mjölkgårdar inkluderades, stora som små, liksom ekologiska och konventionella. Deltagande i studien var frivilligt och om en gård inte ville vara med så plockades den bort från listan och ersattes av en ny slumpmässigt vald gård. Gårdar som vid tillfället för provtagningen var spärrade för salmonella plockades också bort från listan och ersattes på motsvarande sätt.

Målet var att samla in ett prov vardera från 100 gårdar inom varje region, varav 50 prov på våren och 50 prov på hösten.

Provtagning

Provtagningen av mjölkfilter utfördes mellan 13 april och 30 juni (vår) samt mellan 10 augusti och 13 oktober (höst) under 2015. Djurägarna ansvarade för provtagningen och personal från Växa Sverige eller Skånesemin ansvarade för insamling och inskick till Livsmedelsverket. Djurägarna tog ut mjölkfiltret på morgonen direkt efter mjölkningen samma dag som personal från Växa Sverige eller Skånesemin kom till gården. Proverna förvarades och transporterades i kyltemperatur. I samband med provhämtningen fylldes en följesedel i med information om region, antal mjölkkor, mjölkningssystem, provtagningsdatum och tid samt provhämtningsdatum och tid. Vid ankomst till Livsmedelsverkets mikrobiologiska laboratorium mättes temperaturen på mjölkfiltret.

Inför provtagningen skickades material ut till gårdarna tillsammans med en instruktion som beskrev hur provtagningen skulle genomföras. Provtagande person

skulle använda engångshandskar och försiktigt avlägsna filtret efter mjölkning men före rengöring av mjölksystemet. Filtret skulle placeras i en blixtlåspåse och 50 ml transportmedium (Cary-Blair) hållas på. Efter provtagningen skulle påsen med filtret och medium placeras i en kyl i väntan på vidare transport.

Proverna avidentifierades innan de skickades till Livsmedelsverket för analys. Provtagning av mjölkfilter gjordes i början av veckan för att underlätta analysarbetet. I de fall det förelåg risk att provet förvarats felaktigt kasserades mjölkfiltret.

Analys

Hantering av mjölkfiltren vid ankomst till laboratoriet

De inkomna mjölkfiltren delades i tre ungefär lika stora delar inför mikrobiologisk analys av campylobacter, STEC och salmonella. Om fler filter hade skickats in användes enbart ett av filtren för analys. I övrigt hanterades proven enligt Livsmedelsverkets instruktion för provhantering av mikrobiologiska prov, SLV-i144.2.

Detektion och isolering av campylobacter

Mjölkfiltret homogeniserades med stomacher i 150 ml Bolton buljong. Buljongen inkuberades vid 41,5 °C i 44-52 timmar under modifierad atmosfär (5 procent syre, 10 procent koldioxid och 85 procent kväve). Efter anrikning extraherades genomiskt DNA från 1 ml av anrikningsbuljongen med hjälp av Instagene matrix (Bio-Rad laboratories, Inc) enligt tillverkarens instruktion. Detektion av termotoleranta campylobacter utfördes med Realtids-PCR enligt Josefsen et al. (2004). Vid positiv detektion av termotoleranta campylobacter utfördes försök till isolering. Detta utfördes enligt Livsmedelsverkets ackrediterade metod SLV-m246.2 med undantaget att konfirmering av misstänkta isolat enbart utfördes med Realtids-PCR för termotoleranta campylobacter, *C. jejuni* och *C. coli* (SLV-m246.2) samt med Maldi-Tof vilket utfördes vid Statens veterinärmedicinska anstalt enligt deras protokoll.

Detektion och isolering av STEC

Detektion av STEC utfördes enligt Livsmedelsverkets metod, SLV-m243.2, som baseras på en teknisk specifikation från ISO, ISO/TS 13136:2012. Vid detektion av en eller båda *stx*-gener gjordes försök till isolering av STEC med immunoblot enligt Livsmedelsverkets metod, SLV-m242.1. 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. Nedan följer en kort redogörelse för utförande av analysen.

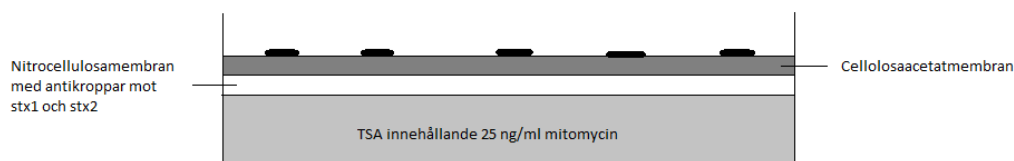
Detektion av STEC med Realtids-PCR

Mjölkfiltret homogeniserades med 150 ml modifierad Trypton Soja Buljong innehållande 12 mg/l acriflavin (mTSB+A). Buljongen inkuberades vid 37 °C i 18-24

timmar. Extraktion av genomiskt DNA utfördes genom att ta 200 µl från anrikningsbuljongen till ett automatiserat system, BioRobot EZ1 och EZ1 DNA Tissue Kit (Qiagen). Eluering gjordes i 100 µl elueringsbuffert. Detektion av generna för shigatoxinerna, *stx1* och *stx2*, utfördes med Realtids-PCR. Vid detektion av en eller båda *stx*-gener utfördes ytterligare en analys med Realtids-PCR för detektion av genen *eae* och gener för serogrupperna O157, O26, O103, O111 och O145 (ISO/TS, 13136:2012).

Isolering av STEC med immunoblot

Analysmetoden innebär att Stx-toxiner som producerats av bakterier fångas upp och detekteras med antikroppar, och utfördes enligt Atalla och Johnson (2000). Analys med immunoblot utfördes på infryst anrikningsbuljong. 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; 0,45 µm). Anrikningsbuljongen späddes och spreds på cellulosaaacetatmembranet (Figur 1). Plattorna inkuberades vid 37 °C i 18-24 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, Stx2a/c, Stx2e och Stx2d-varianter följt av en sekundär antikropp kopplad till enzymkonjugatet Alkaline Phosphatas-konjugerad Affinipure kanin-antimus-IgG. Därefter behandlades nitrocellulosamembranet med framkallningsvätskan BCIP/NBT för att få fram lila prickar på membranet, vilket indikerar shigatoxinproducerande kolonier på motsvarande plats på cellulosaaacetatmembranet. Mistänkt positiva kolonier från cellulosaaacetatmembranet renströks och verifierades som STEC med Realtids-PCR för gener mot *stx* som beskrivits ovan.

Typning av STEC

De isolerade STEC-bakterierna skickades till Folkhälsomyndigheten för serotypning och subtypning av shigatoxingenen genom helgenomsekvensering enligt Folkhälsomyndighetens protokoll.

Detektion och isolering av salmonella

Mjölkfiltret blandades med 150 ml buffrat peptonvatten (BPV) och homogeniserades med stomacher. Efter anrikning vid 37 °C i 16-20 timmar gjordes extraktion

av genomisk DNA följt av detektion med realtids-PCR för salmonella med hjälp av IQ-check Salmonella II kit (Bio-Rad Laboratories, Inc; NordVal certifierad) enligt tillverkarens instruktion, standard protokoll I. Vid positivt PCR-svar av *Salmonella* spp. fortsatte analysen med isolering enligt NMKL 71, utg. 5, 1999.

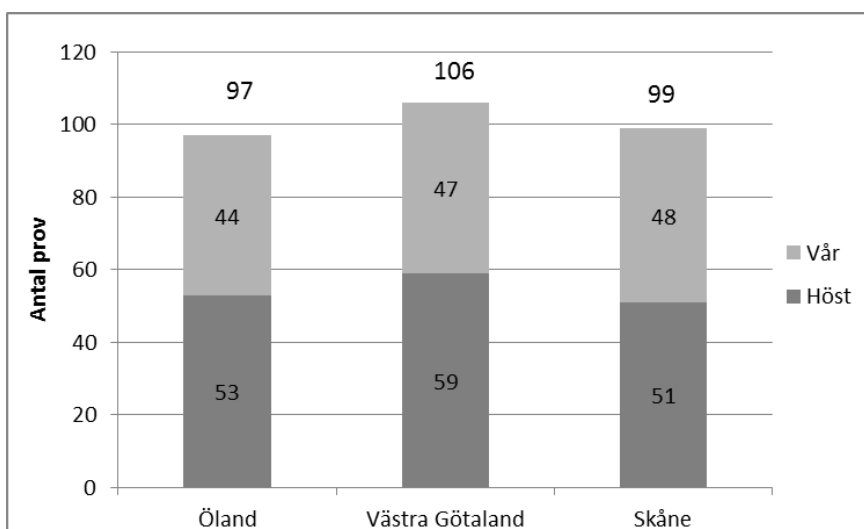
Statistik

Chi2-test utfördes för att undersöka förekomst av signifikanta skillnader variationen i fynd av respektive bakterie med avseende på provtagningstid (vår och höst), region (Skåne, Öland Västra Gölaland) och antal mjölkdjur per gård.

Resultat

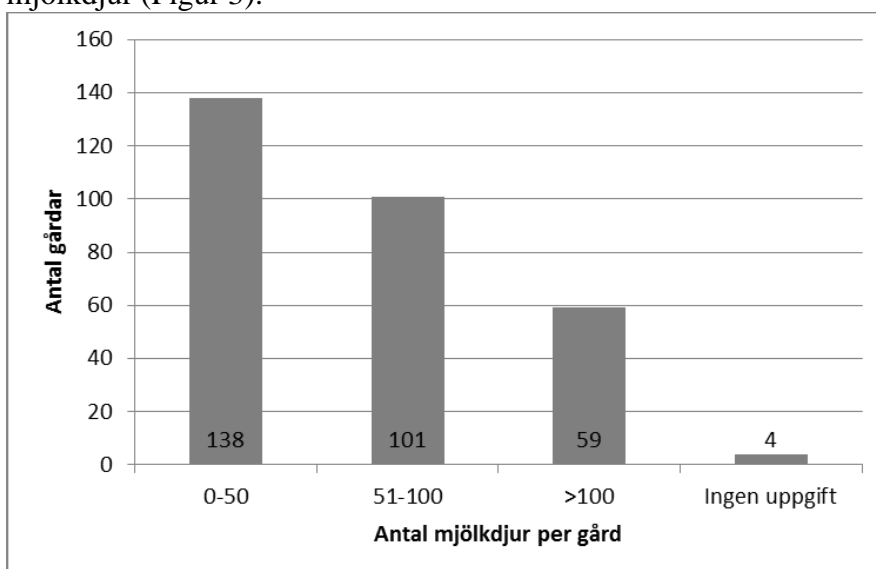
Provtagning

Sammanlagt samlades 302 mjölkfilter in, varav 97 från mjölgårdar på Öland, 106 från Västra Götaland och 99 från Skåne. Ungefär hälften av gårdarna från de tre regionerna provtogs på våren och resterande hälften provtogs på hösten (Figur 2).



Figur 2. Antal provtagna mjölkfilter från mjölgårdar i respektive region samt fördelning över vår och höst.

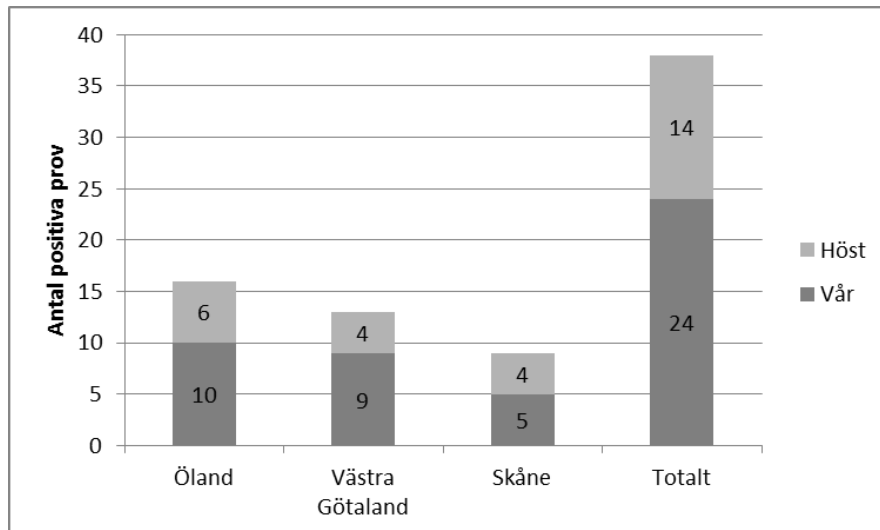
Antalet mjölkdjur på de provtagna gårdarna i de tre regionerna varierade från några få till över 400 mjölkdjur. De flesta gårdarna hade mellan 0-50 eller 51-100 mjölkdjur (Figur 3).



Figur 3. Deltagande gårdar grupperade efter antal mjölkdjur per gård.

Termotoleranta campylobacter

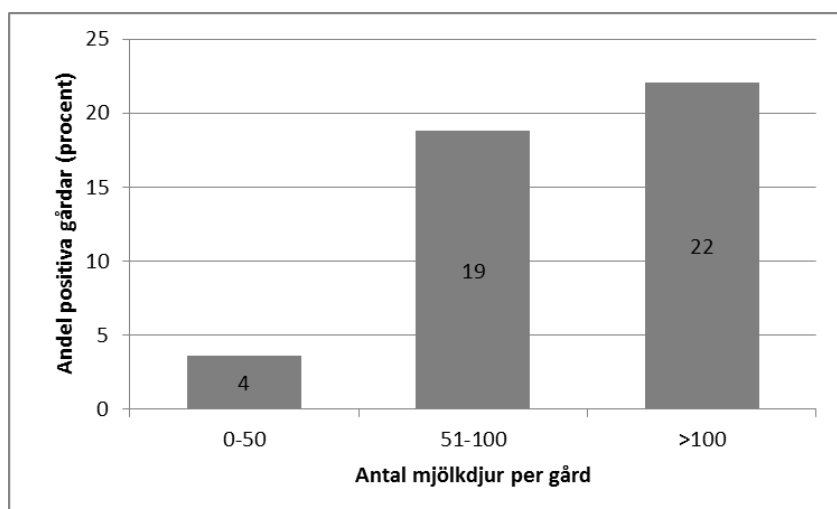
Anrikningsbuljonger från 93 (31 procent) av de 302 mjölkfiltern var positiva vid PCR-analys för termotoleranta campylobacter. Termotoleranta campylobacter isolerades från 38 (13 procent) av 302 mjölkfilter. Signifikant fler fynd av termotoleranta campylobacter gjordes under våren (24 st) jämfört med hösten (14 st) (Chi2-test, P-värde 0,023). Ingen signifikant skillnad i förekomsten av campylobacter kunde ses mellan regionerna (Figur 4).



Figur 4. Antal fynd av termotoleranta campylobacter i mjölkfilter, totalt och i respektive region samt vår och höst.

De flesta fynden av termotoleranta campylobacter tillhörde arten *Campylobacter jejuni* (34 st) och resterande tillhörde arten *Campylobacter lari* (4 st).

Andelen prov som var positiva för termotoleranta campylobacter var signifikant (Chi2-test, P-värde < 0,001) vanligare vid gårdar med 50 djur eller fler (Figur 5).

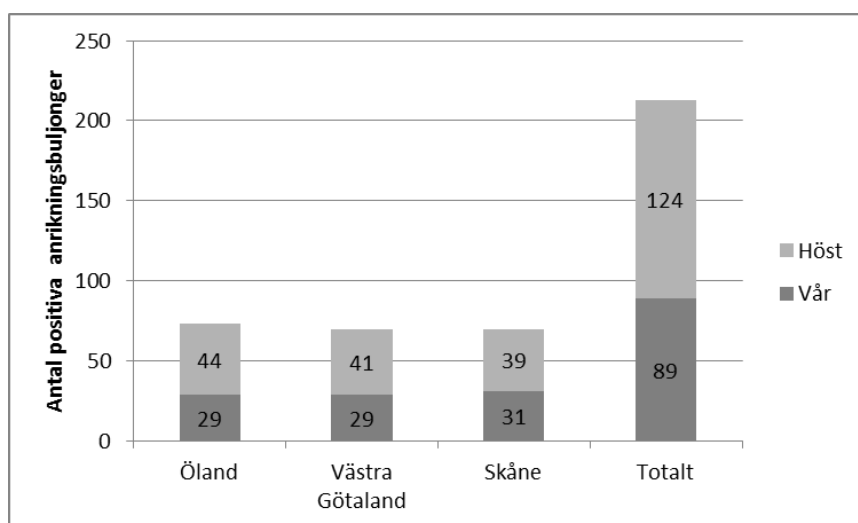


Figur 5. Andel mjölkgårdar positiva för termotoleranta campylobacter i förhållande till antal mjölkdjur per gård; 0-50 mjölkdjur, 51-100 mjölkdjur respektive över 100 mjölkdjur.

STEC

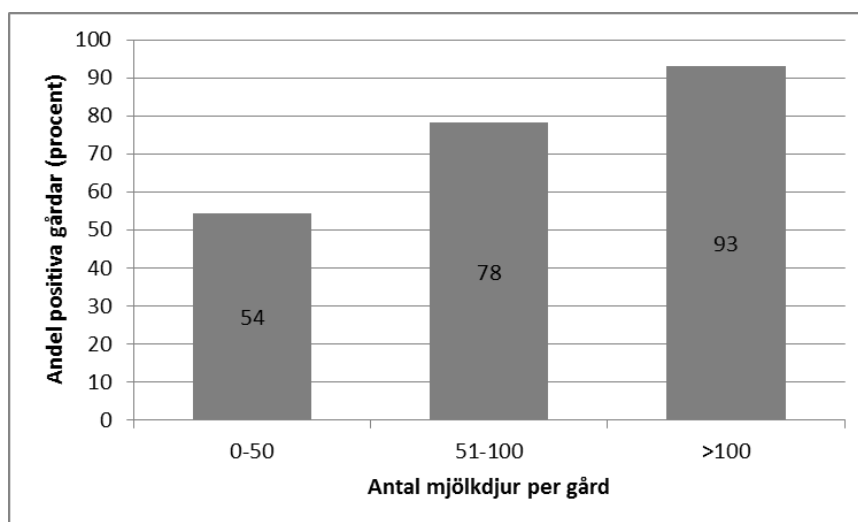
Misstänkta STEC

Anrikningsbuljonger från 213 (71 procent) av de 302 mjölkfiltern var positiva vid PCR-analys av *stx1* och/eller *stx2* (Figur 6). Signifikant fler anrikningsbuljonger var positiva för STEC under hösten (124 st) jämfört med våren (89 st) (Chi2-test, P-värde 0,018). Förekomsten av STEC var jämnt fördelat mellan de tre regionerna. Anrikningsbuljonger med både *stx1*-genen och *stx2*-genen (124 st) var vanligare än buljonger med enbart *stx1*- eller *stx2*-genen (44 st vardera).



Figur 6. Antal prov från anrikningsbuljonger misstänkt positiva för STEC, totalt och för respektive region samt vår och höst.

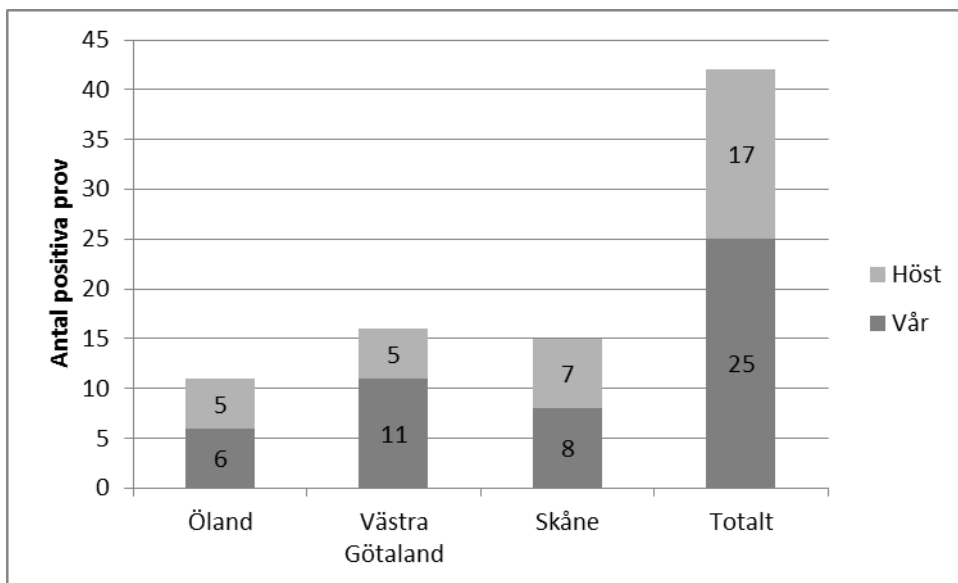
Andelen prov som var positiva för STEC var signifikant vanligare på gårdar med fler än 50 mjölkdjur jämfört med gårdar med 50 djur eller färre (Chi2-test, P-värde < 0,001) (Figur 7).



Figur 7. Andel mjölkfilter på en gård misstänkt positiva för STEC i förhållande till antal mjölkdjur per gård; 0-50 mjölkdjur, 51-100 mjölkdjur respektive över 100 mjölkdjur.

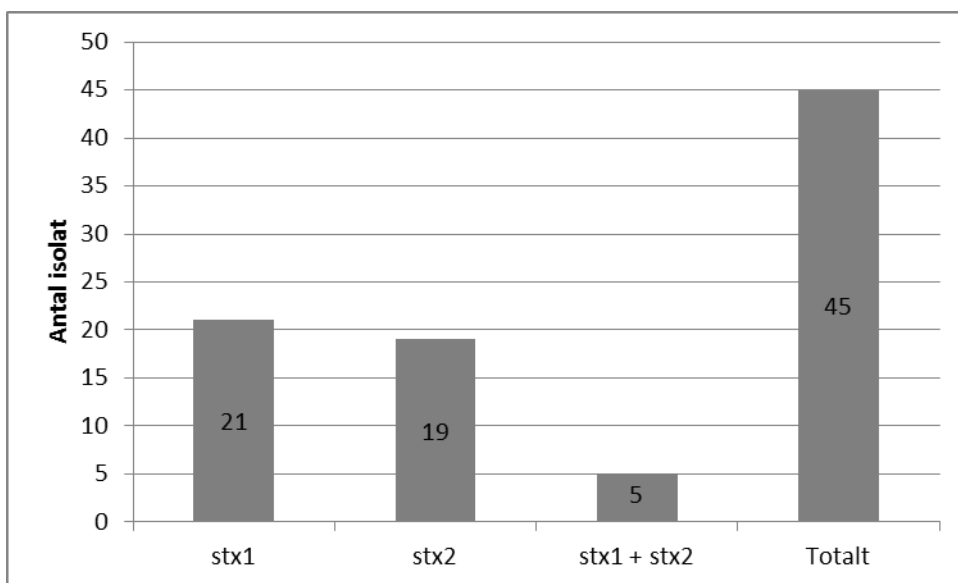
Bekräftade STEC

STEC isolerades från 42 (14 procent) av de 302 analyserade mjölkfiltern. STEC isolerades från 42 (20 procent) av de 213 *stx*-positiva anrikningsbuljongerna. Ingen signifikant skillnad i förekomst av bekräftade STEC (isolat) kunde ses mellan de olika regionerna. Signifikant skillnad påvisades inte heller mellan förekomst av bekräftade STEC (isolat) på våren jämfört med på hösten (Figur 8).



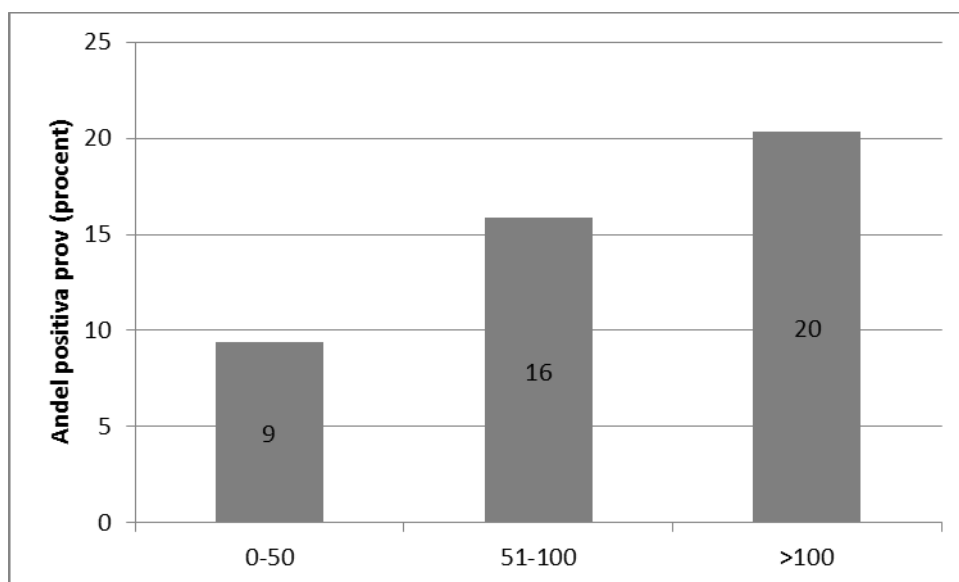
Figur 8. Antal bekräftat positiva prov för STEC i mjölkfilter, totalt och för respektive region samt vår och höst.

Totalt isolerades 45 STEC från mjölkfilterproven, i tre av proven återfanns två olika STEC-isolat. Av de 45 isolaten innehöll 21 *stx1*-genen, 19 *stx2*-genen och resterande 5 isolat innehöll både *stx1* och *stx2* (Figur 9). Genen *eae* tillsammans med *stx*-gen/er hittades i 16 (5 procent) av proven, 2 (0,7 procent) prov var positiva för *stx2* och *eae*-genen och 14 (5 procent) var positiva för *stx1* och *eae*.



Figur 9. Fördelningen av *stx*-gener från isolerade STEC.

Andelen prov som var positiva för STEC var signifikant (Chi2-test, P-värde 0,035) vanligare på gårdar med fler än 100 mjölkdjur jämfört med gårdar med 50 djur eller färre (Figur 10).



Figur 10. Andel mjölkfilter på en gård bekräftat positiva för STEC i förhållande till antal mjölkdjur per gård; 0-50 mjölkdjur, 51-100 mjölkdjur respektive över 100 mjölkdjur.

Av de 45 STEC som isolerats från mjölkfiltren serotypades 29 stycken. Isolaten tillhörde 21 olika serotyper (Tabell 1). Den vanligast förekommande serotypen var O145:H28 som påvisades i fem (2 procent) av de 302 proven och den näst vanligaste O91:H21 som påvisades i tre (1 procent) av proven. STEC tillhörande serotypen O157:H7 påvisades i ett (0,3 procent) av proven. Detta isolat innehöll toxingenerna *stx2a* och *stx2c* samt genen *eae*, men tillhörde inte klad 8. Två av isolaten (0,7 procent) klassades som serotypen O26:H11 av proven. Två av de typade isolaten kunde inte O-serogrupperas.

Tabell 1. Sammanställning av serotypning av isolerade STEC.

Serotyp	Antal	Stx	eae
O145:H28	5	stx1a	eae
O91:H21	2	stx1a, stx2a, stx2d	-
O91:H21	1	stx2d	-
O26:H11	2	stx1a	eae
O154:H31	2	stx1d	-
O182:H25	2	stx1a	eae
O136:H12	1	stx2a	-
O136:H12	1	stx1a	-
O81:H21	1	stx2c, stx2d	-
O84:H2	1	stx1a	eae
O8:H9	1	stx2c	-
O185:H7	1	stx2c	-
O185:H28	1	stx1a, stx2a	-
O168:H8	1	stx2d	-
O157:H7	1	stx2a, stx2c	eae
O113:H4	1	stx2d	-
O109:H48	1	stx1a	-
O109:H16	1	stx2a	-
O103:H2	1	stx1a	eae
?:H28 ^a	1	stx1a	eae
?:H19 ^a	1	stx2a	-
Typade STEC isolat	29		
Ej typade STEC isolat	16		
Totalt	45		

^a O-serogrupp kunde inte bestämmas.

Analyssvårigheter

Att erhålla rena isolat har varit extra problematiskt vid analysen av STEC. STEC-isolaten har varit svåra att separera från den bakgrundsflora som fanns i den opastöriserade mjölken. Även fagen som shigatoxinet sitter på i genomet har ibland förlorats på grund av att upprepade renstryk gjorts i försök att få isolaten rena (Bielaszewska et al., 2007a; Bielaszewska et al., 2007b). Vid publikationsdatum har alla isolat ännu inte serotypats på grund av problematik med att rena de infrysade isolaten samt att vissa blir positiva för toxigen/er med PCR men inte vid sekvensering.

Förekomst av både campylobacter och STEC

I åtta (3 procent) av 302 analyserade prov isolerades både campylobacter och STEC från samma prov. Inga signifikanta samband fanns dock mellan positivt prov för STEC och förekomst av campylobacter i samma prov (Chi2-test, P-värde 0,823).

Salmonella

Sammanlagt två (0,7 procent) av de 302 anrikningsbuljongerna från mjölkfiltren var positiva vid PCR-analys av *Salmonella* spp. Ingen salmonella kunde dock isoleras från de två PCR-positiva anrikningsbuljongerna.

Diskussion

I denna kartläggning har förekomsten av termotoleranta campylobacter, STEC och salmonella undersökts i mjölkfilter från svenska gårdar från Skåne, Öland och Västra Götaland (exklusive sjuhäradsbygden). Då inte hela Sverige ingått i kartläggningen, och endast ett prov tagits per gård, bör resultaten ses som en ögonblicksbild av vilka bakterier som kan finnas i opastöriserad mjölk i regioner med hög mjölkötäthet. Gårdarna i kartläggningen valdes ut slumpvis, vilket innebär att gårdar av varierande storlek och med olika mjölkningssystem slumpmässigt har ingått i studien. Ingen hänsyn har tagits till om gården använder mjölken till att tillverka förädlade mejeriprodukter, har någon försäljning eller annan överlåtelse av opastöriserad mjölk eller själva konsumerar sin egen mjölk. Resultaten kan ha påverkats av att deltagandet var frivilligt för gårdarna.

Vid tidigare utförda kartläggningar av opastöriserad mjölk från andra länder har antingen tankmjölk från gården, tankmjölk från mejerier eller mjölkfilter provtagits (Anonymous, 2015; D'Amico and Donnelly, 2010; Giacometti et al., 2013; Hill et al., 2012; Mohammadi et al., 2013; Murphy et al., 2005; Ruusunen et al., 2013; Schoder et al., 2013; Solomakos et al., 2009; Zastempowska et al., 2016). I denna kartläggning har mjölkfilter provtagits. Mjölkfiltret, som även kallas in-line filter, är det filter som sitter i gårdens egna mjölksystem genom vilken mjölken filtreras innan den når mjölk tanken på gården. Syftet med filtret är att förhindra större partiklar, såsom halm och smuts från att nå gårdens mjölk tank. Filtret släpper igenom mindre partiklar, inklusive bakterier, men studier har visat att en viss koncentring av bakterier kan ske i dessa filter och att provtagning av mjölkfilter ofta ger fler positiva fynd jämfört med prover från tankmjölk (Anonymous, 2015; EFSA, 2015). Olika kartläggningar skiljer sig även från varandra med avseende på vilka bakterier som inkluderats i undersökningen och vilka analysmetoder som använts. Sammanfattningsvis visar resultat från olika kartläggningar att sjukdomsframkallande bakterier så gott som alltid påvisas, men att de förekommer i varierande grad.

I denna kartläggning har fynd av såväl campylobacter som STEC isolerats från mjölkfilter. Däremot har ingen salmonella isolerats.

Campylobacter

I denna kartläggning isolerades campylobacter från 13 procent av de analyserade mjölkfiltren, varav huvudelen av fynden var *Campylobacter jejuni*. Denna förekomst överensstämmer väl med en studie utförd av SVA (Anonymous, 2013), där 10 procent av undersökta tankmjölkfilter från svenska mjölk gårdar var positiva för campylobacter. Campylobacter är också vanligt förekommande i träck från svenska nötdjursbesättningar (Blixt et al., 2001). Även i andra länder har campylobacter påvisats i opastöriserad mjölk. I en kartläggning från Irland, där 600

prov av såväl tankmjölk som mjölkfilter från 211 gårdar över hela landet analyserats, var campylobacter, tillsammans med listeria, vanligast förekommande (Anonymous, 2015). Campylobacter hittades i 22 procent av filtren och i 3 procent av tankmjölkproven (Anonymous, 2015). I norra Italien hittades campylobacter i 6 procent av mjölkfiltren i en kartläggning av gårdar som har tillstånd att sälja opastöriserad mjölk (Giacometti et al., 2013). Höga halter av campylobacter har visats förekomma i gödsel från campylobacter-positiva nötkreatur (Ramonaitė et al., 2013) och det är därför inte förvånande att mjölk kan förorenas med dessa bakterier. Campylobacter är den bakterie som orsakat flest rapporterade livsmedelsrelaterade utbrott inom EU (EFSA, 2015). Konsumtion av opastöriserad mjölk i Sverige orsakade 2009 ett utbrott av campylobacterinfektion där mer än tolv personer som besökt en julmarknad drabbades, och 2011 ett utbrott som drabbade tretton personer på tre gårdar varav ett barn krävde sjukhusvård (Folkhälsomyndigheten, 2011). Våren 2014 insjuknade nio personer, förskolebarn och medföljande vuxna, i Västra Götaland i campylobacterios efter ett besök på en mjölkgård. Den utredning som gjordes, i samarbete med lantbrukaren, visade att misstänkt smittkälla var opastöriserad mjölk (Anonymous, 2014a).

Det är dock inte alltid campylobacter hittas i kartläggningar av opastöriserad mjölk. Under 2014 utfördes i Finland en studie av förekomsten av sjukdomsframkallande bakterier i opastöriserad mjölk från 183 gårdar, där inga campylobacter hittades (Ruusunen et al., 2013). Samma resultat har rapporterats från Nya Zeeland (Hill et al., 2012). Både den finska och den nya zeeländska studien analyserade enbart prov från tankmjölk, vilket kan vara en orsak till att inga campylobacter påvisats. Koncentrationen campylobacter kan ha varit så pass låg att de inte återfunnits vid analys av små volymer tankmjölk.

I denna kartläggning hittades campylobacter i större utsträckning på våren än på hösten. Det fanns även ett signifikant samband med antalet djur på gården, då fler campylobacter isolerades från gårdar med mer än 50 mjölkdjur. Det har tidigare rapporterats att campylobacter kan variera i nötbесättningar över säsongen, med fler positiva prov under sommarmånaderna (Blixt et al., 2001; Hakkinen et al., 2007; Kwan et al., 2008; Lal et al., 2012). Besättningsstorlek har också i vissa fall visat sig vara en riskfaktor för förekomst av flertalet andra sjukdomsframkallande mikroorganismer i nötbесättningar (Dodson and LeJeune, 2005; Widgren et al., 2015; Williams and Winden, 2014). En annan tänkbar orsak är att andelen bakterier som fastnar på mjölkfiltret ökar med mjölmängd då mer smuts på mjölkfiltret gör att fler bakterier fastnar.

STEC

I denna kartläggning påvisades misstänkt STEC, genom påvisandet av generna *stx1* och/eller *stx2* med PCR, i 71 procent av de 302 mjölkfilter som provtagits. Påvisandet av STEC bekräftades genom isolering av bakterien, i 14 procent av de 302 proven. Den stora skillnaden mellan förekomst av misstänkta STEC och bekräftade STEC beror till stor del på svårigheten att isolera STEC i livsmedel med hög bakgrundsflora. I vissa prov gjordes flera fynd av STEC, och totalt isolerades 45 STEC-bakterier. Denna förekomst är högre än vad som rapporterats från flera

andra kartläggningar, men många av dessa har begränsats till att endast leta efter någon eller några få STEC-serogrupper. Kartläggningar som enbart letat efter STEC O157:H7 rapporterar ofta en mycket låg, alternativt ingen påvisad, förekomst i opastöriserad mjölk alternativt mjölkfilter (Anonymous, 2013; D'Amico and Donnelly, 2010; Giacometti et al., 2013; Solomakos et al., 2009), medan det rapporterats något högre förekomster då mer än en serogrupp ingått i studien (Anonymous, 2015). Några studier har, liksom denna kartläggning, letat efter alla serogrupper av STEC eller screenat efter virulensgener med PCR (Giacometti et al., 2012; Lambertini et al., 2015; Mohammadi et al., 2013; Ruusunen et al., 2013; van Kessel et al., 2011). I en studie från USA, där såväl tankmjölk som mjölkfilter analyserats från mer än 500 gårdar över hela landet, påvisades STEC i 51 procent av tankmjölksproven och i 65 procent av mjölkfiltren efter screening med PCR (van Kessel et al., 2011).

I kartläggningen av mjölkfilter från norra Italien påvisades STEC i 8 procent av i 3 procent av tankmjölksproven (Ruusunen et al., 2013).

I denna kartläggning påvisades signifikant fler PCR-positiva prov för STEC under hösten jämfört med våren. En liknande variation ses i antalet rapporterade patienter med STEC-infektion där flest patienter rapporteras under sensommaren och tidig höst. En säsongsvariation ses även hos nötkreatur, där fler djur utsöndrar STEC O157:H7 under slutet av sommaren och hösten (Socialstyrelsen, 2014). Storleken på nötdjursbesättningen har i en tidigare studie korrelerat till förekomst av STEC O157:H7 i miljön på en gård (Widgren et al., 2015). Detta överensstämmer med att den kartläggningen var signifikant vanligare med STEC på gårdar med ett högre antal mjölkkor.

Risken för allvarigare sjukdom är enligt EFSA (2013) högre vid infektion med STEC som har virulensgenerna *stx2* och *eae* eller *aaiC/aggR*. I kartläggningen var förekomsten av genen för Stx2 i kombination med *eae* låg (0,7 procent) hos de isolerade bakterierna. Även olika serotyper av STEC förknippas med olika allvarlighetsgrad av sjukdom hos människa, och det är mer än 400 olika serotyper som har kopplats samman med sjukdom (Tozzoli and Scheutz, 2014). Den vanligast förekommande serotypen som hittades i kartläggningen var O145:H28 (alla fem isolaten var positiva för *stx1a* och *eae*) och den näst vanligaste serotypen var O91:H21 och därefter O26:H11. STEC O145, O91 och O26 är serogrupper som alla har kopplats till allvarliga humanfall (Beutin et al., 2015; De Schrijver et al., 2008; EFSA, 2013; Mathusa et al., 2010; Wahl et al., 2011). I ett pågående, våren 2016, utbrott orsakat av ost från opastöriserad mjölk i Rumänien och Italien, är smittämnet STEC O26 (Peron et al., 2016). I detta utbrott har 25 fall påvisats hittills, varav 19 utvecklade den allvarliga följsjukdomen HUS (EFSA and ECDC, 2016). Under sommaren 2014 smittades två barn i Sverige med STEC O145 (*stx1a*) och smittkällan misstänktes vara mjölkgården, även om det inte kunde bekräftas (Anonymous, 2014b). Även i Norge har det skett utbrott med STEC O145:H28, där smittkällan misstänks vara kontakt med får (Wahl et al., 2011). Serotypen O157:H7, som är den serotyp som är mest undersökt och som orsakat många sjukdomsfall och utbrott hos människa (EFSA, 2013; Mathusa et al., 2010)

hittades i ett (0,3 procent) av proven i denna kartläggning. Det isolat av O157:H7 som hittades i denna studie var tillhörde inte subtypen klad 8.

Denna undersökning visar inte bara förekomsten i mjölkfilter utan ger även en indikation på vilka STEC-serotyper som finns hos svenska mjölkdjur. De flesta svenska studier om förekomst av STEC bland djur har varit inriktade på O157 (Albihn et al., 2003; Boqvist et al., 2009; Eriksson et al., 2005; Widgren et al., 2015). Under perioden 2009–2012 undersöktes totalt 126 nötkreatursbesättningar i Hallands, Västra Götaland, Gotlands och Kronobergs län efter förekomst av STEC O157:H7 (Widgren et al., 2015). I 53 procent av besättningarna kunde STEC O157:H7 påvisas vid minst ett tillfälle. Under 2013 undersöktes sparade prover från 115 av de 126 ovan nämnda besättningarna även för serogrupperna O26, O103 och O121. Totalt påvisades STEC O26 i fem besättningar (4 procent), STEC O103 i sju besättningar (6 procent) och STEC O121 i 14 besättningar (12 procent) (Socialstyrelsen, 2014). Studier på förekomst av den vanligaste serogruppen i denna kartläggning (O145) saknas.

Isoleringsfrekvensen av STEC från de positiva anrikningsbuljongerna i denna kartläggning var förhållandevis hög (20 procent) jämfört med andra studier där en isoleringsfrekvens på 9-12,5 procent rapporterats (Giacometti et al., 2013; Giacometti et al., 2012; Marozzi et al., 2016; Vernozy-Rozand et al., 2005). Isoleringsfrekvensen var däremot mycket lägre än i en tidigare genomförd svensk kartläggning av STEC på nötkött, där den låg på 50 procent (Egervärn and Flink, 2014). Detta trots att båda svenska undersökningarna använde immunoblot (isolerings av STEC som uttrycker toxinet/toxiner) som isoleringsmetod. Jämfört med köttproven var det i denna kartläggning mycket svårare att erhålla rena STEC-isolat, d.v.s. isolat som inte var förorenade av andra bakterier som fanns i mjölkfiltren. Förutom provtypen som analyseras och isoleringsmetodik, beror isoleringsfrekvensen också på vilken typ av STEC som finns i provet och vilka odlingsplattor som används.

Vid detektion av *stx*-gener (misstänkta STEC) med PCR sker ingen differentiering mellan levande eller döda bakterier eller om det är fager med toxingener som finns spridda i miljön som har detekterats. Det går inte heller att uttala sig om det är en eller flera bakterier som innehar de gener som detekterats. Förekomsten av *stx*-gener i anrikningsbuljongen bestod till stor del av en blandning av både *stx1*- och *stx2*-generna medan förekomsten av isolerade STEC framförallt innehöll antingen *stx1*- eller *stx2*-genen. Detta antyder att flera olika STEC bakterier kan ha funnits i provet men att bara en typ av STEC isolerades i de flesta fallen.

Salmonella

Salmonella påvisades med PCR i mindre än 1 procent av proven, varav inga kunde isoleras. Denna låga förekomst stämmer väl överens med den mycket omfattande studie som genomförts på tankmjölk från Sveriges alla mjölkbesättningar, där 1-2 procent seroprevalens påvisats (Ågren et al., 2016). I Sverige har vi infört åtgärder för att minimera förekomst av salmonella samt en omfattande och obligatorisk

torisk kontroll för salmonella, vilket innebär kontroll av hela livsmedelskedjan och åtgärder vid positiva fynd (Jordbruksverket, 2004). Detta gör att vi har ett mycket gott läge med avseende på salmonellaförekomst jämfört med många andra länder.

Slutsatser

Resultaten från undersökningen visar att sjukdomsframkallande bakterier förekommer i mjölkfilter från svenska mjölkbesättningar. Ett positivt samband mellan antalet djur på mjölkgården och positiva fynd av campylobacter och STEC har påvisats. Ju fler djur som finns på en gård desto större är risken att några av djuren bär på sjukdomsframkallande bakterier och att de sprids i besättningen och till mjölken.

Tack

Ett stort tack till de djurägare och personal inom Växa Sverige och Skånesemin som genom tålmodig provtagning gjort det möjligt att genomföra denna kartläggning. Ett tack riktas också till Elisabeth Fredlund, Roland Lindqvist, Hans Lindmark, Maria Egervärn och Mats Lindblad som har deltagit i planerandet av kartläggningen och gett viktigt återkoppling vid skrivandet av rapporten.

Referenser

- Albihn, A., Eriksson, E., Wallen, C., Aspan, A., 2003. Verotoxinogenic *Escherichia coli* (VTEC) O157:H7 - A nationwide Swedish survey of bovine faeces. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 44, 43-52.
- Anonymous, 2013. Sjukdomsframkallande bakterier i opastöriserad mjölk. Statens veterinärmedicinska anstalt. <http://www.sva.se/om-sva/pressrum/nyheter-fran-sva/sjukdomsframkallande-bakterier-i-opastoriserad-mjolk> 2016-05-13.
- Anonymous, 2014a. *Campylobacter* (Västra Götaland, 2014). Folkhälsomyndigheten. <http://www.folkhalsomyndigheten.se/amnesomraden/beredskap/utbrott/utbrottsarkiv/campylobacter-2014/> 2016-05-13.
- Anonymous, 2014b. EHEC - årsrapport 2014. Folkhälsomyndigheten. <https://www.folkhalsomyndigheten.se/amnesomraden/statistik-och-undersokningar/sjukdomsstatistik/enterohemorragisk-e-coli-infektion-ehec/?t=com> 2016-05-13.
- Anonymous, 2015. Raw milk and raw milk filter microbiological surveillance programme. Food Safety Authority of Ireland.
- Atalla, H., Johnson, R., 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. *Journal of Food Protection*. 63, 1167-1172.
- Beutin, L., Delannoy, S., Fach, P., 2015. Sequence variations in the flagellar antigen genes *fliCH25* and *fliCH28* of *Escherichia coli* and their use in identification and characterization of Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) O145:H25 and O145:H28. *PLoS One*.
- Bielaszewska, M., ck, R. K., Friedrich, A. W., Eiff, C. v., Zimmerhackl, L. B., Karch, H., Mellmann, A., 2007a. Shiga toxin-mediated hemolytic uremic syndrome: time to change the diagnostic paradigm? *PLoS One*.
- Bielaszewska, M., Prager, R., Köck, R., Mellmann, A., Zhang, W., Tschäpe, H., Tarr, P. I., Karch, H., 2007b. Shiga toxin gene loss and transfer in vitro and in vivo during Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 infection in humans. *Applied and Environmental Microbiology*. 73, 3144-3150.
- Blixt, Y., Borch, E., Engvall, E. O., Törnquist, M., 2001. *Campylobacter* spp. hos nötkreatur. Swedish Meats R&D. I-395-99036b.
- Boqvist, S., Aspan, A., Eriksson, E., 2009. Prevalence of verotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7 in fecal and ear samples from slaughtered cattle in Sweden. *Journal of Food Protection*. 72, 1709-1712.
- D'Amico, D. J., Donnelly, C. W., 2010. Microbiological quality of raw milk used for small-scale artisan cheese production in Vermont: effect of farm characteristics and practices. *Journal of Dairy Science*. 93, 134-147.
- De Schrijver, K., Buvens, G., Possé, B., Van den Branden, D., Oosterlynck, O., De Zutter, L., Eilers, K., Piérard, D., Dierick, K., Van Damme-Lombaerts, R., Lauwers, C., Jacobs, R., 2008. Outbreak of verocytotoxin-producing *E. coli* O145 and O26 infections associated with the consumption of ice cream produced at a farm, Belgium. *Eurosurveillance*. 13.
- Dodson, K., LeJeune, J., 2005. *Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter jejuni*, and *Salmonella* prevalence in cull dairy cows marketed in northeastern Ohio. *Journal of Food Protection*. 68, 927-931.
- EFSA, 2013. Scientific opinion on VTEC-seropathotype and scientific criteria regarding pathogenicity assessment. *EFSA Journal*. 11, 3138.
- EFSA, 2015. Scientific opinion on the public health risks related to the consumption of raw drinking milk. *EFSA Journal*. 13, 3940.
- EFSA, ECDC, 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA Journal*. doi:1013, 4329.
- EFSA, ECDC, 2016. Multi-country outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection associated with haemolytic uraemic syndrome. Technical Report. EFSA-Q-2016-00232.

- Egervärn, M., Flink, C., 2014. Kartläggning av shigatoxinproducerande *E. coli* (STEC) på nötkött och bladgrönsaker. Livsmedelsverket Rapport 22.
- Eriksson, E., Aspan, A., Gunnarsson, A., Vågsholm, I., 2005. Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) O157 in Swedish dairy herds. *Epidemiology & Infection*. 133, 349-358.
- FDA, Bad bug book: foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins, 2nd edition., 2012. Folkhälsomyndigheten, 2011. Epidemiologisk årsrapport.
- Giacometti, F., Bonilauri, P., Serraino, A., Peli, A., Amatiste, S., Arrigoni, N., Bianchi, M., Bilei, S., Cascone, G., Comin, D., Daminelli, P., Decastelli, L., Fustini, M., Mion, R., Petruzzelli, A., Rosmini, R., Rugna, G., Tamba, M., Tonucci, F., Bolzoni, G., 2013. Four-year monitoring of foodborne pathogens in raw milk sold by vending machines in Italy. *Journal of Food Protection*. 76, 1902-1907.
- Giacometti, F., Serraino, A., Finazzi, G., Daminelli, P., Losio, M. N., Bonilauri, P., Arrigoni, N., Garigliani, A., Mattioli, R., Alonso, S., Piva, S., Florio, D., Riu, R., Zanoni, R. G., 2012. Foodborne pathogens in in-line milk filters and associated on-farm risk factors in dairy farms authorized to produce and sell raw milk in northern Italy. *Journal of Food Protection*. 75, 1263-1269.
- Hakkinen, M., Heiska, H., Hänninen, M.-L., 2007. Prevalence of *Campylobacter* spp. in cattle in Finland and antimicrobial susceptibilities of bovine *Campylobacter jejuni* strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 73, 3232-3238.
- Hill, B., Smythe, B., Lindsay, D., Shepherd, J., 2012. Microbiology of raw milk in New Zealand. *International Journal of Food Microbiology*. 157, 305-308.
- 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.
- Jordbruksverket, 2004. Statens jordbruksverks föreskrifter om bekämpande av salmonella hos djur. SJVFS 2004:2.
- Jordbruksverket, 2012. Marknadsöversikt - mjölk och mejeriprodukter. Rapport. 7.
- Josefsen, M. H., Jacobsen, N. R., Hoorfar, J., 2004. Enrichment followed by quantitative PCR both for rapid detection and as a tool for quantitative risk assessment of food-borne thermotolerant campylobacters. *Applied and Environmental Microbiology*. 70, 3588-92.
- Kwan, P. S. L., Birtles, A., Bolton, F. J., French, N. P., Robinson, S. E., Newbold, L. S., Upton, M., Fox, A. J., 2008. Longitudinal study of the molecular epidemiology of *Campylobacter jejuni* in cattle on dairy farms. *Applied and Environmental Microbiology*. 74, 3626-3633.
- Lal, A., Hales, S., French, N., Baker, M. G., 2012. Seasonality in human zoonotic enteric diseases: a systematic review. *PLoS One*. 7, e31883.
- Lambertini, E., Karns, J. S., Van Kessel, J. A. S., Cao, H., Schukken, Y. H., Wolfgang, D. R., Smith, J. M., Pradhan, A. K., 2015. Dynamics of *Escherichia coli* virulence factors in dairy herds and farm environments in a longitudinal study in the United States. *Applied and Environmental Microbiology*. 81, 4477-4488.
- Lindblad, M., 2012. Kvalitativ riskvärdering av mikroorganismer i opastöriserad konsumtionsmjölk. Livsmedelsverket.
- LIVSFS, 2005:20. Föreskrifter om livsmedelshygien.
- Marozzi, S., Santis, P. D., Lovari, S., Condoleo, R., Bilei, S., Marcianò, R., Mezher, Z., 2016. Prevalence and molecular characterisation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in raw milk cheeses from Lazio region, Italy. *Italian Journal of Food Safety*. 5, 4-6.
- Mathusa, E. C., Chen, Y., Enache, E., Hontz, L., 2010. Non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. *Journal of Food Protection*. 73, 1721-1736.
- Mohammadi, P., Abiri, R., Rezaei, M., Salmanzadeh-Ahrabi, S., 2013. Isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from raw milk in Kermanshah, Iran. *Iranian Journal of Microbiology*. 5, 233-238.
- Murphy, B. P., Murphy, M., Buckley, J. F., Gilroy, D., Rowe, M. T., McCleery, D., Fanning, S., 2005. In-line milk filter analysis: *Escherichia coli* O157 surveillance of milk production holdings. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 208, 407-413.
- Månsson, H. L., 2012. Den svenska mejerimjölkens sammansättning 2009. *Svensk Mjölk*. Rapport nr: 7094.

- Oliver, S. P., Boor, K. J., Murphy, S. C., Murinda, S. E., 2009. Food safety hazards associated with consumption of raw milk. *Foodborne Pathogens and Disease*. 6, 793-806.
- Peron, E., Zaharia, A., Zota, L. C., Severi, E., Mårdh, O., Usein, C., Bălgrădean, M., Espinosa, L., Jansa, J., Scavia, G., Rafila, A., Serban, A., Pistol, A., 2016. Early findings in outbreak of haemolytic uraemic syndrome among young children caused by shiga toxin-producing *Escherichia coli*, Romania, January to February 2016. *Eurosurveillance*. 21.
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T. P., Ross, P., Fitzgerald, G. F., Cotter, P. D., 2013. The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiology Review*. 37, 664-698.
- Ramonaitė, S., Rokaitytė, A., Tamulevičienė, E., Malakauskas, A., Alter, T., Malakauskas, M., 2013. Prevalence, quantitative load and genetic diversity of *Campylobacter* spp. in dairy cattle herds in Lithuania. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 55, 1-6.
- Ruusunen, M., Salonen, M., Pulkkinen, H., Huuskonen, M., Hellström, S., Revez, J., Hänninen, M.-L., Fredriksson-Ahomaa, M., Lindström, M., 2013. Pathogenic bacteria in Finnish bulk tank milk. *Foodborne Pathogens and Disease*. 10, 99-106.
- SCB, 2015. Jordbruksstatistisk årsbok 2015.
- Schoder, D., Maichin, A., Lema, B., Laffa, J., 2013. Microbiological quality of milk in Tanzania: from Maasai stable to African consumer table. *Journal of Food Protection*. 76, 1908-1915.
- Socialstyrelsen, 2014. Infektion med EHEC/VTEC - ett nationellt strategidokument.
- Solomakos, N., Govaris, A., Angelidis, A. S., Pournaras, S., Burriel, A. R., Kritas, S. K., Papageorgiou, D. K., 2009. Occurrence, virulence genes and antibiotic resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from raw bovine, caprine and ovine milk in Greece. *Food Microbiology*. 26, 865-871.
- SvenskMjolk, 2007. Branschriktlinjer för hygienisk mjölkproduktion. Version 2007-10-01.
- Tozzoli, R., Scheutz, F., 2014. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* Infections in Humans. *Pathogenic Escherichia coli*.
- Wahl, E., Vold, L., Lindstedt, B. A., Bruheim, T., Afset, J. E., 2011. Investigation of an *Escherichia coli* O145 outbreak in a child day-care centre - extensive sampling and characterization of *eae*- and *stx1*-positive *E. coli* yields epidemiological and socioeconomic insight. *BMC Infectious Diseases* 2011, 11:238.
- van Kessel, J. A. S., Karns, J. S., Lombard, J. E., Koprak, C. A., 2011. Prevalence of *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* virulence factors in bulk tank milk and in-line filters from U.S. dairies. *Journal of Food Protection*. 74, 759-768.
- Vernozy-Rozand, M. P., M. B., C. B., L. B., 2005. Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from raw milk cheeses in France. *Letters in Applied Microbiology*. 41, 235-241.
- Widgren, S., Söderlund, R., Eriksson, E., Fasth, C., Aspan, A., Emanuelson, U., Alenius, S., Lindberg, A., 2015. Longitudinal observational study over 38 months of verotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7 status in 126 cattle herds. *Preventive Veterinary Medicine*. 121, 343-352.
- Williams, D., Winden, S. V., 2014. Risk factors associated with high bulk milk antibody levels to common pathogens in UK dairies. *Veterinary Record*. 174, 580.
- Zastempowska, E., Grajewski, J., Twarużek, M., 2016. Food-borne pathogens and contaminants in raw milk - a review. *Annals of Animal Science*. DOI:10.1515/aoas-2015-0089.
- Ågren, E. C. C., Sternberg Lewerin, S., Wahlström, H., Emanuelson, U., Frössling, J., 2016. Low prevalence of salmonella in Swedish dairy herds highlight differences between serotypes. *Preventive Veterinary Medicine*. doi:10.1016/j.prevetmed.2015.12.015.

1. Spannmål, fröer och nötter -Metaller i livsmedel, fyra decenniers analyser av L Jorhem, C Åstrand, B Sundström, J Engman och B Kollander.
2. Konsumenters förståelse av livsmedelsinformation av J Grausne, C Gössner och H Enghardt Barbieri.
3. Slutrapport för regeringsuppdraget att inrätta ett nationellt kompetenscentrum för måltider i vård, skola och omsorg av E Sundberg, L Forsman, K Lilja, A-K Quetel och I Stevén.
4. Kontroll av bekämpningsmedelsrester i livsmedel 2013 av A Jansson, P Fohgelberg och A Widenfalk.
5. Råd om bra matvanor - risk- och nyttohanteringsrapport av Å Brugård Konde, R Bjerselius, L Haglund, A Jansson, M Pearson, J Sanner Färnstrand och A-K Johansson.
6. Närings- och hälsopåståenden i märkning av livsmedel – en undersökning av efterlevnaden av reglerna av P Bergkvist, A Laser-Reuterswärd, A Göransdotter Nilsson och L Nyholm.
7. Serveras fet fisk från Östersjön på förskolor och skolor, som omfattas av dioxinundantaget av P Elvingsson.
8. The Risk Thermometer – A tool for risk comparison by S Sand, R Bjerselius, L Busk, H Eneroth, J Sanner Färnstrand and R Lindqvist.
9. Revision av Sveriges livsmedelskontroll 2014 - resultat av länsstyrelsernas och Livsmedelsverkets revisioner av kontrollmyndigheter av A Rydin, G Engström och Å Eneroth.
10. Kommuners och Livsmedelsverkets rapportering av livsmedelskontrollen 2014 av L Eskilsson och M Eberhardson.
11. Bra livsmedelsval för barn 2-17 år – baserat på nordiska näringsrekommendationer av H Eneroth och L Björck.
12. Kontroll av rests substanser i levande djur och animaliska livsmedel. Resultat 2014 av I Nordlander, B Aspenström-Fagerlund, A Glynn, A Törnkvist, T Cantillana, K Neil Persson, Livsmedelsverket och K Girma, Jordbruksverket.
13. Biocidanvändning och antibiotikaresistens av J Bylund och J Ottosson.
14. Symtomprofiler – ett verktyg för smittspårning vid magsjukesjukdom av J Bylund, J Toljander och M Simonsson.
15. Samordnade kontrollprojekt 2015. Dricksvatten - distributionsanläggningar av A Tollin.
16. Oorganisk arsenik i ris och risprodukter på den svenska marknaden 2015 - kartläggning, riskvärdering och hantering av B Kollander.
17. Undeclared milk, peanut, hazelnut or egg – guide on how to assess the risk of allergic reaction in the population by Y Sjögren Bolin.
18. Kontroll av främmande ämnen i livsmedel 2012-2013 av P Fohgelberg och S Wretling.
19. Kontroll av bekämpningsmedelsrester i livsmedel 2014 av A Jansson, P Fohgelberg och A Widenfalk.
20. Drycker – analys av näringsämnen av V Öhrvik, J Engman, R Grönholm, A Staffas, H S Strandler och A von Malmborg.
21. Barnens miljöhälsoenkät. Konsumtion av fisk bland barn i Sverige 2011 och förändringar sedan 2003 av A Glynn, Avdelningen för risk- och nyttovärdering, Livsmedelsverket och T Lind, Miljömedicinsk epidemiologi, Institutet för Miljömedicin, Karolinska institutet, Stockholm.
22. Associations between food intake and biomarkers of contaminants in adults by E Ax, E Warensjö Lemming, L Abramsson-Zetterberg, P O Darnerud and N Kotova.

1. Samordnade kontrollprojekt 2015. Polycykliska aromatiska kolväten (PAH) – kontroll av PAH i traditionellt direktrökta livsmedel av S Wretling.
2. Litteraturstudie av miljöpåverkan från ekologiskt och konventionellt producerade livsmedel – fokus på studier utförda med livscykelanalyset av B Landquist, M Nordborg och S Hornborg.
3. Grönsaker, svamp och frukt – analys av näringsämnen av V Öhrvik, J Engman, R Grönholm, A Staffas, H S Strandler och A von Malmberg.
4. Kontrollprojekt – Djurslagsverifiering av köttvaror av U Fäger, M Sandberg och L Lundberg.
5. Evaluation of the Nordic Nutrition Recommendations 2012 – Results from an external evaluation of the Nordic Nutrition Recommendations 2012 project and suggested improvements on the structure and process for a future revision by J Ahlin.
6. Riskprofil – Livsmedel som spridningsväg för antibiotikaresistens av M Egervärn och J Ottoson.
7. How you cook rice influence the arsenic level by L Abramsson-Zetterberg, B Sundström and B Kollander.
8. Endocrine active substances in the food – what is the problem? Hormonstörande ämnen i maten – vad är problemet? Documentation of a workshop organiserad by the National Food Agency, November 2015.
9. Socioekonomiska skillnader i matvanor i Sverige av I Mattisson.
10. Frukt, bär, grönsaker och svamp -Metaller i livsmedel, fyra decenniers analyser av B Sundström och B Kollander.
11. Barns matvanor ur ett sensoriskt och pedagogiskt perspektiv – kunskapsöversikt av H Sepp, K Höijer och K Wendin.
12. Förekomst av sjukdomsframkallande bakterier i opatröriserad mjölk av Catarina Flink och Karin Nyberg.