

Avdödning av shigatoxin- producerande *Escherichia* *coli* vid tillagning av hamburgare

Riskvärderingsrapport



Denna titel kan laddas ner från: www.livsmedelsverket.se/bestall-ladda-ner-material/.

Citera gärna Livsmedelsverkets texter, men glöm inte att uppge källan. Bilder, fotografier och illustrationer är skyddade av upphovsrätten. Det innebär att du måste ha upphovsmannens tillstånd att använda dem.

© Livsmedelsverket, 2019.

Författare:

Karin Nyberg.

Rekommenderad citering:

Livsmedelsverket. Nyberg, K. 2019. L 2019 nr 20: Avdödning av shigatoxin-producerande *Escherichia coli* vid tillagning av hamburgare. Livsmedelsverkets rapportserie. Uppsala.

L 2019 nr 20

ISSN 1104-7089

Omslag: Livsmedelsverket

Förord

Livsmedelsverket arbetar för att skydda konsumenternas intressen genom att arbeta för säker mat och bra dricksvatten, att informationen om maten är pålitlig så ingen blir lurad och för att främja bra matvanor. Livsmedelsverkets leder och samordnar landets livsmedelskontroll samt med att ta fram och förvalta råd till konsumenter och verksamhetsutövare inom området livsmedel och dricksvatten. Verksamheten baseras på vetenskapliga rön enligt riskanalysens principer.

Livsmedelsverkets rapport L 2019 nr 20 är ett vetenskapligt underlag om avdödning av shigatoxin-producerande *Escherichia coli* vid tillagning av hamburgare. Rapporten har tagits fram av Livsmedelsverkets Risk- och nyttovärderingsavdelning efter en intern beställning från Livsmedelsverkets avdelning Säkra livsmedel. Ansvarig för rapportens innehåll är Karin Nyberg. Rapporten har faktagranskats av Roland Lindqvist och Jakob Ottoson.

Livsmedelsverket

Per Bergman

Avdelningschef, Risk- och nyttovärderingsavdelningen

12 2019

Innehåll

Förord.....	3
Sammanfattning.....	7
Summary	8
Inactivation of shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> during cooking of hamburgers.....	8
Bakgrund och frågeställning.....	9
Övergripande frågeställning.....	9
Specifika frågor.....	9
Metod.....	10
Litteraturgenomgång	10
Modellering	10
Faroidentifiering och -karaktärisering.....	12
Exponeringsuppskattning.....	13
Förekomst av STEC i nötkött	13
Halter av STEC i nötfärs	13
Upphettningsmetod att avdöda bakterier, inklusive STEC	14
Försök med tillagning av hamburgare – avdödning av STEC.....	15
Modellering av avdödning av STEC i nötfärs under upphettning och varmhållning.....	16
Jämförelse mellan modellerad och experimentell logreduktion	18
Riskkaraktärisering med svar på frågor.....	20
Hur vanligt förekommande är STEC i nötkött som kan användas till hamburgare?	20
Hur höga halter av STEC har påvisats i nötkött som kan användas till hamburgare?.....	20
Beskriv sambandet mellan slutlig tillagningstemperatur och avdödning av STEC, baserat på försök med tillagning av hamburgare.	20
Kan modellering av avdödning av STEC under en tillagningsprocess ge en realistisk uppskattning av avdödningen?	21
Referenser	22

Sammanfattning

Syftet med detta underlag är att ge ett vetenskapligt stöd till Livsmedelsverkets arbete med att förebygga spridning av STEC (shigatoxin-producerande *Escherichia coli*) via hamburgare som inte är genomstekta. Specifikt syftar underlaget till att besvara frågor om STEC finns i nötfärs och hur STEC kan avdödas vid tillagning av hamburgare. Underlaget har tagits fram genom litteraturstudier och genom egna beräkningar utifrån data från publicerade studier.

De första frågorna som underlaget besvarar är hur vanligt förekommande STEC är i nötfärs som kan användas till hamburgare och hur stora halterna av STEC är. Det finns två svenska studier på förekomst av STEC på nötkött, och dessa är från Livsmedelsverket. I den första studien, om STEC i svenskt helt nötkött, fanns STEC i 2 procent av proven. I den andra, om STEC i importerat helt och malet nötkött, fanns STEC i 13 procent av proven. De svenska resultaten är jämförbara med de resultat som presenterats från övriga Europa och USA. När det gäller halter av STEC på nötkött eller i nötfärs finns det begränsat med data. Detta beror troligtvis på att halterna är så pass låga att de sällan går att kvantifiera.

Underlaget svarar också på frågor om sambandet mellan slutlig tillagningstemperatur och avdödning av STEC. Vi presenterar resultat från flertalet publicerade studier. Sammanfattningsvis råder sambandet att ju högre slutgiltig tillagningstemperatur, desto större avdödning av STEC. Enligt en publicerad regressionsanalys ger tillagning till 65 °C en förväntad avdödning på cirka 3,9 logenheter, 68 °C en förväntad avdödning på cirka 4,5 logenheter och tillagning till 70 °C en förväntad avdödning på 5 logenheter. Vid tillagningen är det viktigt att tillämpa en process som säkerställer önskad sluttemperatur i hela hamburgaren. Varmhållning av hamburgare vid sluttemperaturen bidrar till fortsatt avdödning av STEC.

Slutligen tar underlaget upp frågan om modellering kan ge en realistisk uppskattning av avdödningen av STEC under en tillagningsprocess. Den modell som använts i detta underlag gav en beräknad avdödning som var högre vid temperaturer över ca 66 °C. I det lägre temperaturintervallet och jämfört med vad som rapporterats från experimentella studier var avdödningen lägre. Varje modell innebär en förenkling av verkligheten. En fördel med att använda modellering är möjligheten att undersöka hur avdödning påverkas av olika parametrar, såsom D- och z-värden, upphettningshastighet och biologisk variation. Värdena på de ingående parametrarna kan hämtas från flera olika experimentella studier och användas för att ge en bild av avdödningen under olika betingelser. Det går lätt att variera tillagningstid och D- och z-värden för att på så sätt simulera skillnader i tillagning och värmetolerans hos STEC. Därmed kan modellering vara ett användbart verktyg för att jämföra olika tillagningsprocesser och teoretiskt bedöma effekten av dessa.

Summary

Inactivation of shiga toxin-producing *Escherichia coli* during cooking of hamburgers

The aim of this report is to provide scientific evidence for the National Food Agency's work to reduce the risk of disease from STEC (shiga toxin-producing *Escherichia coli*) in under-cooked hamburgers. Specifically, the report aims to answer questions about the presence of STEC in minced beef and the inactivation of STEC when cooking hamburgers. The report is based on a literature study as well as calculations based on published data.

The report answers questions on how common STEC is in minced beef that can be used for hamburgers and what levels of STEC have been detected. There are two Swedish studies on the presence of STEC in beef, both done at the National Food Agency. In the first, which was on the presence of STEC in Swedish whole beef, STEC was detected in 2 percent of the samples. In the other, which studied the presence of STEC in imported whole and minced beef, STEC was detected in 13 percent of the samples. The Swedish results fall within the range of results presented from Europe and the USA. Data is very limited regarding levels of STEC on beef or in minced beef. This is probably because the levels are so low that they are rarely quantifiable.

In addition, the report describes the relationship between final cooking temperature and inactivation of STEC. Results from published experimental data are presented. According to a published regression analysis, cooking to a final temperature of 65 °C gives an expected inactivation of approximately 3.9 log units, 68 °C gives approximately 4.5 log units and 70 °C gives approximately 5.0 log units. From a practical and safety perspective, it is important to have a process that ensures that the desired temperature is achieved throughout the burger. Also, holding at the final temperature contributes to safety through the continued inactivation of pathogenic bacteria.

Finally, the report addresses if modelling of STEC inactivation during a cooking process can provide a realistic estimate of the inactivation. The model used in this report yielded an estimated inactivation that was lower in the lower temperature range and higher at temperatures above about 66°C compared to what has been reported in experimental studies. Each model simplifies reality. The advantage of using modelling is the possibility to investigate how inactivation is affected by various parameters, such as D and z values, heating rate, biological variation etc. The values of the included parameters can be obtained from several different experimental studies and can be used to provide an estimate of possible inactivation under different conditions. It is easy to vary cooking time and input D and z values in order to simulate differences in cooking and heat tolerance of STEC. Thus, modelling can be a useful tool for theoretically assessing the effect of, and comparing, different cooking processes.

N.B. The title of the publication is translated from Swedish, however no full version of the publication has been produced in English.

Bakgrund och frågeställning

Det har blivit vanligare att restauranger serverar hamburgare som inte är genomstekta, vilket kan innebära en hälsorisk för konsumenten (Andersson et al., 2019). Den främsta faran som kopplas ihop med icke-genomstekt nötkött är shigatoxin-producerande *Escherichia coli* (STEC). De krav som kommunala kontrollmyndigheter ställer på restauranger som tillagar och serverar hamburgare är beroende av om hamburgarna genomstekts eller inte. För att få servera icke-genomstekta hamburgare krävs att restaurangen kan visa att de har hygieniska rutiner och HACCP-förfaranden som minskar risken för konsumenten. För de som kontrollerar en verksamhet blir det då viktigt med kunskap om, bland annat, vilka tid-och temperaturkombinationer som behövs för att en hamburgare ska anses vara tillräckligt genomstekt.

Syftet med detta underlag är att ge vetenskapligt underlag till Livsmedelsverkets arbete med stöd till kommunala kontrollmyndigheter avseende kontrollen av restauranger för att minska risken för sjukdom av STEC via icke-genomstekta hamburgare. Specifikt syftar underlaget till att besvara frågor om förekomst av STEC i nötfärs och avdödning av STEC vid tillagning av hamburgare. Underlaget har tagits fram genom litteraturstudier och genom egna beräkningar utifrån data från publicerade studier.

Övergripande frågeställning

Hur höga halter av STEC kan förekomma i råvara till hamburgare och hur stor är avdödningen vid tillagning?

Specifika frågor

1. Hur vanligt förekommande är STEC i köttråvara (i första hand nötkött) som kan användas till hamburgare?
2. Hur höga halter av STEC har påvisats i köttråvara som kan användas till hamburgare?
3. Beskriv sambandet mellan slutlig tillagningstemperatur och avdödning av STEC, baserat på försök med tillagning av hamburgare.
4. Kan modellering av avdödning av STEC under en tillagningsprocess ge en realistisk uppskattning av avdödningen?

Metod

Litteraturgenomgång

Den vetenskapliga litteratur som använts i detta vetenskapliga underlag har eftersökts i databasen Pubmed (Tabell 1). Sökningarna genomfördes 2019-04-05. Utifrån de träffar som genererades med söksträngarna har relevanta artiklar valts utifrån abstract. I vissa fall användes vetenskapliga artiklar som hittats genom referenslistor i den insamlade litteraturen.

Tabell 1. Databas, söksträng och antal träffar som ligger till grund för detta underlag.

Databas	Söksträng	Antal träffar	Utvalda artiklar
Pubmed	(shiga toxin OR vero toxin OR O157) AND (beef OR hamburger) AND (presence OR prevalence)	664	14
Pubmed	(shiga toxin OR vero toxin OR O157) AND (beef OR meat OR hamburger) AND inactivation	142	5
Pubmed	(shiga toxin OR vero toxin OR O157) AND (ground beef OR hamburger) AND enumeration	19	2

Modellering

För detta underlag har en modell för att beräkna avdödning under upphettning använts. Modellen har implementerats i programvaran R (R Core Team, 2013) och programmet R Studio har använts som gränssnitt (RStudio Team, 2016).

Som input till modellen behövs D-värden, z-värden och temperatur (T) utifrån temperaturkurvor som beskriver kärntemperaturen i hamburgaren vid tillagning. D-värden för varje temperatur beräknas utifrån ett D-värde (D_T) vid en referenstemperatur (T_{ref}) enligt Ekvation 1. Avdödning har endast beräknats från temperaturer över 45 °C.

Ekvation 1:
$$\log D_T = \log D_{ref} + \frac{T_{ref} - T}{z}$$

D-värdet kombineras med en linjär inaktiveringsmodell som efter lite omflyttningar blir som i Ekvation 2. Där N är antalet bakterier vid en viss tid (t).

Ekvation 2:
$$\log N_t = \log N_0 - \frac{1}{D_{ref} * 10^{\frac{T_{ref} - T}{z}}}$$

Ovanstående ekvationer differentieras för att kunna beräkna avdödningsgraden vid upphettning (icke-isoterma förhållanden), alltså med varierande temperaturkurvor. Se Ekvation 3.

Ekvation 3:

$$\frac{d \log N_t}{dt} = -\frac{1}{D} = -\frac{1}{D_{ref} \cdot 10^{\frac{T_{ref}-T}{z}}}$$

För att ta hänsyn till olika kombinationer av tid och temperatur samt för att validera modellen mot experimentell data har elva temperaturkurvor från Boqvist et al. (2015) används som input i modellen. Dels har en temperaturkurva tagits fram som är ett medelvärde av alla olika delförsök. Denna kurva går från 13-72 °C på 13 minuter. Dels har tio enskilda temperaturkurvor använts som representerar enskilda delförsök. Dessa kurvor varierar i sluttemperatur och tid från 10-57 °C på 3 minuter till 10-71 °C på 11 minuter.

För medeltemperaturkurvan kördes modellen med två D- och z-värde kombinationer som valts ut från litteraturen (Tabell 2) för att representera STEC med olika värmeterans. För att simulera en värmekänslig STEC (snabb inaktivering) användes $D_{60}=1,1$ och $z=5,4$, enligt Brar et al. (2018) och Luchanski et al. (2013). För en mer värmeterant STEC (långsam inaktivering) användes $D_{60}=1,7$ och $z=7,6$, enligt Huang & Juneja (2003). För de tio enskilda temperaturkurvorna har endast en D- och z-värde kombinationer använts i modellen, $D_{60}=1,1$ och $z=5,4$.

Faroidentifiering och -karaktärisering

Vissa stammar av *Escherichia coli* producerar shigatoxin och benämns därför som shigatoxin-producerande *E. coli* (STEC). Tidigare dominerade serotypen O157:H7 bland påvisade serotyper isolerade från sjuka personer både i Sverige och i andra länder, men under senare år har en mängd andra serotyper också isolerats från patienter.

Infektion med STEC kan ge allvarliga symptom, framförallt hos känsliga individer som barn och äldre. I sjukdomsbilden ingår allt ifrån lindrig gastroenterit till blodiga diarréer samt mer allvarliga komplikationer såsom sönderfall av röda blodkroppar, njursvikt (hemolytiskt uremiskt syndrom, HUS) samt neurologiska symptom (thrombotic thrombocytopenic purpura, TTP) (FDA, 2012; Mead & Griffin, 1998). STEC har visats kunna orsaka sjukdom redan vid mycket låg dos (<100 bakterier), vilket betyder att den inte behöver växa i livsmedlet för att kunna orsaka sjukdom (FDA, 2012).

För att kunna bedöma risken vid fynd av STEC i livsmedel undersöks förekomsten av olika virulensgener. Shigatoxin kan förekomma i två huvudgrupper Stx1 och Stx2 som kodas av generna *stx1* respektive *stx2*. Dessa kan vidare delas in i undergrupper som t.ex. Stx2a (EFSA, 2013). Intimin, som kodas av genen *eae*, är ett protein som är viktig för bakteriens vidhäftning och kolonisering i tarmen. STEC som bildar toxinet Stx2 och vidhäftningsproteinet intimin (*eae*) är mer förknippade med allvarlig sjukdom hos människa än STEC som bildar Stx1 (EFSA, 2013). I Sverige förekommer en sub-typ av STEC O157:H7 som kallas klad 8 som har orsakat flera utbrott i Sverige och är associerad med allvarlig sjukdom hos människa (Anonym, 2014). STEC klad 8 bär nästan alltid på genen *stx2a* eller generna *stx2a* och *stx2c* tillsammans.

STEC är vanligt förekommande bland nötkreatursbesättningar men infekterade djur uppvisar inga sjukdomssymptom (Anonym, 2014). Detta medför att nötkött ofta kopplas samman med STEC-infektion hos människa (Mughini-Gras et al., 2018). Enligt data som rapporterats till Europeiska Livsmedelssäkerhetsmyndigheten (EFSA) orsakade nötkött fyra av de nio livsmedelsburna utbrott som skett i Europa under 2017 där smittkällan kunnat bekräftas (EFSA, 2018). I Sverige har nötkött (färs) bekräftats som källa till ett utbrott av STEC O157:H7, med 26 fall, som pågick mellan september 2016 till februari 2017 (Folkhälsomyndigheten, 2017).

Exponeringsuppskattning

Förekomst av STEC i nötkött

I en undersökning av förekomst av STEC i svenskt helt nötkött, utförd av Livsmedelsverket under 2016, påvisades STEC i 2 % (6 av 300) av proven (Flink, 2016). Totalt påvisades sex isolat tillhörande fem serotyper (O171:H2, O22:H16, O116:H48, O185:H28, O91:H14), varav inget hade kombinationen av virulensgener (*stx2* och *eae*) som är kopplad till ökad risk för allvarlig sjukdom.

I ytterligare en av Livsmedelsverket utförd kartläggning av förekomsten av STEC i importerat och infört helt och malet nötkött påvisades STEC i 13 % av proven (23 av 177 prov), varav 3,4 % hade kombinationen av *stx2* och *eae* (Egervärn & Flink, 2014). Denna kartläggning visade att malt nötkött hade en högre andel STEC än helt kött (20 respektive 11 %).

En italiensk kartläggning av kött från butik påvisades STEC i 3,8 % (9 av 239) av proven, varav inget isolat hade kombinationen *stx2* och *eae* (Varcasia et al., 2018). En slakteriprevalensstudie från Irland påvisade STEC från 0,7 % (O157), 0,5 (O26), 2-6 % (O103) och 0 % (O111 och O145) av totalt 402 slaktkroppar (Thomas et al., 2012). En tidigare studie från Irland på drygt 1500 prov av malet kött eller prefabricerade råa hamburgare påvisade STEC O157 i 2,8 % av proven (Cagney et al., 2004).

En artikel som sammanfattat publicerade data av förekomst av STEC från djur till köttprodukt mellan år 1993-2008 visar på en rapporterad förekomst på 0-16,8 % i råa nötköttsprodukter (Rhoades et al., 2009). De flesta granskade studier var på STEC O157. En senare granskning, med artiklar fram till år 2015, har visat en rapporterad förekomst av STEC (främst O157) i råa nötköttsprodukter på mellan 0-52,2 % (Brashears & Chaves, 2017). Resultaten för endast malt nötkött och med studier från Asien och Sydamerika exkluderade visar på en förekomst mellan 0-16,8 %, vilket är samma som redovisats i studien av Rhoades et al (2009). Förekomsten på 16,8 % är från en studie från USA på nötfärs i butik som bygger på PCR-förekomst av *stx*-gener (Samadpour et al., 2002).

Halter av STEC i nötfärs

Det finns inte mycket data om halter av STEC på nötkött eller i nötfärs. En anledning till bristen i haltdata är att STEC ofta förekommer i mycket låga nivåer vilket gör det svårt att kvantifiera utan ett föregående anrikningssteg (FAO & WHO, 2011). Studien från Irland 2002 där STEC O157 påvisades i 45 av 1500 prov (2,8 %) visade att halterna i dessa varierade från under kvantifierbar nivå (22 prov) upp till som mest 10^4 CFU/g (Cagney et al., 2004). I fyra av dessa prov översteg halterna 10^3 CFU/g. I den senare studien från Irland påvisades ingen STEC högre än detektionsgränsen på 1 CFU/cm² (Thomas et al., 2012).

Tabell 2. Ett urval av publicerade D- och z-värden för STEC i malet nötkött med olika fetthalt i temperaturintervallet 55-68 °C.

Stam	Fett (%)	Temp (°C)	D _t (min)	± SD	z-värde (°C)	Referens
O157:H7	7	55	23,64	1,98	-	(Luchansky et al., 2013)
O157:H7	10	55	21,13	0,25	4,9-6,0 (9,25**)	(Juneja et al., 1997a)
O157:H7	30	55	32,58	3,32	-	(Luchansky et al., 2013)
Ej-O157*	5	55	15,93	0,44	5,2	(Brar et al., 2018)
Ej-O157*	10	55	13,87	0,40	5,3	(Brar et al., 2018)
Ej-O157*	15	55	12,75	0,17	5,6	(Brar et al., 2018)
Ej-O157*	20	55	12,40	0,74	5,6	(Brar et al., 2018)
Ej-O157*	25	55	12,66	0,35	5,5	(Brar et al., 2018)
Ej-O157*	30	55	11,69	0,91	5,3	(Brar et al., 2018)
O157:H7	7	60	1,14	0,02	-	(Luchansky et al., 2013)
O157:H7	10	60	3,17	0,18	4,9-6,0 (9,25**)	(Juneja et al., 1997a)
O157:H7	30	60	1,08	0,13	-	(Luchansky et al., 2013)
O157:H7	7	60	1,71	0,01	7,6	(Huang & Juneja, 2003)
Ej-O157*	5	60	1,15	0,04	5,2	(Brar et al., 2018)
Ej-O157*	10	60	1,16	0,14	5,3	(Brar et al., 2018)
Ej-O157*	15	60	1,10	0,08	5,6	(Brar et al., 2018)
Ej-O157*	20	60	1,10	0,13	5,6	(Brar et al., 2018)
Ej-O157*	15	60	0,91	0,05	5,5	(Brar et al., 2018)
Ej-O157*	30	60	1,12	0,10	5,3	(Brar et al., 2018)
O157:H7	7	62,5	0,93	0,01	7,6	(Huang & Juneja, 2003)
O157:H7	4,8	63	0,16	0,02	3,8	(Smith et al., 2001)
O157:H7	19,1	63	0,18	0,01	3,6	(Smith et al., 2001)
O157:H7	10	65	0,39	0,00	4,9-6,0 (9,25**)	(Juneja et al., 1997a)
O157:H7	7	65	0,75	0,01	7,6	(Huang & Juneja, 2003)
Ej-O157*	5	65	0,14	0,01	5,2	(Brar et al., 2018)
Ej-O157*	10	65	0,14	0,01	5,3	(Brar et al., 2018)
Ej-O157*	15	65	0,12	0,01	5,6	(Brar et al., 2018)
Ej-O157*	20	65	0,11	0,01	5,6	(Brar et al., 2018)
Ej-O157*	15	65	0,10	0,02	5,5	(Brar et al., 2018)
Ej-O157*	30	65	0,09	0,01	5,3	(Brar et al., 2018)
O157:H7	7	65,6	0,06	0,00	-	(Luchansky et al., 2013)
O157:H7	30	65,6	0,20	0,02	-	(Luchansky et al., 2013)
Ej-O157*	5	68	0,05	0,01	5,2	(Brar et al., 2018)
Ej-O157*	10	68	0,05	0,01	5,3	(Brar et al., 2018)
Ej-O157*	15	68	0,06	0,01	5,6	(Brar et al., 2018)
Ej-O157*	20	68	0,07	0,01	5,6	(Brar et al., 2018)
Ej-O157*	15	68	0,06	0,02	5,5	(Brar et al., 2018)
Ej-O157*	30	68	0,05	0,01	5,3	(Brar et al., 2018)

* O26:H11, O45:H2, O103:H2, O111:H8, O121:H9, O145:non-motile

** En sub-population av STEC O157 visade på lägre avdödning

Upphetning som metod att avdöda bakterier, inklusive STEC

Värmebehandling är en effektiv metod för att avdöda sjukdomsframkallande mikroorganismer i livsmedel (Aryani et al., 2015). Ett sätt att beskriva avdödningseffekten vid en viss temperatur, t, är att redovisa D-värden (eller D_t-värden). D-värdet motsvarar den tid som krävs för att minska antalet

överlevande celler 10 gånger, d v s en logenhet ($1 \log_{10}$), vid en bestämd temperatur. Ett D-värde beräknas från lutningen av en regressionskurva där logaritmerat antal överlevande organismer plottas mot tid. Konceptet bygger på antagandet att minskningen av logaritmen av antalet celler per tidsenhet vid en given temperatur är linjär och konstant. Detta är dock en förenkling eftersom observerade inaktiveringskurvor ofta har avvikelser, särskilt i början (shoulders) eller slutet (tails) av försöken. Ytterligare en parameter som används för att beskriva avdödning av bakterier är z-värden. Ett z-värde är en angivelse av hur många graders temperaturhöjning det krävs för att åstadkomma en logenhets förändring av D-värdet. Ju högre z-värde desto mer värmetålig är organismen eftersom det krävs en högre temperatur för att förändra D-värdet med en faktor tio. I Tabell 2 syns publicerade D- och z-värden för STEC i mald nötfärs i temperaturintervallet 55-68 °C.

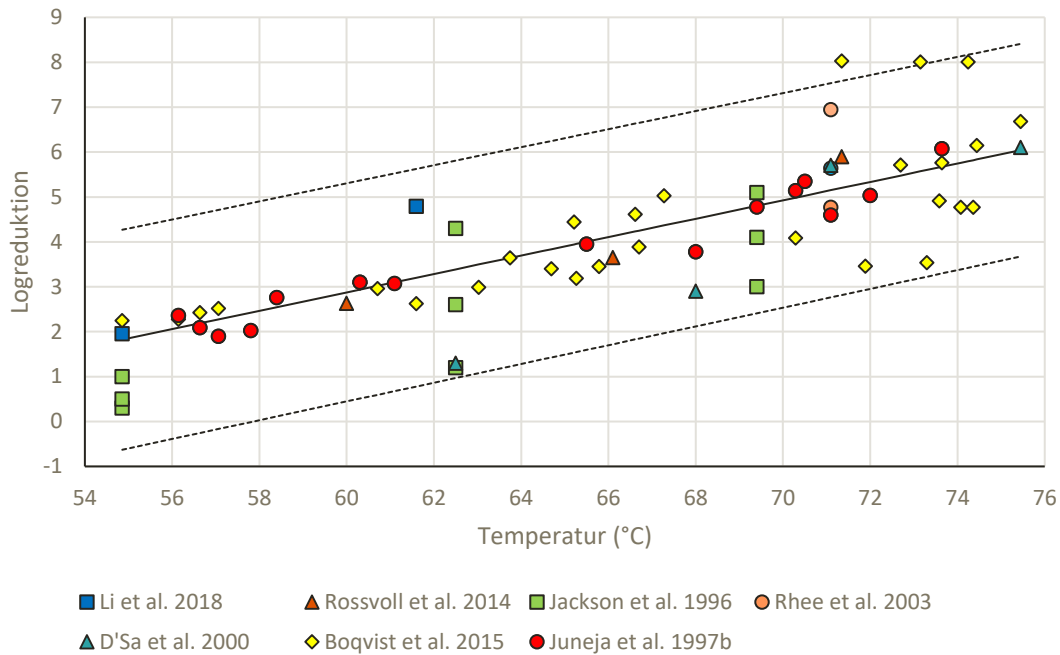
Det kan vara svårt att jämföra D-värden från olika studier. Dels eftersom de flesta studier endast testat enstaka stammar, ett fåtal påverkansparametrar och använt olika experimentella metoder, och dels för att faktorer såsom bakteriens tillväxtfas ofta inte anges. Det är känt att olika bakterier, liksom stammar och isolat av samma bakterie, har olika förmåga att motstå höga temperaturer (Aryani et al., 2015; van Asselt & Zwietering, 2006). Skillnaden i motståndskraft har bland annat förklarats genom hur väl organismen kan upprätthålla en låg vattenhalt i området runt sitt DNA (Adams & Moss, 2008). Det finns ytterligare andra faktorer som visats påverka värmetåligheten hos bakterier, såsom vilken tillväxtfas organismen befinner sig i (Aryani et al., 2015; Gaze et al., 1989) och typ och sammansättning av livsmedel (Aryani et al., 2015; Barrile & Cone, 1970; van Asselt & Zwietering, 2006).

Flera studier har visat att ökad fetthalt i nötfärs ger STEC ett skydd mot värme och förlänger tiden för avdödning (Ahmed et al., 1995; Luchansky et al., 2013; Smith et al., 2001). I studien av Brar et al. (2018) påvisades dock ingen effekt av fetthalt vid 60-68 °C.

Försök med tillagning av hamburgare – avdödning av STEC

Boqvist et al. (2015) har beskrivit sambandet mellan slutlig temperatur i hamburgaren och avdödning i en regressionsekvation (Figur 1: svart linje). Ekvationen följer i stort samma lutning och intercept som tidigare visats av Juneja et al. (1997). Figur 1 visar även att resultat från andra studier som analyserat avdödning av STEC O157:H7 i nötfärsbiffar/hamburgare och korrelerat den till en temperatur mätt i mitten av hamburgaren till stor del faller inom det 95-procents prediktionsintervall som beskrivs av Boqvist et al. (2015).

Utifrån Boqvists regressionsekvation ger tillagning till 65 °C en förväntad avdödning på cirka 3,9 logenheter, 68 °C en förväntad avdödning på cirka 4,5 logenheter och tillagning till 70 °C på motsvarande sätt en förväntad avdödning på 5 logenheter. Prediktionsintervallet ger en spridning på förväntad avdödning på mellan 1,5-6,3 logenheter vid 65 °C, 2,2-7,0 logenheter vid 68 °C och 2,5-7,3 logenheter vid 70 °C.



Figur 1. Logreduktion av STEC O157:H7 i nötfärsbiffar/hamburgare vid angivna sluttemperaturer från publicerade vetenskapliga studier. Svart heldragen linje visar regressionsekvation från Boqvist et al. (2015) och streckade linjer visar övre och undre 95-procents prediktionsintervall.

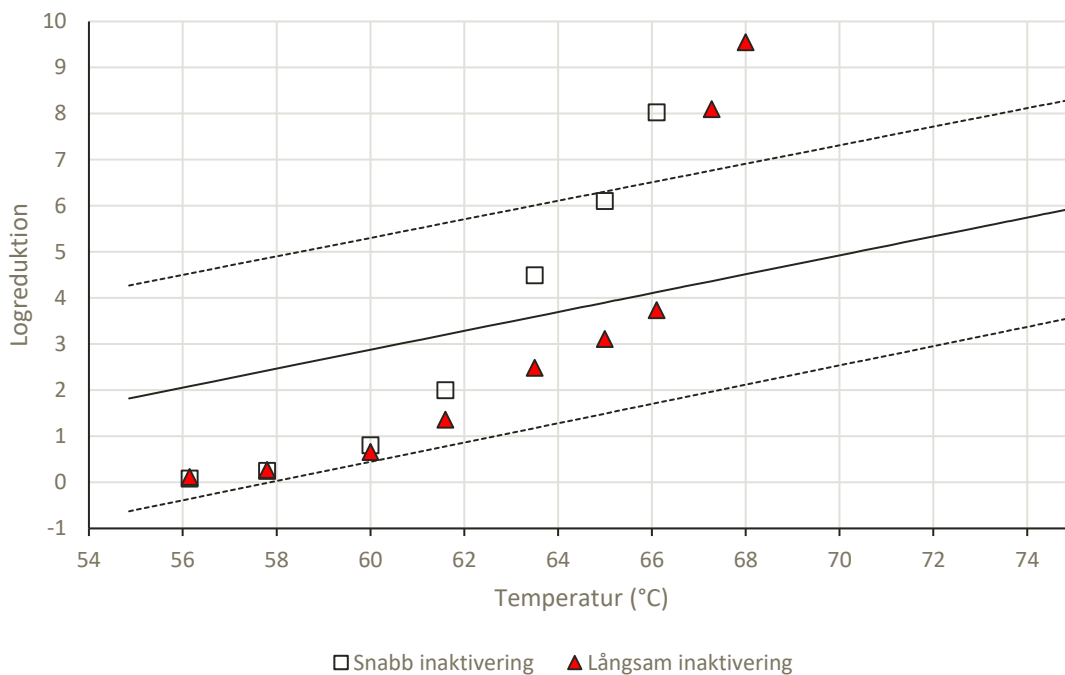
Flera av de studier som visas i Figur 1 har rapporterat en stor spridning i avdödningsresultat (Boqvist et al., 2015; Røssvoll et al., 2014). En förklaring till spridning av resultat inom en studie kan vara att värmedistributionen i hamburgaren är ojämnt fördelad och att det är svårt att hitta och mäta temperaturen i den svalaste delen i mitten av hamburgaren (Røssvoll et al., 2014). I försöket av Boqvist et al. (2015) uppmättes som exempel en temperaturvariation mellan mitten och kanten av en hamburgare på 5 °C (medel) med ett intervall på 1,5 °C (min) och 11,2 °C (max).

Spridningen mellan olika studier kan förklaras av skillnader i försöksupplägg. Tiden till uppnådd sluttemperatur (tillagningstiden) i de publicerade studierna har varierat mellan 4-12 minuter. Skillnaderna beror på bland annat tjockleken på hamburgaren som har varierat från 1 cm (Boqvist et al., 2015), 1,5 cm (Jackson et al., 1996; Juneja et al., 1997b; Lahou et al., 2015; Røssvoll et al., 2014), 2 cm (Li et al., 2018) och 2,5 cm (Shen et al., 2011). Dessutom har olika typer av grill- eller stekutrustning (enkelsidig eller dubbelsidig), olika värmeinställning på utrustningen samt antal vändningar under tillagning varierat. Vissa studier har inkluderat en viloperiod (mellan 0-3 minuter) mellan uppnådd sluttemperatur och analys av STEC, vilket påverkar resultaten eftersom avdödning av STEC fortsätter även efter att hamburgaren tagits från värmen (Li et al., 2018).

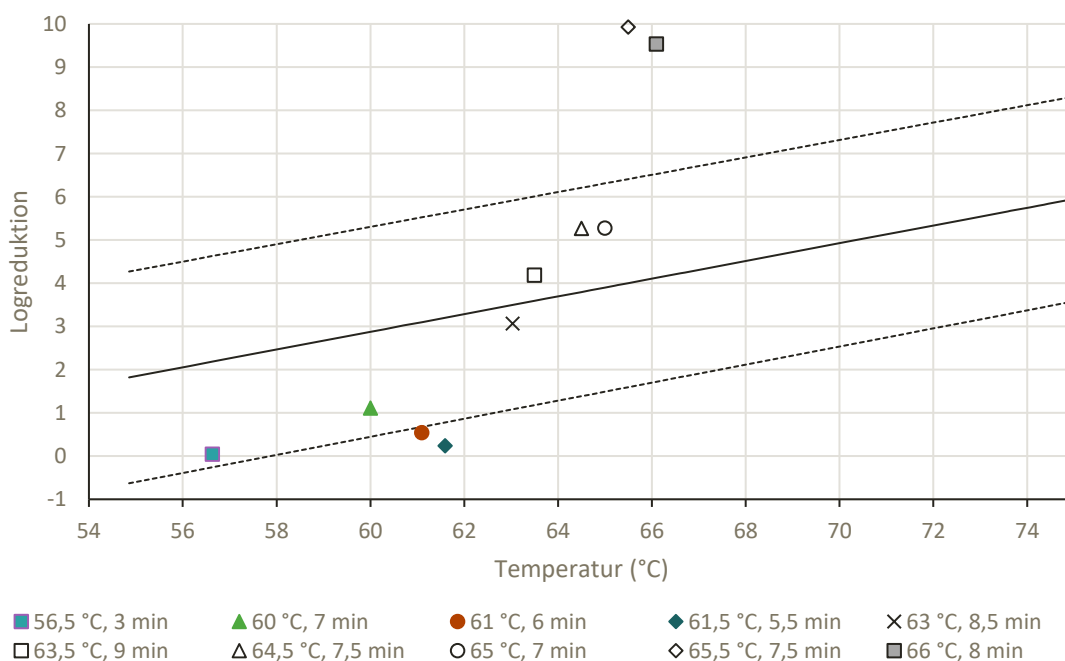
Modellering av avdödning av STEC i nötfärs under upphettning och varmhållning

Beräknad logreduktion vid olika temperaturer utifrån medeltemperaturkurvan från Boqvist et al. (2015) visas i Figur 2. Resultaten visar att logreduktionen skiljer sig beroende på vilken D- och z-värde kombination som använts i modellen. Denna skillnad utmärker sig först vid högre temperaturer

och blir tydligare ju högre temperatur som testas. Modellen visar på att en inaktivering på mer än 8 log förväntas ske när temperaturen passerat 66-67 °C.



Figur 2. Beräknad logreduktion av STEC (\log_{10} CFU/g) efter upphettning till olika temperaturer utifrån en medeltemperaturkurva från experimentella försök av Boqvist et al. (2015). Logreduktionen visas i två olika scenarier för hur känslig STEC är för värme: Snabb inaktivering ($D_{60}=1,1$ & z-värde=5,4) samt långsam inaktivering ($D_{60}=1,7$ & z-värde=7,6). Svart heldragen linje visar regressionslikvation och streckade linjer visar övre och undre 95-procents prediktionsintervall från Boqvist et al. (2015).

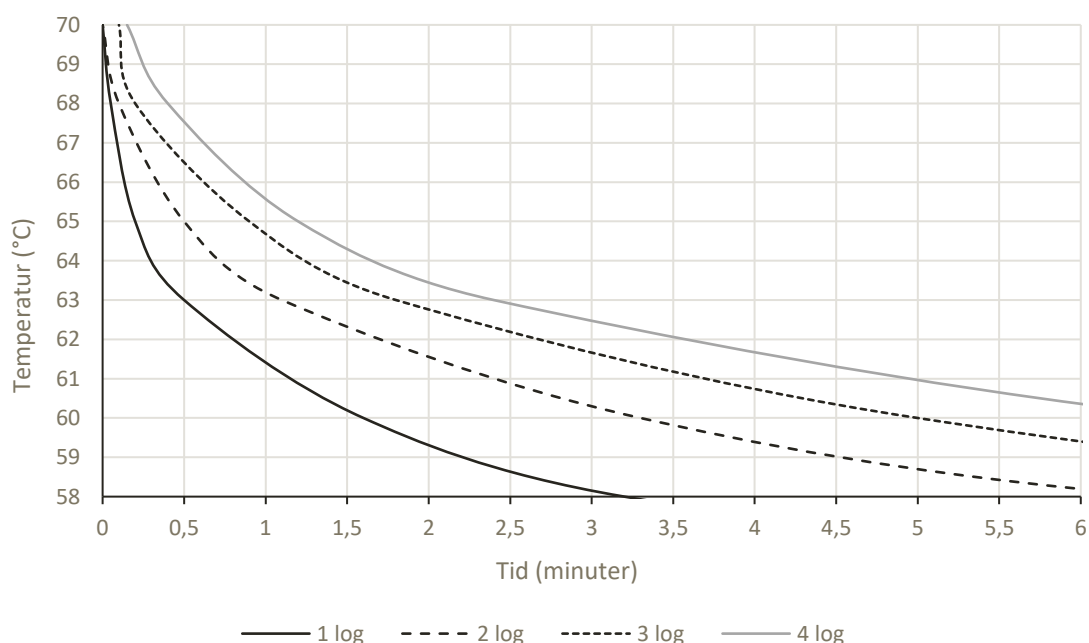


Figur 3. Beräknad logreduktion av STEC (\log_{10} CFU/g) efter upphettning till tio olika sluttemperaturer som valts utifrån experimentella försök av Boqvist et al. (2015). Logreduktionen visas i ett scenario: Snabb inaktivering

($D_{60}=1,1$ & z -värde=5,4). Svart heldragen linje visar regressionsekvation från och streckade linjer visar övre och undre 95-procents prediktionsintervall från Boqvist et al. (2015).

Figur 3 visar den inaktivering som erhålls från modellen vid uppnådd sluttemperatur efter tio olika temperaturkurvor från Boqvist et al. (2015). Samma generella mönster visar sig som i Figur 2, men det blir tydligare att tiden för upphettning och upphettningsskurvans utseende också är en faktor vid inaktivering.

För att illustrera effekten av varmhållning efter tillagning har ett exempel på tid att uppnå 1-, 2-, 3- och 4- logenheters avdödning vid konstant temperatur plottats i Figur 4. Detta är den avdödning som sker efter att önskad sluttemperatur har uppnåtts, och inkluderar därmed inte den avdödning som sker under upphettningstiden. Figur 4 illustrerar avdödningen vid den högre D- och z-värde kombinationen ($D_{60} = 1,7$ och $z = 7,6$), för lägre D- och z-värde sker snabbare avdödning.



Figur 4. Diagram som visar 1-, 2-, 3- och 4-logenheters avdödning och sambandet mellan varmhållningstid och temperatur som behövs för att uppnå avdödningen. Diagrammet är baserat på beräknade värden vid referenstemperatur 60 °C med D-värde = 1,7 och z-värde = 7,6.

Jämförelse mellan modellerad och experimentell logreduktion

Till skillnad mot det till synes linjära samband mellan logreduktion och sluttemperatur som visats i experimentella studier (Figur 1) visar resultaten från modelleringen ett samband med mer exponentiellt utseende (Figur 2 och 3).

Den beräknade logreduktionen ligger, för de flesta punkterna, inom prediktionsintervallet för temperaturer upp till ca 65 °C (Figur 2 och 3). Vid temperaturer upp till ca 60 °C ligger den beräknade logreduktionen nära eller strax under det lägre 95-procents prediktionsintervallet. Att logreduktionen är lägre än vad som visats experimentellt kan förklaras av att modellen beräknar avdödning med

antagandet att hela hamburgaren har samma temperatur som kärnan. I praktiken skapas en temperaturgradient vid stekning av hamburgare som medför att avdödning påbörjas tidigare i hamburgarens yttre delar. Vid stekning blir temperaturen på ytan snabbt mycket hög samtidigt som kärntemperaturen är fortfarande är låg (Shen et al., 2011). Således blir beräknad avdödning i början av upphettningen en underskattning av den avdödningen som faktiskt sker, då modellen exkluderar den avdödning som sker på ytan och i det yttre lagret av hamburgaren.

Vid temperaturer från ca 66 °C är den beräknade logreduktionen högre än vad som redovisats från experimentella studier. Det skulle kunna tolkas som att modellen överskattar den faktiska avdödningen vid höga temperaturer. Dock råder viss osäkerhet kring hur väl rapporterade experimentella resultat, både vad gäller uppnådd temperatur och kvantifierad avdödning, och därmed också presenterad regressionsekvation, speglar verkligheten vid de högre temperaturerna. Som nämnts ovan var den genomsnittliga temperaturskillnaden i en hamburgare 5,2 °C enligt Boqvist et al. (2015), och den maximala temperaturskillnaden var 11 °C. Det betyder att temperaturer som anges i Figur 1 är de genomsnittliga, medan några delar av hamburgaren kan ha klart lägre temperatur där bakterier kan överleva. Vid de högre temperaturerna ligger dessutom rapporterad avdödning från experimentella studier ofta nära vad som är maximalt möjligt utifrån rapporterad spikningsnivå, vilket innebär osäkerhet i kvantifieringen. I flera av studierna saknas en angivelse för vilken detektions/kvantifieringsgräns som den använda analysmetoden har och endast enstaka studier har rapporterat hur de hanterat negativa provsvar i beräkningarna. Li et al. (2018) rapporterar inget resultat vid 71,1 °C eftersom resultaten vid denna temperatur inte kunde kvantifieras (Figur). Boqvist et al. (2015) rapporterar att resultat som föll under detektionsgränsen sattes till ett schablonvärde på 10 bakterier (1 log), vilket ger den logreduktion på 8 log som syns i Figur 1. Den faktiska reduktionen var alltså större än 8 logenheter. Det är inte orimligt att tänka att fler studier hanterat negativa resultat på liknande sätt. Garre et al. (2019) har visat att den svans av överlevande bakterier som ofta redovisas i avdödningsstudier troligtvis är en artefakt av kvantifieringsmetoden. Detta sammantaget kan vara tecken på att rapporterad avdödning vid högre temperaturer är en underskattning av den faktiska avdödningen.

Riskkaraktärisering med svar på frågor

Hur vanligt förekommande är STEC i nötkött som kan användas till hamburgare?

Det finns endast två svenska studier på förekomst av STEC på nötkött, och det är studier utförda vid Livsmedelsverket. Den första studien är på förekomst av STEC i svenskt helt nötkött, utförd av Livsmedelsverket under 2016, som påvisade STEC i 2 % av proven. Ingen av dessa STEC hade kombinationen av virulensgener (*stx2* och *eae*) som är kopplad till ökad risk för mer allvarlig sjukdom. I den andra studierades förekomst av STEC i importerat och infört helt och malet nötkött. I denna studie påvisades STEC i 13 % av proven (23 av 177 prov) varav 3,4 % hade kombinationen av *stx2* och *eae*. De svenska resultaten faller inom det intervall av resultat som presenterats från Europa och USA.

Hur höga halter av STEC har påvisats i nötkött som kan användas till hamburgare?

Det finns mycket begränsad data om halter av STEC på nötkött eller i nötfärs, troligtvis eftersom halterna är så pass låga att de sällan går att kvantifiera. Den enda studie som har hittats där haltdata rapporterats är studien på malet kött eller prefabricerade råa hamburgare från Irland där STEC O157 påvisades i 2,8 % (45 av 1500 prov). Halterna i dessa varierade från under kvantifierbar nivå upp till som mest 10^4 CFU/g. I fyra av dessa prov översteg halterna 10^3 CFU/g.

Beskriv sambandet mellan slutlig tillagningstemperatur och avdödning av STEC, baserat på försök med tillagning av hamburgare.

Sambandet mellan slutlig tillagningstemperatur och avdödning av STEC som visats i olika tillagningsförsök sammanfattas i Figur 1. Sammanfattningsvis råder sambandet att ju högre slutgiltig tillagningstemperatur desto större avdödning av STEC.

Enligt regressionsekvationen som presenterats av Boqvist et al. (2015) ger tillagning till 65 °C en förväntad avdödning på cirka 3,9 logenheter, 68 °C en förväntad avdödning på cirka 4,5 logenheter och tillagning till 70 °C en förväntad avdödning på 5 logenheter. Prediktionsintervallet som de flesta publicerade studiers resultat faller inom ger en spridning på förväntad avdödning på mellan 1,5-6,3 logenheter vid 65 °C, 2,2-7,0 logenheter vid 68 °C och 2,5-7,3 logenheter vid 70 °C.

Det råder dock viss osäkerhet råder kring hur väl rapporterade experimentella resultat, och därmed också presenterad regressionsekvation, speglar verkligheten vid de högre temperaturerna. Vid de högre temperaturerna ligger rapporterad avdödning ofta nära vad som maximalt är möjligt utifrån rapporterad spikningsnivå. I flera av studierna saknas dessutom en angivelse för vilken

detektions/kvantifieringsgräns som använd kvantifieringsmetod har och endast enstaka studier har rapporterat hur de hanterat negativa provsvar i beräkningarna. Boqvist et al. (2015) rapporterar att resultat som föll under detektionsgränsen sattes till ett schablonvärde på 10 bakterier (1 log). Således ger detta den logreduktion på 8 log som syns i Figur 1, även om den faktiska reduktionen är större men okänd. Det är alltså möjligt att det angivna sambandet underskattar avdödningen vid de höga temperaturerna. Ytterligare en förklaring till högre överlevnad i experimenten kan vara att det finns områden i hamburgarna med lägre temperaturer än de angivna sluttemperaturerna. En variation på i genomsnitt 5 °C och som mest 11 °C visades i Boqvist et al. (2015) mellan temperaturen i mitten av hamburgaren och på olika platser från mitten, vilket innebär en överlevnad hos bakterierna större än förväntat av den angivna sluttemperaturen.

Ur ett praktiskt och säkerhetsmässigt perspektiv kan sägas att det vid tillagning är viktigt att ha en process som säkerställer att önskade temperatur uppnås i hela hamburgaren. Även varmhållning vid sluttemperaturen kan bidra till säkerheten genom fortsatt avdödning av patogena bakterier.

Kan modellering av avdödning av STEC under en tillagningsprocess ge en realistisk uppskattning av avdödningen?

Upp till en temperatur på ca 65 °C ger modelleringen som använts i detta underlag en beräknad avdödning som, i de flesta punkter, hamnar inom det 95-procentiga prediktionsintervallet som rapporterats för den linjära regressionsekvationen framtagen i Boqvist et al. (2015). Den beräknade avdödningen upp till 65 °C skiljer sig alltså inte i detta intervall från den som rapporterats i experimentella vetenskapliga studier på tillagning av hamburgare. Modellerad avdödning följer dock inte det linjära samband mellan logreduktion och temperatur som publicerade studier visat. Detta visar sig genom att beräknad avdödning blir lägre än vad som rapporterats från experimentella studier i det lägre temperaturintervallet och mycket högre vid temperaturer över ca 66 °C (Figur 2 och 3).

Fördelen med att använda modellering är möjligheten att undersöka hur avdödning påverkas av olika parametrar, såsom D- och z-värden, upphettningshastighet, biologisk variation etc. Värdena på de ingående parametrarna, kan hämtas från flera olika experimentella studier och kan användas för att ge en bild av möjlig avdödning under olika betingelser. Det går lätt att variera tillagningstid och ingående D- och z-värden för att på så sätt simulera skillnader i tillagning och värmetolerans hos STEC. Därmed kan modellering vara ett användbart verktyg för att exempelvis bedöma effekten av, och jämföra, olika tillagningsprocesser.

Varje modell innebär en förenkling av verkligheten och processer som inte ingår i modellen, t ex effekten av avdödning vid stekytan på hamburgaren, kommer därför inte inkluderas i det beräknade resultatet. Det är därför nödvändigt att så långt möjligt validera resultaten mot verkliga försök, till exempel genom att jämföra med experimentella studier som har gjorts i detta underlag. En sådan validering kan också ge insikter och hypoteser om avdödningsprocessen. Till exempel varför modellen visar en högre logreduktion än vad experimentella studier visar vid högre temperaturer. Finns det värmetåligena subpopulationer, skyddande komponenter i köttet, är det som ser ut som överlevande bakterier egentligen en artefakt av kvantifieringsmetoden, eller är det en konsekvens av att det finns områden i hamburgaren med lägre temperatur än den angivna sluttemperaturen?

Referenser

- Adams, MR, & Moss, MO. (2008). Food microbiology. Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Ahmed, Nahed M., Conner, Donald E., & Huffman, Dale L. (1995). Heat-resistance of Escherichia coli O157:H7 in meat and poultry as affected by product composition. Journal of Food Science, 60, 606-610. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1995.tb09838.x>
- Andersson, Ulrika, Flink, Catarina, Johansson, Anders, Lindblad, Mats, & Selin, Daniel (2019). Blodiga burgare – kontroll av malet kött till icke genomstekta hamburgare. Livsmedelsverkets rapportserie: L2019:01.
- Anonym. (2014). Infektion med EHEC/VTEC – ett nationellt strategidokument. Socialstyrelsen, 2014-12-17. Nås på: <https://www.folkhalsomyndigheten.se/contentassets/08e034fcb26145debc5d4c0a5a1a1a9d/infektion-med-ehectec-ett-nationellt-strategidokument-2014-12-17.pdf>
- Aryani, D. C., den Besten, H. M. W., Hazeleger, W. C., & Zweitering, M.H. (2015). Quantifying variability on thermal resistance of Listeria monocytogenes. International Journal of Food Microbiology, 193, 130-138. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.10.021>
- Barrile, Judith C., & Cone, J. Frank. (1970). Effect of added moisture on the heat resistance of Salmonella anatum in milk chocolate. Applied Microbiology, 19, 177-178.
- Boqvist, S, Fernström, L-L, Alsanius, B, & Lindqvist, R. (2015). Escherichia coli O157:H7 reduction in hamburgers with regard to premature browning of minced beef, colour score and method for determining doneness. International Journal of Food Microbiology, 215, 109-116. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.08.023>
- Brar, JS, Waddell, JN, Bailey, M, Corkran, S, Velasquez, C, Juneja, Vijay K., & Singh, M. (2018). Thermal inactivation of Shiga toxin-producing Escherichia coli in ground beef with varying fat content. Journal of Food Protection, 81, 986-992. doi: <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-455>
- Brashears, MM, & Chaves, BD. (2017). The diversity of beef safety: A global reason to strengthen our current systems. Meat Science, 132, 59-71. doi: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.03.015>
- Cagney, C., Crowley, H., Duffy, G., Sheridan, J. J., O'Brien, S., Carney, E., Anderson, W., McDowell, D. A., Blair, I. S., & Bishop, R. H. (2004). Prevalence and numbers of Escherichia coli O157:H7 in minced beef and beef burgers from butcher shops and supermarkets in the Republic of Ireland. Food Microbiology, 21, 203-212. doi: [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(03\)00052-2](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(03)00052-2)
- EFSA. (2013). Scientific opinion on VTEC-seropathotype and scientific criteria regarding pathogenicity assessment. EFSA Journal, 11, 3138. doi: <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3138>
- EFSA. (2018). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. EFSA Journal, 16, 5500. doi: <https://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5500>
- Egervärn, M, & Flink, C. (2014). Kartläggning av shigatoxinproducerande E. coli (STEC) på nötkött och bladgrönsaker. Livsmedelsverket Rapport 22.
- FAO, & WHO. (2011). Enterohaemorrhagic Escherichia coli in raw beef and beef products: approaches for the provision of scientific advice: meeting report. . Microbiological Risk Assessment Series 18, 126 pp.
- FDA. (2012). Bad bug book, foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins, 2nd ed.

Flink, C. (2016). Förekomst av shigatoxinproducerande *Escherichia coli* (STEC) i svenskt nötkött. Livsmedelsverket.

Folkhälsomyndigheten. (2017). <https://www.folkhalsomyndigheten.se/smittskydd-beredskap/utbrott/utbrotsarkiv/ehec-o157-sverige-september-november-2016/>.

Garre, Alberto, Egea, Jose A., Esnoz, Arturo, Palop, Alfredo, & Fernandez, Pablo S. (2019). Tail or artefact? Illustration of the impact that uncertainty of the serial dilution and cell enumeration methods has on microbial inactivation. *Food Research International*, 119, 76-83. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.059>

Gaze, J. E., Brown, G. D., Gaskell, D. E., & Banks, J. G. (1989). Heat resistance of *Listeria monocytogenes* in homogenates of chicken, beef steak and carrot. *Food Microbiology*, 6, 251-259. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0740-0020\(89\)80006-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0740-0020(89)80006-1)

Huang, Lihan, & Juneja, Vijay K. (2003). Thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef supplemented with sodium lactate. *Journal of Food Protection*, 66, 664-667. doi: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-66.4.664>

Jackson, TC, Jardin, MD, & Acuff, GR. (1996). Heat resistance of *E.coli* O157:H7 in nutrient medium and in ground beef patties as influenced by storage and holding temperatures. *Journal of Food Protection*, 59, 230-237. doi: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-59.3.230>

Juneja, Vijay K., Snyder, OP, & Marmer, BS. (1997a). Thermal destruction of *Escherichia coli* O157:H7 in beef and chicken: determination of D- and z-values. *International Journal of Food Microbiology*, 35, 231-237. doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(96\)01237-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(96)01237-8)

Juneja, Vijay K., Snyder, OP, Williams, AC, & Marmer, BS. (1997b). Thermal destruction of *Escherichia coli* O157:H7 in hamburger. *Journal of Food Protection*, 60, 1163-1166. doi: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-60.10.1163>

Lahou, Evy, Wang, Xiang, De Boeck, Elien, Verguldt, Elien, Geeraerd, Annemie, Devlieghere, Frank, & Uyttendaele, M. (2015). Effectiveness of inactivation of foodborne pathogens during simulated home pan frying of steak, hamburger or meat strips. *International Journal of Food Microbiology*, 206, 118-129. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.014>

Li, K, McKeith, AG, Shen, C, & McKeith, R. (2018). A comparison study of quality attributes of ground beef and veal patties and thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 after double pan-broiling under dynamic conditions. *Foods*, 7. doi: <https://doi.org/10.3390/foods7010001>

Luchansky, J. B., Porto-Fett, A. C. S., Shoyer, B. A., Phillips, J., Eblen, D., Evans, P., & Bauer, N. (2013). Thermal inactivation of a single strain each of serotype O26:H11, O45:H2, O103:H2, O104:H4, O111:H:8211;, O121:H19, O145:NM, and O157:H7 cells of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in wafers of ground beef. *Journal of Food Protection*, 76, 1434-1437. doi: <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-429>

Mead, Paul S., & Griffin, Patricia M. (1998). *Escherichia coli* O157:H7. *The Lancet*, 352, 1207-1212. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)01267-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(98)01267-7)

Mughini-Gras, L., van Pelt, W., van der Voort, M., Heck, M., Friesema, I., & Franz, E. (2018). Attribution of human infections with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) to livestock sources and identification of source-specific risk factors, The Netherlands (2010–2014). *Zoonoses and Public Health*, 65, e8-e22. doi: <https://doi.org/10.1111/zph.12403>

R Core Team. (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>

Rhoades, J. R., Duffy, G., & Koutsoumanis, K. (2009). Prevalence and concentration of verocytotoxigenic *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in the beef production chain: A review. *Food Microbiology*, 26, 357-376. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.10.012>

RStudio Team. (2016). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA URL <http://www.rstudio.com>

Røssvoll, Elin, Sørheim, Oddvin, Heir, Even, Møretrø, Trond, Olsen, Nina Veflen, & Langsrud, Solveig. (2014). Consumer preferences, internal color and reduction of shigatoxigenic *Escherichia coli* in cooked hamburgers. *Meat Science*, 96, 695-703. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.09.009>

Samadpour, M, Kubler, M, Buck, FC, DePavia, GA, Mazengia, E, Stewart, J, Yang, P, & Alfi, D. (2002). Prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef and cattle feces from King County, Washington. *Journal of Food Protection*, 65, 1322-1325. doi: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.8.1322>

Shen, C, Geornaras, I, Belk, KE, Smith, GC, & Sofos, JN. (2011). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in moisture-enhanced nonintact beef by pan-broiling or roasting with various cooking appliances set at different temperatures. *Journal of Food Science*, 76, M64-71. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01882.x>

Smith, SE, Maurera, JL, Orta-Ramirez, A, Ryser, ET, & Smith, DM. (2001). Thermal inactivation of *Salmonella* spp., *Salmonella typhimurium* DT104, and *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. *Journal of Food Science*, 66, 1164-1168. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb16099.x>

Thomas, KM, McCann, MS, Collery, MM, Logan, A, Whyte, P, McDowell, DA, & Duffy, G. (2012). Tracking verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157, O26, O111, O103 and O145 in Irish cattle. *International Journal of Food Microbiology*, 15, 288-296. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.012>

van Asselt, Esther D., & Zwietering, Marcel H. (2006). A systematic approach to determine global thermal inactivation parameters for various food pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 107, 73-82. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.08.014>

Varcasia, BM, Tomassetti, F, De Santis, L, Di Giamberardino, F, Lovari, S, Bilei, S, & De Santis, P. (2018). Presence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in fresh beef marketed in 13 regions of Italy (2017) *Microorganisms*, 6, 126. doi: <https://doi.org/10.3390/microorganisms6040126>

