



Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för landskapsplanering,  
trädgårds- och jordbruksvetenskap

## ***Salmonella* och verotoxinproducerande *E. coli* i färdigsallader**

***Salmonella* and verotoxin producing *E. coli* in ready-made salads**

***Joakim Sjöstrand***

Självständigt arbete 15 hp

Hortonomprogramet

Självständigt arbete vid LTJ-fakulteten, SLU

Alnarp 2012

# ***Salmonella* och verotoxinproducerande *E. coli* i färdigsallader**

*Salmonella* and verotoxin producing *E. coli* in ready-made salads

*Joakim Sjöstrand*

**Handledare:** Professor Beatrix Waechter Alsanius, SLU, Hortikultur

**Examinator:** Docent Malin Hultberg, SLU, Hortikultur

**Omfattning:** 15 hp

**Nivå och fördjupning:** Grundnivå, G2E

**Kurstitel:** Kandidatarbete i biologi

**Kurskod:** EX0493

**Program/utbildning:** Hortonomprogrammet

**Ämne:** Biologi

**Utgivningsort:** Alnarp

**Utgivningsår:** 2012

**Serietitel:** Självständigt arbete vid LTJ-fakulteten, SLU

**Elektronisk publicering:** <http://stud.epsilon.slu.se>

**Nyckelord:** *E. coli*, *Salmonella*, Verotoxin, Shigatoxin, Shiga-like toxin, EHEC, Färdigsallad, Ready-to eat salads



Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för landskapsplanering,  
trädgårds- och jordbruksvetenskap

## Förord

Jag vill börja med att tacka min handledare Beatrix Alsanius för hennes stöd och vägledning vilket gav mig översikt över vad jag hade kvar att göra och hur mycket tid jag hade på mig att göra det. Jag vill även nämna min syster Sandra som hjälpte mig trots att jag väckte dig med frågor om logaritmer när du skulle ha sovmorgon (förlåt). Sedan vill jag även tacka alla som har hjälpt mig med ord och formuleringar när vi träffats i biblioteket.

Malmö, Maj 2012

Joakim Sjöstrand

## Sammanfattning

Färdigsallader är en produktgrupp som blir allt mer populär. Dessvärre har det på senare år förekommit ett antal utbrott där människor har smittats av tarmbakterier som *Salmonella* och verotoxinproducerande *Escherichia coli* i olika ouppvärmade produkter som till exempel böngroddar från Tyskland.

I denna litteraturstudie undersöks vilka patotyper av *E. coli* och *Salmonella* som kan infektera människor och hur detta kan gå till. Det ges förslag för att minska smittspridningen. Särskilt fokus ges *E. coli*-patotyper som tillverkar verotoxiner eftersom dessa ger allvarliga symptom hos människor. De vanligaste verotoxinproducerande *E. coli*- och *Salmonella*-serovaryarna som finns på sallader identifieras också.

Slutsatserna är att hygien under hela produktionskedjan är av största vikt men att det är efter skörd som den största spridningen sker. Riskfaktorer som tillsats av animaliska produkter, och förslag på hur dessa risker kan minimeras, diskuteras.

## Abstract

Ready-to-eat salads are an increasingly popular commodity. It displays a convenient way to prepare a meal. However, in recent years there have been a number of disease outbreaks caused by enteric bacteria such as *Salmonella* spp. and *E. coli*. One example is the recent outbreak of *E. coli* O104:H4, which was caused by contaminated sprouts.

The aim of this thesis was to find out which pathotypes of *Salmonella* and *E. coli*, which are the most dangerous and also to try to find ways to deal with them to decrease their numbers. The main focus will be on verotoxin-producing *E. coli* as they can cause potentially life threatening symptoms apart from the other pathotypes which usually cause less severe symptoms.

The conclusions are that the most important measure to take is to make sure that a high level of hygiene is maintained throughout the postharvest chain. It is here the main transmission of bacteria between, for example, field grown leafy vegetables may occur.

<b>Innehållsförteckning</b>	<b>Sida</b>
1. Inledning	7
1.1. Bakgrund	7
1.2. Syfte	7
1.3. Hypoteser	7
1.4. Bakteriecellens morfologi	8
1.5. <i>Salmonella</i>	9
1.5.1. <i>Salmonella</i> Nomenklatur	9
1.5.2. De vanligaste salmonella-serovaren i USA 2006 och 2007	9
1.6. <i>Escherichia coli</i>	10
1.6.1 <i>Escherichia coli</i> Nomenklatur	10
1.7. <i>E. coli</i> :s olika diarréframkallande patotyper	11
1.7.1. EPEC	11
1.7.2. ETEC	11
1.7.3. EAEC	12
1.7.4. EIEC	13
1.7.5. DAEC	13
1.7.6. EHEC och VTEC	13
1.8. Tysklandsutbrottet, orsakat av <i>E. coli</i> O104:H4	14
1.9. Virulensfaktorer hos <i>E. coli</i>	15
1.9.1. Adhesiner och koloniseringsfaktorer	15
1.9.2. Toxiner och effekter	16
1.9.3. Shigatoxinerna och deras nomenklatur	16
1.10. Smittvägar	17
1.11. Smittkedjan	18
1.11.1. <i>Salmonella</i> -serovarer och deras vanligaste spridningsvägar	18
1.11.2. Vanliga spridningsvägar för VTEC	19
1.11.3. <i>E. coli</i> :s vidhäftning på salladsbladet	19
1.11.4. Vanliga <i>Salmonella</i> -serovarer och VTEC på sallad	19

2. Material och metoder	21
3. Resultat	21
3.1. Riskfaktorer innan och efter skörd	21
3.2. Odlingsåtgärder och hygien	23
3.3. Animaliska produkter i sallad	25
3.4. Metoder för att minska antalet bakterier utan kemikalier	26
4. Diskussion	28
5. Referenser	31

# 1. Inledning

## 1.1. Bakgrund

Det blir allt vanligare att man köper en färdig sallad till lunch och utbudet har ökat markant de senaste åren. De senaste åren har även haft ett antal skandaler där folk har blivit sjuka av olika produkter som t.ex. groddar. Därför är det viktigt att utreda vilka bakterier som finns i salladerna. Man måste också undersöka om det finns en skillnad i sallader som innehåller kött för att utveckla strategier som är anpassade till dessa förhållanden. Med färdigsallader avses alla färdigskurna sallader, både sådana som endast består av skurna blad, men även sådana som även innehåller dressing eller kött.

## 1.2. Syfte

Genom att identifiera de viktigaste humanpatogena patotyperna av *Salmonella* och *E. coli* kan metoder för att minska smittspridning i framtiden utvecklas.

## 1.3. Hypoteser

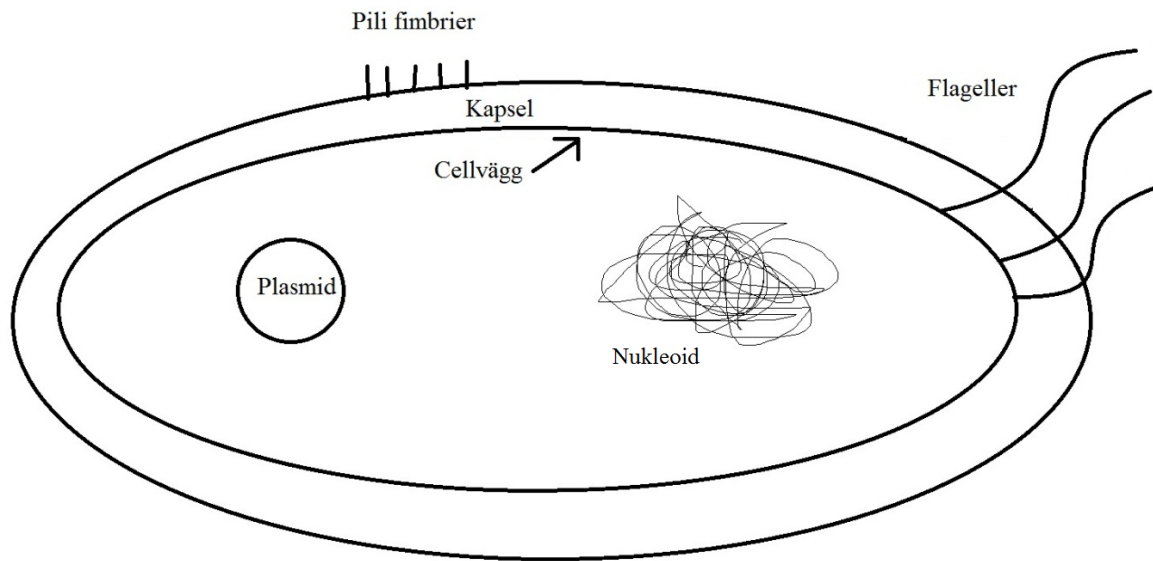
Hypotes 1: Huvuddelen av bakterierna kommer till produkten vid odling eller skörd.

Hypotes 2: Med hjälp av bättre hygien eller ändrade odlingsåtgärder kan risken för tarmsmittor minskas.

Hypotes 3: I sallader vari det förekommer kött eller andra animaliska produkter, förväntas fler och farligare bakterier.

Hypotes 4: Det bör finnas ett sätt, utan kemikalier, att förhindra tillväxt av bakterier i sallader.

## 1.4. Bakteriecens morfologi



*Figur 1.* Bilden visar en typisk bakteriecell. Observera att organellerna ej är skalenliga. Efter Hogg (2005).

Flagellerna, som sitter utanför cellväggen, används av bakterien för förflyttning (Hogg, 2005). Ofta är flagellerna längre än cellen själv (Hogg, 2005). Pili påminner om flageller på så sätt att de också har ett hårligt utseende men de är betydligt kortare än flagellerna (Hogg, 2005). När pili kan användas som en patogenitetsfaktor för att fästa vid en värd vävnad kallas de ibland fimbrier (Hogg, 2005). Pili är för korta och är dessutom inte fästa i cellväggen till skillnad från flagellerna och därför kan pili ej användas för rörelse (Hogg, 2005).

I nukleoiden finns de viktigaste av bakteriens gener (Hogg, 2005) men hos vissa bakterier finns dessutom plasmider som innehåller andra gener (Hogg, 2005). Generna i plasmiden kan vara gener som styr produktion av toxiner eller antibiotikaresistens det vill säga virulensgener (Hogg, 2005).



Bakterier har generellt en tjock och rigid cellvägg vilken behövs eftersom bakterierna oftast lever i en miljö som har en lägre andel lösta ämnen än deras omgivning (Hogg, 2005). Om bakterierna inte hade haft sina cellväggar hade vatten strömmat in i bakterierna och de hade spruckit (Hogg, 2005). Utanför cellväggen finns ett slemlager (Hogg, 2005). När slemlagret är väldefinierat och tjockt kallas det för kapsel (Hogg, 2005). Kapseln är en viktig del för skydd mot fagocyter och vid bildandet av biofilm (Hogg, 2005).

## **1.5. *Salmonella***

### **1.5.1. *Salmonella* Nomenklatur**

Det finns två arter av *Salmonella*, *Salmonella enterica* och *Salmonella bongori* (CIDRAP, 2012), med över 2500 serovarer av *Salmonella* (Agbaje et al., 2011). Serovarer är varianter av en bakterieart där bakterierna skiljer sig från varandra till exempel genom att ha olika flagellproteiner (Brenner et al., 2000). *Salmonella enterica* delas upp i sex stycken underarter kallade I, II IIIa, IIIb, IV och VI (CIDRAP, 2012). Underarterna har dessutom namn där underart I även kallas *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, underart II kallas *S. enterica* subsp. *salamae*, IIIa kallas *S. enterica* subsp. *arizonae*, IIIb kallas *S. enterica* subsp. *diarizonae*, sort IV kallas *S. enterica* subsp. *houtenae* och till sist underart VI som kallas *S. enterica* subsp. *indica*. Tidigare ansågs *Salmonella bongori* att vara en underart till *S. enterica* och då kallades den subspecies V (Brenner et al., 2000). Nyupptäckta serovarer, av arten *S. enterica* och subsp *enterica*, namnges oftast efter platsen där de först isolerades, medan de serotyper av de andra underarterna eller den andra arten *S. bongori* namnges efter antigener (Brenner et al., 2000). Det är oftast *Salmonella enterica* som orsakar sjukdom hos människor och oftast är det underarten I som är ansvarig, enligt vissa forskare upp till i 99 % av fallen (Brenner et al., 2000).

### **1.5.2. De vanligaste *Salmonella*-serovarererna i USA 2006 och 2007**

En undersökning av CDC visade att sju serotyper av *Salmonella* stod för 61,6% av fallen av *Salmonella* år 2007 (CDC, 2008). Det var serotyperna Enteritidis (16,9%), Typhimurium (16,0%), Newport (10,4); I 4 [5],12:i- (5,7%), Javiana (5,5%), Heidelberg (3,9%) och Montevideo (3,4%). Även året innan var det samma 7 serovarer som stod för majoriteten av antalet salmonellafall, detta år 60 %, men de hade en annan spridningsprocent (CDC, 2007).

## 1.6. *Escherichia coli*

### 1.6.1 *Escherichia coli* Nomenklatur

*Escherichia coli* är en bakterieart som förekommer naturligt i tarmsystemet hos människor där den i de flesta fall fungerar utan att skada människan.

Diarréframkallande *E. coli* delas upp i sex stycken patotyper beroende på sättet de orsakar diarrén på (CIDRAP, 2006). Dessa kallas enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), diffusely adherent *E. coli* (DAEC) och till sist enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) (CIDRAP, 2006).

I detta arbete kommer fokus att ligga på de enterohemorrhagiska *E. coli* som bildar en viss typ av toxiner som kallas verotoxiner. Det finns olika benämningar på EHEC, framförallt utomlands används benämningarna verotoxinproducerande *E. coli* (VTEC) eller shigatoxinproducerande *E. coli* (STEC) (Smittskyddsinstitutet, 2011a).

Olika serovarer av *E. coli* kan skiljas från varandra genom somatiska antigener (O), flagellantigener, (H), och till mindre del kapselantigener (K) (Orskov et al., 1977). En antigen är en speciell struktur eller ett speciellt protein som immunförsvaret kan utveckla en antikropp mot. Med somatiska antigener (O) menas antigener relaterade till bakteriens yta, det vill säga vilken sorts antigener som finns i bakteriens lipopolisackrid-yta (DebRoy et al., 2011). Dessa används av tradition tillsammans med antigenerna för flagellerna (H) för att skilja olika serovarer av *E. coli* från varandra (DebRoy et al., 2011). Det fanns tankar på att använda kapselantigener (K) för att skilja serovarena åt (Orskov et al., 1977) men dessa planer användes aldrig eftersom få laboratorier hade möjlighet att testa efter K-antigenerna när tekniken utvecklades (DebRoy et al., 2011).

O-antigenen är en yt-antigen som finns hos alla smooth (S forms) av *Enterobacteriaceae* (Orskov et al., 1977). Det är en termotabil antigen vilket innebär att den behåller sina funktioner immunogen och agglutininbindande förmåga även om den kokas (Orskov et al., 1977). O-antigenen är den O-specifika polysackariden av cellväggens lipopolysackarid (Orskov et al., 1977). Hos *E. coli* har mer än 174 olika O-antigener upptäckts (CIDRAP, 2006). Några vanliga serotyper vid utbrott av EHEC är O104, O157 och O111 (CIDRAP, 2006).

K-antigenen är formen på (eller typen av) bakteriens kapsel. Kapseln bildar ett polysackaridlager som kan vara antingen ett ganska löst slemlager eller en mer fast kapsel (Hogg, 2005). Detta lager kan ha en mängd olika funktioner. Exempel på funktioner är skydd mot torka (Hogg, 2005), att fästa vid olika ytor (Hogg, 2005) eller hjälp till att bilda biofilm (Hogg, 2005). Slemmet eller kapseln kan även fungera som skydd mot fagocytcellerna i immunförsvaret (Hogg, 2005).

H-antigenen är bakteriens flagell. Flageller används av bakterien för rörelse (Hogg, 2005). Genom en energikrävande process får bakterierna de långa hårlika proteintrådarna flagellin att röra sig och kan på så sätt röra sig själv (Hogg, 2005). En bakterie kan ha en eller flera flageller beroende på art sort eller serovar (Hogg, 2005). Det finns 53 beskrivna H-antigener (CIDRAP, 2006).

Kapsel-, flagell- och ytantigenerna kan kombineras på olika sätt men det är inte alla kombinationer som infekterar människor (CIDRAP, 2006). Olika kombinationer är dessutom olika virulenta.

## **1.7. *E. coli*:s olika diarréframkallande patotyper**

### **1.7.1. EPEC (Enteropatogenic *E. coli*)**

EPEC delar flera virulensfaktorer med EHEC men saknar förmågan att syntetisera shigatoxiner och orsakar därför inte HUS (Hemorrhagiskt uremiskt syndrom) eller blodig diarré (Nguyen et al., 2006). EPEC skiljer dock sig från andra patotyper av *E. coli* i det att de ofta bär på plasmider som underlättar adherens (Bieber et al., 1998), det vill säga en plasmid som har gener som skapar pili som hjälper bakterien att fästa vid en yta och bidrar till virulensen hos bakterien (Bieber et al., 1998). De har dessutom gener som signalerar till ett enzym i värden att bryta ner cellskelettet (Frankel et al., 1998).

### **1.7.2. ETEC (Enterotoxigenic *E. coli*)**

De enterotoxiska *E. coli* (ETEC) orsakar diarré främst hos barn och turister i utvecklingsländer (Nataro och Kaper, 1998). Symptomen kan vara allt från milda till mycket kraftiga (Kaper et al., 2004). Symptomen uppstår eftersom bakterierna utsöndrar enterotoxiner av vilka det finns två grupper, värmelabila (LT) och värmestabila (ST) (Kaper et al., 2004). Bakteriestammar kan ha förmågan att producera bara LT, bara ST, eller båda typerna av enterotoxiner (Kaper et al., 2004).

LT1, som är den vanligaste av de värmekänsliga enterotoxinerna hos människa, fungerar så att det genom ett antal steg gör så att kloridkanalerna till tarmen öppnas permanent (Sears och Kaper, 1996, Field et al., 1972). LT hindrar absorption av NaCl och ökar sekretion av kloridjoner vilket innebär att en osmotisk potential uppstår som driver vatten in i tarmen (Nataro och Kaper, 1998). Detta leder i sin tur till diarré.

ST toxinerna, som är peptidtoxiner, är mindre än LT-toxinerna (Kaper et al., 2004). ST-toxinerna är uppdelade i två klasser, STa och STb, men det är bara STa som har påvisats skapa symptom hos människor (Nataro och Kaper, 1998).

Bakterierna verkar så att de koloniserar ytan i tunntarmen med hjälp av antingen fimbrier eller fibriller (Kaper et al., 2004). Det finns tre olika sorters koloniseringsfaktorer, CFA (colonization factor antigen), CS (coli surface antigen) och PCF (putative colonization factor) vilka i sin tur också har undergrupper (Kaper et al., 2004). Detta innebär att det finns över tjugo stycken olika koloniseringsfaktor (Kaper et al., 2004).

### **1.7.3. EAEC (Enteraggative *E. coli*)**

Vanliga symptom vid EAEC-smitta är diarré som aldrig verkar vilja gå över (Kaper et al., 2004). EAEC smittar barn såväl som vuxna finns både i utvecklingsländer och i industrialiserade länder (Kaper et al., 2004).

Bakterien klistrar sig fast vid en speciell sorts tarmceller kallade Hep-2 i ett mönster som kallas autoaggregativt mönster, liknande en murad vägg (Nataro och Kaper, 1998). Med hjälp av aggregative adherence fimbriae (AFA), varav det finns två varianter, koloniserar bakterierna mucosan (Czeczulin et al., 1997). Det finns fyra olika AAFs (Kaper et al., 2004) men bakterierna har inte alla dessa och vissa EAEC har inga alls utan använder sig av ett protein som heter dispersin (Sheikh et al., 2002) som bildar en yta runt en växande koloni av EAEC (Sheikh et al., 2002).

Flera toxiner har beskrivits hos EAEC, både enterotoxiner och cytotoxiner (Kaper et al., 2004). Två av enterotoxinerna är Shigella enterotoxin 1 (ShET1)(Kaper et al., 2004) och enteroaggregativ *E. coli* ST (EAST1) där den senare är en homolog till ETEC:s Sta-toxin (Savarino et al., 1993). Det finns dock aldrig några ST eller LT hos EAEC (Kaper et al., 2004).

#### **1.7.4. EIEC (Enteroinvasive *E. coli*)**

EIEC är den enda av patotyperna som går in i cellerna där den reproducerar sig (Kaper et al., 2004). EIEC bildar också ett speciellt enzym som lyserar serin kallat SepA (Kaper et al., 2004). Detta enzym finns inte i de andra patotyperna (Kaper et al., 2004). Dessutom finns ett speciellt system för att tillgodogöra sig järn kallat aerobactin iron acquisition system (Kaper et al., 2004).

#### **1.7.5. DAEC (Diffusely adherent *E. coli*)**

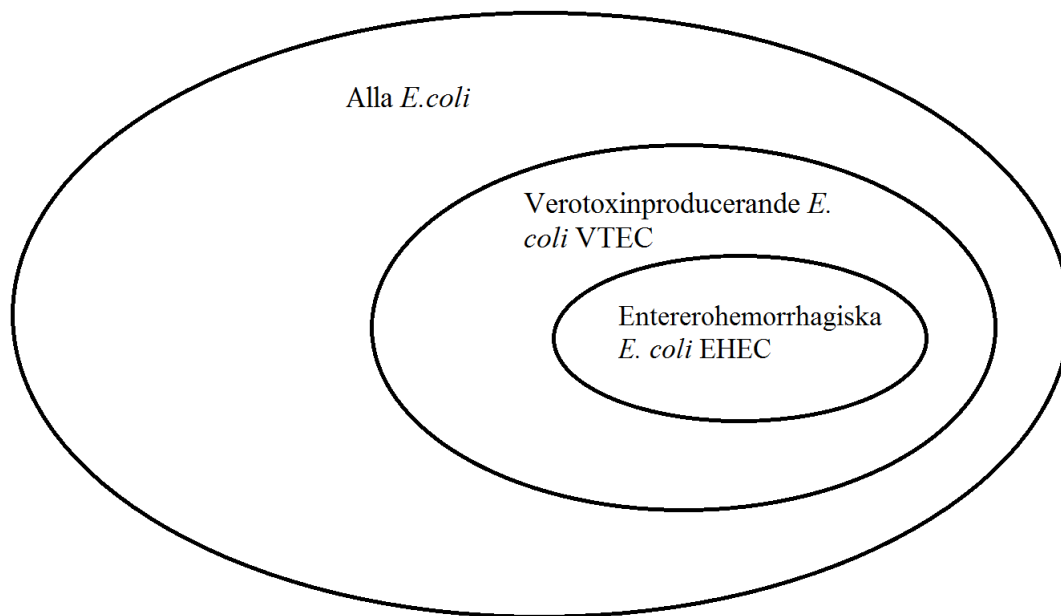
Främst barn under 12 månader får diarré av DEAC (Scaletsky et al., 2002). Bakterien stimulerar tarmen så att en lång fingerlik utväxt växer ut och sedan täcker över bakteriekolonin. 75 % av alla EAEC producerar en adhesin F1845 (Bilge et al., 1989). Adhesinet binder till samma celler (hep-2) som EAEC men täcker hela cellen till skillnad från EAEC som binder till speciella ställen på cellytan (Scaletsky et al., 1984).

#### **1.7.6. EHEC (Enterohemorrhagic *E. coli*) och VTEC (Verotoxinproducing *E. coli*)**

Ett djur, ofta en idisslare, kan vara en bärare av VTEC som inte ger några symptom hos djuret (Smittskyddsinstitutet, 2011a). Alla VTEC syntetiserar verotoxiner men det är endast en del av dem, EHEC, som orsakar symptom hos människor (Smittskyddsinstitutet, 2011a). Vissa av dessa VTEC kan sedan infektera en människa och då kallas de för EHEC (Smittskyddsinstitutet, 2011a). Utöver blodig diarré kan EHEC även orsaka hemolytiskt uremiskt syndrom (HUS) och haemoragisk kolit (HC) hos människor (Tzschoppe et al., 2012). De vanligaste sjukdomsframkallande hos människa är stammarna är O26, O103, O111, O121, O145 och framförallt O157 (Tzschoppe et al., 2012, Gill och Gill, 2010).

HUS innebär en samling av symptom där skador på njurarna, trombocytopeni (brist på trombocyter) och hemolytisk anemi (nedbrytning av röda blodkroppar) är de vanligaste (Wong et al., 2000). Trombocytogenin innebär att kroppen får svårare att stoppa blödningar eftersom detta är trombocyternas uppgift. Nedbrytningen av röda blodkroppar gör den sjuke trött eftersom syre inte kan transporteras fram till de ställen där det behövs i tillräcklig mängd. Njurskadorna som uppstår är akut njursvikt (Williams et al., 2002). Det drabbar oftast barn (Williams et al., 2002).

Haemoragisk kolit är blödande grovtarmsinflammation (Smittskyddsinstitutet, 2011a).



Figur 2. Skillnaden mellan VTEC och EHEC

### 1.8. Tysklandsutbrottet, orsakat av *E. coli* O104:H4

Utbrottet av *E. coli* i Tyskland år 2011 orsakades av en ovanlig serotyp av *E. coli*. Enstaka fall av personer som smittats hade förekommit men aldrig som ett epidemiskt utbrott (Mellmann et al., 2008, Bae et al., 2006). Bakteriestammens serotyp var O104:H4 (Bielaszewska et al., 2011). Utbrottet av *E. coli* i Tyskland i fjol orsakades av en bakteriestam vilken delade egenskaper från både EHEC och EAEC (Bielaszewska et al., 2011). Hos EHEC brukar huvudsakligen barn drabbas av HUS (Bielaszewska et al., 2011).

Från EHEC hade de fått förmågan att tillverka verotoxinet  $vt_2$  men inte  $vt_1$  (Bielaszewska et al., 2011). Dessutom hade den tre stycken adhesiner vilka är typiska för EHEC nämligen, *iha*, *Ipf*<sub>O26</sub> och *Ipf*<sub>O113</sub> (Bielaszewska et al., 2011). Det EHEC-typiska adhesinet *intimin* saknades dock (Bielaszewska et al., 2011).

Från EAEC har den fått förmågan att bilda dispersin och att binda till Hep-II cellerna i autoaggregativt mönster (som ser ut som en murad vägg) (Bielaszewska et al., 2011) med hjälp av AAF (Kaper et al., 2004). Dispersinet har som tidigare nämnts funktionen att bilda en yta runt en växande EAEC-koloni och hjälper troligen även här till att penetrera mucosan

(Sheikh et al., 2002). Även genen som kodar för det EAEC-typiska toxinet Shigella enterotoxin 1 (Shet1) har påvisats hos O104:H4 (Bielaszewska et al., 2011).

Det hos EAEC annars så vanliga toxinet EAEC värmestabila enterotoxin 1 (EAST1) finns ej i tysklandsstammen (Bielaszewska et al., 2011).

Möjligheten att binda till tarmcellerna innebär att verotoxinet kan överföras effektivare till epitelcellerna i tarmen (Bielaszewska et al., 2011). Detta kan vara en förklaring till att en ovanligt stor del av de insjuknade utvecklade HUS (Bielaszewska et al., 2011). Det är på grund av ett locus som heter locus of enterocyte effacement som bakterierna kan fästa vid tarmväggen (Jores et al., 2004). I detta locus finns generna för intimin, typ III sekretions system vilka används för att fästa vid tarmen (Jones 2004).

Tysklandstammen har dessutom förmågan att bryta ner ett brett spektrum av  $\beta$ -laktamaser (Bielaszewska et al., 2011, Rohde et al., 2011).

## **1.9. Virulensfaktorer hos *E. coli***

### **1.9.1. Adhesiner och koloniseringsfaktorer**

Virulensfaktorer är ämnen hos bakterierna som underlättar deras spridning eller kolonisation. Ett exempel är adhesiner vilka hjälper bakterien att fästa vid en cell eller yta. Hos EPEC och EHEC finns intimin med tio beskrivna varianter (Kaper et al., 2004). Intimin hjälper bakterien att binda till epitelceller (Jerse et al., 1990).

Hos ETEC finns så kallade CFA:s, de finns tre undergrupper, cfa, cs och pcf, och med de olika sorterna blir de sammanlagt ungefär 20 stycken (Kaper et al., 2004).

Även andra ämnen som är till nytta för bakterien på andra sätt ska nämnas. Ett exempel är dispersin som hjälper till vid kolonisering av tarmen där det möjliggör penetrering av slemmet (Sheikh et al., 2002). Dispersin finns hos EAEC (Kaper et al., 2004)

Virulensfaktorn aerobactin hjälper bakterierna att ta upp järn (Kaper et al., 2004).

Flagellin (H) är proteiner som används för förflyttning (Kaper et al., 2004). De finns hos nästan alla *E. coli* patotyper och finns i nästan 50 serotyper (Kaper et al., 2004).

Även bakteriens cellväggslipopolysackarid (O) (DebRoy et al., 2011) utgör en virulensfaktor (se 1.2.1 *Escherichia coli* Nomenklatur) (Kaper et al., 2004).

### **1.9.2. Toxiner och effekter**

För att skapa en så gynnsam miljö som möjligt för sig själv har bakterierna utvecklat olika mekanismer.

Som tidigare nämnts finns värmelabila enterotoxiner, LT, hos ETEC (Kaper et al., 2004). Den gör, via ett antal steg, så att tarmen stimuleras att släppa ut kloridjoner (Nataro och Kaper, 1998) vilket innebär att kroppen förlorar viktiga salter.

Även hos EAEC (och kanske EIEC) finns ett toxin som inducerar jonsekretion (Kaper et al., 2004). Det är toxinet Shigella Enterotoxin 1 oftast förkortat ShET1 (Kaper et al., 2004).

### **1.9.3. Shigatoxinerna och deras nomenklatur**

De så kallade STEC tillverkar toxiner som kallas shigatoxiner, det finns två sorter stx<sub>1</sub> och stx<sub>2</sub> och de består av vars två delar subenhet A och subenhet B (de Sablet et al., 2008, Carey et al., 2008). Subenhet A är den aktiva delen av toxinet som orsakar symptomen (de Sablet et al., 2008). Subenhet B, som består av fem stycken likadana enheter, behövs för att toxinet ska kunna binda till receptor kallad glykolipid Gb3 (de Sablet et al., 2008).

Dessa toxiner fungerar så att de inhiberar proteinsyntesen i eukaryota celler (Carey et al., 2008). Shigatoxinernas giftighetsgrad beror till stor del på om de är stx<sub>1</sub> eller stx<sub>2</sub>, där den senare varianten är 1000 gånger giftigare för den förmodade verkningsorten nämligen celler på insidan av blodkärl i njurarna (Louise och Obrig, 1995).

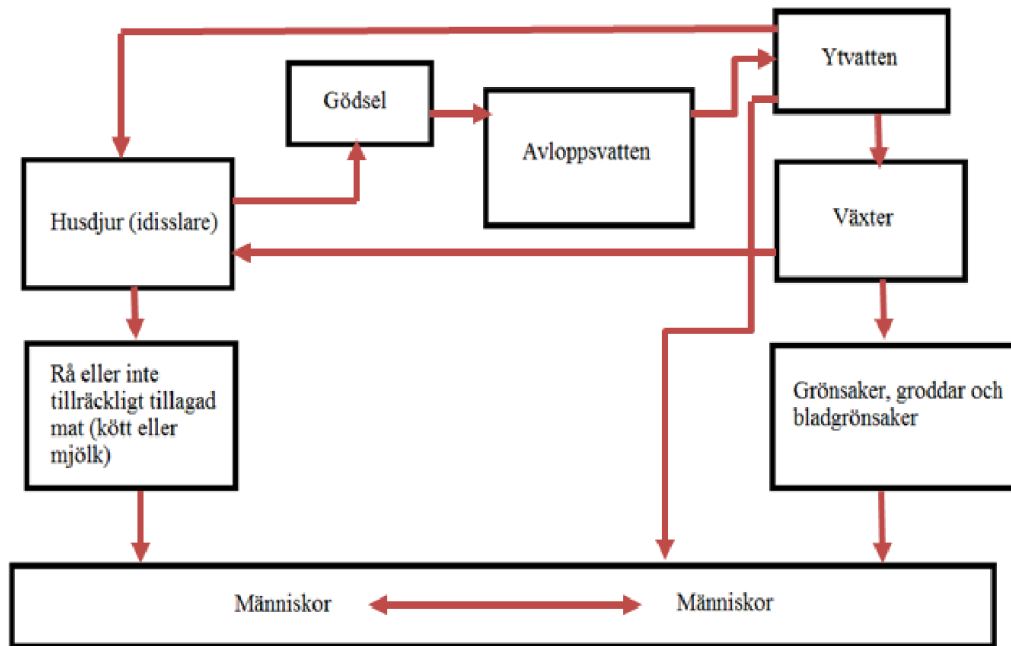
Stx<sub>1</sub> har dessutom undergrupper kallade stx1 (Bielaszewska et al., 2006), stx<sub>1c</sub> (Zhang et al., 2002) och stx<sub>1d</sub> (Burk et al., 2003). Stx<sub>2</sub> har fler undergrupper än stx<sub>1</sub>-varianterna och är dessutom betydligt mer heterologa än stx<sub>1</sub> varianterna (Bielaszewska et al., 2006). Det finns sex stycken varianter av stx<sub>2</sub>, Stx<sub>2</sub> (Bielaszewska et al., 2006), stx<sub>2c</sub> (Schmitt et al., 1991), stx<sub>2c2</sub> (Jelacic et al., 2003), stx<sub>2d</sub> delas upp i två varianter stx<sub>2d</sub><sub>EH250</sub> (Pierard et al., 1998) och stx<sub>2d</sub><sub>activatable</sub> (Melton-Celsa et al., 1996), stx<sub>2e</sub> (Sonntag et al., 2005) och stx<sub>2f</sub> (Schmidt et al., 2000).



## 1.10. Smittvägar

Patogenerna kan komma till produkten både före under och efter skörd (Beuchat och Ryu, 1997). Före skörd kan infekterad jord sprida smitta till produkten (Beuchat och Ryu, 1997). Ibland används obehandlat bevattningsvatten eller avloppsvatten för att bevattna grödorna (Taban och Halkman, 2011). Detta är naturligtvis en stor riskfaktor när det gäller risken för kontamination. Det har visats att kontaminering av djur, både vilda och tama kan ha en förmåga att sprida patogener som *E. coli* och *Salmonella* (Brackett, 1999). Dessutom har också kontaminerat vatten påvisats kontaminera olika trädgårdsprodukter (Brackett, 1999). Övriga faktorer som tros spela en viktig roll vid smittspridning är obehandlad gödsel, avloppsvatten eller dåligt desinfekterade maskiner (Brackett, 1999).

Under och efter skörd kan insekter och andra djur, inte nödvändigtvis bärare av smitta, sprida bakterier mellan produkter (Beuchat och Ryu, 1997). Maskiner och redskap som används för att processa salladen kan sprida eventuell smitta från en enstaka smittad planta till flera (Beuchat och Ryu, 1997). På samma sätt kan sköljvatten/tvättvatten sprida smitta (Beuchat och Ryu, 1997) om metoden är felkonstruerad. Mellan salladshuvuden kan smitta också överföras i postharvestkedjan om de kommer i kontakt med varandra (Beuchat och Ryu, 1997). Förpackningar och transportlastbilar som inte rengjorts kan sprida smitta (Beuchat och Ryu, 1997). Olämplig behandling i grossist och detaljistledet är även det en riskfaktor (Beuchat och Ryu, 1997). Även dålig handhygien hos personal i olika skeden av produktionen kan vara en källa till smitta (Beuchat och Ryu, 1997).



Figur 3. Vanliga smittvägar och reservoarer för EHEC. Efter (Weiss et al., 2011).

## 1.11. Smittkedjan

### 1.11.1. *Salmonella*-serovarer och deras vanligaste spridningsvägar

*Salmonella* har en stor spridning av vektorer (Santos et al., 2003). Den vanligaste humanpatogenen, *S. enteritidis*, är vanligast hos varmblodiga djur (Jones, 2005). Även hos vilda fåglar har *Salmonella* påträffats vilken de skulle kunna sprida till andra fågeluppsättningar som t.ex. kalkon- eller kycklinguppfödning (Pennycott et al., 2006) varifrån de sedan skulle kunna spridas till människor. Hos sköldpaddor finns också *Salmonella* av sort I och II (Hidalgo-Vila et al., 2007) och hos andra reptiler och amfibier har sort II-VI påträffats (Mermin et al., 2004).

Huvudsakligen koloniserar *Salmonella* typ I och II varmblodiga djurs tarmsystem medan sorterna IIIa, IIIb IV VI och arten *S. bongori* föredrar kallblodiga djurs tarmsystem (Grimont och Weill, 2007). Även andra undersökningar har visat att typerna II-IV fanns i högre andel i reptilers tarmsystem än sorten I (de Sa och Solari, 2001)

### **1.11.2. Vanliga spridningsvägar för VTEC**

VTEC-bakterier har isolerats från både idisslare och icke-idisslande husdjur och även från produkter från dem (Weiss et al., 2011). Även från dricksvatten, grönsaker och mjölkprodukter har VTEC isolerats (Weiss et al., 2011). Den huvudsakliga reservoaren för VTEC är tarmsystemet hos idisslare speciellt kor, vilka ofta inte visar några symtom (Weiss et al., 2011). Om man använder gödslet riskerar man att VTEC kan etablera sig på produkten (Weiss et al., 2011). Även vatten eller jordkontakt är risker vid odling.

### **1.11.3. *E. coli*:s vidhäftning på salladsbladet**

Tre mekanismer för att fästa på bladytor har beskrivits hos *E. coli* O157 (Berger et al., 2010). Dessa är olika former av hårlika utväxter från cellen som till exempel flageller, filament eller curli (Berger et al., 2010). Curli är en sorts hårlika fiber som sticker ut ur cellerna (Chapman et al., 2002). Chapman et al. (2002) rapporterar vidare att de hjälper till vid kolonisering av inerta ytor och biofilmbildning. Enligt Chapman et al. (2002) hjälper de till vid bindning till ett antal olika proteiner.

*E. coli* har förmågan att antingen skapa en egen biofilm eller att fästa i redan etablerade biofilmer (Wingender och Flemming, 2011).

*E. coli* har också visast kunna gå in via stomata, och har förmågan att överleva inne i växtens kärlsystem om fröna var VTEC-kontaminerade (Itoh et al., 1998).

Även flageller kan användas för att fästa vid en bladyta (Xicohtencatl-Cortes et al., 2009).

Filamentous typ III sekretions system binder till bladens epidermis med hjälp av samma filament som tidigare visats spela en viktig roll vid koloniseringen av tarmen av kor och människor (Knutton et al., 1998, Shaw et al., 2008).

### **1.11.4. Vanliga *Salmonella*-serovarer och VTEC på sallad**

Det var smittade groddar som orsakade utbrottet i Tyskland år 2011 (Risiokobewertung, 2011). Över 3800 personer insjuknade och 58 dog (Rosner et al., 2011). Huvuddelen av de sjuka var tyskar (Rosner et al., 2011) men även andra europeiska länder som Österrike, Tjeckien, Danmark, Frankrike, Grekland, Luxemburg, Nederländerna, Norge, Polen, Spanien, Sverige och Storbritannien drabbades (Bielaszewska et al., 2011). Även i USA och Kanada inträffade fall (Bielaszewska et al., 2011). I Sverige dog en av de smittade av HUS

(Bielaszewska et al., 2011). En ovanlig egenskap som skiljer O104:H4 från till exempel EHEC, vilka också orsakar HUS, är att i det fallet drabbades betydligt större andel vuxna än barn (Bielaszewska et al., 2011).

På senare tid har det blivit allt populärare med färdiga sallader (Taban och Halkman, 2011). Dessa har också orsakat ett antal utbrott av sjukdom och matförgiftning (Taban och Halkman, 2011). Två salmonellaserovarer som har förekommit är *Salmonella enterica* Typhimurium DT104 i Norge och *Salmonella enterica* Newport i Spanien (Taban och Halkman, 2011). Båda dessa utbrott berodde på kontaminerad sallad (Taban och Halkman, 2011).

I USA har det förekommit 12 fall där folk har blivit magsjuka, antingen av *Salmonella* eller av *E. coli* O157:H7, till följd av att de ätit färdigsallader (Tauxe et al., 2010). Mycket arbete har lagts ner för att minska kontamineringen av *Salmonella* i kött, ägg och kyckling och i jämförelse med detta arbete har förhållandevis lite arbete lagts ner på att hindra smitta från färdigsallad (Tauxe et al., 2010).

De vanligaste smittbärandegrönsakerna är bladgrönsaker, sallad, groddar och meloner och det är *Salmonella* och *E. coli* som är de oftast isolerade patogenerna (Tauxe et al., 2010). Det är vanligare att bli magsjuk av *E. coli* än av *Salmonella* (Golberg et al., 2011). Men det finns fall där salmonellasmittad sallad har varit smittkällan. Ett exempel är i USA år 1992 då tolv personer smittades av salmonellaseroaren *S. enterica* Enteritidis (Hanning et al., 2009). Året därpå kom ett nytt utbrott av smittad sallad då serovaren Heidelberg smittade 18 personer som ätit av kontaminerad sallad (Hanning et al., 2009). Ett utbrott på senare tid är ett utbrott av serovaren Newport vilket smittade 97 personer år 2004 (Hanning et al., 2009).

Även om *Salmonella* sällan förekommer på sallad kan den ibland förekomma på andra produkter som ingår i en sallad. Under ett utbrott av *S. enteridis* Senftenberg i England och Wales år 2007 fastslogs smittkällan vara färdigpackad basilika (Pezzoli et al., 2008). Det finns misstankar om att en person smittades av en pastasallad där den smittade basilikan troligen var en ingrediens (Pezzoli et al., 2008). Tomater har också flera gånger spridit *Salmonella* av ett antal olika serovarer (Hanning et al., 2009).

Under 2004 blev det ett utbrott av *S. enteridis* Thompson som drabbade Norge och flera andra europeiska länder (Nygard et al., 2008). Det visade sig sedan att det var en omgång rucola från Italien som var kontaminerad (Nygard et al., 2008). Den smittade rucolan fanns även iblandad i salladsblandningar (Nygard et al., 2008).

## 2. Material och metoder

Undersökningen utförs som en litteraturstudie. Genom att söka i databaser sammanställs information vilken sedan jämförs med hypoteserna.

Jag väljer att undersöka verotoxinproducerande *E. coli* och *Salmonella* eftersom de är de vanligaste patogenerna som har gett upphov till sjukdomsutbrott. Det finns många serotyper av *E. coli* men endast en del av dessa producerar toxiner som är farliga för människor. Det är dessa bakterier som kommer att undersökas närmare. Med färdigsallad åsyftas alla sorters sallader som är beredda för färskkonsumtion från enkla varianter som sköljda blad till mer avancerade rätter som en Ceasarsallad med kycklingbitar och dressing.

## 3. Resultat

### 3.1. Riskfaktorer innan och efter skörd

Den huvudsakliga sanitära kvaliteten på grödorna under primärproduktion beror på odlingsmiljön (Brackett, 1999). I fallet groddar anses huvudkällan till smitta vara kontaminerade fröer (Mandrell, 2010). Har då bakterierna sedan väl etablerat sig på ett frö är det svårt att utrota dem (Jaquette et al., 1996). I ett försök inokulerades *S. enterica* Stanley på frö av alfalfa varpå de sedan placerades i kyla (8°C) respektive värme (21°C) (Jaquette et al., 1996). Detta reducerade bakteriepopulationerna med 1 respektive 2 logaritmer men vid blötläggning och groningen ökade sedan antalet CFU (colony forming units) igen (Jaquette et al., 1996).

Det finns flera sätt som medlemmar i familjen *Enterobacteriaceae* som *Salmonella* och *E. coli* tillhör kan komma till bladen (Weiss et al., 2011). Eftersom deras naturliga miljö är tarmen (Weiss et al., 2011) är det oftast här smittkedjan startar. Den smittade avföringen kan spridas antingen när smittat gödsel används som gödning, användande av bevattningsvatten som kontaminerats med avföring, eller med hjälp av vilda djur och fåglar (Heaton och Jones, 2008).

Vattenkvaliteten är viktig för att undvika kontaminering av grönsaker eftersom vatten ofta är kontaminerat av *Salmonella* (Cherry et al., 1972). Det kontaminerade vattnet kan vara både bevattningsvatten eller ytavrinning (Meakin och Dickinson, 2006). *E. coli* har dock visats ha

dålig överlevnad i vatten (Lim och Flint, 1989). I ofiltrerat sjövattnet uppmättes en snabb minskning av *E. coli*:s viable cell count (Lim och Flint, 1989).

I ett försök visades det att *Salmonella* som inokulerats på morot eller rädisa vid endast ett tillfälle kunde överleva i mellan 203 och 231 dagar i jorden (Islam et al., 2004). I en undersökning av *E. coli* O157:H7 vilken också inokulerades vid endast ett tillfälle, denna gång på lök och morot, visade sig kunna överleva i jorden i mellan 154 och 196 dagar i jorden (Islam et al., 2005). Ett annat försök visade att både *E. coli* och *Salmonella* som spridits med gödsel över en jord kan i genomsnitt överleva i en månad i jorden (Nicholson et al., 2005).

Även från jorden kan patogener plockas upp om salladen kommer i kontakt med jorden (Weiss et al., 2011). Jordkontakt kan uppstå antingen beroende på väderförhållande som t.ex. regn som innebär att jord stänker upp på bladen eller genom sekundära vektorer som fåglar eller gnagare som kontaminerar bladen (Meakin och Dickinson, 2006).

*Salmonella* och *E. coli* kräver som tidigare nämnts en värd (Winfield och Groisman, 2003). *Salmonella* har ett bredare värdval och kan klara sig i både däggdjur, fåglar, reptiler och insekter medan *E. coli* främst finns hos däggdjur (Winfield och Groisman, 2003). En skillnad mellan de två bakterierna är att *Salmonella* generellt klarar miljön utanför värdjuret bättre och därmed kan återinfektera en ny värd medan *E. coli*, åtminstone i icke-tropiska områden, oftast dör när de hamnar i den externa miljön (Winfield och Groisman, 2003).

Vid skörd kommer det in plockare eller lantbrukare och även dessas personliga hygien kan ha en effekt på spridningen av patogener på produkten som produceras. En sådan enkel sak som handtvätt kan reducera risken för smitta (Brackett, 1999). Det är viktigt att det finns mobila toaletter och möjlighet att tvätta händerna (Brackett, 1999). Detta ska finnas på ett bekvämt avstånd från arbetsstället (Brackett, 1999).

Även efter skörd är det viktigt att personalen är utbildade i riskfyllda steg i produktionskedjan och medvetna om sätt som smitta kan spridas (Brackett, 1999). Även arbetarnas motivation att följa hygienregler är en viktig riskfaktor (Brackett, 1999). Det är vida accepterat att det är vid hanteringen efter skörd som de allra flesta fallen av kontaminering inträffar (Meakin och Dickinson, 2006). Här är det dock lättare att hålla en bra hygien eftersom man till exempel kan placera ut handtvätsstationer där de anställda rör sig (Brackett, 1999). Det är också lättare att övervaka att de anställda så att de sköter sin hygien med sådana tvättstationer under postharvestprocessen (Brackett, 1999).

Processteget innebär också en risk att föröka upp och sprida bakterier (Brackett, 1999) där en smittad produkt smittar en annan. I sköljvattnet kan det finnas hypoklorit men den är där endast för att behålla en bra mikrobiologisk kvalitet på sköljvattnet och inte för att rena produkten från patogener (Brackett, 1999). I Sverige använd hypoklorit som desinfektionsmedel till utrustning i livsmedelsindustrin (Kemikalieinspektionen, 1998).

Vid distribution kan smitta spridas mellan produkter. Ett exempel är om man använder en lastbil där det tidigare funnits idisslare riskerar man att smitta sprids till den färska produkten (Brackett, 1999). Vid felaktig lastning av kylbilar kan inte luften cirkulera som den ska och därför uppstår inte rätt kyleffekt (Brackett, 1999) vilket kan medföra att bakteriekolonier växer till sig.

Även i växtskyddsmedel har det visats att både *E. coli* och *Salmonella* kan både överleva och växa till (Ng et al., 2005). Växtskyddsmedlen blandades till anvisad koncentration i olika sorters vatten som finns i odling som till exempel sjövatten, sedan inokulerades bakterierna i vätskan som sedan odlades på agar vilket visade att bakterierna inte endast överlevde utan också förökades i växtskyddsmedlet (Ng et al., 2005). Har man alltså berett sprutföringen på kontaminerat vatten och inte sköter tömningen som man ska riskerar man att sprida patogenerna vidare.

### **3.2. Odlingsåtgärder och hygien**

Eftersom det är av så stor vikt att man har rena frön till att börja med har det utvecklats olika metoder för att desinficera fröer. I ett försök utvärderades effekten av ClO<sub>2</sub>-gas, ozon (O<sub>3</sub>) och även bestrålning av fröer (Trinetta et al., 2011). Man undersökte tre olika sorters fröer, tomat-, sallad- och cantaloupemelonfröer (Trinetta et al., 2011). Både *E. coli* O157:H7 och *S. enterica* testades (Trinetta et al., 2011). Samtliga behandlingar sänkte markant antalet bakterier på fröna (Trinetta et al., 2011). Grobarheten sänktes endast i ett fall, när av ClO<sub>2</sub>-gas användes på cantaloupemelonfröerna (Trinetta et al., 2011).

Brackett (1999) nämner flera gånger vikten av hygien och då framförallt vikten av att arbetare har möjligheten att tvätta händerna. Toaletter som finns att tillgå nära arbetsplatsen är också av stor vikt (Brackett, 1999). Arbetarna kan annars sprida patogener från en planta till en annan eller också från sig själv till produkten. Även under postharvesthanteringen kan dålig hygien hos plockare/packare vara en faktor som sprider smitta (Heaton och Jones, 2008). Francis (1999) beskriver ett flödesdiagram hur produktionen av minimalt processade

grönsaker som till exempel en färdigsallad. Det första steget är att ta bort de yttre lagren som ofta är kontaminerade med jord och smuts (Francis et al., 1999). Sedan skivas eller strimlas produkten för att sedan sköljas antingen i bara vatten eller en lösning av ett antimikrobiellt ämne som till exempel klorin (100ppm), askorbinsyra eller citronsyra (Francis et al., 1999)

Smittad avföring är som tidigare nämnts en riskfaktor vid odling (Heaton och Jones, 2008). Man kan dock minska halten patogener i gödslet genom att låta gödselstacken kompostera ordentligt (Nicholson et al., 2005). I gödselhögar där temperaturen översteg 55°C överlevde inga bakterier längre än en månad och i de flesta fall kunde inga patogener detekteras efter en vecka (Nicholson et al., 2005).

Jorden kan steriliseras på så sätt att den först fuktas med vatten för att sedan täckas över med en plastväv (Wu et al., 2009). Under plasten uppstår då en hög temperatur på upp till 40°C vilket medför att bakterierna minskar till en odetekterbar nivå på fyra veckor istället för sex veckor som i kontrollen (Wu et al., 2009). För att kvantifiera bakterierna togs prover av jorden efter behandlingen (Wu et al., 2009). Jordproverna späddes med steril saltlösning och sedan odlades lösningen på agarplattor (Wu et al., 2009). Till sist räknades antalet cfu per gram torrsvikt ut (Wu et al., 2009).

Det har visats att brunråttor (*Rattus norvegicus*) som lever nära bondgårdar med kor kan bära på samma serotyper av *E. coli* som korna (Nielsen et al., 2004). Dessa råttor skulle sedan kunna sprida dessa serotyper av *E. coli* till sallad eller den produkt man tillverkar (Nielsen et al., 2004). Samma undersökning visade även att starar (*Sturnus vulgaris*) också kan vara bärare av *E. coli* från kor (Nielsen et al., 2004). Enligt undersökningen var dock andelen djur som var smittade låg men försöket visar ändå att det finns en risk att dessa djur har förmågan att föra vidare smitta från kor till grödan. Måsar som bor vid soptippar har också visats kunna bära på *E. coli* O157 (Wallace et al., 1997).

Enligt Meakin och Dickinson (2006) är *Salmonella* och *E. coli* ofta isolerade från tarmsystemen från människor och djur och sällan från miljön (Meakin och Dickinson, 2006). Därför ses de som indikatorer på att jorden/grönsaken är kontaminerad med avföring (Meakin och Dickinson, 2006).

Eftersom bakterierna kan öka sitt antal betydligt bättre vid 12°C (Luo et al., 2010) än vid lägre temperaturer kan en viktig hygienåtgärd vara att se till att kyla produkten direkt efter skörd för att minska tiden som bakterien har på sig att växa till.



### 3.3. Animaliska produkter i sallad

Både *Salmonella* ssp. och *E. coli* är mycket vanliga i fågel-produktionssystem (Chaves et al., 2011). Detta leder till att de riskerar spridas till fågelköttet vilket är oroande (Chaves et al., 2011). Vid en undersökning i Argentina på EPEC i kyckling visar hur *E. coli* kan sprida sig i olika steg i slaktprocessen av kyckling (Alonso et al., 2011). Undersökningen visade att *E. coli* fanns i mellan 6 till 28 % av fåglarnas kloaker, i mellan 39 till 56 % av de otvättade kropparna och i de tvättade kropparna detekterades *E. coli* i mellan 4 till 58 % av fallen (Alonso et al., 2011). Detta visar att halten av bakterier hölls på samma nivå eller till och med ökade under slaktkedjan (Alonso et al., 2011).

Det finns flera steg i slaktkedjan då smittan kan spridas (Alonso et al., 2011). Som exempel på hur en slakt går till beskrivs slakten av kycklingar. Slakten går till så att kycklingarna anländer till slakteriet i burar för att sedan avlivas (Alonso et al., 2011). Nästa steg är att skålla kycklingkropparna för att underlätta plockning (Alonso et al., 2011). Vid nästa steg tas djurets inre organ ut och kroppshålan sköljs för att få bort blod, fett, vävnader och avföring (Alonso et al., 2011). Till slut kyls kycklingarna ner och förpackas för att sedan för att sedan distribueras till konsumenterna (Alonso et al., 2011).

Ägg har visats innehålla *Salmonella* av serovarerna Enteritidis och Typhimurium (Martelli och Davies, 2012). Man kan smittas av antingen råa eller inte tillräckligt tillagade ägg (Martelli och Davies, 2012). Detta kan vara ett problem dels för att man kan ha ägg i en sallad men också en dressing baserad på majonnäs (som innehåller rått ägg) kan sprida *Salmonella* om ägget var infekterat. Detta kan vara ett problem om man använder ägg som inte är från Sverige eftersom svenska ägg ännu så länge är fria från *Salmonella* till skillnad från ägg från andra europeiska länder. (Smittskyddsinstitutet, 2011b).

En ingrediens som blir allt populärare i ready-to-eat-produkter är skaldjur (Amagliani et al., 2012). Dessa kan dock innehålla *Salmonella* vilken djuren kan ha tagit upp antingen i sin naturliga levnadsmiljö, vid odling i akvakultur, eller infekterats med vid processning (Amagliani et al., 2012). Som tidigare nämnts är *E. coli* O157:H7 en vanligare patogen på bladgrönsaker än *Salmonella* (Golberg et al., 2011). Om man blandar in räkor eller ägg som oftare bär på *Salmonella* inför man ytterligare en ny patogen i salladen.

### 3.4. Metoder för att minska antalet bakterier utan kemikalier

Vid tvätt av grönsaker används ofta klorin eller andra syntetiska desinficeringsmedel (Gunduz et al., 2009). Det har dock visats att olja från myrten (*Myrtus communis*) i sköljvattnet kan minska antalet kolonier av *S. enterica* Typhimurium på både isbergssallad och tomat (Gunduz et al., 2009).

Sallad packas ofta i påsar med en modifierad atmosfär bestående av kvävgas vilket verkar sänka *E. coli*:s överlevnadsgrad (Weiss et al., 2011). Vid ett försök visades att *E. coli* som inokulerats på isbergssallad med en gasblandning som var lik den som finns i atmosfären hade betydligt större aktivitet i gener som kodade för intimin och shigatoxin 2. (Sharma et al., 2011).

Ett annat sätt att hålla nere antalet bakterier är att sänka temperaturen (Luo et al., 2010). När man sänker temperaturen runt salladen för att bevara dess kvalitet har man dessutom sideeffekten att man sänker tillväxthastigheten för *E. coli* O157:H7 (McKellar och Delaquis, 2011). Ett försök utfördes på både romansallad och isbergssallad och visade att *E. coli* O157:H7 av stammen F6460 signifikant ökade sitt antal när salladen förvarades vid 12°C (Luo et al., 2010). Dessutom visade de att *E. coli* O157:H7 till stor del började avdödas när salladen förvarades vid 5°C (Luo et al., 2010). Det har visats att *E. coli* O157:H7 kan växa till på strimlad isbergssallad förvarad i en semipermiabel påse vid temperaturer på endast 8°C (Francis och O'Beirne, 2001). Här påvisades dock en konstant populationsstorlek av *E. coli* O157:H7 när påsarna förvarades vid 4°C (Francis och O'Beirne, 2001).

För *Salmonella* har också temperatur visats ha en effekt. När romansallad, som inokulerats med *Salmonella*, förvarades vid 5°C i tio dagar minskade antalet bakterier till en tiondel (Oliveira et al., 2010). När de förvarades vid 25 grader ökade antalet bakterier kraftigt (Oliveira et al., 2010).

En annan metod att reducera antalet bakterier på sallad är att bestråla den färdigpackade salladen (Niemira och Cooke, 2010) med upp till 1 kGy. Den bästa effekten för man om strålbehandlingen utförs innan bakterierna kan bilda biofilm (Niemira och Cooke, 2010).

En annan undersökning, där spenat bestrålades med elektroner, visade att det inte sker någon förändring av hållbarheten (Gomes et al., 2008). Halten av karotenoider och klorofyll förändras inte till följd av bestrålningen (Gomes et al., 2008). Halten av vitamin C sjönk dock (Gomes et al., 2008). I sensoriska tester av otränade privatpersoner fick de bestrålade

spenatbladen något lägre betyg i dofttestet men överlag fick de inte lägre betyg än de obehandlade bladen (Gomes et al., 2008). Ett test genomfördes också där en påse med spenatblad bestrålades för att se om den ojämna packningen i påsen skulle innebära att vissa av bladen fick för låg dos av strålning för att avdöda bakterierna (Gomes et al., 2008). Det visade sig att detta inte var ett problem enligt forskargruppen är det enligt dem och därför anser de att bestrålning av bladgrönsaker kan vara en metod att använda för att minska risken för tarmsmitta (Gomes et al., 2008).

I ett försök att utrota *E. coli* och *S. enterica* Typhimurium från ytan av råa fågelprodukter användes en metod som gick ut på att frysa produkten genom att snabbt kyla ner den till en mycket låg temperatur (-85°C) för att på så sätt få ner antalet CFU (Chaves et al., 2011). Dessvärre visade inte försöket på någon signifikant skillnad i reduktion av CFU mellan de behandlade eller de obehandlade proverna (Chaves et al., 2011). Minskningen av bakterier var låg, varken för *Salmonella* eller för *E. coli* uppnådde man den önskade reduktionen som var en reduktion till en tiondel av ursprungspopulationen (Chaves et al., 2011).

Man skulle också kunna använda salladsdressingen som ett antibakteriellt medel. I ett försök undersöktes både *S. enterica* Typhimurium och *E. coli* O157:H7 och deras överlevnad på strimlad isbergssallad (Chang och Fang, 2007). Till exempel har det visats att risvinäger, med 5 % ättiksyra och pH 3, sänkte antalet CFU på strimlad isbergssallad till en tusendel av ursprungsvärdet efter endast fem minuter i risvinägern (Chang och Fang, 2007). Man testade även desinficerings-effekten av vinäger med endast 0,5 % ättiksyra och pH 3,26 och i övrigt samma förutsättningar som i förgående försök men här uppmättes endast en reduktion med mindre än en tiondel (Chang och Fang, 2007).

Även essentiella oljor skulle kunna användas som tillväxthämmande ämnen. Det har visats att essentiella oljor från citrusfrukter, främst bergamott (*Citrus bergamia*) har en tillväxthämmande effekt på *E. coli* O157 när oljan sprids på kålblad som inokulerats med *E. coli* O157 (Fisher och Phillips, 2006, Nannapaneni et al., 2008).

## 4. Diskussion

En tarmbakteries väg från smittkälla till människa är en komplex sådan vilket visas i figur 3. I en färdigsallad ingår flera komponenter vilka ofta producerats i olika länder med olika kvalitetsstandarder.

Huvuddelen av bakterierna kommer till produkterna vid odling och skörd. Bakterier koloniserar ytan på ett salladsblad så fort det har vuxit ut ur fröet. De flesta bakterierna är dock bra för tarmfloran. Dock kan tarmbakterier som *E. coli* och *Salmonella* även de kolonisera ytan på ett blad.

Även om många faktorer samverkar är djuravföring och människor är viktiga källor till tarmsmittor (Weiss et al., 2011). Vid odling sprids gödsel, det kan beattnas med kontaminerat vatten och dessutom kan bakterierna överleva länge i jorden (Cherry et al., 1972, Meakin och Dickinson, 2006, Islam et al., 2005, Islam et al., 2004). Detta är naturligtvis riskfaktorer. Vid senare steg i produktionskedjan sker det huvudsakligen en spridning av bakterier från infekterade produkter till oinfekterade. Det är alltså viktigt att man ser till att ha så rena produkter som möjligt från början men det är viktigt att hålla samma höga hygienstandard genom hela produktionskedjan även om huvuddelen av bakterierna kommer till salladsbladen vid odling.

Som tidigare nämnts är smittvägen från tarmsystem till produkt ämnad för konsumtion en komplex väg. Emellertid finns ett antal viktiga steg där man kan sätta in åtgärder för att minska risken för smittspridning.

Dålig handhygien är en vanlig källa till spridning av tarmbakterier (Brackett, 1999). Genom att ge arbetare möjligheten till handtvätt och tillgång till mobila toaletter nära till hands för arbetare kan denna riskfaktor elimineras (Brackett, 1999).

Gödsel är av naturliga skäl en spridare av tarmsmittor. Ett sätt att oskadliggöra *E. coli* är att värmebehandla jorden (Wu et al., 2009) och låta gödslet kompostera ordentligt (Nicholsson et al., 2005).

Resultaten antyder att det åtminstone kan förekomma fler bakterier i en sallad där animaliska produkter ingår. Dessutom verkar bakteriekulturerna i en sallad som innehåller animaliska produkter innehålla mer divers bakteriekulturer i förhållande till en utan. Detta stöds utav Golberg et al. (2011) som rapporterar att *Salmonella* är ovanligt på sallad men vanligare i animaliska produkter. Dessutom innebär varje extra ingrediens en riskfaktor.

En salladsbladning som även innehåller kött och dressing är ett än mera komplext system än de föregående. Det behöver utredas om bakterierna kan anpassa sig från att leva på kött till att leva på växtsaft.

Om bakterierna är av farligare serotyper kan jag inte svara på med den litteratur jag har funnit. Man kan dock misstänka att det blir farligare när fler sorter av bakterier finns i en produkt.

Man bör dock se till att göra regelbundna kontroller om man tillverkar sallader med animaliska produkter. Genom att undvika att använda produkter som ägg från länder där det är vanligt med *Salmonella* kan risken för tarmsmittor minskas. En annan viktig säkerhetsåtgärd är att se till att animaliska produkter har värmts ordentligt för att avdöda bakterier.

Ett problem med färdigsallader är att när man hackar bladen skapar man en större yta för bakterierna att kolonisera. Dessutom läcker cellvätska ut vilket även detta bidrar till en gynnsam miljö för bakterierna. Det finns dock ett antal metoder för att minska tillväxten av bakterier i en färdigpackad sallad.

Tidigare har jag nämnt att använda salladsdressing som antibakteriellt medel. Essentiella oljor från bergamott har visats hindra tillväxten av *E. coli* O157:H7 (Fisher och Phillips 2006). Även tillsats av syra som vinäger har visats ha en effekt på *E. coli* O157:H7 (Chang och Fang, 2007). Förutsättningen var dock att pH låg på 3 (Chang och Fang, 2007) vilket är ett lågt värde. Det låga pH-värdet kan vara ett problem för konsumenten som uppfattar salladen som för sur men också möjligtvis för salladen som kanske inte tål längre perioder i en så pass sur miljö. *E. coli* kan dock överleva i upp till fem timmar i pH 2,5 vilket innebär att dressingen måste få tid att verka ett tag innan desinficering sker.

Det har visats att *E. coli* kan överleva låga pH som på 2,5 eller 3,0 i upp till fem timmar (Benjamin och Datta, 1995). Temperaturer runt fem grader har visats sänka antalet *E. coli* O157:H7 (Luo et al., 2010). *E. coli* är en fakultativ aerob (Ingledeew och Poole, 1984). Detta innebär att de kan använda syre om det finns tillgängligt men klarar även sig utan (Hogg, 2005).

## 5. Referenser

- Agbaje, M., Begum, R. H., Oyekunle, M. A., Ojo, O. E. & Adenubi, O. T. 2011. Evolution of *Salmonella* nomenclature: A critical note. *Folia Microbiologica*, 56, 497-503.
- Alonso, M. Z., Padola, N. L., Parma, A. E. & Lucchesi, P. M. A. 2011. Enteropathogenic *Escherichia coli* contamination at different stages of the chicken slaughtering process. *Poultry Science*, 90, 2638-2641.
- Amagliani, G., Brandi, G. & Schiavano, G. F. 2012. Incidence and role of *Salmonella* in seafood safety. *Food Research International*, 45, 780-788.
- Bae, W. K., Lee, Y. K., Cho, M. S., Ma, S. K., Kim, S. W., Kim, N. H. & Choi, K. C. 2006. A case of hemolytic uremic syndrome caused by *Escherichia coli* O104 : H4. *Yonsei Medical Journal*, 47, 437-439.
- Benjamin, M. M. & Datta, A. R. 1995. Acid tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 1669-1672.
- Berger, C. N., Sodha, S. V., Shaw, R. K., Griffin, P. M., Pink, D., Hand, P. & Frankel, G. 2010. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental Microbiology*, 12, 2385-2397.
- Beuchat, L. R. & Ryu, J. H. 1997. Produce handling and processing practices. *Emerging Infectious Diseases*, 3, 459-465.
- Bieber, D., Ramer, S. W., Wu, C. Y., Murray, W. J., Tobe, T., Fernandez, R. & Schoolnik, G. K. 1998. Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science*, 280, 2114-2118.
- Bielaszewska, M., Friedrich, A. W., Aldick, T., Schurk-Bulgrin, R. & Karch, H. 2006. Shiga toxin activatable by intestinal mucus in *Escherichia coli* isolated from humans: Predictor for a severe clinical outcome. *Clinical Infectious Diseases*, 43, 1160-1167.
- Bielaszewska, M., Mellmann, A., Zhang, W. L., Kock, R., Fruth, A., Bauwens, A., Peters, G. & Karch, H. 2011. Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in germany, 2011: A microbiological study. *Lancet Infectious Diseases*, 11, 671-676.
- Bilge, S. S., Clausen, C. R., Lau, W. & Moseley, S. L. 1989. Molecular characterization of a fimbrial adhesin, f1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to hep-2 cells. *Journal of Bacteriology*, 171, 4281-4289.
- Brackett, R. E. 1999. Incidence, contributing factors, and control of bacterial pathogens in produce. *Postharvest Biology and Technology*, 15, 305-311.
- Brenner, F. W., Villar, R. G., Angulo, F. J., Tauxe, R. & Swaminathan, B. 2000. *Salmonella* nomenclature - guest commentary. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 2465-2467.
- Burk, C., Dietrich, R., Acar, G., Moravek, M., Bulte, M. & Martlbauer, E. 2003. Identification and characterization of a new variant of shiga toxin 1 in *Escherichia coli* ont : H19 of bovine origin. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 2106-2112.
- Carey, C. M., Kostrzynska, M., Ojha, S. & Thompson, S. 2008. The effect of probiotics and organic acids on shiga-toxin 2 gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7. *Journal of Microbiological Methods*, 73, 125-132.
- CDC. 2007. *Preliminary foodnet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food --- 10 states, 2006* [Online]. Available: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5614a4.htm> [Accessed 2012-05-16].
- CDC. 2008. *Preliminary foodnet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food --- 10 states, 2007* [Online]. Available: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5714a2.htm>.
- Chang, J. M. & Fang, T. J. 2007. Survival of *Escherichia coli* O157 : H7 and *salmonella enterica* serovars typhimurium in iceberg lettuce and the antimicrobial effect of rice vinegar against e.Coli o157 : H7. *Food Microbiology*, 24, 745-751.
- Chapman, M. R., Robinson, L. S., Pinkner, J. S., Roth, R., Heuser, J., Hammar, M., Normark, S. & Hultgren, S. J. 2002. Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science*, 295, 851-855.

- Chaves, B. D., Han, I. Y., Dawson, P. L. & Northcutt, J. K. 2011. Survival of artificially inoculated *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* on the surface of raw poultry products subjected to crust freezing. *Poultry Science*, 90, 2874-2878.
- Cherry, W. B., Biddle, J. W., Hanks, J. B., Thomason, B. M., Murlin, A. M. & Croom, J. M. 1972. *Salmonellae* as an index of pollution of surface waters. *Applied Microbiology*, 24, 334-&.
- CIDRAP. 2006. *Diarrheagenic Escherichia coli* [Online]. Available: <http://www.cidrap.umn.edu/cidrap/content/fs/food-disease/causes/ecoli/view.html> [Accessed 2012-05-16].
- CIDRAP. 2012. *Salmonellosis* [Online]. Available: <http://www.cidrap.umn.edu/cidrap/content/fs/food-disease/causes/salm/view.html> [Accessed 2012-05-04 2012].
- Czeczulin, J. R., Balepur, S., Hicks, S., Phillips, A., Hall, R., Kothary, M. H., NavarroGarcia, F. & Nataro, J. P. 1997. Aggregative adherence fimbria ii, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 65, 4135-4145.
- de Sa, I. V. A. & Solari, C. A. 2001. *Salmonella* in brazilian and imported pet reptiles. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32, 293-297.
- de Sablet, T., Bertin, Y., Varelle, M., Girardeau, J. P., Garrivier, A., Gobert, A. P. & Martin, C. 2008. Differential expression of stx(2) variants in shiga toxin-producing *Escherichia coli* belonging to seropathotypes a and c. *Microbiology-Sgm*, 154, 176-186.
- DeRoy, C., Roberts, E. & Fratamico, P. M. 2011. Detection of o antigens in *Escherichia coli*. *Animal Health Research Reviews*, 12, 169-185.
- Field, M., Alawqati, Q., Fromm, D. & Greenoug, Wb 1972. Effect of cholera enterotoxin on ion transport across isolated ileal mucosa. *Journal of Clinical Investigation*, 51, 796-&.
- Fisher, K. & Phillips, C. A. 2006. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 1232-1240.
- Francis, G. A. & O'Beirne, D. 2001. Effects of vegetable type, package atmosphere and storage temperature on growth and survival of *Escherichia coli* O157 : H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 27, 111-116.
- Francis, G. A., Thomas, C. & O'Beirne, D. 1999. The microbiological safety of minimally processed vegetables. *International Journal of Food Science and Technology*, 34, 1-22.
- Frankel, G., Phillips, A. D., Rosenshine, I., Dougan, G., Kaper, J. B. & Knutton, S. 1998. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: More subversive elements. *Molecular Microbiology*, 30, 911-921.
- Gill, A. & Gill, C. O. 2010. Non-O157 verotoxigenic *Escherichia coli* and beef: A Canadian perspective. *Canadian Journal of Veterinary Research-Revue Canadienne De Recherche Veterinaire*, 74, 161-169.
- Golberg, D., Kroupitski, Y., Belausov, E., Pinto, R. & Sela, S. 2011. *Salmonella typhimurium* internalization is variable in leafy vegetables and fresh herbs. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 250-257.
- Gomes, C., Moreira, R. G., Castell-Perez, M. E., Kim, J., Da Silva, P. & Castillo, A. 2008. E-beam irradiation of bagged, ready-to-eat spinach leaves (*Spinacea oleracea*): An engineering approach. *Journal of Food Science*, 73, E95-E102.
- Grimont, A. D. P. & Weill, F.-X. 2007. *Antigenic formulae of the Salmonella serovars* [Online]. Available: <http://nih.dmsc.moph.go.th/aboutus/media/antigenic%20formula%20of%20Salmonella.pdf> [Accessed 2012-05-07].
- Gunduz, G. T., Gonul, S. A. & Karapinar, M. 2009. Efficacy of myrtle oil against *Salmonella Typhimurium* on fresh produce. *International Journal of Food Microbiology*, 130, 147-150.
- Hanning, I. B., Nutt, J. D. & Ricke, S. C. 2009. Salmonellosis outbreaks in the united states due to fresh produce: Sources and potential intervention measures. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6, 635-648.



- Heaton, J. C. & Jones, K. 2008. Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere: A review. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 613-626.
- Hidalgo-Vila, J., Diaz-Paniagua, C., de Frutos-Escobar, C., Jimenez-Martinez, C. & Perez-Santigosa, N. 2007. *Salmonella* in free living terrestrial and aquatic turtles. *Veterinary Microbiology*, 119, 311-315.
- Hogg, S. 2005. *Essential microbiology*, Chichester, John Wiley & Sons Ltd.
- Ingledew, W. J. & Poole, R. K. 1984. The respiratory chains of *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*, 48, 222-271.
- Islam, M., Doyle, M. P., Phatak, S. C., Millner, P. & Jiang, X. P. 2005. Survival of *Escherichia coli* O157 : H7 in soil and on carrots and onions grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Food Microbiology*, 22, 63-70.
- Islam, M., Morgan, J., Doyle, M. P., Phatak, S. C., Millner, P. & Jiang, X. P. 2004. Fate of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on carrots and radishes grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 2497-2502.
- Itoh, Y., Sugita-Konishi, Y., Kasuga, F., Iwaki, M., Hara-Kudo, Y., Saito, N., Noguchi, Y., Konuma, H. & Kumagai, S. 1998. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 present in radish sprouts. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 1532-1535.
- Jaquette, C. B., Beuchat, L. R. & Mahon, B. E. 1996. Efficacy of chlorine and heat treatment in killing *Salmonella* Stanley inoculated onto alfalfa seeds and growth and survival of the pathogen during sprouting and storage. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 2212-2215.
- Jelacic, J. K., Damrow, T., Chen, G. S., Jelacic, S., Bielaszewska, M., Ciol, M., Carvalho, H. M., Melton-Celsa, A. R., O'Brien, A. D. & Tarr, P. I. 2003. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in montana: Bacterial genotypes and clinical profiles. *Journal of Infectious Diseases*, 188, 719-729.
- Jerse, A. E., Yu, J., Tall, B. D. & Kaper, J. B. 1990. A genetic-locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue-culture cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 7839-7843.
- Jones, B. D. 2005. *Salmonella* invasion gene regulation: A story of environmental awareness. *Journal of Microbiology*, 43, 110-117.
- Jores, J., Rumer, L. & Wieler, L. H. 2004. Impact of the locus of enterocyte effacement pathogenicity island on the evolution of pathogenic *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology*, 294, 103-113.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P. & Mobley, H. L. T. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 123-140.
- Kemikalieinspektionen. 1998. *Teknisk beskrivning av ämnet hypokloriter* [Online]. Available: <http://apps.kemi.se/flodessok/floden/kemamne/hypokloriter.htm> [Accessed 2012-05-16 2012].
- Knutton, S., Rosenshine, I., Pallen, M. J., Nisan, I., Neves, B. C., Bain, C., Wolff, C., Dougan, G. & Frankel, G. 1998. A novel *espa*-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. *Embo Journal*, 17, 2166-2176.
- Lim, C. H. & Flint, K. P. 1989. The effects of nutrients on the survival of *Escherichia coli* in lake water. *Journal of Applied Bacteriology*, 66, 559-569.
- Louise, C. B. & Obrig, T. G. 1995. Specific interaction of *escherichia-coli* O157:H7-derived shiga-like toxin-II with human renal endothelial-cells. *Journal of Infectious Diseases*, 172, 1397-1401.
- Luo, Y. G., He, Q. A. & McEvoy, J. L. 2010. Effect of storage temperature and duration on the behavior of *Escherichia coli* O157:H7 on packaged fresh-cut salad containing romaine and iceberg lettuce. *Journal of Food Science*, 75, M390-M397.
- Mandrell, R. E. 2010. Tracing pathogens in fruit and vegetable production chains. In: Brul, S., Fratamico, P. M. & Mcmeekin, T. A. (eds.) *Tracing pathogens in the food chain*. Cambridge: Woodhead Publ Ltd.
- Martelli, F. & Davies, R. H. 2012. *Salmonella* serovars isolated from table eggs: An overview. *Food Research International*, 45, 745-754.

- McKellar, R. C. & Delaquis, P. 2011. Development of a dynamic growth-death model for *Escherichia coli* O157:H7 in minimally processed leafy green vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, 151, 7-14.
- Meakin, H. & Dickinson, M. 2006. Microbial contamination of ready-to-eat salad vegetables. *Outlooks on Pest Management*, 17, 225-227.
- Mellmann, A., Bielaszewska, M., Kock, R., Friedrich, A. W., Fruth, A., Middendorf, B., Harmsen, D., Schmidt, M. A. & Karch, H. 2008. Analysis of collection of hemolytic uremic syndrome-associated enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases*, 14, 1287-1290.
- Melton-Celsa, A. R., Darnell, S. C. & O'Brien, A. D. 1996. Activation of shiga-like toxins by mouse and human intestinal mucus correlates with virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91:H21 isolates in orally infected, streptomycin-treated mice. *Infection and Immunity*, 64, 1569-1576.
- Mermin, J., Hutwagner, L., Vugia, D., Shallow, S., Daily, P., Bender, J., Koehler, J., Marcus, R., Angulo, F. J. & Emerging Infections Program, F. 2004. Reptiles, amphibians, and human *Salmonella* infection: A population-based, case-control study. *Clinical Infectious Diseases*, 38, S253-S261.
- Nannapaneni, R., Muthaiyan, A., Crandall, P. G., Johnson, M. G., O'Bryan, C. A., Chalova, V. I., Callaway, T. R., Carroll, J. A., Arthington, J. D., Nisbet, D. J. & Ricke, S. C. 2008. Antimicrobial activity of commercial citrus-based natural extracts against *Escherichia coli* O157:H7 isolates and mutant strains. *Foodborne Pathogens and Disease*, 5, 695-699.
- Nataro, J. P. & Kaper, J. B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11, 142-+.
- Ng, P. J., Fleet, G. H. & Heard, G. M. 2005. Pesticides as a source of microbial contamination of salad vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, 101, 237-250.
- Nguyen, R. N., Taylor, L. S., Tauschek, M. & Robins-Browne, R. M. 2006. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* infection and prolonged diarrhea in children. *Emerging Infectious Diseases*, 12, 597-603.
- Nicholson, F. A., Groves, S. J. & Chambers, B. J. 2005. Pathogen survival during livestock manure storage and following land application. *Bioresource Technology*, 96, 135-143.
- Nielsen, E. M., Skov, M. N., Madsen, J. J., Lodal, J., Jespersen, J. B. & Baggesen, D. L. 2004. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in wild birds and rodents in close proximity to farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 6944-6947.
- Niemira, B. A. & Cooke, P. H. 2010. *Escherichia coli* O157:H7 biofilm formation on romaine lettuce and spinach leaf surfaces reduces efficacy of irradiation and sodium hypochlorite washes. *Journal of Food Science*, 75, M270-M277.
- Nygaard, K., Lassen, J., Vold, L., Andersson, Y., Fisher, I., Lofdahl, S., Threlfall, J., Luzzi, I., Peters, T., Hampton, M., Torpdahl, M., Kapperud, G. & Aavitsland, P. 2008. Outbreak of *Salmonella* Thompson infections linked to imported rucola lettuce. *Foodborne Pathogens and Disease*, 5, 165-173.
- Oliveira, M., Usall, J., Solsona, C., Alegre, I., Vinas, I. & Abadias, M. 2010. Effects of packaging type and storage temperature on the growth of foodborne pathogens on shredded 'romaine' lettuce. *Food Microbiology*, 27, 375-380.
- Orskov, I., Orskov, F., Jann, B. & Jann, K. 1977. Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. *Bacteriological Reviews*, 41, 667-710.
- Pennycott, T. W., Park, A. & Mather, H. A. 2006. Isolation of different serovars of *Salmonella enterica* from wild birds in great britain between 1995 and 2003. *Veterinary Record*, 158, 817-820.
- Pezzoli, L., Elson, R., Little, C. L., Yip, H., Fisher, I., Yishai, R., Anis, E., Valinsky, L., Biggerstaff, M., Patel, N., Mather, H., Brown, D. J., Coia, J. E., van Pelt, W., Nielsen, E. M., Ethelberg, S., de Pinna, E., Hampton, M. D., Peters, T. & Threlfall, J. 2008. Packed with *Salmonella*-investigation of an international outbreak of *Salmonella* Senftenberg infection linked to contamination of prepacked basil in 2007. *Foodborne Pathogens and Disease*, 5, 661-668.
- Pierard, D., Muyldermans, G., Moriau, L., Stevens, D. & Lauwers, S. 1998. Identification of new verocytotoxin type 2 variant b-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 3317-3322.

- Risikobewertung, B. f. 2011. *EHEC outbreak: Bfr confirms contamination of sprouts with O104:H4* [Online]. Available: [http://www.bfr.bund.de/en/press\\_information/2011/17/ehec\\_outbreak\\_bfr\\_confirms\\_contamination\\_of\\_sprouts\\_with\\_o104\\_h4-70976.html](http://www.bfr.bund.de/en/press_information/2011/17/ehec_outbreak_bfr_confirms_contamination_of_sprouts_with_o104_h4-70976.html) [Accessed 2012-05-07].
- Rohde, H., Qin, J. J., Cui, Y. J., Li, D. F., Loman, N. J., Hentschke, M., Chen, W. T., Pu, F., Peng, Y. Q., Li, J. H., Xi, F., Li, S. H., Li, Y., Zhang, Z. X., Yang, X. W., Zhao, M. R., Wang, P., Guan, Y. L., Cen, Z., Zhao, X. N., Christner, M., Kobbe, R., Loos, S., Oh, J., Yang, L., Danchin, A., Gao, G. F., Song, Y. J., Li, Y. R., Yang, H. M., Wang, J., Xu, J. G., Pallen, M. J., Aepfelbacher, M., Yang, R. F. & Crowd-Sourcing, E. c. O. H. G. A. 2011. Open-source genomic analysis of shiga-toxin-producing *E. coli* O104:H4. *New England Journal of Medicine*, 365, 718-724.
- Rosner, B., Bernard, H., Werber, D., Faber, M., Stark, K. & Krause, R. 2011. Epidemiology of EHEC O104: H4/hus outbreak in germany, may to july 2011. *Journal Fur Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit-Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 6, 473-481.
- Santos, R. L., Tsolis, R. M., Baumler, A. J. & Adams, L. G. 2003. Pathogenesis of *Salmonella*-induced enteritis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36, 3-12.
- Savarino, S. J., Fasano, A., Watson, J., Martin, B. M., Levine, M. M., Guandalini, S. & Guerry, P. 1993. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin-1 represents another subfamily of *Escherichia coli* heat-stable toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 3093-3097.
- Scaletsky, I. C. A., Fabbriotti, S. H., Carvalho, R. L. B., Nunes, C. R., Maranhao, H. S., Morais, M. B. & Fagundes-Neto, U. 2002. Diffusely adherent *Escherichia coli* as a cause of acute diarrhea in young children in northeast brazil: A case-control study. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 645-648.
- Scaletsky, I. C. A., Silva, M. L. M. & Trabulsi, L. R. 1984. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to hela-cells. *Infection and Immunity*, 45, 534-536.
- Schmidt, H., Scheef, J., Morabito, S., Caprioli, A., Wieler, L. H. & Karch, H. 2000. A new shiga toxin 2 variant (stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1205-1208.
- Schmitt, C. K., McKee, M. L. & O'Brien, A. D. 1991. 2 copies of shiga-like toxin-ii-related genes common in enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains are responsible for the antigenic heterogeneity of the O157-H- strain-e32511. *Infection and Immunity*, 59, 1065-1073.
- Sears, C. L. & Kaper, J. B. 1996. Enteric bacterial toxins: Mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiological Reviews*, 60, 167-215.
- Sharma, M., Lakshman, S., Ferguson, S., Ingram, D. T., Luo, Y. G. & Patel, J. 2011. Effect of modified atmosphere packaging on the persistence and expression of virulence factors of *Escherichia coli* O157:H7 on shredded iceberg lettuce. *Journal of Food Protection*, 74, 718-726.
- Shaw, R. K., Berger, C. N., Feys, B., Knutton, S., Pallen, M. J. & Frankel, G. 2008. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* exploits espa filaments for attachment to salad leaves. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 2908-2914.
- Sheikh, J., Czczulin, J. R., Harrington, S., Hicks, S., Henderson, I. R., Le Bouguenec, C., Gounon, P., Phillips, A. & Nataro, J. P. 2002. A novel dispersin protein in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Investigation*, 110, 1329-1337.
- Smittskyddsinstitutet. 2011a. *Sjukdomsinformation om enterohemorragisk E. coli-infektion (ehec)* [Online]. Available: <http://www.smittskyddsinstitutet.se/sjukdomar/enterohemorragisk-e-coli-infektion/> [Accessed 2012-05-04].
- Smittskyddsinstitutet. 2011b. *Sjukdomsinformation om salmonellainfektion* [Online]. Available: <http://www.smittskyddsinstitutet.se/sjukdomar/salmonellainfektion/> [Accessed 2012-05-07].
- Sonntag, A. K., Bielaszewska, M., Mellmann, A., Dierksen, N., Schierack, P., Wieler, L. H., Schmidt, M. A. & Karch, H. 2005. Shiga toxin 2e-producing *Escherichia coli* isolates from humans and pigs differ in their virulence profiles and interactions with intestinal epithelial cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 8855-8863.
- Taban, B. M. & Halkman, A. K. 2011. Do leafy green vegetables and their ready-to-eat rte salads carry a risk of foodborne pathogens? *Anaerobe*, 17, 286-287.

- Tauxe, R. V., Doyle, M. P., Kuchenmuller, T., Schlundt, J. & Stein, C. E. 2010. Evolving public health approaches to the global challenge of foodborne infections. *International Journal of Food Microbiology*, 139, S16-S28.
- Trinetta, V., Vaidya, N., Linton, R. & Morgan, M. 2011. A comparative study on the effectiveness of chlorine dioxide gas, ozone gas and e-beam irradiation treatments for inactivation of pathogens inoculated onto tomato, cantaloupe and lettuce seeds. *International Journal of Food Microbiology*, 146, 203-206.
- Tzschoppe, M., Martin, A. & Beutin, L. 2012. A rapid procedure for the detection and isolation of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (ehc) serogroup O26, O103, O111, O118, O121, O145 and O157 strains and the aggregative EHEC O104:H4 strain from ready-to-eat vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, 152, 19-30.
- Wallace, J. S., Cheasty, T. & Jones, K. 1997. Isolation of vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from wild birds. *Journal of Applied Microbiology*, 82, 399-404.
- Weiss, A., Schmidt, H. & Stober, H. 2011. Mechanisms of enterohemorrhagic *Escherichia coli* spread along the food-chain and precautionary measures. *Zeitschrift für Verbraucherschutz Lebensmittelsicherheit-Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 6, 503-510.
- Williams, D. M., Sreedhar, S. S., Mickell, J. J. & Chan, J. C. M. 2002. Acute kidney failure - a pediatric experience over 20 years. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*, 156, 893-900.
- Winfield, M. D. & Groisman, E. A. 2003. Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 3687-3694.
- Wingender, J. & Flemming, H. C. 2011. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 214, 417-423.
- Wong, C. S., Jelacic, S., Habeeb, R. L., Watkins, S. L. & Tarr, P. I. 2000. The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157 : H7 infections. *New England Journal of Medicine*, 342, 1930-1936.
- Wu, S. J., Nishihara, M., Kawasaki, Y., Yokoyama, A., Matsuura, K., Koga, T., Ueno, D., Inoue, K. & Someya, T. 2009. Inactivation of *Escherichia coli* in soil by solarization. *Soil Science and Plant Nutrition*, 55, 258-263.
- Xicohtencatl-Cortes, J., Chacon, E. S., Saldana, Z., Freer, E. & Giron, J. A. 2009. Interaction of *Escherichia coli* O157:H7 with leafy green produce. *Journal of Food Protection*, 72, 1531-1537.
- Zhang, W. L., Bielaszewska, M., Kuczius, T. & Karch, H. 2002. Identification, characterization, and distribution of a shiga toxin 1 gene variant (stx(1c)) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 1441-1446.