

Vurdering fra DTU Fødevareinstituttet: Mikrobiologiske risici ved frugt og grønt

Vurdering fra DTU Fødevareinstituttet: Mikrobiologiske risici ved frugt og grønt

DTU Fødevareinstituttet har for Fødevarestyrelsen udarbejdet en vurdering af risikoen for forekomsten sygdomsfremkaldende mikroorganismer i frugt og grønt på det danske marked. Vurderingen indeholder svar på, hvilke faktorer, der påvirker forekomsten af sygdomsfremkaldende bakterier og virus, og hvad mulighederne er for at forebygge fødevareoverførte sygdomme hos mennesker fra frugt og grønt.

Vurderingen bliver indledt med en opsummering af:

- Risici for forurening af frugt og grønt med sygdomsfremkaldende mikroorganismer
- Vurdering af den relative risiko ved forskellige typer af frugt og grønt
- Eksponering og muligheder for at udarbejde smitekilderegnskab for frugt og grønt
- Vurdering af hvilke analysedata, der skal indgå i smitekilderegnskab for frugt og grønt
- Vurdering af den statistiske sikkerhed ved forskellige typer stikprøveplaner
- Vurdering af omfanget af prøver til kvantitativ mikrobiologisk risikovurdering
- Vurdering af hvilke analyseparametre og – metoder der er relevante i Danmark
- Vurdering af anbefalingen til forbrugerne om at skylle frugt og grønt
- Vurdering af mikrobiologiske undersøgelser af spirer

Derudover består vurderingen af fire appendiks, som danner baggrunden for opsummeringen. Vurderingen blev afleveret til Fødevarestyrelsen august 2011 og har dannet grundlag for Fødevarestyrelsens Redegørelse om initiativer i kontrollen med frugt og grønt 2011.

DTU Fødevareinstituttet
Afdelingen for Fødevaremikrobiologi & Afdelingen for Epidemiologi og Genomisk Mikrobiologi
September 2012

Dorte Lau Baggesen
Annette Nygaard Jensen
Jens Kirk
Jeppe Boel
Anne Wingstrand
Tine Hald

Redegørelse fra DTU Fødevareinstituttet: Mikrobiologiske risici ved frugt og grønt

Indledende bemærkninger

Jord-til-Bord løsninger

Erfaring fra Danmark, såvel som fra andre lande, viser at der ofte i kølvandet på større fødevarerudbrud opstår et pres for en større grad af kontrol baseret på analyser af stikprøver af færdige fødevarer. Det bør fastholdes, at i de allerfleste tilfælde opnås den mest effektive forebyggelse ved ændringer i landbrugsmæssig praksis i primærproduktionen. Den tidligere ensidige anvendelse af kontrolanalyser af slutprodukter til forebyggelse af fødevarerudbrud har i praksis vist sig utilstrækkelig. Dette forhold skabte baggrunden for et paradigmeskift frem mod Jord-til-Bord tankegangen i midten af 90'erne. Konceptet er accepteret internationalt, men er i realiteten kun indført i en mindre række lande, heriblandt Danmark. Det har betydet at en række af de relevante fødevarerpatogener nu bekæmpes i primærproduktionen, når det gælder kødrelaterede fødevarer, f.eks. med betydelig succes i den danske Salmonella bekæmpelse.

Mens denne erkendelse initialt relaterede sig til tarmpatogener i kød, adskiller forekomst af tilsvarende patogener i frugt og grønt sig principielt ikke herfra. Problemstillingen i frugt og grønt opstår ofte som følge af forurening af produktet i primærproduktionen, i dette tilfælde på markerne, pga. landbrugsmæssig praksis (uhensigtsmæssig anvendelse af husdyrgødning eller spildevandsslam på afgrøder eller fækal forurening af vandingsvand). De mest effektive løsninger på sådanne problemstillinger er ofte netop i det primære produktionssystem, et system, der ofte ligger uden for Danmarks – og EU's – grænser. Betydningen af relevant oplysning og uddannelse af såvel ledelse som arbejdsstyrke involveret i primærproduktionen bør derfor ikke undervurderes, og adskillige specifikke tilfælde af frugt/grønt relaterede udbrud har da også specifikt medført en effektiv opfølgning, inkluderende træning og uddannelse i eksporterende lande (eksempelvis efter udbrud i USA forårsaget af import fra Guatemala og Mexico).

Specifikke problemstillinger vedr. stikprøvebaseret overvågning og kontrol

Det er vigtigt at enhver anvendelse af (nødvendige) kontrolanalyser funderes i en vurdering af den videnskabelige baggrund for stikprøvetagning relateret til den enkelte problemstilling – typisk kombineret med en bredere analyse af praktiske og økonomiske muligheder. Overvågning og kontrol af fødevarer foregår typisk ved udtagning af stikprøver af partier. Det er i sagens natur ikke muligt at udtage prøver af alle enheder i et parti; udover at det vil være omkostningsfuldt, vil det i praksis medføre væsentlige restriktioner i mængden af fødevarer til distribution.

Stikprøvebaserede programmer medfører imidlertid altid en vis usikkerhed og det er ikke muligt med 100% sikkerhed at teste et parti fødevarer fri for forekomst af sygdomsfremkaldende mikroorganismer. Det skyldes, at der altid vil være en risiko for at man ikke får udtaget prøver af netop de enheder som er forurenede. Denne usikkerhed kaldes den statistiske usikkerhed. Risikoen for at "frikende" et parti som rent faktisk er forurenede vil være højere, hvis forekomsten i partiet er lav dvs. at få enheder er forurenede. Den statistiske usikkerhed kan mindskes ved at øge antallet af stikprøver med deraf følgende stigning i omkostninger.

Udover den statistiske usikkerhed taler man også om analysemetodens følsomhed som er et udtryk for, hvor god metoden er til at påvise mikroorganismer i en forurenede prøve. Reglen er at ingen metode er 100% effektiv. Så selvom man rent faktisk får udtaget prøver af de forurenede enheder i et parti kan det være, at mængden af mikroorganismer i prøven er så lav, at analysemetoden ikke er i stand til at påvise dem. Analysemetodens følsomhed vil derfor også være med til at øge usikkerheden af stikprøveresultatet.

Både den statistiske usikkerhed og analysemetodens følsomhed er vigtige at overveje, når man skal fastsætte formålet med en given overvågning/kontrol, herunder hvilke konsekvenser stikprøveresultaterne skal have for den resterende del af partiet og/eller producenten.

1. Risici for kontaminering af frugt og grønt

Det antages, at frugt og grønt vil kunne kontamineres under flere af processerne fra Jord til Bord (– herunder dyrkning, gødsning, vanding, høst, transport, opbevaring, forarbejdning og håndtering i en gros og detailedet). Afsnittet beskriver, hvilke faktorer – tillige med disses relative betydning – der kan bidrage til kontaminering og eventuelt vækst af sygdomsfremkaldende mikroorganismer i forbindelse med håndtering af frugt og grønt.

Risikoen for kontaminering af frugt og grønt med uønskede mikroorganismer (bakterier, virus, protozoer) fra jord til bord, afgøres af et komplekst samspil af en række faktorer gennem hele produktionskæden i forbindelse med dyrkning, gødsning, vanding, høst, opbevaring, forarbejdning/håndtering og distribution. Den største fødevarerikkerhedsmæssige effekt vil opnås ved at fokusere på at forhindre overførsel af humanpatogene mikroorganismer til frugt og grønt, dels i primærproduktionen og dels i senere led produktionskæden. Mikroorganismene overføres via fækal forurening fra husdyr, den vilde fauna, eller mennesker (virus i opkast) og evt. indirekte via kontamineret vand, miljø eller udstyr. I primærproduktionen er anvendelse af husdyrgødning derfor en stor potentiel kilde til forurening med uønskede mikroorganismer. Ved gødsning af grøntsager med husdyrgødning i Danmark, anbefales det at anvende kompostet gødning (Rådets forordning (EF) nr. 834/2007 og Vejledning om økologisk jordbrugsproduktion 2010). Der synes dog ikke at være direkte lovmæssige krav til behandling af almindelig husdyrgødning, eller til minimum tidsinterval mellem udbringning af husdyrgødning og plantning/såning eller høst. I praksis anvendes både ubehandlet gylle og fast gødning (ukontrolleret kompostering). Dette er i kontrast til f.eks. USA (National Organic Farming) og det private verdensomspændende certificeringsorgan Global G.A.P. (Good Agricultural Practice), hvor der er specifikke regler mht. behandling af husdyrgødning (kontrolleret kompostering med specifikke temperatur krav) og tidsintervaller mellem udbringning og plantning/såning eller høst. Ligeledes angiver en række guidelines (FDA, 1998, 2007; Codex, 2010, WHO, 2011), at en god praksis mht. anvendelse af husdyrgødning betyder, at man IKKE benytter ubehandlet gødning, eller at man maksimerer tidsintervallet mellem anvendelse og plantning/såning eller høst.

Ved høst og i de videre led i produktionskæden frem til forbrugerne, vil der ske en håndtering som indebærer kontakt til mennesker, udstyr/miljø og vand. Denne kontakt indebærer en risiko for eksponering til uønskede mikroorganismer. Der bør være særlig fokus på personhygiejne (fækalier, opkast (virus) i denne del af produktionskæden pga. den direkte manuelle håndtering af produkter. Etablering af god hygiejne og håndterings praksis, herunder uddannelse af medarbejdere og vand af

god mikrobiologisk kvalitet (vask, rengøring), vil mindske risikoen for smitte af produkter med uønskede mikroorganismer.

Overordnet vil den reelle smitterisiko fra eventuelt kontamineret frugt og grønt afhænge af den endelige forekomst af humanpatogene mikroorganismer i spiseklare produkter. Den endelige forekomst i produktet vil i høj grad afhænge af fysisk-kemiske faktorer (f.eks. temperatur, UV eksponering, fugtighed, næringsstoffer), der påvirker mikroorganismernes overlevelse og evt. opformering (bakterier). Konkret viden om de enkelte faktorerers betydning er fortsat mangelfulde. Desuden er forbrugeradfærd afgørende for smitterisikoen, da grøntsagstyper som indtages uden yderligere forarbejdning, udgør en langt større risiko end varmebehandlede produkter.

FØR-HØST

Fra starten af vækstperioden til høsttidspunktet, vil dyrkningsforhold, gødsning og vanding have en betydning for overførsel af humanpatogene mikroorganismer til grøntsager og bær. Mikroorganismene overføres via fækal forurening fra husdyr, den vilde fauna, eller mennesker (virus i opkast) og evt. indirekte via kontamineret vand eller udstyr. Generelt i forbindelse med gødsning vil smitterisikoen være størst ved anvendelse af ubehandlet husdyrgødning, der er et velkendt og vigtigt reservoir for zoonotiske patogener, såsom *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157 og andre verotoxinproducerende *E. coli* (VTEC) samt *Campylobacter*. Behandling af husdyrgødning vil typisk være kompostering, hvor der sker en varmeudvikling, som er med til at sikre et henfald af patogene mikroorganismer. Henfaldet er dog betinget af at der opnås bestemte temperaturer over et givet tidsinterval (kontrolleret kompostering). Desuden vil smitterisikoen afhænge af alderen af gødningen på udbringningstidspunktet. Frisk gødning (f.eks. kontinuert input til gylletank) vil indeholde flest mikroorganismer og der med udgøre størst risiko. Smitterisikoen vil også forøges jo tættere udbringning sker på plantning/såning og eller høst.

Udbringningsmetode/jordbehandling vil have betydning for muligheden for direkte kontakt mellem gødning og planterne og dermed også af plantetypen. Ved vanding er den mikrobiologiske kvalitet af vandet af stor betydning. Desuden vil vandingsmetoder, hvor evt. forurenede vand kommer i direkte kontakt med den spiselige del af planterne (f.eks. sprinkler), eller indirekte forårsager plask af forurenede jord, udgøre den største risiko i forhold til metoder, hvor vandet ikke kommer i direkte kontakt (f.eks. drypvanding).

Bær og grøntsager med størst eksponering til den vilde fauna, f.eks. friland versus drivhus, vil være mest udsat for smittefare. Desuden er marker, hvor der er en risiko for oversvømmelse eller afstrømning fra tilstødende (forurenede) marker, ekstra udsatte mht. smitterisiko.

Udover planternes eksponering til humanpatogene mikroorganismer, er vækst/henfald af disse mikroorganismer i og på planter af stor betydning. Meget af den nuværende viden om vækst/henfald er baseret på eksperimentelle forsøg, som kan være svært at overføre til naturlige forhold. Overlevelse og potentiel opformering af humanpatogene mikroorganismer på planter, vil afhænge af typen af plante (struktur/overflade), graden af UV-lys eksponering, temperaturforhold, fugtighed og næringsstof-tilgængelighed. Beskadigelser i plantevævet eller plantesygdomme kan eventuelt fremme koloniseringen af planter med patogener. Generelt er overlevelsestiden på planter længst for virus og dernæst bakterier og protozoer (WHO, 2006).

HØST/EFTER-HØST

Hele produktionskæden fra høst og frem til bordet indeholder mange trin, hvor råvarer alt efter produkttype, er i kontakt med mennesker, udstyr og overflader, vand og miljø (jord, støv og fauna). I

hvert af disse trin vil der kunne tilføres mikrobiel forurening. Den manuelle håndtering af produkter ved høst og forarbejdning betyder at en god personhygiejne (fækalier, opkast (virus)) er vigtig i denne del af produktionskæden. For eksempel har syge bærplukkere været årsag til udbrud med norovirus fra hindbær. Etablering af god hygiejne og håndterings praksis, herunder uddannelse af medarbejdere, vil være med til at forhindre smitte af produkter fra mennesker, udstyr, miljø og vand. En praksis med et adskilt flow mellem indgående råvarer og udgående produkter vil f.eks. mindske risikoen for krydskontaminering. Vand anvendes til mange formål, f.eks. vask, rengøring og nedkøling. Anvendelse af vand af god mikrobiologisk kvalitet vil også mindske smitterisikoen.

Som gældende før høst, er henfald/vækst af uønskede mikroorganismer i og på planter af stor betydning for den endelige smitterisiko. Hæmning af vækst, f.eks. ved nedkøling, er vigtigt for ikke at overskride den infektiøse dosis af patogenet, hvorved risikoen for human infektion mindskes. Selvom nogle forarbejdningstrin potentielt kan mindske mikrobielle risici (f.eks. vask), kontrollere mikrobiel vækst (f.eks. nedkøling) og beskytte produktet mod yderligere eksponering (f.eks. emballage), vil den største effekt mht. fødevarer sikkerhed dog opnås ved helt at undgå kontaminering med uønskede mikroorganismer tilbage i primærproduktion.

Baggrundsmateriale for afsnittet fremgår af appendiks 3.

2. Vurdering af relative risiko ved forskellige typer frugt og grønt

Forskellige typer af frugt og grønt – herunder bl.a. salat, tomater, krydderurter, meloner, æbler og spirer - har været beskrevet som vehikel i flere større fødevarerborne sygdomsudbrud over hele verden. Afsnittet beskriver DTU Fødevarer instituttets vurdering af den relative risiko relateret til de forskellige typer af frugt og grønt, der er på markedet. Vurderingen indeholder tillige, så vidt det er muligt, betydningen af forskellige distributionsruter – herunder bl.a. direkte salg til forbruger, dagligvare-forretninger, restaurationssektoren og cateringvirksomheder.

Et stigende antal fødevarerborne udbrud i såvel Danmark som EU og USA er gennem de seneste år blevet relateret til forurenede frugt og grønt. Årsagerne, hvad angår såvel agens som produkttype, er mangfoldige, men Norovirus, Salmonella og i mindre omfang sygdomsfremkaldende E. coli er de hyppigste agens, mens især bær og bladsalat er hyppige fødevarer kilder. Også flere typer af spirer har verden over været kilde til flere udbrud. Herudover er lectin og cucurbitacin relative hyppige årsager til kemiske fødevarerforgiftninger.

Udbrudsdata bidrager til vurdering af betydningen af forurenede frugt og grønt som årsag til sygdom hos mennesker, men mangfoldigheden i agens og produkttyper, der har været relateret til udbrud, indikerer, at stort set alle typer af frugt og grønt og alle mikrobiologiske agens under uheldige omstændigheder kan spredes via denne type fødevarer. Forurening af produkterne sker dels i primærproduktionen og dels sekundært ved håndtering i produktionskæden inkl. tilberedning. Sidstnævnte har især givet anledning til en række udbrud i restauranter, catering og private hjem forårsaget af Norovirus. Forurenede frugt og grønt kan, udover at give anledning til fødevarerborne udbrud, også være årsag til sporadiske infektioner hos mennesker, men omfanget af disse infektioner er vanskeligt at vurdere på grundlag af eksisterende data. I relation hertil bør opmærksomhed rettes

mod, at nogle agens under visse forhold (især ved lavkontaminerede eller små partier af fødevarer) kan have væsentlig betydning som årsag til sporadiske tilfælde uden at optræde i udbrudsstatistikken.

Frugt, grønt og urter bidrager med knap 15 % af de fødevarerbårne udbrud i Danmark og 23% af de udbrudsrelaterede sygdomstilfælde. Tallet varierer dog fra 7 til 22% af udbruddene. I opgørelser af udbrud fra EU udgør frugt, grønt og urter kun få procent af udbruddene men 5% af sygdomstilfældene. I USA udgør udbrud fra frugt grønt og urter 13% af udbruddene og 21% af sygdomstilfældene. Det skal understreges at der er betydelige forskelle i, hvordan udbrud rapporteres i hhv. EU og USA, så de angivne procentdele kan ikke umiddelbart sammenlignes.

Norovirus er årsag til knap halvdelen af udbruddene fra frugt og grønt både i Danmark, EU og USA. I Danmark udgør udbrud med toxiner (primært lectin og cucurbitacin) 29% af de 34 registrerede udbrud, Salmonella 9% og patogener E. coli 6%. I EU er der sammenlignet med Danmark registreret en større andel udbrud med Clostridier, og i USA udgør Salmonella en større andel af udbrudsårsagerne end i Danmark.

Bær (hindbær) er den hyppigste årsag til udbrud fra frugt og grønt i Danmark. Selv når to grupper af udbrud fra hhv. hindbær i 2005 og lollo bionda salat i 2010 kun regnes for eet udbrud hver, udgør udbrud fra hindbær en fjerdedel af de 34 udbrud. Udbrud fra tørrede bønner (lectin) og squash (cucurbitacin) udgør tilsvarende henholdsvis 18% og 12% af udbrudskilderne, mens bladsalat er kilden til 15% af udbruddene fra frugt og grønt. I EU er detaljer om frugt og grønt udbrudskilderne ikke nemt tilgængelige, men grønt er hyppigere registreret som kilde til udbrud end frugt og friske krydderurter. I USA er blandede salater og blandet frugt samlet årsag til mere end halvdelen af alle udbrud fra grønt, frugt og urter. I to tredjedele af disse udbrud er patogenet ikke kendt. Salat er den hyppigste enkeltkilde til udbrud i USA (13%) efterfulgt af melon, spirer, juice og bær med hver 5-7%.

De hyppigste lokaliteter for de 34 danske udbrud fra grønt- og frugt er kantiner (24%), restaurant/catering (24%) og private fester (21%). De forskellige grønt- og frugttyper og patogener som kilde til udbrud er ikke ligeligt fordelt på udbrudslokaliteter. I USA er lokaliteten for halvdelen af udbruddene fra frugt og grønt restauranter og lignende, mens 13% af udbruddene er i private hjem. Fordelingen af lokaliteter for udbrud fra frugt og grønt i EU kunne ikke opgøres.

Danmark har haft tre udbrud fra spirer (to salmonellaudbrud med *S. Newport* i 1995 og *S. Weltevreden* i 1997 samt VTEC/EHEC udbruddet fra 2011). Der er desuden blevet fundet patogener (*Listeria* og *Salmonella*) i spirer, som ikke kunne relateres til humane tilfælde.

Generelt kan det bemærkes, at frugt og grønt i en række case-kontrol undersøgelser af sporadiske (ikke udbrudsrelaterede) zoonotiske infektioner i de nordiske lande oftest peger på frugt og grønt som en tilsyneladende beskyttende faktor mod infektion, men en case-kontrol undersøgelse antyder, at specifikt spirer, kan være forbundet med sporadiske VTEC-infektioner i Danmark. Det må således stå som et åbent spørgsmål hvorvidt antallet af sporadiske zoonotiske infektioner forårsaget af frugt og grønt udviser samme billede som for andre fødevarer, hvor antallet af sporadiske tilfælde ofte er endog betydeligt højere end registrerede udbruds tilfælde.

Baggrundsmaterialet for afsnittet fremgår af appendiks 1.

3. Eksponering og muligheder for at udarbejde smittekilderegnskab for frugt og grønt

Afsnittet indeholder en vurdering af behovet – og mulighederne for - at udvikle et håndteringsmæssigt redskab i form af en matematisk baseret eksponeringsmodel, der ville kunne anvendes til at indikere, hvilke mikrobiologiske risici forbrugerne eksponeres for ved forskellige (eller ændrede) forbrugsmønstre, og hvis der sker ændringer i prævalens og kvantitativ forekomst af relevante sygdomsfremkaldende mikroorganismer i forskellige typer af frugt og grønt.

Eksponeringsmodel

En eksponeringsmodel estimerer, hvor meget af et givent patogen forbrugerne udsættes (eksponeres) for gennem forskellige smitekilder og smitteveje. I modsætning til en kvantitativ risikovurdering, som typisk kun beskæftiger sig med én patogen-fødevarer kombination, forsøger en eksponeringsvurdering at inddrage alle de vigtigste kilder og smitteveje. Til gengæld inkluderer eksponeringsvurderingen generelt mange færre trin i produktionskæden og dosis-respons modellen kan også vælges udeladt for at simplificere beregningerne. Resultaterne kan derfor udelukkende bruges til at vurdere den relative betydning af forskellige smitekilder og dermed den overordnede effekt af iværksatte kontrolforanstaltninger, mens de ikke kan anvendes til at vurdere effekten af mulige (dvs. ikke iværksatte) specifikke kontrolforanstaltninger, hvilket man typisk anvender en kvantitativ risikovurderingsmodel til.

En eksponeringsmodel kan betragtes som et alternativ til et typningsbaseret smittekilderegnskab. Der er dog en væsentlig forskel. Mens et typningsbaseret smittekilderegnskab henfører humane infektioner til et – oftest animalsk - reservoir (fx svin), foretager en eksponeringsmodel en relativ fordeling på kilder tæt på tidspunktet for konsumering (dvs. indtag/eksponering). Man vil derfor nødvendigvis ikke forvente, at de to typer af modeller giver fuldstændig samme resultater og valget af model vil bl.a. afhænge af formålet samt af hvilke data der er til rådighed.

En eksponeringsmodel vil især være relevant for:

- at få inkluderet en vurdering af kilder som ikke er blandt de typiske reservoirs for patogenet fx Salmonella eller VTEC fra frugt og grønt, hvor de primære reservoirs betragtes som animalske;
- at få vurderet den relative betydning af forskellige kilder så tæt på forbrugeren som muligt for fx at få belyst detailhandlens og forbrugernes roller bedre (fx Norovirus);
- patogener, hvor det er væsentlig at skelne mellem smitteveje indenfor samme reservoir fx fersk vs. tilberedte fødevarer (fx VTEC i hhv. oksekøds- og mejeriprodukter eller Salmonella i fersk svinekød og spiseklare svinekødsprodukter);
- patogener, hvor det primære reservoir er humant, men hvor smittevejene er mangfoldige (fx Norovirus og Shigella);
- patogener, hvor et typningsbaseret smittekilderegnskab endnu ikke er udviklet (fx Campylobacter) eller ikke kan udvikles, fordi der ikke eksisterer indlysende sammenhænge mellem specifikke patogen undertyper og reservoirs, evt. fordi problemet primært er relateret til produktionsmiljøet (fx Listeria).

Teoretisk set er en eksponeringsvurdering det mest præcise redskab man kan forestille sig til at få belyst samtlige kilder og deres betydning, men som følge af manglende data for såvel indtag og

forekomst i den store og heterogene gruppe af fødevarer er de fleste publicerede vurderinger ofte forbundet med store usikkerheder.

I Holland har man udarbejdet en eksponeringsmodel for *Campylobacter* spp. (Evers et al., 2008). I denne beregnes den gennemsnitlige dosis af *Campylobacter* indtaget per person per dag i gennemsnit over hele den hollandske befolkning via forskellige smitteveje, herunder indtagelse af fødevarer (animalsk og vegetabilsk oprindelse, rå og tilberedte), direkte kontakt med dyr (kæledyr, husdyr og "klappe-zoo" dyr) og vand (overflade- og drikkevand). Enogtredivet smitteveje blev undersøgt og ca. 2/3 af den gennemsnitlige eksponering blev relateret til direkte kontakt med dyr, mens 1/3 blev relateret til fødevarer. (Overflade) vand bidrog til ~1% af den samlede eksponering. Inden for fødevarer, blev rå eller delvist tilberedte fødevarer (kyllingelever, mælk, sild (traditionel hollandsk spise), og grønsager) udpeget som de vigtigste kilder til eksponering, mens kyllingekød udgjorde den vigtigste kilde til eksponering fra varmebehandlet kød.

McBride et al. (2005) har anvendt en lignende model til at sammenligne *Campylobacter* smitterisici fra fire af de store generelle smitteveje (fødevarer, "rekreativt svømmevand" (søer, åer, mv.), drikkevand og erhvervsmæssig kontakt med husdyr). I denne undersøgelse blev de gennemsnitlige anslåede daglige eksponeringer kombineret med en dosis-respons model til at estimere infektionsrisici. Som i den hollandske undersøgelse, var der stor usikkerhed på estimerne pga. utilstrækkelige data, og resultaterne blev angivet som foreløbige.

En eksponeringsvurdering rettet mod *Listeria monocytogenes* inkluderede udelukkende fødevarer, herunder specifikke middagsretter og spiseklare produkter (FDA, 2003). Denne undersøgelse identificerede kødpålæg som den vigtigste kilde til listeriose i USA og var understøttet af relative gode kvantitative data for forekomst af L.m. i fødevarer i detailhandlen.

DTU Fødevarerinstitutionen har gennem et Ph.D. projekt, der havde til formål at sammenligne forskellige metoder til at vurdere den relative betydning af forskellige kilder, udviklet en eksponeringsmodel for *Salmonella* i Danmark (Pires, 2009). Resultaterne antydede, at specielt frugt (~12%) og kæledyr (~10%) kunne udgøre en ikke uvæsentlig kilde til humane salmonella infektioner, men også i dette projekt var resultaterne forbundet med stor usikkerhed pga. manglende data vedr. indtag/eksponering og speciel kvantitativ forekomst for flere af kilderne.

Datakrav til en eksponeringsmodel

En eksponeringsmodel kræver følgende data:

- **Indtagsdata** af alle fødevarer, som ønskes inddraget i modellen fx opdelt på dansk og importeret, forarbejdet og fersk, etc., alt efter, hvor detaljeret resultaterne ønskes. Hvis det drejer sig om fødevarer der særligt spises af specielle befolkningsgrupper, kan det desuden være nødvendigt at opdele indtagsdata på fx alder, køn og/eller etnisk oprindelse. Indtagsdata opgøres normalt som gennemsnitligt indtag over fx gram pr. dag, men for en mikrobiologisk eksponeringsmodel vil det være mere ønskeligt med data om *frekvens* (dvs. hvor tit spises fødevareren) og *mængde pr. måltid*, da det i langt højere grad afspejler den reelle eksponering.
- **Prævalensdata** for alle fødevarer typer som ønskes inddraget i modellen. Prøverne som prævalens estimerne baseres på skal være udtaget, så de er repræsentative for det som danske forbrugere eksponeres for.

- **Kvantitative koncentrationsdata** dvs. antallet af patogener pr. gram af fødevaren. Koncentrationsdata varierer betydeligt og det er vigtigt, at denne variation fanges i data der bruges som input til modellen, da det er de (få) tilfælde med høje koncentrationer, som giver anledning til stor eksponering og dermed relativ større risiko for sygdom.

Alle ovennævnte data vil i en eksponeringsmodel beskrives ved hjælp af sandsynlighedsfordelinger. Sandsynlighedsfordelingerne tager højde for usikkerhed på data (og afhænger derfor af stikprøvestørrelsen) og forsøger desuden at beskrive den biologiske variation af de parametre som der måles på fx indtags- og koncentrationsdata.

Antallet af prøver, der skal analyseres for at tilvejebringe tilstrækkelige data for udarbejdelse af en eksponeringsmodel afhænger derfor af den ønskede præcision, den forventede biologiske variation samt det ønskede detaljeringsniveau. Ønsker man fx at eksponeringen fra en bestemt fødevarer (fx rucolasalat) eller fødevarerkategori (bladsalater) skal kunne opgøres på dansk og importeret skal der statistisk set tages dobbelt så mange prøver, som hvis denne opdeling ikke skal foretages for at opnå samme præcision. Det samme gælder for andre opdelinger som fx fersk vs. forarbejdet. Hvis det i øvrigt giver biologisk mening kan man ved estimering af fordelinger for patogenkoncentrationer vælge at kombinere data fra flere produkttyper (fx rucola og hovedsalat) og -niveauer (fx dansk og importeret) under antagelse af, at koncentrationen er den samme dvs. at en eventuel forskel i eksponering skyldes forskelle i prævalens og/eller indtag. Derved kan prøveantallet reduceres.

En eksponeringsvurdering kan i princippet også inddrage ikke fødevarerbarne kilder fx kontakt med husdyr eller kæledyr. Dette kræver imidlertid data om frekvens af kontakt med de pågældende dyr, samt forekomst (prævalens og koncentration) af det givne patogen i de pågældende dyr. Sådanne data er sjældent til rådighed i nødvendigt omfang.

Udfordringen ved udarbejdelse af en eksponeringsmodel vil være at vurdere, hvilke typer af fødevarer som er mest relevante at inddrage, samt at fremskaffe relevante data for indtag, forekomst og håndtering.

Gode indtagsdata vil i første omgang kunne bruges til at prioritere, hvilke kilder det er relevant at medtage i en eksponeringsmodel og vil senere skulle anvendes i selve modellen. Regelmæssig opdatering af indtagsdata (f.eks. hvert 3.-4. år) vil være nødvendigt for hele tiden have tal for den aktuelle forbrugereksponeering. Bedre og mere detaljerede indtagsdata vil desuden kunne fungere som hypotesegenererende værktøj i udbrudseftersporinger ved at koble demografi af patienter (køn, alder, etc.) med indtagsmønstre.

Muligheder for tilvejebringelse af relevante eksponeringsdata vedr. patogenforekomst diskuteres i afsnit 4. Fordelinger for prævalens og patogenkoncentrationer forventes at skulle estimeres på basis af eksisterende overvågningsdata og resultater fra (nye) målrettede screeningsundersøgelser, herunder CKL projekter. En eksponeringsmodel bør opdateres, når nye data bliver tilgængelige fx hvert 3.-4. år. For ikke-fødevarerbarne kilder som vurderes at være relevante at inkludere (fx kæledyr og vand (drikke-, vandings- eller "svømme"vand)) kan målrettede screeningsundersøgelser være med at afdække problemets omfang.

Data vedr. praksis for håndtering og tilberedning af fødevarer i detail- og specielt forbrugerleddet og disse processers betydning for krydssmitte og overlevelse af patogener, er for nuværende mangelfulde, men er vigtige parametre i en eksponeringsmodel (Nauta & Christensen, 2011). I bl.a. Holland (van Asselt et al., 2009; van Asselt et al., 2008; Nauta et al., 2008) er der lavet undersøgelser,

der har haft til formål at belyse betydningen af forbrugeradfærd, og data herfra kan anvendes i danske modeller med de forbehold som dette indebærer. Det kan dog overvejes at iværksætte et projekt som belyser problematikken under danske forhold og som evt. fokuseres på håndtering og anvendelse af forskellige typer af frugt og grønt (se også afsnit 8).

Alternative metoder

Der eksisterer andre metoder end det typningsbaserede smittetilregnskab og eksponeringsvurdering, der kan anvendes til at estimere den relative betydning af forskellige smitekilder.

For eksempel er udbrudsdata i mange lande den primære datakilde til viden om smitekilder til fødevarerborne infektioner. Et styrket udbrudsberedskab, hvor der bl.a. foretages en mere systematiseret indsamling af data fra fødevarerborne udbrud, vil kunne belyse kilder som ellers ikke identificeres. Et styrket udbrudsberedskab vil også øge muligheden for at følge udbruddene helt til dørs med henblik på at finde ud af præcis, hvad der gik galt, så lignende situationer kan forebygges i fremtiden. Bedre mikrobiologiske udbrudsdata, herunder afdækning af mængden af kontaminerede fødevarer og derved anslået antal eksponerede forbrugere samt evt. kendskab til koncentrationen af det pågældende patogen i fødevarer, vil desuden kunne anvendes direkte i en eksponeringsmodel.

Case-kontrol (interview) undersøgelse, hvor patienter og raske kontrolpersoner udspørges om, hvad de har været eksponeret for før sygdom/interview, identificerer risikofaktorer for sygdom, herunder fødevarerborne smitekilder, og vil i princippet kunne udpege fx specifikke frugter og grøntsager. Kvaliteten af undersøgelserne afhænger i høj grad af de interviewedes hukommelse og baseret på tidligere erfaringer har de ikke vist sig at være egnede til at skelne mellem danske og importerede fødevarer, da de interviewede generelt ikke ved eller kan huske dette. Desuden vil resultaterne kun afspejle et "snapshot" af situationen og vil ikke kunne anvendes som løbende "dynamisk overvågning".

Endelig har indtag af frugt og grønt i flere case-kontrol undersøgelser vist sig at reducere risikoen for sygdom. Årsagen hertil ikke klarlagt, men en af hypoteserne er, at det er biologisk betinget, således at folk der generelt spiser meget grønt er bedre beskyttet mod tarminfektioner. Årsagen kan dog også være mere simpel og opstå fordi folk der spiser mere grønt generelt spiser mindre kød, hvorved risikoen for eksponering nedsættes, da kød for mange af patogenerne fortsat er den primære smittetil til sporadiske infektioner. I en meta-analyse af 35 case-kontrol undersøgelser for sporadisk salmonellose foretaget i perioden fra 1989 til 2003 i 11 forskellige lande lå den samlede odds ratio for grøntsager og frugt på hhv. 0,6 og 0,5 (Domingues et al., submitted).

Integrering af metoder

De forskellige smittetilregnskabsmetoder (typningsbaserede, eksponeringsvurderinger, case-kontrol undersøgelser m.fl.) stiller forskellige krav til data og har forskellige metodemæssige karakteristika, såsom parametre, forudsætninger og antagelser, samt estimering af usikkerhed. Dertil kommer, at metoderne ofte kun fokuserer på ét punkt i produktionskæden (fx reservoir eller konsumering/eksponering) og typisk kun inddrager enten sporadiske eller udbrudsrelaterede infektioner. Dette betyder, at anvendelsen af kun én metode kan være utilstrækkelig til at besvare specifikke risikohåndterings spørgsmål (Pires et al., 2009; Hald et al., 2011). Det må derfor anbefales, at man så vidt muligt anvender flere metoder, hvor resultaterne sammenlignes og/eller integreres. Integrering af metoder diskuteres pt. i "smittetilregnskabdeforskerkredse", men det vil kræve en forskningsindsats for at få nogle af disse metoder udviklet til et niveau, hvor resultaterne kan bruges til risikohåndtering.

Som eksempler på integrering af metoder kan nævnes:

- Integrering af typningsbaserede metoder og eksponeringsvurderinger, hvor der i sidstnævnte skelnes mellem patogen undertyper, hvorved den relative betydning af smitteveje for infektioner med forskellige undertyper evt. indenfor samme reservoir kan vurderes.
- Integrering af eksponeringsvurderinger og case-kontrol undersøgelser, hvor sidstnævnte bl.a. kvantificere ikke-fødevarerborne risikofaktorer (fx prædisponerende faktorer) ved hjælp af odds ratios, der så kan anvendes i eksponeringsvurderinger for fx at tage højde for, at nogle befolkningsgrupper har større risiko for infektion end andre.
- Integrering af typningsbaserede metoder og data fra udbrudseftersporinger foretages allerede i det nuværende smittekileregnskab for Salmonella og kan hvor muligt og relevant udvides til andre patogener.
- Integrering af case-kontrol undersøgelser af sporadisk sygdom og analyse af data fra udbrudseftersporinger i samme tidsperiode kan være i stand til at vurdere den samlede relative betydning af kilder til både sporadiske og udbrudsrelaterede tilfælde. Resultater herfra må dog betragtes som retrospektive.
- Udvikling af eksponeringsmodeller, der i stand til også at inddrage udbrudsrelaterede tilfælde dvs. inkludere sandsynligheden for at en given kontaminering leder til et udbrud, samt estimere størrelsen på udbruddet.

4. Vurdering af hvilke analysedata, der skal indgå i smittekileregnskab for frugt og grønt

Afsnittet indeholder en vurdering af, hvilke informationer, der skal præsenteres for, at analysedata fra produktgruppen frugt og grønt kan indgå som en valid datakilde ved udarbejdelse af smittekileregnskaber ("hazard exposure").

Som diskuteret ovenfor er det ikke tilstrækkeligt kun at kigge på enkelte fødevarer i en eksponeringsvurdering, som skal bruges til at vurdere den relative betydning af smitekilder (smittekileregnskab). Her bør alle potentielt vigtige kilder inddrages.

For Salmonella vil det eventuelt være muligt i en periode at øge omfanget af de eksisterende overvågnings- og kontrolprøver (fx case-by-case data eller CKL projekter) for dansk og importeret kød og analysere disse kvantitativt, så der kan defineres koncentrationsfordelinger i fødevarer typerne.

For VTEC og Norovirus kan eksisterende data fra tidligere og/eller planlagte CKL projekter eventuelt indgå, men det må forventes, at det også er nødvendigt at iværksætte nye undersøgelser.

For Norovirus, der primært har et humant reservoir, kan det overvejes kun at belyse produktgruppen frugt og grønt. Derved får man udelukkende en vurdering af den relative betydning indenfor denne produktgruppe dvs. andre betydningsfulde kilder, som skaldyr og drikkevand inddrages ikke. En sådan model kunne med fordel udvides til at omfatte hele produktionskæden (dvs. som i en kvantitativ risikovurdering) og vil således kunne pege på, hvilke trin i processen, som er af størst betydning for forbrugereksposering fx primærproduktion vs. håndtering og tilberedning i detail- eller forbrugerledet.

For de egentlige eksponeringsvurderinger vil prøveomfanget pr. fødevaretype afhænge af den ønskede præcision og den forventede prævalens, men omkring 500-1000 prøver pr. fødevaretype anslås at være tilstrækkeligt for de fleste fødevarer (se desuden spm. 5). Dog skal det sikres at prøverne kan udtages repræsentativt samt, at der i stikprøveplanen tages højde for en eventuel cluster-effekt på partiniveau. Med hensyn til produktgruppen frugt og grønt vil det ifølge udredningen i spm. 2 være mest relevant at kigge på spirer, bær og bladsalater samt evt. krydderurter. Bladsalater kan evt. opdeles på hele salathoveder og afskårne salatblade, da der kan være forskelle i risici for de to typer (Lynch et al., 2009). Desuden vil det også være relevant at opdele produkterne på dansk produceret og importeret (eventuelt landespecifikke estimater).

For Salmonella vil prøveresultaterne fra frugt og grønt kunne indgå i det typningsbaserede smittekileregnskab såfremt positive isolater undertypes i tilstrækkeligt omfang (serotypning, fagtypning og/eller MLVA typning, samt antibiotikaresistensbestemmelse). Da smittekileregnskabet henfører humane infektioner til det primære reservoir må det dog forventes, at man specielt for de dansk producerede fødevarer vil få et sammenfald mellem typer fra frugt og grønt samt specielt svin og kvæg, og derfor ikke kan få en fuldstændig adskillelse af betydningen af smitekilderne. I modsætning hertil kan importerede produkter af frugt og grønt bedre betragtes som et selvstændigt reservoir, da de primære reservoirs befinder sig uden for Danmark. Undersøgelser har desuden indikeret, at der er forskelle mellem Salmonella serotyper med hensyn til deres evne til at binde sig til bladgrønsager (Berger et al., 2009), hvilket eventuelt kan fanges i en typningsbaseret model.

Anbefalinger

På baggrund af ovenstående anbefales det, at FVST og DTU Fødevarerinstitutionen i samarbejde iværksætter et indledende projekt, der skal beskrive:

- For hvilke patogener er det mest relevant at udarbejde eksponeringsmodeller for at få belyst problematikken vedr. frugt og grønt (fx Norovirus, Salmonella og VTEC; se spm 2);
- For hvilke patogener vil det være mere relevant at anvende andre metoder (fx kvantitativ risikoanalyse for Norovirus);
- Hvilke fødevarer og/eller fødevarer kategorier skal inkluderes i eksponeringsmodellerne, herunder specifikke typer af frugt og grønt (fx spirer, bær og bladsalater; se spm. 1+2);
- I hvilket omfang kan eksisterende datakilder for patogenforekomst og indtag bruges til eksponeringsmodellerne, og hvor er der behov for at iværksætte nye initiativer;
- Stikprøveplaner evt. i CKL regi for de valgte patogener og fødevarer under hensyntagen til diskussionerne i spm. 5 og 6, samt hvad der er praktisk og økonomisk muligt;
- Egnede analysemetoder (kvalitative og kvantitative) for de valgte patogener.

Omfanget af det indledende projekt afhænger af antallet af valgte patogener og fødevarer typer, men omkring 6 måneder fra iværksættelsen (~0,6-1,0 mio. kr.). Der skal muligvis nedsætte en arbejdsgruppe pr. patogen.

Varighed og omfang af udarbejdelse af selve eksponeringsvurderingerne afhænger igen af antallet af valgte patogener og fødevarer typer, samt omfanget af prøveindsamlingen. Inklusiv datahåndtering og -analyse samt modeludvikling anslås det, at der skal påregnes omkring to år pr. model/patogen (~ 1,3-1,7 mio. kr. eksklusiv omkostninger til prøveudtagning og mikrobiologiske analyser).

Referencer til afsnit 3 og 4 fremgår af appendiks 4.

5. Vurdering af den statistiske sikkerhed ved forskellige typer stikprøveplaner

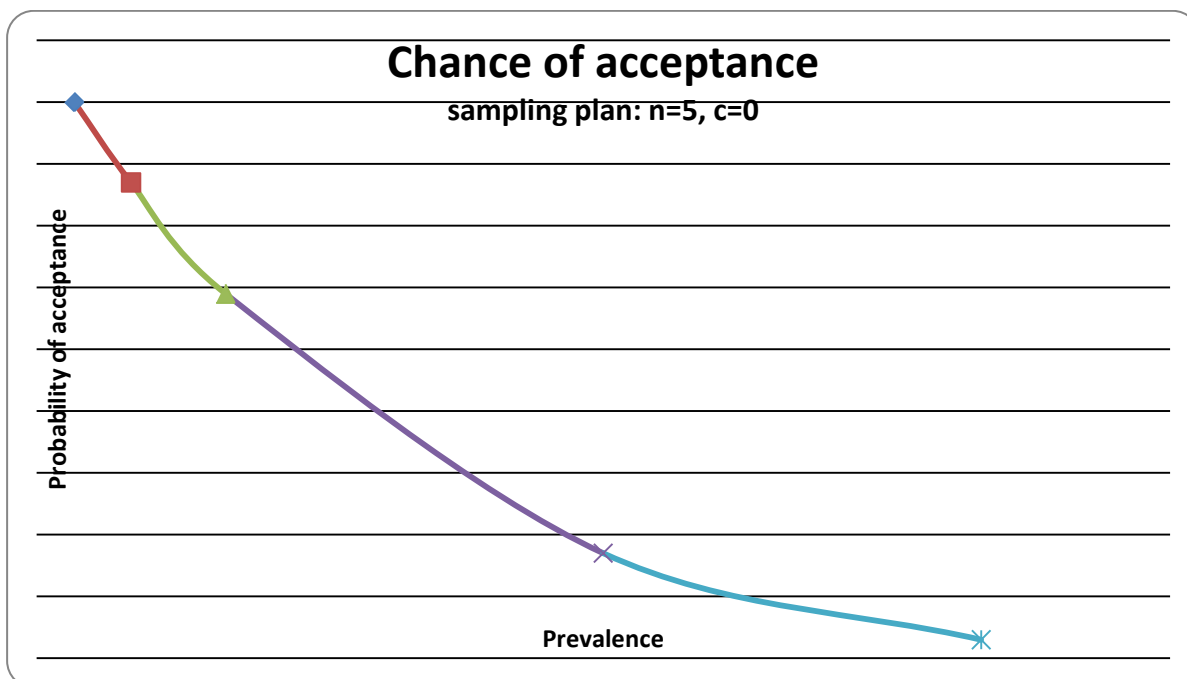
Det er erkendt, at forskellige stikprøveplaner medfører forskellige grader af statistisk sikkerhed på resultatet af den eller de parametre, der ønskes undersøgt. I relation til mikrobiologiske undersøgelser (såvel egenkontrol som offentlig kontrol) af prøver af frugt og grønt ønskes en vurdering af hvilken sikkerhed, der er forbundet med følgende stikprøveplaner under forudsætning af lav-gradig forekomst af sygdomsfremkaldende mikroorganismer (f.eks. 2 – 5 % kontaminede partier): 1, 5, 10, 20, 30 og 60 pr. parti.

Bemærkninger: DTU Fødevareinstituttet har antaget, at der menes 2-5% kontaminede prøver pr. parti. Det er desuden antaget at analysemetoden har 100% specificitet og 100% sensitivitet, så der alene er taget højde for den statistiske usikkerhed, som anført i spørgsmålet. Ønskes testsensitivitet og testspecificitet inddraget i usikkerhedsberegningerne er det det som minimum nødvendigt at vide, hvilke specifikke parametre og dermed analysemetoder, der tænkes anvendt. I kvantitative risikovurderinger antages testspecificiteten ofte at være 100%; specielt hvis der er tale om en dyrkningsmetode med supplerende typning på species og/eller serotype niveau. Testsensitiviteten for en analysemetode er ofte ukendt og varierer afhængig af prøvematerialer, men i kvantitative risikovurderinger kan testsensitiviteten beskrives ved hjælp af en sandsynlighedsfordeling (fx fra 60-90%), som kan defineres ud fra fx ekspertvurderinger.

Sandsynlighed for at acceptere et kontamineret parti som funktion af stikprøvestørrelse

Sandsynligheden for at godkende eller afvise et parti afhænger af stikprøvestørrelsen og prævalensen af den aktuelle parameter der analyseres for. Den hyppigst anvendte stikprøveplan for sygdomsfremkaldende mikroorganismer er en 2-klasse plan, hvor der udtages 5 enkeltprøver, hvoraf der ikke accepteres fund i nogen af enkeltprøverne ($n=5$, $c=0$).

I Figur 1 er vist sandsynligheden for at acceptere et parti ved denne stikprøveplan, som funktion af prævalensen. Figuren viser en såkaldt OC-kurve, der illustrerer "Operating Characteristics" ved den givne stikprøveplan.



Figur 1. Sandsynligheden for at acceptere et kontamineret parti ved forskellige patogenforekomster (prævalenser) og med en stikprøvestørrelse på 5.

Ønsker man at reducere sandsynligheden for at acceptere et kontamineret parti kan stikprøvestørrelsen øges. I nedenstående tabel vises sandsynligheden for at acceptere et kontamineret parti ved forskellige niveauer af kontamination (prævalens) som funktion af størrelsen af stikprøven. De viste beregninger gælder for 2-klasse planer, hvor der ikke accepteres fund af det patogen der testes for og vil fx være relevante for spiseklare produkter.

Tabel 1. Sandsynligheden for at acceptere et kontamineret parti ved forskellige stikprøvestørrelser og patogenforekomster (prævalenser)

Prævalens i partiet	Antal prøver pr. parti								
	1	3	5	10	20	30	60	100	300
1%	0,99	0,97	0,95	0,90	0,82	0,74	0,55	0,37	0,05
2%	0,98	0,94	0,90	0,82	0,67	0,55	0,30	0,13	0
3%	0,97	0,91	0,86	0,74	0,54	0,40	0,16	0,05	0
4%	0,96	0,88	0,82	0,66	0,44	0,29	0,09	0,02	0
5%	0,95	0,86	0,77	0,60	0,36	0,21	0,05	0,01	0

Det er åbenlyst, at der ved lave prævalenser er en meget stor risiko for ikke at påvise en given patogen, altså at godkende et kontamineret parti. Hvis fx prævalensen i partiet er 1%, vil der med en stikprøve på 10 kun være 10% sandsynlighed for at mindst en af prøverne er positive. Denne sandsynlighed øges til 95% ved en stikprøvestørrelse på 300.

Som nævnt er der i ovenstående betragtninger kun taget hensyn til den statistiske usikkerhed. Der forudsættes altså at de mikrobiologiske analyser har en følsomhed på 100%, hvilket meget sjældent

er tilfældet. Dette betyder at sandsynligheden for at godkende et kontamineret parti reelt set er højere end vist i Tabel 1.

Beregningerne forudsætter desuden, at det givne patogen har samme sandsynlighed for at blive påvist i alle stikprøver, altså at den er fordelt ensartet i partiet. Dette vil sjældent være tilfældet i virkeligheden. For flydende fødevarer med en høj viskositet vil der være en mere ensartet fordeling, mens faste fødevarer vil have en meget uensartet fordeling. Tørre fødevarer som foderstoffer, korn og f.eks. frø til fremstilling af spirer vil være meget uensartet fordelt, og sandsynlighederne i Tabel 1 må højst betragtes som vejledende.

Effekten af at anvende samleprøver (pools)

Anvendelse af samleprøver kan anvendes for at reducere antallet af prøver, som der skal analyseres. Med en stikprøvestørrelse på 60 kan man fx analysere 12 samleprøver med 5 prøver i hver og derved reducere antallet af analyser fra 60 til 12. Anvendes samleprøver til at acceptere partier med ingen positive fund er den statistiske usikkerhed i princippet uafhængigt af antallet af samleprøver dvs. det er statistisk lige sikkert at analysere en samleprøve bestående af 60 enkeltprøver som at analysere 60 enkeltprøver, da det forudsættes at hvis en af prøverne i samleprøven er positiv vil samleprøven også være positiv. Dog viser erfaringen at dette ikke gælder i praksis, da der sker et sensitivitetstab, når prøverne pooles (samles). Det vil med andre ord sige, at sandsynligheden for at påvise et kontamineret parti falder, når antallet af undersøgte pools reduceres. Som for enkeltprøver er denne sandsynlighed også afhængig af prævalensen i partiet dvs. jo lavere prævalens des lavere er sandsynligheden for at påvise en kontaminering.

Anvendelsen af samleprøver har imidlertid størst indflydelse på den sikkerhed, hvorved man kan estimere en enkeltprøveprævalens i et givet parti. Skal en given kontrol fx anvendes til at afvise partier med en forekomst over et vist niveau mindskes sikkerheden på prævalensestimater, når antallet af undersøgte pools reduceres. Dette er forsøgt demonstreret i Tabel 2, hvor der for to stikprøvestørrelser (hhv. 60 og 30 prøver) er angivet den estimerede enkeltprøveprævalens og tilhørende konfidensgrænser for forskellige kombinationer af antal undersøgte samleprøver (pools) og antallet af enkeltprøver i hver samleprøve (pool size).

Tabel 2. Effekten af at anvende samleprøver for bestemmelse af enkeltprøveprævalensen i kontaminerede partier.

Stikprøvestørrelse = 60

Pool size	5			6			10			20		
Pools	12			10			6			3		
Antal positive pools	Estimeret enkeltprøveprævalens			Estimeret enkeltprøveprævalens			Estimeret enkeltprøveprævalens			Estimeret enkeltprøveprævalens		
	2,50%	97,50%		2,50%	97,50%		2,50%	97,50%		2,50%	97,50%	
1	1,7%	0,0%	9,3%	1,7%	0,0%	9,3%	1,8%	0,0%	9,7%	2,0%	0,0%	11,1%
2	3,6%	0,4%	12,4%	3,7%	0,4%	12,7%	4,0%	0,4%	13,9%	5,3%	0,5%	21,3%
3	5,6%	1,1%	15,6%	5,8%	1,1%	16,2%	6,7%	1,2%	19,2%	100,0%	1,7%	100,0%
4	7,8%	2,1%	19,0%	8,2%	2,1%	20,0%	10,4%	2,5%	26,9%			
5	10,2%	3,2%	22,7%	10,9%	3,4%	24,4%	16,4%	4,3%	42,1%			
6	12,9%	4,6%	26,7%	14,2%	4,9%	29,6%	100,0%	7,5%	100,0%			
7	16,1%	6,3%	31,4%	18,2%	6,9%	36,3%						
8	19,7%	8,2%	37,0%	23,5%	9,3%	45,9%						
9	24,2%	10,6%	44,0%	31,9%	12,6%	63,1%						
10	30,1%	13,5%	53,9%	100,0%	17,8%	100,0%						
11	39,2%	17,4%	70,8%									
12	100,0%	23,3%	100,0%									

Stikprøvestørrelse = 30

Pool size	5			6			10			15		
Pools	6			5			3			2		
Antal positive pools	Estimeret enkeltprøveprævalens			Estimeret enkeltprøveprævalens			Estimeret enkeltprøveprævalens			Estimeret enkeltprøveprævalens		
	2,50%	97,50%		2,50%	97,50%		2,50%	97,50%		2,50%	97,50%	
1	3,6%	0,1%	18,5%	3,7%	0,1%	18,9%	4,0%	0,1%	21,0%	4,5%	0,1%	25,3%
2	7,8%	0,9%	25,9%	8,2%	0,9%	27,4%	10,4%	1,0%	38,0%	100,0%	1,1%	100,0%
3	12,9%	2,5%	34,8%	14,2%	2,6%	38,8%	100,0%	3,4%	100,0%			
4	19,7%	4,9%	46,6%	23,5%	5,4%	58,6%						
5	30,1%	8,5%	66,5%	100,0%	10,3%	100,0%						
6	100,0%	14,4%	100,0%									

6. Vurdering af omfanget af prøver til kvantitativ mikrobiologisk risikovurdering

Afsnittet indeholder en vurdering af omfanget af prøver, der skal udtages/undersøges med henblik på at genere valide data til brug for et overvågningsprogram, eksponeringsmodel og en egentlig kvantitativ mikrobiologisk risikovurdering.

Overvågningsprogrammer

Generelt for stikprøvebaserede overvågningsprogrammer taler man om to begreber, som er vigtige for validiteten af resultaterne:

- **Nøjagtighed:** For at opnå prævalensestimater, der er så tæt på virkeligheden (nøjagtige) som muligt er det vigtigt, at overvågningen er *repræsentativ* for det, som den skal afdække fx repræsentere hvad danske forbrugere eksponeres for. Dette opnås bedst ved tilfældig (randomiseret) stikprøveudtagning af de fødevarer der ønske mål for (fx bønnespiser).
- **Præcision:** Præcisionen (som er det omvendte af usikkerheden) afhænger af stikprøvestørrelsen; jo flere prøver jo mindre usikkerhed er der på estimaterne, som diskuteres under spørgsmål 5.

Generelt er det bedre at prioritere nøjagtighed frem for præcision. Der er jo ikke megen nytte i at have snævre konfidensintervaller, hvis det estimat man opnår ligger langt fra virkeligheden.

For deciderede overvågningsprogrammer, hvor resultaterne primært skal bruges til at fremvise et landsdækkende gennemsnit (prævalens) af et patogen i en given fødevaretype er antallet af prøver, som er nødvendige mindre end, hvis resultaterne skal bruges til at agere på i forbindelse med kontrol eller risikobaseret overvågning. Rent statistisk vil det fx være tilstrækkeligt at udtage omkring 400 prøver for med 95% sikkerhed at estimere en prævalens med en præcision på max +/- 5% (EKS: 20 positive prøver ud af 400 udtagne giver en prævalens = 5% og 95% C.I. = 3,3-7,6%).

Ofte vil det dog være nødvendigt at hæve prøveantallet for at få en tilstrækkelig nøjagtighed på estimatet. Dette gælder formentlig særligt fødevarer kategorier, hvor udbuddet er stort og mangfoldigt. Det vil også være nødvendigt at hæve prøveantallet, hvis overvågningen skal bruges til at estimere forekomster på fx virksomhedsniveau, landniveau (fx oprindelsesland), og produkttypeniveau.

Er man interesseret i at estimere relative forekomster på patogentypeniveau (fx species, serotype og resistenstyper) vil antallet af isolater desuden være en væsentlig faktor. Hvis prævalensen for de patogentyper man ønsker estimater for er lav vil det alt andet lige kræve en relativ stor stikprøve.

Uden at kende de specifikke formål med et overvågningsprogram er det ikke muligt at foreslå en bestemt stikprøveplan. I Tabel 3 er der for forskellige prævalenser og stikprøvestørrelse angivet konfidensintervaller for at illustrere stikprøvestørrelsen indflydelse på den sikkerhed, hvormed prævalensen kan bestemmes.

Tabel 3. Eksempler på stikprøvestørrelsens indflydelse på bredden af konfindensintervallet ved forskellige prævalenser.

Stikprøvestørrelse	Antal		Prævalens	2,50% 97,50%	
	positive				
20	0	1%	0%	16,10%	
100	1	1%	0,20%	5,40%	
200	2	1%	0,30%	3,60%	
400	4	1%	0,40%	2,50%	
1000	10	1%	0,50%	1,80%	
5000	50	1%	0,80%	1,30%	
20	1	5%	0,90%	23,60%	
100	5	5%	2,20%	11,20%	
200	10	5%	2,70%	9,00%	
400	20	5%	3,30%	7,60%	
1000	50	5%	3,80%	6,50%	
5000	250	5%	4,40%	5,60%	
20	2	10%	2,80%	30,10%	
100	10	10%	5,50%	17,40%	
200	20	10%	6,60%	14,90%	
400	40	10%	7,40%	13,30%	
1000	100	10%	8,30%	12,00%	
5000	500	10%	9,20%	10,90%	

Eksponeringsmodel

En eksponeringsmodel estimerer, hvor meget af et givent patogen forbrugerne udsættes (eksponeres) for gennem forskellige smitekilder og smitteveje. I modsætning til en kvantitativ risikovurdering, som typisk kun beskæftiger sig med én patogen-fødevarer kombination, forsøger en eksponeringsvurdering at inddrage alle de vigtigste kilder og smitteveje. Til gengæld inkluderer eksponeringsvurderingen generelt mange færre trin i produktionskæden og dosis-respons modellen kan også vælges udeladt for at simplificere beregningerne. Resultaterne kan derfor udelukkende bruges til at vurdere den relative betydning af forskellige smitekilder og dermed den overordnede effekt af iværksatte kontrolforanstaltninger, mens de ikke kan anvendes til at vurdere effekten af mulige (dvs. ikke iværksatte) specifikke kontrolforanstaltninger, hvilket man typisk anvender en kvantitativ risikovurderingsmodel til. En eksponeringsmodel kan betragtes som et alternativ til et typningsbaseret smittekilderegnskab.

En eksponeringsmodel kræver følgende data:

- **Indtagsdata** af alle fødevarer, som ønskes inddraget i modellen fx opdelt på dansk og importeret, forarbejdet og fersk, etc., alt efter, hvor detaljeret resultaterne ønskes. Hvis det drejer sig om fødevarer der særligt spises af specielle befolkningsgrupper, kan det desuden være nødvendigt at opdele indtagsdata på fx alder, køn og/eller etnisk oprindelse. Indtagsdata opgøres normalt som gennemsnitligt indtag over fx gram pr. dag, men for en mikrobiologisk eksponeringsmodel vil

det være mere ønskeligt med data om frekvens (dvs. hvor tit spises fødevaren) og mængde pr. måltid, da det i langt højere grad afspejler den reelle eksponering.

- **Prævalensdata** for alle fødevarer typer som ønskes inddraget i modellen. Prøverne som prævalensestimaterne er baseret på skal være udtaget, så de er repræsentative for det som danske forbrugere eksponeres for.
- **Kvantitative koncentrationsdata** dvs. antallet af patogener pr. gram af fødevaren. Koncentrationsdata varierer betydeligt og det er vigtigt at denne variation fanges i data der bruges som input til modellen, da det er de (få) tilfælde med høje koncentrationer, som giver anledning til stor eksponering og dermed relativ større risiko for sygdom.

Alle ovennævnte data vil i en eksponeringsmodel beskrives ved hjælp af sandsynlighedsfordelinger. Sandsynlighedsfordelingerne tager højde for usikkerhed på data (og afhænger derfor af stikprøvestørrelsen) og forsøger desuden at beskrive den biologiske variation af de parametre som der måles på fx indtags- og koncentrationsdata.

Antallet af prøver, der skal analyseres for at tilvejebringe tilstrækkelige data for udarbejdelse af en eksponeringsmodel afhænger derfor af den ønskede præcision, den forventede biologiske variation samt det ønskede detaljeringniveau. Ønsker man fx at eksponeringen fra en bestemt fødevarer (fx rucolasalat) eller fødevarer kategori (bladsalater) skal kunne opgøres på dansk og importeret skal der statistisk set tages dobbelt så mange prøver, som hvis denne opdeling ikke skal foretages for at opnå samme præcision. Det samme gælder for andre opdelinger som fx fersk vs. forarbejdet.

Sammenhængen mellem usikkerhed på prævalensestimater og stikprøvestørrelser er beskrevet ovenfor. Heraf fremgår det, at en stikprøvestørrelse på 400 (pr. laveste produktniveau fx dansk rucolasalat) giver et rimeligt sikkert prævalens estimat. Skal de samme data bruges til at generere fordelinger for patogenkoncentrationen, må det imidlertid forventes at der skal udtages flere prøver for at få beskrevet variationen i koncentrationen i tilstrækkeligt omfang. Antallet af prøver vil afhænge af prævalensen, da koncentrationsfordelingerne estimeres på basis af positive prøver. Antages det fx at prævalensen er 5% vil man ved en stikprøve på 1000 i gennemsnit få 50 positive prøver. Hvis det i øvrigt giver biologisk mening kan man ved estimering af fordelinger for patogenkoncentrationer vælge at bruge data fra flere produktniveauer (fx dansk og importeret) under antagelse af, at koncentrationen er den samme (dvs. at en eventuel forskel i eksponering skyldes forskelle i prævalens og/eller indtag). Derved kan prøveantallet reduceres.

En eksponeringsvurdering kan i princippet også inddrage ikke fødevarer bårne kilder fx kontakt med husdyr eller kæledyr. Dette kræver imidlertid data om frekvens af kontakt med de pågældende dyr, samt forekomst (prævalens og koncentration) af det givne patogen i de pågældende dyr. Sådanne data er sjældent til rådighed i nødvendigt omfang.

Kvantitativ mikrobiologisk risikovurdering

Formålet med en kvantitativ risikovurderingsmodel er typisk at beskrive den humane risiko ved forekomsten af et bestemt patogen i en bestemt fødevarer eller fødevarer kategori fx *Salmonella spp.* i bønnespirer eller *Campylobacter spp.* i kylling. Det absolutte risikoestimat anvendes dog sjældent direkte, da det ofte er forbundet med stor usikkerhed relateret til bl.a. datakvalitet, herunder data for generering af dosis-responskurver. I stedet er det meget anvendt at sammenligne risikoestimater

under forskellige forudsætninger fx ved vurdering af effekten af forskellige interventionsmetoder og/eller produktionsmetoder/-processer.

En egentlig kvantitativ risikovurdering modellerer forekomsten af et patogen fra primærproduktion via konsumering til human sygdom. Man kan vælge kun at inddrage dele af eksponeringskæden, men konsumering og risikoen for human sygdom skal altid inkluderes. Foruden data om prævalens og koncentration af patogenet er det nødvendigt at have viden om de forskellige produktions- og forarbejdningsprocessers effekt på patogenet dvs. om en proces reducerer eller øger prævalensen og/eller koncentrationen. Det siger sig selv, at en risikovurderingsmodel kræver mange data og kan gøres meget kompliceret. Kunsten ligger i kun at inkludere de trin (og dermed data) som må anses for væsentlige for det endelige resultat.

Modellens primære input data er sandsynlighedsfordelinger for prævalens og koncentration af patogenet i fødevarer ved det første trin i produktionsprocessen. For en model vedr. *Salmonella* i bønnespiser kan det fx være batch og indenfor batch prævalens af frø og koncentration af *Salmonella* i kontaminerede sække. Ud fra dette modelleres så eventuelle ændringer i prævalens og koncentration som følge af effekten af de vigtigste produktionsprocesser. Tilgængelige data om prævalens og forekomst længere fremme i produktionskæden fx efter spiring eller lige inden pakning anvendes til at validere modellens resultater.

Betragtninger omkring stikprøvestørrelser er principielt de samme som diskuteret ovenfor, men til forskel fra eksponeringsmodeller kræves der data fra flere trin i den samme produktionskæde, hvor det første trin, som er modellens udgangspunkt, må anses for at være det vigtigste.

7. Vurdering af hvilke analyseparametre og – metoder der er relevante i Danmark

Flere forskellige typer af mikroorganismer (herunder bl.a. *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli*, *Campylobacter* og forskellige virus og parasitter) har været beskrevet som årsag til fødevarerelateret sygdom med frugt og grønt som vehikel. Afsnittet indeholder en vurdering af, hvilke analyseparametre – og tilhørende analysemetoder - det vil være relevant at anvende under danske forhold. Herunder, hvorvidt data skal genereres i kvalitativ eller kvantitativ form.

Frugt og grønsager er samlet set en divers gruppe af fødevarer, der potentielt kan være kontamineret med forskellige humanpatogene mikroorganismer. Det er derfor vanskeligt at give generelle forslag til mikrobiologiske analyseparametre. Relevansen af de enkelte parametre vil afhænge af produkttyper, specifikke produktionsforhold, forarbejdning m.v.

Der vil ofte være forskel på de mikrobiologiske analyser, der gennemføres i offentlig regi, og de analyser, der udføres som egenkontrol. For de analyser, der gennemføres i offentlig regi gælder, at de ofte udføres med henblik på at etablere en overordnet viden om forekomst af specifikke mikroorganismer i forskellige produkttyper. For de enkelte virksomheder, der udøver egenkontrol, vil det, med enkelte undtagelser, være af meget begrænset gavn at lave mikrobiologiske analyser for patogene mikroorganismer, da forekomsten af disse typisk er meget lav. Som eksempler på relevante analyser for patogene mikroorganismer, kan nævnes kontrol af spirefrø for forekomst af *Salmonella* og

VTEC, samt testning af visse typer af spiseklare fødevarer for forekomst af *Listeria monocytogenes*. Det kan også være relevant at analysere for forekomst af indikatorbakterier, primært *Escherichia coli*, der er en indikator på fækal forurening.

Når der vælges analyseparametre til undersøgelse af frugt og grønsager, er det relevant at se på oprindelseslandet. For hvert land må man så vurdere, om de sanitære og sundhedsmæssige forhold samt regler for, og kontrol med, produktionsmæssige forhold sikrer en minimering af risikoen for, at der sker spredning af sygdomsfremkaldende mikroorganismer. Som eksempel på parametre, hvor der vil være forskel på danske og udenlandske produkter, kan nævnes humanspecifikke mikroorganismer, som *Shigella*, *Salmonella Typhi/Paratyphi*, enterotoksin producerende *E. coli* (EPEC) samt hepatitis A. Med hensyn til zoonoser, som *Salmonella*, *Campylobacter*, parasitter m.v., så findes disse vidt udbredt i verden hos både dyr og mennesker, så her vil det være viden om produktionsforhold nærmere end oprindelsesland, der afgør relevansen af de enkelte parametre. Det samme gør sig gældende for ubikvitært forekommende mikroorganismer, som *Listeria monocytogenes*, *Bacillus* og *clostridier*, *Staphylococcus aureus* og norovirus.

Der findes veletablerede og internationalt anerkendte standardmetoder til påvisning af *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella*, og *E. coli* O157 (VTEC). Ligeledes findes der anerkendte standardmetoder til kvantitativ påvisning af *L. monocytogenes*, *clostridier*, *S. aureus* og *Bacillus*. For virus (noro- og hepatitis A), parasitter (*Cryptosporidium*, spp og *Giardia* spp), og VTEC gælder, at der findes velegnede metoder, men der findes ingen internationalt anerkendte metoder. Der findes endvidere internationalt anerkendte standardmetoder til kvantificering af *E. coli* og *Enterobacteriaceae*.

Alt efter formålet med undersøgelser, vil der være forskel på, om analyserne skal laves kvalitativt eller kvantitativt. Hvis man ønsker at sige noget om sikkerheden for enkelt produkter med hensyn til for eksempel *Salmonella*, *Campylobacter*, *Shigella*, og nogle typer af VTEC, bør data være kvalitative, da forekomst af disse bakterietyper generelt er uønsket. Kvantitative data vil dog være relevante med henblik på at generere data til risikovurderinger og viden om human eksponering. Lave niveauer af *L. monocytogenes* kan være acceptable, hvis produkterne er stabiliseret med hensyn til vækstmuligheder, så for *L. monocytogenes* kan såvel kvantitative som kvalitative data være relevante. For VTEC, virus og parasitter er forholdene komplicerede, primært fordi der er stor forskel i virulensen af de VTEC, virus og parasitter, der kan påvises i fødevarer. Den sundhedsmæssige betydning af fund af disse mikroorganismer er således uklar. For de miljøbetingende patogene bakterier som *clostridier*, *Bacillus*, og *S. aureus*, vil det som oftest være mest relevant at generere kvantitative data og det samme gælder for indikator-organismerne *E. coli* og *Enterobacteriaceae*.

Når man vælger analyseparametre og analysemetoder er det vigtigt at være bevidst om hvad resultaterne skal bruges til. Inden man foretager analyser, skal man have overvejet forhold omkring prøveudtagningsplaner, grænseværdier (se spørgsmål 5 og 6), og, helt essentielt, aktion hvis grænseværdierne overskrides.

Baggrundsmaterialet fremgår af appendiks 2.

8. Vurdering af anbefalingen til forbrugerne om at skylle frugt og grønt

Fødevarestyrelsen anbefaler private forbrugere at skylle frugt og grønt. Afsnittet indeholder DTU Fødevareinstituttets vurdering af, hvor stor effekt en sådan skylning har på forekomst af mikroorganismer påført overfladen af frugt og grønt.

Mikrobiologisk effekt af vask af grønt

Af afsnit 1 fremgår, at det at vaske/skylle frugt og grøntsager kan medføre en vis reduktion i antallet af mikroorganismer i mange typer af frugt og grønt. Denne nyttige effekt kan opnås uanset hvor i produktionskæden fra jord til bord trinnet anvendes, og således også hos den enkelt forbruger.

Effekt af vask/skylning hos den enkelte forbruger er meget sparsomt belyst i den videnskabelige litteratur, og umiddelbart er det også en kompliceret opgave, at dokumentere effekten af forbrugernes vask/skylning.

Standard skylning af grønt salat med rent vand rapporteres at fjerne 92,4% af den tilstedeværende mikroflora (Adams et al., 1989). Udover at den rapporterede nøjagtighed her er urealistisk må det vurderes at et sådant resultat mest sandsynligt vil være nogenlunde ens for de fleste relevant bakteriearter, der ikke besidder specifikke fasthæftningsmekanismer til salat. Det er uvist om *Salmonella* spp. og VTEC besidder sådanne mekanismer. I de samme undersøgelser fandtes at den totale mikroflora reduceredes med 97,8% når vaske-vandet tilsattes 100 ppm fri chlor. En sådan forøget reduktion (svarende til ca. $\frac{1}{2}$ log) vurderes at være minimal.

Nyere, tilsvarende undersøgelser viser basalt set sammenlignelige resultater, i dette tilfælde for *E. coli* O157:H7, som reduceres ca. 1 log enhed (90%) ved vask med rent vand og ca. 1,5 log (97%) ved vask med Natrium-hypochlorit (100 ppm) (Daisuke et al., 2009).

I en samlet jord-til-bord risikovurdering af produktion af salat i relation til *E. coli* O157 anvendes ligeledes approximerede effekt af vask (i dette tilfælde med chlor) på omkring 1 log reduktion. Det anerkendes at ved større koncentrationer af chlor samt længere behandlingstider kan denne reduktion øges (Danyluk og Schaffner, 2011)

I andre undersøgelser rapporteredes en reduktion af *Listeria monocytogenes* på skåret salat ved skylning (nedsækning i vand med 200 ppm chlor i 10 minutter) på 1,3 to 1,7 log₁₀ CFU/g svarende til ca. 92-97% reduktion (Beuchat og Ryu, 1997)

I en rapport fra UK Food Standards Agency fastslås at det generelt må erkendes at selv ved industriel vask af grøn salat kan man på ingen måde garantere fravær af mikrobielle patogener (Anon, 2008). Dette gælder også ved tilsætning af chlor til vaskevand. Rapporten vurderer at løst tilhæftede jordpartikler og bakterier kan fjernes, mens partikler og bakterier der er tættere hæftet ikke påvirkes.

En forklaring på den relativt ringe effekt af skylning såvel med som uden tilsat chlor er foreslået at være at skyllevand har svært ved at nå de naturlige små åbninger og sprækker i planteoverflader (Lund, 1983)

Det må således foreløbigt konkluderes at:

- 1) Der er meget begrænsede videnskabelige undersøgelser af den dekontaminerende effekt af skylning med rent vand i forbrugerens køkken
- 2) Det er sandsynligt at der kan opnås en reduktion på omkring en log enhed (ca. 90%) af den almindelige bakterieflora ved almindelig skylning. En sådan reduktion vil resultere i minimal (men sandsynligvis målelig) reduktion i risiko for sygdom

Råd til forbrugere

Der er stor forskel på hvad den enkelte forbruger opfatter som "vasket/skyttet" og dermed klar til at indgå som en del af måltidet. Nogle forbrugere er meget grundige med vasken, og sørger for at skære eventuelt syge/rådne, eller stærkt jordforurenede dele helt fra, mens andre forbrugere kan være mindre kritiske. Hvis man ønsker at belyse effekten af forbrugeres vask/skytning, må man udføre studier af forbrugernes adfærd, og her må man anvende såvel mikrobiologiske, sociologiske (adfærdsstudier) og, måske epidemiologiske metoder.

Nedenstående anbefalinger er direkte kopieret fra US FDA's hjemmeside, fra et dokument, der retter sig mod forbrugerne, med titlen "Produce Safety, Safe Handling of Raw Produce and Fresh-Squeezed Fruit and Vegetable Juices, se <http://www.fda.gov/food/resourcesforyou/consumers/ucm114299>. (Fødevareinstituttet undersøger i øjeblikket muligheden for at opnå indsigt i den direkte faglige baggrund anvendt af FDA ved udarbejdelsen af disse råd - (det forventes at sådan information vil være tilgængelig senest 19.08.2011)

"Preparation Tips for Fresh Produce"

- *When preparing any fresh produce, begin with clean hands. Wash your hands for 20 seconds with warm water and soap before and after preparation.*
- *Cut away any damaged or bruised areas on fresh fruits and vegetables before preparing and/or eating. Produce that looks rotten should be discarded.*
- *All produce should be thoroughly washed before eating. This includes produce grown conventionally or organically at home, or produce that is purchased from a grocery store or farmer's market. Wash fruits and vegetables under running water just before eating, cutting or cooking.*
- *Even if you plan to peel the produce before eating, it is still important to wash it first.*
- *Washing fruits and vegetables with soap or detergent or using commercial produce washes is not recommended.*
- *Scrub firm produce, such as melons and cucumbers, with a clean produce brush.*
- *Drying produce with a clean cloth towel or paper towel may further reduce bacteria that may be present."*

Mulige undersøgelser til belysning/optimering af forbrugeres adfærd

Da der ikke ses at være videnskabeligt baserede undersøgelser, der belyser typisk forbruger-adfærd mht. vask af grønt eller måske ligeså relevant effekt af forskellige metoder til vask af grønt i forbrugernes køkken, kan det foreslås at sådanne undersøgelser søges udført i Danmark.

Det vil være muligt, baseret på eksisterende laboratiemæssig samt epidemiologisk set-up på Fødevareinstituttet at udføre relevante undersøgelser til belysning af effekt af forbruger-adfærd på dette område, samt til mulig forbedring af sådan adfærd.

- 1) Den mikrobiologiske effekt kan for eksempel belyses ved at måle effekt af vask/skylning under de forhold, der gør sig gældende i forbrugernes køkken. Her kan man så vælge forskellige definerede skylle/vaske regimer, og afprøve effekt af disse på forskellige produkter, for eksempel bladsalat. Mht. skylle/vaske regimer kunne man for eksempel evaluere de råd som US FDA anbefaler til forbrugerne under danske forhold.
- 2) Man kan også lave forskellige studier af den måde, som forbrugerne behandler grøntsager på i køkkenet. Sådanne studier kan dels være baserede på interviews, hvor et relativt stort antal forbrugere kan nås, samt på at observere konkret adfærd i køkkenet for et mindre antal forbrugere. Hypotesen er at man kan inddele forbrugere i nogle få overordnede grupper, der beskriver en typisk adfærd i forhold håndtering og tilberedning af grøntsager.
- 3) Intensiveret opfølgning på udbrud forårsaget af grøntsager vil måske kunne bruges til at eftervise hypotesen om, at forbrugeradfærd, herunder vaskning/skylning af grøntsager, spiller en rolle for sygdomsrisiko. Hvis man i en udbrudssituation, hvor kilden fx er rucola salat, har mulighed for efterfølgende at opspore og kontakte en stor del af de eksponerede inkl. de syge, kan det være muligt at påvise beskyttende faktorer, herunder håndtering af kilden, for infektion ved at sammenligne adfærden mellem ikke-syge og syge.

En mulig tidsramme samt ressourceforbrug er estimeret til

- 1) 3-4 måneder, total 0,5 årsværk
- 2) 15-18 måneder, total 1,5 årsværk
- 3) 3-4 måneder, total 1,0 årsværk

Referencer til afsnittet fremgår af appendiks 4.

9. Vurdering af mikrobiologiske undersøgelser af spirer

Kontaminerede spirer af forskellig type har som bekendt været årsag til flere store sygdomsudbrud. Afsnittet indeholder en beskrivelse af hvilke egenkontrolmæssige tiltag – herunder mikrobiologiske undersøgelser af mindre dele af frøpartier - der vurderes at være de mest optimale med henblik på at forhindre fødevarebåren sygdomsforhold set i forhold til produktionsformen, der anvendes på danske virksomheder. Afsnittet indeholder derudover en vurdering af, hvilke analyseparametre og metoder, der vil være mest hensigtsmæssige til brug i såvel virksomhedernes egenkontrol som i den offentlige kontrol (udover Salmonella som angivet i mikrobiologiforordningen, 2073/2005).

Med baggrund i danske og udenlandske udbrud må det antages at den største risiko for udbrud fra spirer relaterer sig til Salmonella species og VTEC. Det må antages at forurening med fækale patogener (Salmonella og VTEC) primært er relateret til fækal forurening, oprindeligt ved frøproduktion på lokaliteter uden for Danmark.

De væsentligste tiltag til reduktion af risiko relateret til produktion af danske spirer vurderes at være:

- Indførelse af 'good agricultural practices' (beskrevet i Codex Alimentarius) under frøproduktion, specielt undgå 'natur-gødning' på grønne plantedele samt anvendelse af ubehandlet natur-gødning
- Test (certificering) af frø for Salmonella og VTEC på frø-produktions lokalitet før afskibning
- Test af forspirede del-partier i spireproduktions lokalitet for Salmonella og VTEC
- Stikprøve test af færdig producerede spirer for Salmonella og VTEC

Test af såvel spirer som frø skal foretages med en relevant stikprøveplan relateret til den ønskede sikkerhed – se afsnit 5 og 6.

Erfaringer fra udbrud

Der har tidligere været spire relaterede udbrud af fødevarer sygdom in Danmark. Det første rapporterede udbrud fandt sted i 1995 og involverede 154 cases (Salmonella Newport) der alle kunne linkes til spirer produceret i Danmark med importerede frø af ukendt oprindelse. I 2007 forekom et udbrud forårsaget af Salmonella Weltevreden i spirer produceret frø fra Italien. Begge udbrud kunne desuden linkes til tilsvarende udbrud i andre lande. Øvrige spire-bårne Salmonella udbrud i nabolande til Danmark, forårsaget af Italienske frø, er forekommet i 2007 og 2008. I 2010 blev Listeria monocytogenes isoleret fra danske spirer men kunne ikke forbindes definitivt til humane tilfælde. Senere i 2010 blev Salmonella isoleret fra importerede hollandske spirer – partiet blev trukket tilbage og blev ikke associeret med humane tilfælde.

Baggrund for forurening med og vækst af patogener

Patogener, der kontaminerer spirer kommer typisk fra kontamineret frø, som igen typisk er kontamineret fra husdyrgødning, spildevand eller vand kontamineret med human eller animale fækalier. Sådanne typer af kontaminering leder typisk til store, ofte transnationale udbrud, hvorimod lokal kontaminering fra skadedyr eller kontaminering fra produktion- eller lagrings-forhold oftere leder til lokale udbrud. Patogener involveret i store spire-relaterede udbrud har typisk været Salmonella og VTEC.

Salmonella og VTEC kan persistere i frøets parenchym (sandsynligvis lige under frøets eksterne lag). Kontamination med fækal materiale i vækst sæsonen sandsynligvis baggrund for sådan persistens. Overlevelse i parenchym kan muligvis være forklaringen på bakteriers meget lange overlevelse (år) ved korrekt opbevaring af frø (som vist i det danske Salmonella Newport udbrud i 1995). Specifikke overlevelses data for VTEC findes ikke, men man vil typisk i sådanne tilfælde ekstrapolere fra Salmonella.

Mens lucerne frø der anvendes i DK produceres i Italien eller Canada kan mung frø komme mange steder fra. Eksempelvis Kina, hvor produktionen typisk stammer fra mange små producenter, hvor hygiejnen er usikker og kendskabet til good agricultural practices sandsynligvis er ringe. Et eksporteret parti vil derfor bestå af en sammenblanding af mange enkelt-partier

Under spiring (der typisk varer 2-6 dage) holdes temperaturen typisk omkring 20-25 °C og der vandes hyppigt. Uden vanding kan temperaturen nå 30-40 °C. Ved disse temperaturer og denne fugtighed, samt tilstedeværelsen af høj koncentration af organisk materiale er der vækstpotentiale for de relevante patogener. Danske resultater (fra 1995 udbrud) viser vækst af *Salmonella* på mere end en log under spirings-processen.

Kontrol

Brug af chlor til dekontaminering af frø har kun begrænset effekt og er i øvrigt ikke tilladt i EU. Forskellige resultater fra international litteratur synes at vise at der kan være mulighed for 1-2 log reduktion af *Salmonella* på frø. Disse resultater er dog påvirkelige af positionering af *Salmonella* i frøet (jo dybere - jo mindre effekt) samt mængden af organisk forurening i væsken (jo højere - jo mindre effekt). I sådanne tilfælde kan reduktionen være mindre end 1 log.

EU direktiv 2073/2005 indeholder en grænse for *Salmonella* i spirer: < 1 per 25 gram ved holdbarheds udløb.

Egenkontrol for spireproducenter kan fokusere på: 1) Mikrobiologisk certificering af frø fra leverandører. 2) Mikrobiologisk analyse af partier on-site før spiring. 3) Rutine analyser af slutprodukter.

Ad1) Kan medvirke til bedre sikkerhed, men prøvetagningsusikkerhed (sfa uens fordeling af *Salmonella*/VTEC i partiet) samt problemer med parti-identifikation gør, at denne process ikke generelt kan sikre frø partiets sikkerhed. Der er dog oplagte fordele ved dette tiltag, idet udpegning af kontaminerede partier på dette trin vil sikre spredning tidligt.

Ad 2) Da 1) er usikker anses mikrobiologisk analyse også efter ankomst af nye frø-partier at være fornuftigt. Danske spireproducenter anvender typisk prøvespiring af 15- til 25 kilo enheder af frø før mikrobiologisk test. Patogen koncentration kan dog stadig være ganske lav og test af 25 grams prøver kan derfor give en lav sikkerhed – en forøget prøvestørrelse på f.eks. 3-500 gram vil forøge sikkerheden...

Ad 3) Under produktion kan regelmæssig er mikrobiologisk test af det færdige produkt eller fra spiringstank en mulighed, der vil forøge den samlede mulighed for at udpege forurenede partier.

Der findes i Danmark primært to producenter af spirer: Bønnelykken, Ringsted og Lundby Grønt i Ringe. Begge inkluderer i egenkontrol certificering fra frø-producent, analyse af forspirede partier, og regelmæssig (månedlig) rutine analyse af færdige produkter. Codex regler inkluderet i Code of Hygienic Practice for Fresh Fruit and Vegetables, CAC/RCP 53-2003 (revised 2010) foreslår forebyggelse fokuseret på to områder: a) under produktion af frø, og b) under spiring, herudover foreslås c) specifikke analyser.

- a) Dyregødning, 'naturlig gødning', 'biosolids' bør kun bruges efter behandling (lagring, varmebehandling el. lign.) der sikrer højt niveau af patogen reduktion.
- b) Dekontaminering af frø umiddelbart før spiring for at forebygge introduktion af patogener og mindske mulighed for vækst. Vand der anvendes under produktionen bør være drikkevandskvalitet.
- c) Frø-partier bør analyseres for patogener; der advares dog mod at stole alene på resultaterne af sådanne tests.

Vedr. metoder til analyser af Salmonella og VTEC henvises afsnit 7.

Appendiks 1

Opgørelse af grønt og frugt som årsag til udbrud i Danmark og internationalt

Appendikset er en litteraturbaseret oversigt over, hvilke grønt og frugttyper der hyppigst figurerer som kilde til udbrud i Danmark og internationalt. Oversigten vil primært være baseret på eksisterende opgørelser af udbrudskilder. I den udstrækning det er muligt, vil udbrudsrisikoen ved de forskellige typer grønt og frugt dels blive vurderet indbyrdes og dels i forhold til risikoen fra andre fødevarer. Endelig vil opgørelsen i muligt omfang omfatte en vurdering af distributionsveje, som omtalt i bestillingen.

Det skal pointeres, at opgørelsen hovedsageligt angår sygdom relateret til udbrud og ikke nødvendigvis afspejler forholdene ved sporadiske tilfælde. Det skal også bemærkes, at kilder, der kun vanskeligt påvises som årsag til udbrud (f.eks. fordi de er meget almindelige), kan være underrapporteret i de udbrudsoversigterne som ligger til grund for undersøgelsen.

Under punkt 2 er der desuden en kort opsummering vedr. frugt og grønt som risikofaktor i case-kontrol-undersøgelser af sporadiske (ikke-udbrudsrelaterede), zoonotiske tarminfektioner.

Besvarelsen er delt i følgende hovedafsnit:

1. Grønt og frugt som kilde til udbrud i Danmark
2. Grønt og frugt som kilde til udbrud i EU
3. Grønt og frugt som kilde til udbrud i tredjelande
4. Referencer
5. Bilag

Resume:

Frugt, grønt og urter bidrager med ca. 20% af de fødevarerbårne udbrud i Danmark og 23% af de udbrudsrelaterede sygdomstilfælde. Tallet varierer dog meget fra år til år (7-45% af udbrud) på grund af nogle år med mange udbrud fra samme kilde. I opgørelser af udbrud fra EU udgør udbrud fra frugt, grønt og urter kun få procent af udbruddene men 5% af sygdomstilfældene. I USA udgør udbrud fra frugt grønt og urter 13% af udbruddene og 21% af sygdomstilfældene.

Norovirus er årsag til knap halvdelen af udbruddene fra frugt og grønt både i Danmark, EU og USA. I Danmark udgør udbrud med toxiner (primært lectin og cucurbitacin) 20% af udbruddene, Salmonella 9% og patogene E. coli 6%. I EU er der sammenlignet med Danmark registreret en større andel udbrud med Clostridier, og i USA udgør Salmonella en større andel af udbrudsårsagerne end i Danmark.

Bær (hindbær) er den hyppigste årsag til udbrud fra frugt og grønt i Danmark. Selv når der tages højde for hindbæruddbruddene med samme oprindelse i 2005, udgør udbrud fra hindbær en fjerdedel af udbruddene. Udbrud fra tørrede bønner (lectin) og squash (cucurbitacin) udgør henholdsvis 18% og 12% af udbrudskilderne, mens bladsalat er kilden til 15% af udbruddene fra frugt og grønt, selv når udbruddene fra lollo bionda salat fra samme kilde i 2010 regnes for eet udbrud. I EU er detaljer om frugt og grønt udbrudskilderne ikke nemt tilgængelige, men grønt er hyppigere registreret som kilde til

udbrud end frugt og friske krydderurter. I USA er blandede salater og blandet frugt samlet årsag til mere end halvdelen af alle udbrud fra grønt, frugt og urter. I to tredjedele af disse udbrud patogenet ikke kendt. Salat er den hyppigste enkeltkilde til udbrud i USA (13%) efterfulgt af melon, spirer, juice og bær med hver 5-7%.

De hyppigste lokaliteter for de 34 danske udbrud fra grønt- og frugt er kantiner (24%), restaurant/catering (24%) og private fester (21%). De forskellige grønt- og frugttyper og patogener som kilde til udbrud er ikke ligeligt fordelt på udbrudslokaliteter. I USA er lokaliteten for halvdelen af udbruddene fra frugt og grønt restauranter og lignende, mens 13% af udbruddene er i private hjem. Fordelingen af lokaliteter for udbrud fra frugt og grønt i EU kunne ikke opgøres.

Danmark har haft tre udbrud fra spirer (to salmonellaudbrud og VTEC/EHEC udbruddet fra 2010) og desuden fund af patogener i spirer, som ikke kunne relateres til humane tilfælde.

Generelt kan det bemærkes, frugt og grønt i en række case-kontrol undersøgelser af sporadiske (ikke udbrudrelaterede) zoonotiske infektioner i de nordiske lande oftest peger på frugt og grønt som en tilsyneladende beskyttende faktor mod infektion, men en case-kontrol undersøgelse antyder, at specifikt spirer kan være forbundet med sporadiske VTEC-infektioner i Danmark.

1. Grønt og frugt som kilde til udbrud i Danmark

Til opgørelse af grønt og frugt som kilde til udbrud i Danmark er anvendt årsopgørelserne af 608 fødevarerudbrud fra Annual Report on Zoonoses in Denmark 2001-2010. Før 2005 blev fødevarerudbrud i Danmark registreret af flere instanser. Fra 2005 og frem er alle fødevarerudbrud og vandbårne udbrud blevet registreret i een central database (FødevarerUdbrudsDatabasen, FUD), hvilket har gjort udbrudsregistreringen væsentligt mere systematisk. Nærværende opgørelse har derfor mest fokus på perioden 2005-2010.

Det skal bemærkes at tallene i denne opgørelse ikke er helt identiske med tallene i årsrapporterne, idet der er foretaget mindre korrektioner. Det skal desuden pointeres, at opgørelsen hovedsageligt angår sygdom relateret til udbrud og ikke nødvendigvis afspejler forholdene ved sporadiske tilfælde. Det skal også bemærkes, at kilder, der kun vanskeligt påvises som årsag til udbrud (f.eks. fordi de er meget almindelige), kan være underrapporteret i de udbrudsversigterne som ligger til grund for undersøgelsen.

1.1. Grønt og frugt som en af mange udbrudskilder i Danmark

I alt 341 udbrud blev registreret i perioden 2005-2010, med 10.691 registrerede syge og 3.669 laboratoriekonfirmerede tilfælde (tabel 1). I 260 af disse udbrud er kilden kendt. Grønt og frugt blev registreret som kilde i 57 (21,9%) af 260 udbrud med kendt kilde, varierende fra 6,7% i 2008 til 45,3% i 2010.

Tabel 1. Opgørelse af 608 fødevarerudbrud i Danmark 2001-2010.
(Kilde: Annual Report on Zoonoses in Denmark fra 2001 til 2010).

Kilde: Annual Report on Zoonoses in Denmark	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2001-2010	2005-2010
Ukendt kilde	3	3	4	4	7	15	11	24	11	13	95	81
Kød	8	10	14	5	12	7	7	9	5	8	85	48
Fisk			1	1	2	1	2	2	5	6	20	18
Æg	2	1	2			1	1		3		10	5
Mælk/mælkeprodukter/ost				1			2				3	2
Mollusker						2	1		1	1	5	5
Tørrede krydderier										1	1	1
Vand							1		1	2	4	4
Sammensat måltid / Buffet	72	62	49	21	10	16	20	30	16	17	313	109
Andre fødevarer	2					4		1			7	5
Kontakt med dyr				1							1	0
Person-til-person									6		6	6
Ikke-grønt/frugt i alt	84	73	66	29	24	31	34	42	37	35	455	203
Grønt / Frugt	0	0	1	0	7	4	10	3	4	29	58	57
Kendt kilde i alt	84	73	67	29	31	35	44	45	41	64	513	260
Udbrud i alt	87	76	71	33	38	50	55	69	52	77	608	341
Grønt/ frugt i % af alle	0,0	0,0	1,4	0,0	18,4	8,0	18,2	4,3	7,7	37,7	9,5	16,7
Grønt/ frugt i % af kendt kilde	0,0	0,0	1,5	0,0	22,6	11,4	22,7	6,7	9,8	45,3	11,3	21,9
Cases registreret i alt					1.874	1.460	1.508	1.274	1.819	2.756		10.691
Lab-konfirmerede cases ialt					193	245	318	1690	783	440		3.669

I perioden fra 2001 til 2004 blev kun et enkelt udbrud noteret med grønt/frugt som kilde. Det drejer sig om et lille udbrud forårsaget af *Salmonella* lbadan fra importerede tomater i 2003.

I 2005 og i 2010 blev to store udbrud fra henholdsvis frosne hindbær og Lollo Bionda salat registreret i FUD som 5 hhv. 20 enkeltudbrud. I de efterfølgende opgørelser figurerer der kun 34 udbrud fra grønt og frugt i perioden 2005-2010, idet de førnævnte to grupper af udbrud er slået sammen til et enkelt udbrud fra hver kilde. Disse 34 udbrud fra grønt og frugt udgør 14,3% af 237 fødevarebårne udbrud med kendt kilde. Samlede data fra udbruddene ses i Bilag 1.

Tabel 2. Kilder til fødevarebårne udbrud fra grønt og frugt i Danmark 2005-2010.

Kilde: Annual Report on Zoonoses in Denmark fra 2005 til 2010 samt informationer fra FUD.

Udbrudskilde (vehikel)	2005	2006	2007	2008	2009	2010	Hovedtotal	% af udbrud fra grønt og frugt
Bær	2		1		2	4	9	26,5
Hindbær	2		1		1	4	8	
Hyldebær					1		1	
Friske bælgfrugter					1		1	2,9
Sukkerærter					1		1	
Friske krydderurter		1	1				2	5,9
Basilikum		1	1				2	
Græskarfamilien				3	1		4	11,8
Squash				3	1		4	
Kål			1				1	2,9
Broccoli			1				1	
Knoldgrønt			1				1	2,9
Fennikel			1				1	
Majs			1				1	2,9
Babymajs			1				1	
Rodfrugter	1						1	2,9
Gulerødder	1						1	
Salat		2				3	5	14,7
Div grønne		2					2	
Iceberg						1	1	
Lollo Bionda salat						1	1	
Romaine salat						1	1	
Spirer			1	1			2	5,9
Lucerne			1	1			2	
Tomater						1	1	2,9
Tomater						1	1	
Tørrede bælgfrugter		1	1	1	1	2	6	17,6
Kikærter og/eller hestebønner				1			1	
Tørrede bønner		1	1		1	2	5	
Hovedtotal	3	4	10	3	4	10	34	100

1.2. Danske grønt- og frugtudbrud

I de 34 udbrud fra grønt og frugt fra 2005-2010 blev der i alt registreret 2474 cases (23,1% af alle udbrudsrelaterede cases) og 319 laboratoriekonfirmerede cases (8,7% af alle lab-konfirmerede cases relateret til udbrud).

1.2.1. Grønt- og frugttyper som kilde til danske udbrud

De typer af grøntsager og frugt, der blev registreret som kilde til fødevarerelaterede udbrud 2005-2010, er vist i tabel 2. De hyppigste kilder var bær (9 udbrud, 26,5%), tørrede bælgfrugter (6 udbrud, 17,6%), salat (5 udbrud, 14,7%) og squash (4 udbrud, 11,8%), mens kun et enkelt eller to udbrud kunne tilskrives hver af de resterende grønt- og frugttyper.

I alt 10 mulige udbrud fra grønt/frugt er registreret i FUD åtd. pr. 20. juli 2011. For disse er kilderne foreløbigt angivet til at være hindbær (6), bukkehornsspirer i Tyskland (1), sukkerærter (1), tørrede bønner (1) og uspecificeret frugt (1) (data ikke vist).

1.2.2. Patogener/toxiner involveret i danske udbrud fra grønt- og frugt

De patogener og toxiner, som hyppigst er involveret i udbrud fra grønt og frugt er norovirus (15 udbrud, 44,1%), lectiner (5 udbrud, 14,7%), cucurbitacin (4 udbrud, 11,8%), Salmonella (3 udbrud, 8,8%) og Shigella sonnei (2 udbrud, 5,9%). De øvrige 8 udbrud fra grønt og frugt (23%) skyldes 5 forskellige bakterielle patogener, hver registreret som årsag til et enkelt eller to udbrud (tabel 3). Norovirus er det patogen, der forårsager flest udbrud og flest humane sygdomstilfælde, mens Shigella sonnei er det patogen, der har givet anledning til flest laboratorie-konfirmerede tilfælde.

Tabel 3. Antal udbrud, cases og laboratorie-konfirmerede cases fordelt på patogener i 34 udbrud fra grønt og frugt i Danmark 2005-2010.

	Antal udbrud	% af udbrud	Antal cases	% af cases	Antal lab-konfirmerede cases	% af lab-konfirmerede cases
Andre kemiske substanser (glucosider)	1	2,9	28	1,1	0	0,0
Clostridium perfringens	1	2,9	19	0,8	1	0,3
Cryptosporidium	1	2,9	99	4,0	12	3,8
Cucurbitacin	4	11,8	15	0,6	0	0,0
E. coli (antagelig)	1	2,9	45	1,8	0	0,0
ETEC (komb. M. S. Anatum.)	1	2,9	250	10,1	21	6,6
Lectiner	5	14,7	156	6,3	1	0,3
Norovirus	14	41,2	1257	50,8	68	21,3
Norovirus+ETEC	1	2,9	405	16,4	7	2,2
Salmonella	3	8,8	0	0,0	27	8,5
Shigella sonnei	2	5,9	200	8,1	182	57,1
Ialt	34	100	2474	100	319	100

1.2.3. Oprindelsesland for grønt- og frugt udbrudskilder i Danmark

Blandt grønt og frugt, der var involveret i de 34 danske udbrud fra 2005-2010, havde kun et enkelt produkt oprindelse i Danmark, 8 havde oprindelse i det øvrige Europa og 5 stammede fra tredjelande. For 13 udbrud var oprindelsen ikke kendt, og i 6 udbrud skyldtes udbruddet med stor sandsynlighed kontaminering af grønt eller frugt fra udskillelse fra syge eller raske personer i forbindelse med tilberedning eller servering (tabel 4), det drejer sig om tre af 5 udbrud fra salat og de tre registrerede udbrud fra knoldfrugter, rodfrugter og tomat.

Tabel 4. Grønt- og frugt-kilder til 34 fødevarerudbrud 2005-2010 samt produkternes oprindelse og de involverede patogener/toxiner. Kilde Annual Report on Zoonoses in Denmark fra 2005 til 2010 samt informationer fra FUD. Flere patogener kan være til stede i en kilde.

Type	Undertype	Oprindelse	Patogen/toxin
Bær (9)	Hindbær (8) Hyldebær (1)	Serbien (3) Polen (2) Kina (1) Ikke oplyst (2)	Norovirus (8) Glucosider (1)
Tørrede bælgfrugter (6)	Tørrede bønner (6)	Ikke oplyst (6)	Lektin (6) Cl. Perfringens (1)
Salat (5)	Diverse (2), Iceberg (1) Lollo Bionda (1) Romaine (1)	Frankrig (1) Ikke oplyst (1) Personsmitte* (3)	Norovirus (5) ETEC (1)
Græskarfamilien (4)	Squash (4)	DK (1), Ikke oplyst (3)	Cucurbitacin (4)
Friske krydderurter (2)	Frisk Basilikum (2)	Israel (2)	Salmonella (2) ETEC (1)
Spirer (2)	Lucerne (2)	Italien (2)	Salmonella (2)
Friske bælgfrugter (1)	Sukkerærter (1)	Kenya (1)	Shigella sonnei (1)
Kål (1)	Broccoli (1)	Personsmitte* (1)	Norovirus (1)
Knoldgrønt (1)	Fennikel (1)	Ikke oplyst (1)	Antagelig E. coli (1)
Majs (1)	Babymajs (1)	Thailand (1)	Shigella sonnei (1)
Rodfrugter (1)	Gulerødder (1)	Personsmitte* (1)	Cryptosporidium hominis (1)
Tomater (1)	Tomater (1)	Personsmitte* (1)	Norovirus (1)

*Kontaminering af grønt eller frugt fra syge eller raske personer ved tilberedning eller servering.

1.2.4. Lokalteter for danske grønt- og frugtudbrud

De hyppigste lokaliteter for de 34 danske udbrud fra grønt- og frugt er kantiner (8 udbrud), restaurant/catering (8 udbrud) og private fester (7 udbrud). De forskellige grønt- og frugttyper og patogener som kilde til udbrud ser ikke ud til at være ligeligt fordelt på udbrudslokaliteter. Således opstod knap halvdelen af norovirus-udbruddene og udbruddene fra bær i privat regi, mens det ikke var tilfældet for nogen af de 6 lektin-udbrud fra tørrede bælgfrugter (tabel 5 og 6).

Tabel 5. Udbrud fra grønt og frugt i Danmark 2005-2010 (N=34). Grønt- eller frugttype fordelt på udbrudslokalitet.

Grønt/frugt type	Lokalitet										
		Kantine	Restaurant/catering	Privat fest	Diverse*	Privat hjem	General outbreak	Unknown	Farm	Skole	Food producer
Bær (9)	Privat fest (4), Kantine (3), Diverse* (1), Restaurant/catering (1)	3	1	4	1						
Tørrede bælgfrugter (6)	Restaurant/Catering (4), Kantine (2)	2	4								
Salat (5)	Privat fest (2), Kantine (1), Diverse* (1), Privat hjem (1)	1		2	1	1					
Græskarfamilien (4)	Farm (1), Privat fest (1), Privat hjem(1), Restaurant/Catering (1)		1	1		1			1		
Spirer (2)	General outbreak (1), Unknown (1)						1	1			
Friske krydderurter (2)	Skole (1), Unknown (1, muligvis smittet udenlands)							1		1	
Friske bælgfrugter (1)	General outbreak (1)						1				
Kål (1)	Restaurant/Catering (1)		1								
Knoldgrønt (1)	Food producer (1)										1
Majs (1)	Kantine (1)	1									
Rodfrugter (1)	Kantine (1)	1									
Tomater (1)	Restaurant/Catering (1)		1								
	I alt	8	8	7	2	2	2	2	1	1	1

* Relaterede udbrud fra hhv. Lollo Bionda salat og Hindbær med mange lokaliteter

Tabel 6. Udbrud fra grønt og frugt i Danmark 2005-2010 (N=34). Patogener fordelt på udbrudslokalitet.

Patogen/toxin	Lokalitet										
		Kantine	Restaurant/catering	Privat fest	Diverse*	Privat hjem	General outbreak	Unknown	Farm	Skole	Food producer
Norovirus (14)	Privat fest (6), Kantine (3), Restaurant/Catering (3), Diverse* (1)	3	3	6	1	1					
Lectiner (5)	Restaurant/Catering (3), Kantine (2)	2	3								
Cucurbitacin (4)	Farm (1), Privat fest (1), Privat hjem (1), Restaurant/catering (1)		1	1		1			1		
Salmonella (3)	General outbreak (1), Ukendt (2)						1	2			
Shigella sonnei (2)	General outbreak (1), Kantine (1)	1					1				
Glucosider (1)	Kantine (1)	1									
Clostridium perfringens (1)	Restaurant/catering (1)		1								
Cryptosporidium (1)	Kantine (1)	1									
E. coli (antagelig) (1)	Food producer (1)										1
Norovirus+ETEC (1)	Diverse* (1)				1						
ETEC (+ S. Anatum) (1)	Skole (1)									1	
	I alt	8	8	7	2	2	2	2	1	1	1

* Relaterede udbrud fra hhv. Lollo Bionda salat og Hindbær med mange lokaliteter

1.3. Danske spire-relaterede fødevareproblemer

1.3.1. Danske spire-relaterede udbrud og fødevareproblemer

I Danmark er der frem til 2010 registreret tre udbrud fra spirer, og yderligere to fødevareproblemer har været relateret til spirer.

Det første udbrud, hvor spirer blev påvist som kilde, fandt sted i 1995 og omfattede 154 patienter inficeret med Salmonella Newport fra lucernespirer (Neimann et al., 1995). Året før (1994) sås et tilsvarende cluster på 140 patienter med Salmonella Newport, men kilden blev ikke fundet. Patienterne i 1995-udbruddet var overvejende voksne fra Sjælland, og kvinder var overrepræsenteret, svarende til den overordnede alders- og kønsfordeling i det VTEC O104-udbruddet i Tyskland i 2011. De kontaminerede lucernefrø, der var årsag til Salmonella Newport udbruddet, var importeret, men oprindelsen forblev ukendt. Det samme parti frø forårsagede udbrud i Oregon (USA) og British Columbia (Canada), ligesom enkelte tilfælde blev registreret i Sverige.

I 1997 havde Danmark et udbrud med Salmonella Weltevreden (19 patienter) som også skyldtes lucernespirer. Spirerne var produceret i Danmark og frøene stammede fra Italien. Lucernefrøene blev også importeret til Norge og der var også udbrud i Norge og Finland. Sverige havde samme år et udbrud med S. Stanley, og i forbindelse med udbrudsefterforskningen fandtes S. Mbandaka i frø fra samme italienske frøfirma (notificeret). Året efter (2008) havde Norge endnu et udbrud med S. Weltevreden, der formentlig skyldtes spirer. Samme år fandt Tyskland S. Mbandaka i spirer (notificeret), frøene kom fra samme italienske firma tidligt i 2007.

VTEC/EHEC O104 tilfældene i Danmark i forsommeren 2011, havde alle på nær et tilfælde sikker rejseanamnese til Tyskland og det store udbrud fra bukkehornsspirer med oprindelse i Ægypten eller var sekundære tilfælde til disse.

De tre verificerede danske udbrud fra spirer skyldtes således alle lucernefrø kontamineret før spiring.

I 2010 blev der fundet Listeria monocytogenes i lucernespirer i Danmark samtidigt med et mindre cluster af human listeriose. Det var ikke muligt at forbinde disse tilfælde med indtag af spirer. I Danmark blev der samme år desuden isoleret Salmonella fra rødbedespirer. Rødbedespirerne var importeret fra Holland, og de blev trukket tilbage fra det danske marked. Rødbedespirerne gav tilsyneladende ikke anledning til sygdomsudbrud.

1.4 Frugt og grønt som risikofaktor for sporadiske tarminfektioner i Danmark

I to danske case-kontrol undersøgelser af sporadiske campylobacterinfektioner, er både risikofaktorer og 'beskyttende' faktorer (OR<1) behandlet. Neimann et al. (2003) fandt en markant 'beskyttende' effekt fra indtag af æbler og pærer, mens en tilsyneladende forøget risiko fra indtag af vindruer så ud til at være et artefakt forårsaget af sæsonafhængigt indtag kombineret med tidsforskydning af interview af patienter og kontrolpersoner. Wingstrand et al., (2006) fandt ligeledes en markant 'beskyttende' effekt af både indtag af æbler og pærer og af dagligt indtag af rå grøntsager, mens indtag af purløg tilsyneladende var en risiko for campylobacterinfektion. Andre nordiske studier af sporadiske zoonotiske

tarminfektioner har også typisk fundet grønt og frugt som en 'beskyttende' faktor (OR<1), omend ikke altid signifikant (Kapperud et al., 2003; Boquist et al., 2009; Huovinen et al., 2010).

1.4.1. Spirer som risikofaktor for sporadiske VTEC-tilfælde i Danmark

Spørgsmål om indtag af spirer var inkluderet i spørgeskemaet til en dansk case-kontrol-undersøgelse af 62 sporadiske (=ikke-udbrudsrelaterede) humane VTEC-tilfælde i årene 2003-2005 og 133 raske kontrolpersoner matchet til patienterne på alder, køn og bopæl (Porsbo, L.J., DTU Food, personlig meddelelse).

Undersøgelsens fokusperiode var kort (3 dage op til sygdomsstart) og dermed væsentligt under den inkubationsperiode, som blev fundet i VTEC O104-udbruddet i Tyskland i 2011. Mindre end 10% af patienterne rapporterede, at de havde spist spirer (3,2% (indtag af spirer), 6,5% (havde spirer i husholdningen). Selvom indtag af spirer ikke var en statistisk signifikant risikofaktor i undersøgelsen, er det påfaldende, at risikoen ved spirer var >1 og steg til ca. 3 og tæt-på-signifikant, når der i stedet blev spurgt om "spist+måske spist spirer" og "havde+havde måske spirer i husholdningen") (tabel 7).

Tabel 7. Dansk case-kontrol-undersøgelse af risikofaktorer for sporadiske humane VTEC-infektioner (2003-2005). Tabellen viser univariate OR for indtag af spirer og for at have spirer i husholdningen i en 3-dages perioden før sygdomsstart for 62 cases og 133 raske kontrolpersoner matchet på alder, køn og bopæl. (Porsbo, L.J., DTU Food, personlig meddelelse).

	Cases (N=62)	Kontroller (N=133)	Matchet OR	CL 95%	p-value
Spist spirer	2	3	1.695	0.3 - 10.2	0,5652
Spist og måske spist spirer	5	3	3.347	0.8 - 14.4	0,1046
Havde spirer i husholdningen	4	6	1.537	0.4 - 6.7	0,5673
Havde og havde måske spirer i husholdningen	8	6	2.983	0.9 - 10.4	0,0860

2. Grønt og frugt som kilde til udbrud i EU

Til oversigten er benyttet Community Summary Reports on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in the European Union in 2006, 2008 og 2009 samt Community Summary Report on Food-borne Outbreaks in the European Union in 2007. Kun enkelte tal er inkluderet fra 2006-rapporten. I tidligere opgørelser af fødevarebårne udbrud i EU er rapporteringen ikke harmoniseret i samme omfang som i årene 2007-2009. Opgørelserne omfatter ikke udbrud indrapporteret fra de EU-associerede lande Norge og Schweiz. Det skal bemærkes, at der er stor forskel på EU medlemslandenes praksis vedrørende detektion, registrering og rapportering af udbrud. Derfor skal oversigten betragtes som "bedst mulige" overblik men ikke det fulde billede af udbrudssituationen i EU, og tallene skal derfor fortolkes med forsigtighed. Det har ikke for alle opgørelser været muligt at ekstrahere tal fra alle tre EU-rapporter (2007, 2008 og 2009) da de har vægt på forskellige emner, derfor indeholder visse af nedenstående opgørelser tal fra færre end tre år.

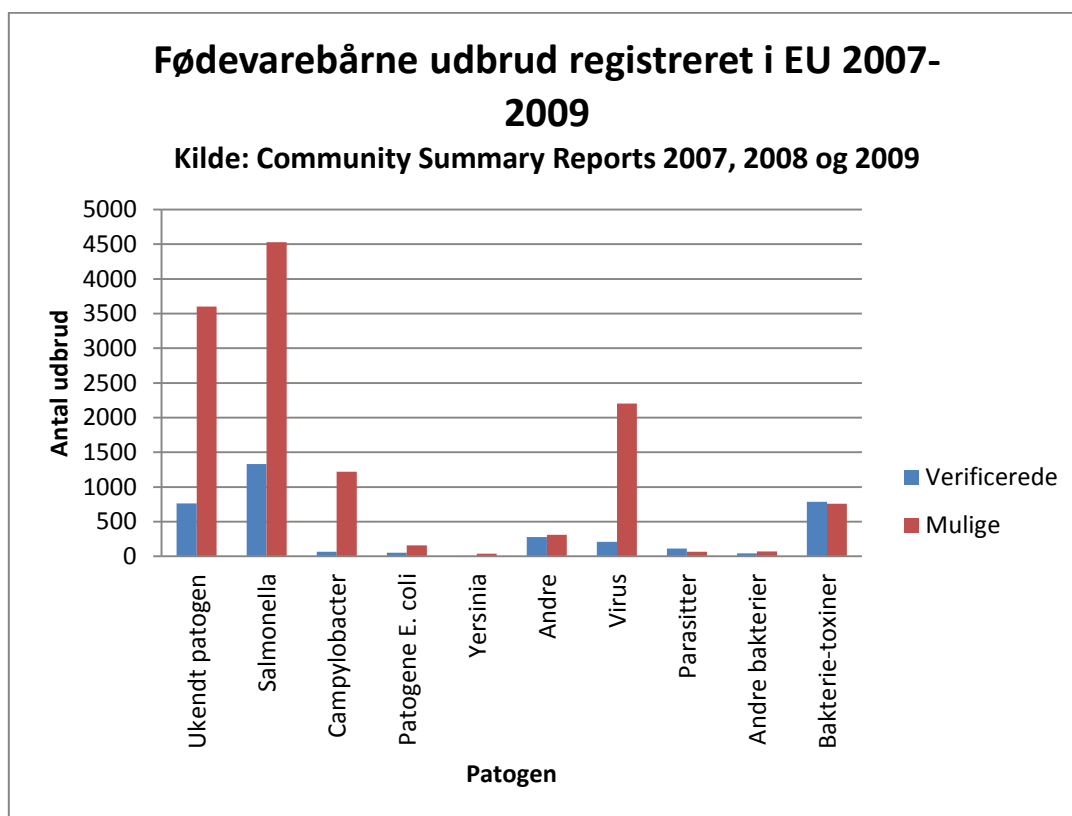
Der blev i alt rapporteret 16.615 udbrud i EU medlemslandene i årene 2007-2009, heraf var 3.651 (22%) verificerede udbrud og 12.964 mulige udbrud. I 2008 og 2009 var udbruddene samlet årsag til hhv. 45.622 og 48.964 syge, 6.230 og 4.356 hospitalsindlæggelser og 32 og 46 dødsfald. Årsagen til udbruddene var kendt for 12.249 verificerede udbrud (73,7%), heraf 2.888 verificerede og 9.361 mulige udbrud.

Detaljer om udbruddene i de følgende afsnit angår de verificerede udbrud. I årene 2007-2009 var de 3.651 verificerede udbrud årsag til 63.300 syge, 7.194 hospitalsindlæggelser og 62 dødsfald.

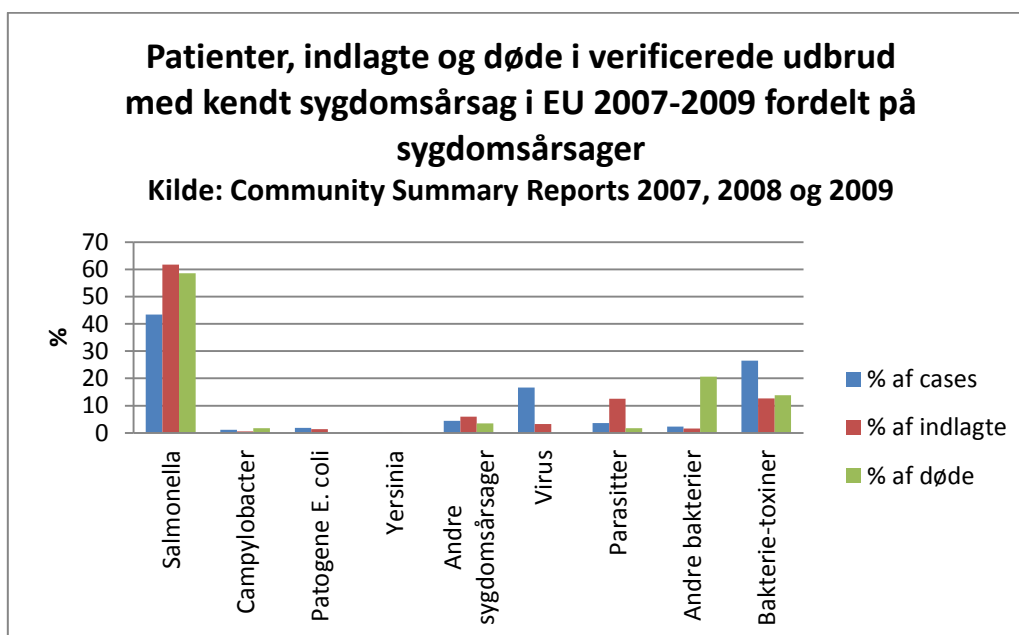
2.1. Patogener involveret i fødevarebårne udbrud i EU

De hyppigste patogener involveret i de 3.651 verificerede udbrud var Salmonella (1.331 udbrud), bakterielle toxiner (788 udbrud), virus (212 udbrud) og andre (ikke-bakterielle) udbrudsårsager (277 udbrud) (figur 1). Hyppige patogener ved de "mulige" udbrud omfattede tillige Campylobacter.

Salmonella var det patogen, der var årsag til flest dødsfald, hospitalsindlæggelser og dødsfald i forbindelse med verificerede udbrud i EU 2007-2009. Der var også mange patienter forbundet med virusudbrud og udbrud fra bakterielle toxiner, mange indlagte i forbindelse med udbrud forårsaget af parasitter og bakterielle toxiner og mange døde i forbindelse med udbrud forårsaget af andre bakterier (heriblandt Listeria) og bakterielle toxiner (figur 2).



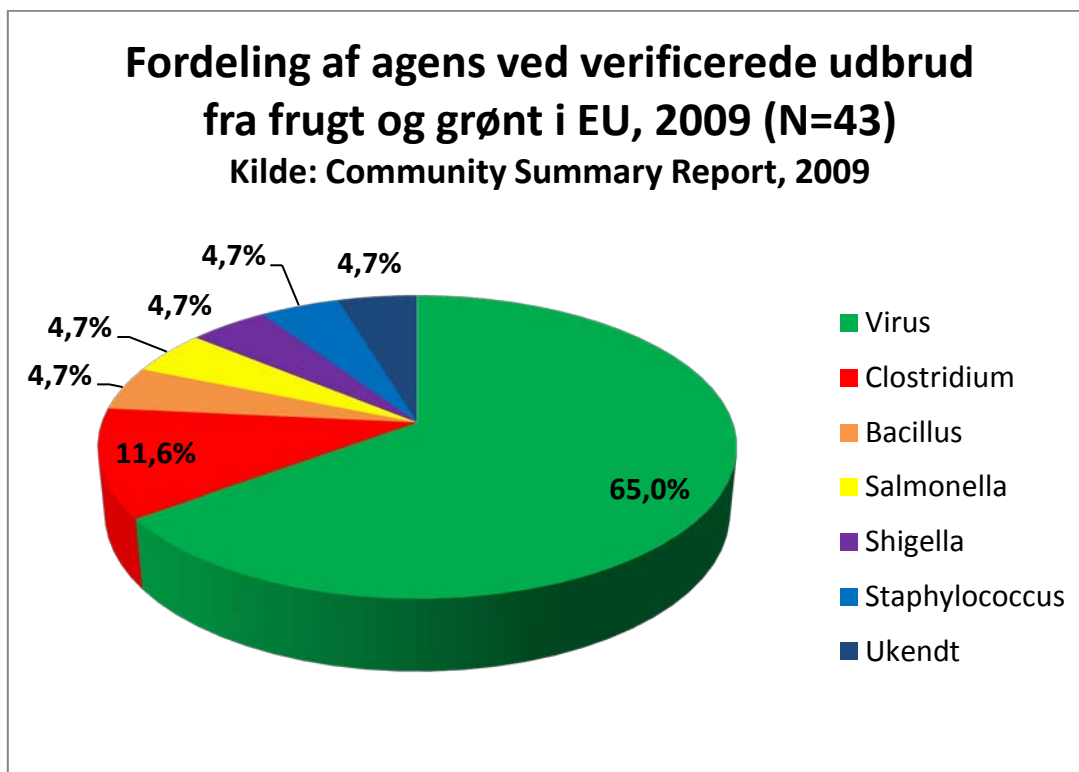
Figur 1. Verificerede og mulige fødevarebårne udbrud registreret i EU 2007-2009, fordelt på patogener. Virus omfatter bl.a. rotavirus og hepatitis A. Andre sygdomsårsager omfatter bl.a. svampe- og marine toxiner, histamin, mycotoxiner og uspecificerede agens. Parasitter er primært Trichinella. Andre bakterier omfatter bl.a. Brucella, Listeria, Shigella, Vibrio og i 2009 desuden Yersinia.



Figur 2. Patienter, indlagte og døde i verificerede fødevarerudbrud i EU 2007-2009, fordelt på patogener. Virus omfatter bl.a. rotavirus og hepatitis A. Andre sygdomsårsager omfatter bl.a. svampe- og marine toxiner, histamin, mycotoxiner og uspecificerede agens. Parasitter er primært Trichinella. Andre bakterier omfatter bl.a. Brucella, Listeria, Shigella, Vibrio og i 2009 desuden Yersinia.

2.1.1. Patogener i udbrud fra frugt og grønt i EU i 2009

I EU rapporten fra 2009 blev fordelingen af patogener opgjort specifikt for de 43 verificerede udbrud fra frugt, grønt og urter/krydderier (incl juice og produkter heraf). Langt det hyppigste patogen var virus (65% af udbruddene), oftest norovirus. Clostridier var involveret i 5 af 43 udbrud (11,6%). Desuden bidrog forskellige bakterielle patogener med i alt 8 udbrud (18,6%) (figur 3 og 5A). Af de mange norovirusudbrud i 2009 var en stor del finske og skyldtes kontaminerede, frosne hindbær fra Polen.



Figur 3. fordelingen af patogener involveret i 43 verificerede udbrud fra frugt, grønt urter/krydderier (inkl. juice og produkter heraf) i EU 2009.

2.1.2. Fødevaretyper i fødevarebårne udbrud i EU

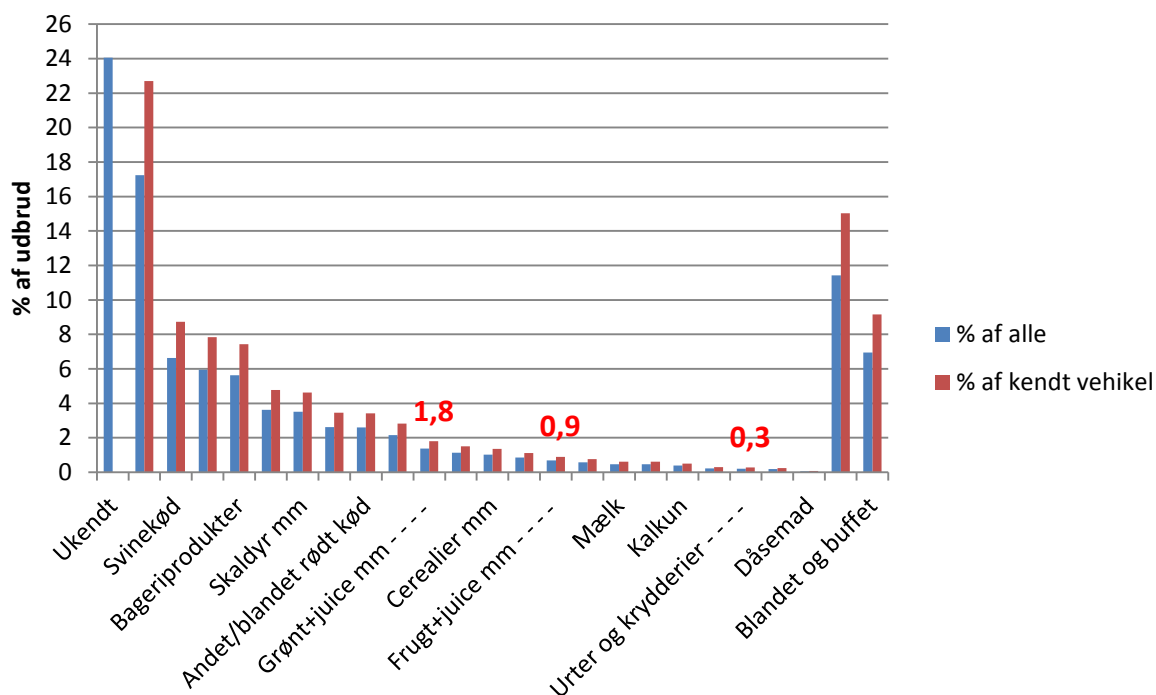
Æg var langt den hyppigste kilde til fødevarebårne udbrud i EU i årene 2007-2009 (23% af udbrud med kendt kilde). Herefter kom en stor del af de øvrige animalske fødevarer. Grønt, frugt og urter/krydderier udgjorde hhv. 1,8%, 0,9% og 0,3% af udbrudskilderne i perioden (i alt 3%) (figur 4). Bidragene fra disse kilder har været få procent af udbruddene alle tre år, omend med nogen variation (tabel 8).

I 2007 og 2008 var frugt+grønt årsag til henholdsvis 18 og 19 verificerede fødevarebårne udbrud i EU mens hhv. 5 og 1 udbrud skyldtes urter/krydderier, mod 43 udbrud fra frugt og grønt samt 2 udbrud fra krydderier i 2009.

I figur 5A ses, at frugt primært bidrog som kilde til virusudbrud (calici-/norovirus), samt til en lille del af salmonellaudbruddene i EU 2007-2009. Grønt bidrog mest til udbrud med virus, bakterielle toxiner og desuden til udbrud med parasitter og Salmonella (figur 5B), mens urter/krydderier bidrog til en lille del af udbrud med bakterielle toxiner og Salmonella (figur 5C).

Fødevarerborne udbrud registreret i EU 2007-2009

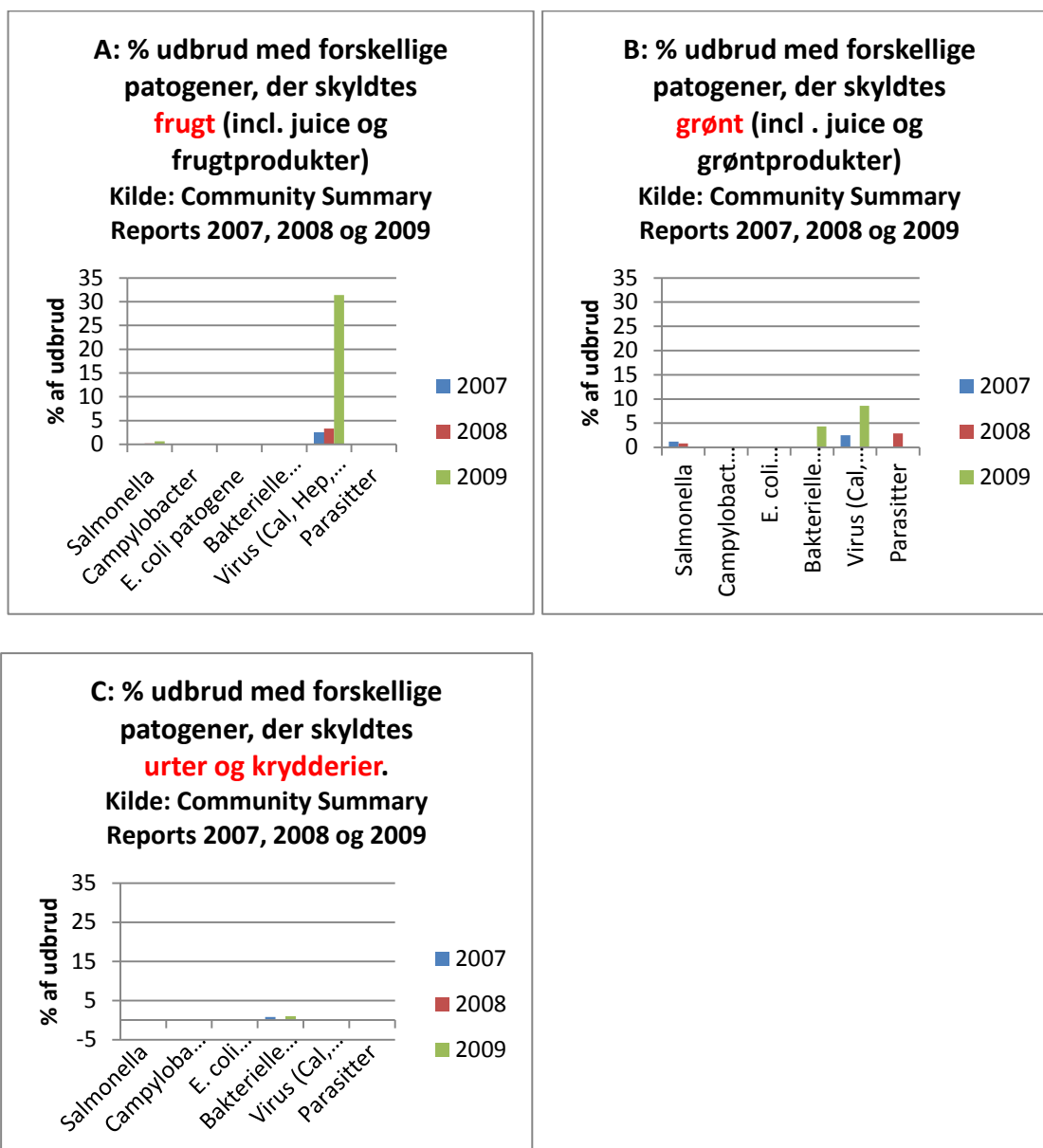
Kilde: Community Summary Reports 2007, 2008 og 2009



Figur 4. Fordeling af kilder til verificerede fødevarerborne udbrud i EU 2007-2009. Procent udbrud med hhv. grønt, frugt og urter/krydderier som kilder er angivet med rødt (8% af udbrud med kendt kilde).

Tabel 8. Frugt, grønt og urter som kilde til verificerede fødevarerborne udbrud i EU 2006-2009.

% af verificerede udbrud i EU	2006	2007	2008	2009
Ukendt kilde	42,6	31,2	42,6	22,1
Frukt/bær (inkl. juice of produkter)	0,4	0,1	0,4	2,3
Urter/krydderier	0,1	0,2	0,1	0,2
Grønt (inkl. juice og produkter)	1,9	0,8	1,9	2,1
Øvrige kendte kilder	55,0	67,7	55,0	73,3
Kendt kilde i alt	57,4	68,8	57,4	77,9
Frukt, grønt og urter i % af udbrud med kendt kilde	4,2	1,6	4,2	5,9



Figur 5. Procent af udbrud forårsaget af forskellige patogener i EU 2007-2009, der havde hhv. frugt (A), grønt (B) og urter/krydderier (C) som kilde.

2.2. Udbrud, cases, indlagte og døde som følge af udbrud fra frugt, grønt og urter/krydderier i % af alle fra udbrud med kendt kilde i EU, 2007

Frugt, grønt og urter/krydderier blev i 2007 registreret som kilde til 1,7% af alle udbrud i EU med kendt patogen og tilgængelige detailoplysninger, heraf 8,3% af udbrud med 'andre bakterier' (et Dansk ud-

brud med 200 patienter forårsaget af *Shigella sonnei*), 4,1% af virusudbruddene (alle calici/norovirus) og 3,7% af udbrud med andre agens.

Frugt, grønt og urter/krydderier var årsag til 5,4% af alle cases i udbrud med kendt patogen i 2007, og var årsag til højeste andel af cases i udbrud med virus (13,6% af cases) og 'andre bakterier' (40,2% af cases, se ovenfor). Frugt, grønt og urter/krydderier sås kun som årsag til 0,4% af alle indlæggelser som følge af udbrud. Alle skyldtes *Salmonella* (0,7% af alle indlagte som følge af salmonellaudbrud). Udbrud fra frugt, grønt og urter/krydderier blev ikke registreret som årsag til dødsfald i EU i 2007 (tabel 9).

Tabel 9. Frugt, grønt og urter/krydderiers andel af udbrud, cases, indlagte og døde fra udbrud med kendt agens og oplyste udbrudsdetaljer i EU 2007. Kilde Community Summary Report. 2007.

Patogen	Fra frugt, grønt og urter/krydderier i % af alle			
	Udbrud	Cases	Indlagte	Døde
Salmonella (403 udbrud)	1,5	3,4	0,7	0,0
Campylobacter (25 udbrud)	0,0	0,0	0,0	*
E. coli patogener (24 udbrud)	0,0	0,0	0,0	*
Yersinia (2 udbrud)	0,0	0,0	0,0	*
Bakterietoxiner (396 udbrud)	0,8	2,7	0,0	0,0
Virus (98 udbrud)	4,1	13,6	0,0	*
Parasitter (30 udbrud)	0,0	0,0	0,0	*
Andre bakterier (12 udbrud)	8,3	40,2	0,0	*
Andre agens (136 udbrud)	3,7	1,1	0,0	0,0
I alt (1126 udbrud)	1,7	5,4	0,4	0,0

*Ingen døde registreret sfa. dette patogen

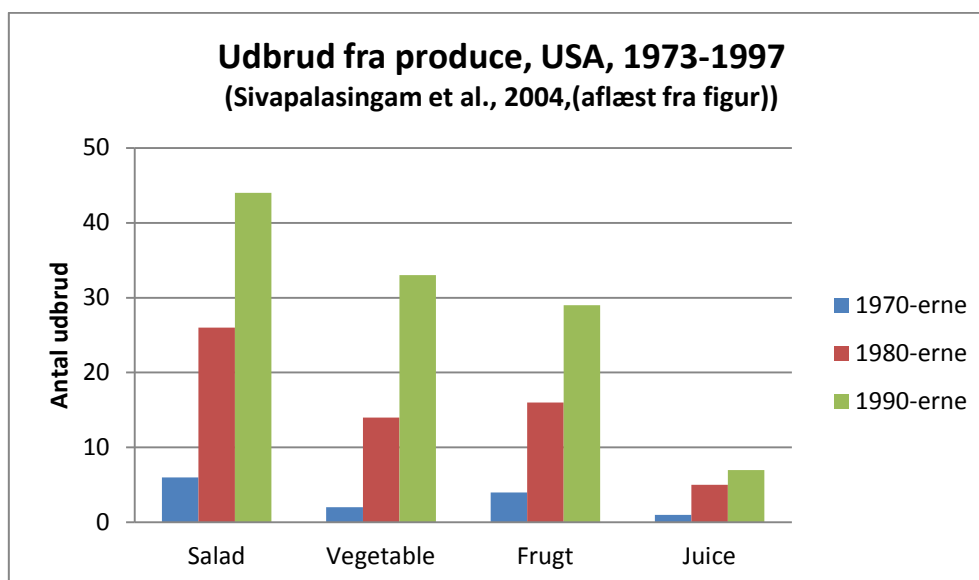
3 Grønt og frugt som kilde til fødevarerborne udbrud i tredjelande

Udbrud fra frugt og grønt er rapporteret fra mange dele af verden – herunder lande udenfor EU - der har systematisk overvågning af fødevarerborne sygdomsudbrud. Nedenfor er det valgt at fokusere på to store opgørelser af udbrud fra USA, men også f.eks. Australien har opgjort de fødevarerborne udbrud, og har fundet frugt og grønt som kilde til 4% af udbruddene, 2001-2005 (Kirk et al., 2008, i Lynch et al., 2009). En opgørelse fra 2010 (Berger et al.) peger særligt på Norovirus, Salmonella og E. coli (herunder VTEC O157) som infektiøse årsager og blandt specifikke grønt/frugt typer nævnes hindbær, tomat/chilipeberfrugter, bladsalat, grønne krydderurter, spirer og juice som almindelige kilder til udbrud. Opgørelsen er primært baseret på udbrud fra USA, men inkluderer også udbrud fra andre dele af verden.

3.1. Grønt og frugt som kilde til fødevarerborne udbrud i USA

Sivapalasingam et al., (2004) identificerede 190 udbrud fra grønt og frugt i USA i perioden 1973-1997, med i alt 16.058 syge, 598 indlagte og 8 døde. Udbruddene fordelte sig med 13 udbrud i 1970-erne, 63 udbrud i 1980-erne og 114 udbrud i 1990-erne. Stigningen sås for frugt, grøntsager, salater og juice (figur 6).

Udbrud fra grønt og frugt udgjorde en stigende andel af det samlede antal udbrud (0,7% i 1970-erne mod 6% i 1990-erne), ligesom de udgjorde en stigende andel af cases fra udbrud (1% i 1970-erne mod 12% i 1990-erne) og udbruddene blev større (det mediane antal cases pr. udbrud steg fra 21 i 1970-erne til 43 i 1990-erne). Der blev registreret 21 multi-state udbrud fra frugt og grønt (2 i hver af de første årtier mod 17 i 1990-erne); multi-state udbruddene omfattede ca. 4 gange så mange tilfælde som enkelt-stat udbrud, målt på det mediane antal cases. De hyppigste kilder til multi-state udbrud var bl.a. udbrud fra spirer (5), æblecider (2), meloner (3), hindbær (2) og frosne jordbær (2).



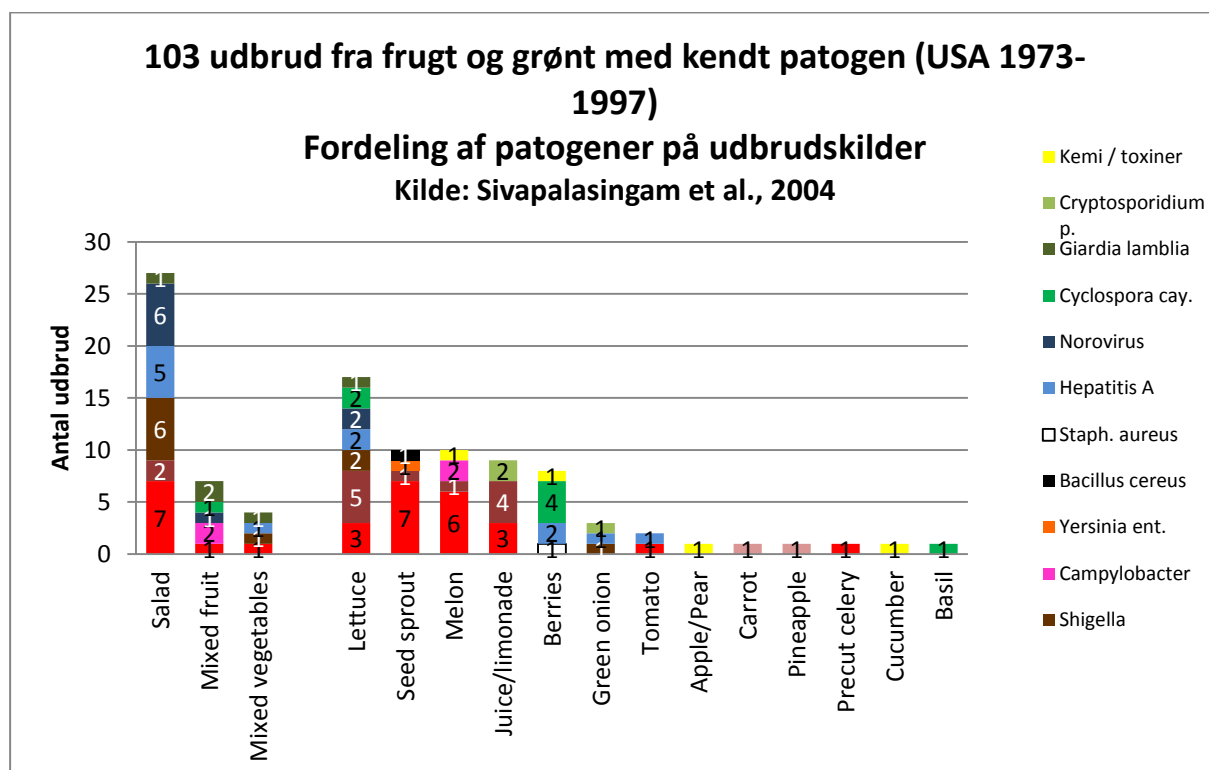
Figur 6. Antal udbrud fra udvalgte grønt- og frugttyper i USA i tre perioder: 1973-1979 (1970-erne), 1980-1989 (1980-erne) og 1990-1997 (1990-erne).

En undersøgelse af udbrud fra grønt og frugt i USA i perioden 1990 til 2005 (DeWaal og Bhuia, 2007), fandt 713 udbrud (34.049 syge) fra frugt og grønt i databasen CSPI (Centre for Science in the Public Interest), svarende til samlet 13% af alle fødevarerudbrud og 21% af syge herfra. Halvdelen af udbruddene skyldtes fødevarer fra restauranter eller andre fødevarer"establishments", og 13% var fra private hjem. Udbrud fra frugt og grønt forekom også på arbejdspladser (6%), catering (3%), skoler (3%) og madordninger for syge/gamle/unge (3%). I gennemsnit var der 48 syge per udbrud i perioden, hvilket er flere syge end der ses for udbrud fra oksekød, fjerkræ og seafood.

Antal udbrud fra frugt og grønt steg markant fra 10-30 udbrud pr. år i perioden 1990-1997 til 60-80 udbrud pr. år fra 1999 til 2005. iflg. DeWaal og Bhuia, 2007 skyldes stigningen meget sandsynligt en styrket indsats i udbrudsovervågningen hos CDC i 1998. Kilden nævner også at forbedrede laboratoriemetoder til påvisning af norovirus er en mulig forklaring. Også øget indtag af frugt og grønt i USA, stigende import fra fjerne oprindelseslande eller øget forekomst af norovirus generelt nævnes af forskellige forfattere som mulige forklaringer på stigningen.

3.1.1. Kilder og patogener involveret i udbrud fra frugt og grønt i USA.

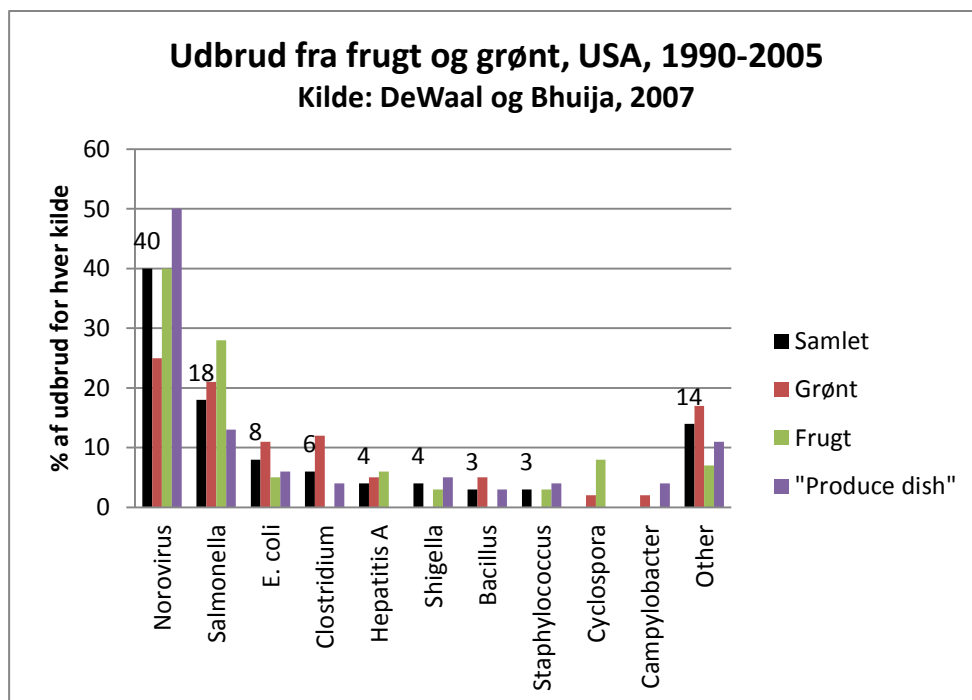
De hyppigste kilder til de 190 udbrud fra frugt og grønt i USA i 25-års perioden 1973-1997 var blandede salater (76 udbrud), bladsalat (25 udbrud), blandet frugt (22 udbrud), spirer (11 udbrud), juice (11 udbrud) og bær (10 udbrud) (Sivapalasingam et al., 2004). Fordelingen af patogener på de forskellige kilder, hvor både oplysning om patogen og kilde findes, ses i figur 7.



Figur 7. Patogener involveret i 103 udbrud fra grønt og frugt i USA 1973-1997.

I undersøgelsen af udbrud fra frugt og grønt i USA mellem 1990 og 2005 (DeWahl og Bhuiya, 2007) var norovirus årsag til 40% af udbruddene (fra 25% af udbrud fra grønt, over 40% af udbrud fra frugt til 50% af udbrud fra "produce dish"). Widdowson et al. (2005) angiver at knap halvdelen af alle norovirusudbrud (inkl. udbrud fra andre kilder end frugt og grønt) med detaljerede oplysninger om kilden anses for at skyldes kontaminering fra "foodhandlers" i forbindelse med - eller tæt på - serveringstidspunktet, men påpeger at andelen reelt meget vel kan være højere. For bakterie-udbrud er andelen associeret med food-handlers kun 20%. Salmonella var samlet årsag til 18% af udbruddene (flere fra frugt, færre fra "produce dish") og E. coli var årsag til 8% af udbruddene (figur 8).

De hyppigste kombinationer af patogener og frugt/grønt i USA i perioderne 1973-1997 og 2000-2005 ses i tabel 10. Det ses tydeligt, at norovirus de seneste år har udgjort en langt større andel af de registrerede udbrud end tidligere. Særligt udbrud af norovirus fra salat bliver meget hyppigere registreret.



Figur 8. De forskellige patogeners andel af udbruddene fra hhv. grønt, frugt og "produce dish" i USA, 1990-2005.

Tabel 10. De hyppigste kombinationer af kilder og patogener i udbrud fra frugt og grønt i USA 1973-1997 og 1998-2005. Antal udbrud, patogen (% af udbrud fra frugt og grønt).

Frugt/grønt-kilde	USA 1973-1997 (N=190) Sivapalasingam et al. (2004)	USA 1998-2005 (N=565) DeWahl og Bhuiya (2007)
Salater	7 Salmonella (3,4%) 6 Shigella (3,2%) 6 Norovirus (3,2%) 5 Hepatitis A (2,6%) -	12 Salmonella (2,1%) - 139 Norovirus (24,6%) - 11 E. coli (2,0%)
Blåsalat	5 E. coli O157 (2,6%) -	- 29 E. coli (5,1%)
Spirer	7 Salmonella (3,4%)	
Melon	6 Salmonella (3,2%)	11 Salmonella (2,0%)
Juice/limonade	4 E. coli O157:H7 (2,1%)	
Bær	4 Cyclospora (2,1%)	
"Frugt"	-	18 Norovirus (3,2%)
Spirer	-	16 Salmonella (2,8%)
"Grøntsager"	-	13 Norovirus (2,3%)
"Frugtsalat"	-	12 Norovirus (2,1%)
Tomater	-	11 Salmonella (2,0%)

Referencer:

Anonymous. Annual Report on Zoonoses in Denmark fra 2001-2010.

Berger, C.N., Sodha, S.V., Shaw, R.K., Griffin, P.M., Pink, D., Hand, P. and G. Frankel. 2010. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens (minireview). *Environ. Microbiol.* 12(9), 2385-2397.

Boqvist, S., Pettersson, H., Svensson, Å. And Y. Andersson. 2009. Sources of sporadic *Yersinia enterocolitica* infection in children in Sweden, 2004: a case-control study. *Epidemiol. Infect.* 137, p 897-905.

DeWaal, C.S. and F. Bhuiya. 2007. Outbreaks by the numbers: fruits and vegetables 1990-2005. international Association for Food Protection Poster Presentation P3-03, July 8-11, Orlando, Florida. posted at <http://www.cspinet.org/foodsafety/IAFPPPoster.pdf> (accessed July 2011)

Emberland, K.E., Ethelberg, S., Kuusi, M., Vold, L., Jensvoll, L., Lindstedt, B-A., Nygård, K., Kjelsø, C., Torpdahl, M., Sørensen, G., Jensen, T., Lukinmaa, S., Niskanen, T. og G. Kapperud. 2007. Outbreak of *Salmonella* Weltevreden infections in Norway, Denmark and Finland associated with alfalfa sprouts, July-October 2007. *Euro Surveill.* Nov 29;12(11):E071129.4. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=3321>

European Food Safety Authority. 2007. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonotic Agents, Antimicrobial resistance and Food-borne Outbreaks in the European Union in 2006. *The EFSA Journal*, 130.

European Food Safety Authority. 2009. The Community Summary Report on Food-borne Outbreaks in the European Union in 2007. *The EFSA Journal*, 271.

European Food Safety Authority. 2010. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in the European Union in 2008. *The EFSA Journal* 8(1):1496.

European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. 2011. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009. *Efsa Journal* 2011; 9(3); 2090. [378pp.] doi: 10.2903/j.efsa.2011.2090. Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal

FødevareUdbrudsDatabasen (FUD)

Huovinen, E., Sihvonen, L.M., virtanen, M.J., Haukka, K., Siltonen, A and M. Kuusi. 2010. Symptoms and sources of *yersinia enterocolitica*-infection: a case-control study. *BMC Infectious Diseases*, 10: 122.

Kapperud, G., Espeland, G., Wahl, E., Walde, A., Herikstad, H., Gustavsen, S., Tveit, I., Natås, O., Bevanger, L. and A. Digranes. 2003. Factors Associated with Increased and Decreased Risk of Campylobacter Infection: A Prospective Case-Control Study in Norway. *Am J Epidemiol*, 158: 234-242.

Lynch, M.F., Tauxe, R.V and C.W. Hedberg. 2009. The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: risks and opportunities (review article). *Epidemiol. Infect.* 137, 307-315.

Neimann, J., Baggesen, D.L. og S.V. Nielsen. 1995. Salmonella Newport-epidemi – smittekilden var lucernespirer. *Zoonose-nyt*, 2(3), p. 9-10.

Neimann, J., Engberg, J., Mølbak, K. and H.C. Wegener. 2003. A case-control study of risk factors for sporadic campylobacter infections in Denmark. *Epidemiol Infect*, 130, 353-366.

Sivapalasingam, S., Friedman, C.R., Cohen, L. and R.V. Tauxe. 2004. Fresh Produce: A Growing Cause of Outbreaks of Foodborne Illness in the United States, 1973 through 1997. *J. Food. Prot.* 67 (10); p 2342-2353.

Widdowson, M-A., Sulka, A., Bulens, S.N., Beard, R.S., Chaves, S.S., Hammond, R., Salehi, E.D.P., Swanson, E., Totaro, J., Woron, R., Mead, P.S., Breese, J.S., Monroe, S.S. and R.I. Glass. 2005. norovirus and Foodborne Disease, United States, 1991-2000. *Emerg. Infect. Dis.* 11(1), p 95-102.

Wingstrand, A., Neimann, J., Engberg, J., Nielsen, E.M., Gerner-Schmidt, P., Wegener, H.C. and K. Mølbak. 2006. Fresh Chicken as Main Risk Factor for Campylobacteriosis, Denmark. *Emerg. Infect. Dis.*, 12(2) 280-284.

Bilag 1

34 udbrud fra grønt eller frugt registreret i FødevarerUdbrudsDatabasen fra 2005 til 2010

År	Måned	FUD nr.	Vehikel	Grønt/frugt	Grønt/frugt Undertype	Distributionsvej	Cases	Confirmed	Setting	Patogen	Patogen Subtype	Fødevareroprindelse
2005	5-8	457-461	Hindbær	Bær	Hindbær	Forsk. Hindbærdesserter på sygehus, plejehjem, madudbringning, restaurant	1007	52	Diverse	Norovirus		Polen
2005	8	414	Gulerødder	Rodfrugter	Gulerødder	Person til person smitte fra syge kokke el kunde i kantine (ssv)	99	12	Kantine	Cryptosporidium	Hominis	
2005	9	462	Hindbær	Bær	Hindbær	Hele frosne hindbær i koldskål fra kantine	34	3	Kantine	Norovirus		Polen
2006	7	627	Friske grøntsager	Tørrede bælgfrugter	Tørrede bønner	Ukendt	10	0	Kantine	Lectiner		
2006	9	638	Friske grøntsager	Salat	Div grønne	Person til person smitte fra syge kokke	35	1	Privat fest	Norovirus		
2006	10	671	Friske grøntsager	Salat	Div grønne	Smitte fra person sygt spædbarn ved fremstilling af salat	4	0	Privat hjem	Norovirus		
2006	11	661	Friske krydderier	Friske krydderurter	Basilikum	Ssv. kontamineret basilikum komb m for langsom nedkøling af pasta m. pesto	250	21	Skole	EPEC (+ S. Anatum)		Israel
2007	4	703	Friske krydderier	Friske krydderurter	Basilikum	Afskåret i israel, pakket på destinationen (UK) 2/3 DK cases kan være smittet i UK, samme batch ikke sporet til DK		3	Unknown	Salmonella	Senftenberg	Israel
2007	5	708	Frisk frugt	Bær	Hindbær	Frosne bær pakket i Kina	9	0	Privat fest	Norovirus		Kina
2007	6	734	Friske grøntsager	Kål	Broccoli	Smitte fra person, kok i inkub.fase	14	0	Restaurant/Catering	Norovirus		
2007	7	743	Friske grøntsager	Spirer	Lucerne	Via NL og DE mellemed, spiret i DK		19	Unknown	Salmonella	Wелtevrede	Italien ssv
2007	8	761	Friske grøntsager	Græskarfamilien	Squash	Ukendt	3	0	Privat hjem	Cucurbitacin		
2007	8	726	Friske grøntsager	Majs	Babymajs	Fra stor dansk grossist til catering og detail samt spist rå fra flere firmaers frokostkantiner	200	172	Kantine	Shigella Sonnei		Thailand

År	Måned	FUD nr.	Vehikel	Grønt/frugt	Grønt/frugt Undertype	Distributionsvej	Cases	Confir-med	Setting	Patogen	Patogen Subtype	Fødevareroprindelse
2007	9	762	Friske grøntsager	Græskarfamilien	Squash	Ukendt	2	0	Privat fest	Cucurbitacin		
2007	9	732	Friske grøntsager	Knoldgrønt	Fennikel	Bulgursalat med rå, skyllet fennikel og sorte oliven fra cateringfirma til flere frokostkantiner	45	0	Food producer	E. coli (antagelig)		
2007	10	763	Friske grøntsager	Græskarfamilien	Squash	Ukendt	6	0	Restaurant/Catering	Cucurbitacin		
2007	12	772	Friske grøntsager	Tørrede bælgfrugter	Tørrede bønner	Ukendt	6	1	Restaurant/Catering	Lectiner		
2008	1	860	Friske grøntsager	Spirer	Lucerne	Mulig sammenhæng til SE udbrud frø fra Italien, spiret i SE		5	General outbreak	Salmonella	Stanley	Italien
2008	7	831	Friske grøntsager	Tørrede bælgfrugter	Kikærter og/eller hestebønner	Hummus evt. komb. lektin og Cl. P.	19	1	Restaurant/Catering	Clostridium perfringens		
2008	8	835	Friske grøntsager	Græskarfamilien	Squash	Købt fra gårdbutik	4	0	Farm	Cucurbitacin		DK
2009	2	870	Juice	Bær	Hyldebær	Frosne rå hyldebær i smoothies	28	0	Kantine	Glucosider		
2009	3	890	Friske grøntsager	Tørrede bælgfrugter	Tørrede bønner	Utilstrækkelig varmebehandling	19	0	Kantine	Lectiner		
2009	4	888	Friske grøntsager	Friske bælgfrugter	Sukkerærter	Fra grossist i Holland til supermarkedskæde i DK		10	General outbreak	Shigella Sonnei		Kenya
2009	9	936	Frisk frugt	Bær	Hindbær	Frosne hindbær fra Netto	6	1	Privat fest	Norovirus		Serbien
2010	1	987	Friske grøntsager	Salat	Iceberg	Smitte fra person ved håndtering	18	0	Privat fest	Norovirus		
2010	1	20 FUD numre	Lollo Bionda salat	Salat	Lollo Bionda salat	Fra engros til cateringvirksomheder	405	7	Diverse	Norovirus+ETEC		Frankrig
2010	3	992	Hindbær	Bær	Hindbær	Frosne hindbær	5	0	Privat fest	Norovirus		Serbien
2010	3	990	Friske grøntsager	Tomater	Tomater	Smitte fra person ved håndtering	15	0	Restaurant/Catering	Norovirus		
2010	6	1005	Bønner	Tørrede bælgfrugter	Tørrede bønner	fra catering til 15 virksomhedskantiner	105	0	Restaurant/Catering	Lectiner		
2010	8	1008	Lettuce Romaine	Salat	Romaine salat	Fra catering til virksomhedskantiner	14	4	Kantine	Norovirus		Sporing ikke mulig
2010	10	1021	Frisk frugt	Bær	Hindbær	Frosne hindbær fra Netto	6	0	Privat fest	Norovirus		Serbien
2010	10	1020	Raspberries	Bær	Hindbær	Ukendt	30	3	Kantine	Norovirus		
2010	11	1025	Bønner	Tørrede bælgfrugter	Tørrede bønner	For kort udblødningstid	16	0	Restaurant/Catering	Lectiner		
2010	11	1030	Hindbær	Bær	Hindbær	Ssv. smoothies med hindbær på kursuscenter	60	4	Restaurant/Catering	Norovirus		

Appendiks 2

Vurdering af hvilke analyseparametre og – metoder der er relevante i Danmark

Flere forskellige typer af mikroorganismer (herunder bl.a. Salmonella, Shigella, E. coli, Campylobacter og forskellige virus og parasitter) har været beskrevet som årsag til fødevarebåren sygdom med frugt og grønt som vehikel. Appendixet indeholder en vurdering af, hvilke analyseparametre – og tilhørende analysemetoder - det vil være relevant at anvende under danske forhold. Herunder, hvorvidt data skal genereres i kvalitativ eller kvantitativ form.

Sammendrag:

Frugt og grønsager er samlet set en divers gruppe af fødevarer, der potentielt kan være kontaminerede med forskellige humanpatogene mikroorganismer. Det er derfor vanskeligt at give generelle forslag til mikrobiologiske analyseparametre. Relevansen af de enkelte parametre vil afhænge af produkttyper, specifikke produktionsforhold, forarbejdning m.v.

Der vil ofte være forskel på de mikrobiologiske analyser, der gennemføres i offentlig regi, og de analyser, der udføres som egenkontrol. For de analyser, der gennemføres i offentlig regi gælder, at de ofte udføres med henblik på at etablere en overordnet viden om forekomst af specifikke mikroorganismer i forskellige produkttyper. For de enkelte virksomheder, der udøver egenkontrol, vil det, med enkelte undtagelser, være af meget begrænset gavn at lave mikrobiologiske analyser for patogene mikroorganismer, da forekomsten af disse typisk er meget lav. Som eksempler på relevante analyser for patogene mikroorganismer, kan nævnes kontrol af spirefrø for forekomst af Salmonella og VTEC, samt testning af visse typer af spiseklare fødevarer for forekomst af Listeria monocytogenes. Det kan også være relevant at analysere for forekomst af indikatorbakterier, primært Escherichia coli, der er en indikator på fækæl forurening.

Når der vælges analyseparametre til undersøgelse af frugt og grønsager, er det relevant at se på oprindelseslandet. For hvert land må man så vurdere, om de sanitære og sundhedsmæssige forhold samt regler for, og kontrol med, produktionsmæssige forhold sikrer en minimering af risikoen for, at der sker spredning af sygdomsfremkaldende mikroorganismer. Som eksempel på parametre, hvor der vil være forskel på danske og udenlandske produkter, kan nævnes humanspecifikke mikroorganismer, som Shigella, Salmonella Typhi/Paratyphi, enterotoksin producerende E. coli (ETEC) samt hepatitis A. Med hensyn til zoonoser, som Salmonella, Campylobacter, parasitter m.v., så findes disse vidt udbredt i verden hos både dyr og mennesker, så her vil det være viden om produktionsforhold nærmere end oprindelsesland, der afgør relevansen af de enkelte parametre. Det samme gør sig gældende for ubikvitært forekommende mikroorganismer, som Listeria monocytogenes, Bacillus og clostridier, Staphylococcus aureus og norovirus.

Der findes veletablerede og internationalt anerkendte standardmetoder til påvisning af Salmonella, Campylobacter, Listeria monocytogenes, Shigella, og E. coli O157 (VTEC). Ligeledes findes der anerkendte standardmetoder til kvantitativ påvisning af L. monocytogenes, clostridier, S. aureus og Bacillus. For virus (noro- og hepatitis A), parasitter (Cryptosporidium, spp og Giardia spp), og VTEC gælder, at der findes velegnede metoder, men der findes ingen internationalt anerkendte metoder. Der findes endvidere internationalt anerkendte standardmetoder til kvantificering af E. coli og Enterobacteriaceae.

Alt efter formålet med undersøgelser, vil der være forskel på, om analyserne skal laves kvalitativt eller kvantitativt. Hvis man ønsker at sige noget om sikkerheden for enkelt produkter med hensyn til for eksempel Salmonella, Campylobacter, Shigella, og nogle typer af VTEC, bør data være kvalitative, da forekomst af disse bakterietyper generelt er uønsket. Kvantitative data vil dog være relevante med henblik på at generere data til risikovurderinger og viden om human eksponering. Lave niveauer af L. monocytogenes kan være acceptable, hvis produkterne er stabiliseret med hensyn til vækstmuligheder, så for L. monocytogenes kan såvel kvantitative som kvalitative data være relevante. For VTEC, virus og parasitter er forholdene komplicerede, primært fordi der er stor forskel i virulensen af de VTEC, virus og parasitter, der kan påvises i fødevarer. Den sundhedsmæssige betydning af fund af disse mikroorganismer er således uklar. For de miljøbetingsende patogene bakterier som clostridier, Bacillus, og S. aureus, vil det som oftest være mest relevant at generere kvantitative data og det samme gælder for indikator-organismerne E. coli og Enterobacteriaceae.

Når man vælger analyseparametre og analysemetoder er det vigtigt at være bevidst om hvad resultaterne skal bruges til. Inden man foretager analyser, skal man have overvejet forhold omkring prøveudtagningsplaner, grænseværdier (se spørgsmål 5 og 6), og, helt essentielt, aktion hvis grænseværdierne overskrides.

Baggrund

Frugt og grønsager er samlet set en divers gruppe af fødevarer, der potentielt kan være kontaminerede med en række forskellige human patogene mikroorganismer. Det er derfor vanskeligt at give generelle forslag til relevante mikrobiologiske analyseparametre. Relevansen af de enkelte parametre vil afhænge af produkttyper, specifikke produktionsforhold, forarbejdning, mv., og dette uanset om det er dansk eller udenlandsk dyrkede/forarbejdede produkter.

Der vil i mange tilfælde være forskel på de mikrobiologiske analyser, der gennemføres i regi af det offentlige, og de analyser, der udføres som egenkontrol af virksomhederne. For den offentlige brug af mikrobiologiske analyser gælder, at disse ofte udføres med henblik på at etablere en overordnet viden om forekomst af forskellige patogene mikroorganismer i forskellige produkttyper. Denne viden, og viden omkring aktuelle udbrudsmønstre, kan så danne grundlag for risikovurderinger, der igen kan aflede forskellige anbefalinger. Fødevarestyrelsens anbefalinger om at give frosne hindbær et kort opkog for at sikre mod for virus, er et eksempel på en anbefaling, der er afledt af den offentlige kontrols erfaringer fra udbrudshåndtering. Den offentlige kontrol kan også ske med henblik på at kontrollere, om gældende mikrobiologiske kriterier, for eksempel dem, der specificeres i forordningen EU 2073/2005 for frugt og grønsager, overholdes.

For de enkelte virksomheder, der udøver egenkontrol, vil det med enkelte undtagelser, være omsonst at anvende mikrobiologiske analyser for patogene mikroorganismer, da forekomsten af disse typisk er

meget lav. Men der er også nævnes tilfælde, hvor analyser for patogene mikroorganismer er relevante, for eksempel frø til spireproduktion, der kan undersøges for forekomst af Salmonella og VTEC. Det kan også være relevant at analysere for forekomst af indikatorbakterier, som Escherichia coli og Enterobacteriaceae.

Når man vælger analyseparameter og analysemetoder er det vigtigt at være bevidst om hvad resultaterne skal bruges til. Inden man foretager analyser, skal man have overvejet forhold omkring prøveudtagningsplaner, grænseværdier og, helt essentielt, aktion hvis grænseværdierne overskrides. Analyseparametre og analysemetoder indgår også som delelementer i begrebet mikrobiologiske kriterier, der ifølge Fødevarestyrelsens "Vejledning om mikrobiologiske kriterier for fødevarer Fødevarestyrelsen" af 22. december 2005 indeholder følgende elementer:

- Angivelse af den relevante mikroorganisme eller dens giftstof (toksin)
- Analysemetode
- Prøveudtagningsplan
- Grænseværdi
- Antal prøveenheder, der skal overholde grænseværdien
- Beskrivelse af opfølgning ved overskridelse af grænseværdien

Endvidere skal det fremgå for hvilken fødevarer det enkelte kriterium gælder og på hvilket trin i produktionskæden.

For sygdomsfremkaldende bakterier som *Salmonella*, og patogene *E. coli* og *Shigella* og *Campylobacter* gælder, at disse bakterier ikke bør findes i spiseklare fødevarer. Derfor skal man anvende kvalitative metoder til undersøgelser. Forekomst af lave niveauer af *Listeria monocytogenes* i spiseklare produkter kan være acceptabelt, hvis det kan dokumenteres, at produktet i øvrigt er stabiliseret med hensyn til vækstmuligheder for *L. monocytogenes*. Kvantitative data er relevante med henblik på at generere data om human eksponering. Her skal man dog være opmærksom på, at mange typer af frugt og grønsager kan understøtte vækst, så sådanne prøver bør tages så "tæt på forbrugeren" som muligt.

For de miljøbetingende patogene mikroorganismer, som *Staphylococcus aureus*, clostridier, og *Bacillus* er det mest relevant at genere kvantitative data. Forekomst af disse typer af bakterier i høje tal vil skulle vurderes individuelt, alt efter produkttype. For virus og parasitter gælder specielle forhold, som der redegøres for senere.

Når der vælges analyseparametre er det relevant at se på oprindelseslandet, og for hvert enkelt land vurdere, om de sanitære og sundhedsmæssige forhold samt regler for og kontrol med produktionsmæssige forhold sikrer, at risikoen for at der sker spredning af sygdomsfremkaldende mikroorganismer minimeres. Som eksempel på bakteriologiske parametre, hvor der vil være forskel på danske og udenlandske produkter, kan nævnes human-specifikke bakterier, som *Shigella*, *Salmonella* Typhi/Paratyphi, enterotoksin producerende *E. coli* (ETEC) og human patogene *Vibrio cholerae*. Disse bakterier findes endemisk i mange udviklingslande, hvor de sanitære forhold kan være af varierende kvalitet. For virus gælder tilsvarende, at Hepatitis A kun findes i begrænset omfang i Danmark, og derfor er det mindre relevant at undersøge danske produkter for denne type af virus. Med hensyn til

zoonoser, som Salmonella, Campylobacter, parasitter m.v. så findes disse vidt udbredt i verden hos både dyr og mennesker, så her vil det være viden om produktionsforhold nærmere end oprindelsesland, der afgør relevansen af de enkelte parametre. Det samme gør sig gældende for ubikvitært forekommende mikroorganismer, som L. monocytogenes, Bacillus og clostridier og S. aureus.

Eksisterende kriterier i EU

I forordningen om mikrobiologiske kriterier for fødevarer (EU 2073/2005) angives mikrobiologiske kriterier for følgende kombination af fødevarer kategorier, mikroorganismer, prøveudtagningsplan, grænseværdier og analysemetoder:

Fødevarer-kategori	Mikroorganismer	Prøveudtagningsplan		Grænseværdier		Reference analysemetode	Led, hvor kriteriet anvendes	Foranstaltning i tilfælde af utilfredsstillende resultater
		N	C	M	M			
1.18. Spirer (spiseklare)	Salmonella	5	0	Ingen i 25 g		EN/ISO 6579	Markedsførte produkter i deres holdbarhedsperiode	
1.19. Snittede frugter og grønsagsager (spiseklare)	Salmonella	5	0	Ingen i 25 g		EN/ISO 6579	Markedsførte produkter i deres holdbarhedsperiode	
1.20. Upasteuriseret frugt- og grønsagsaft (drikkeklar)	Salmonella	5	0	Ingen i 25 g		EN/ISO 6579	Markedsførte produkter i deres holdbarhedsperiode	
2.5.1. Snittede frugter og grønsager (spiseklare)	E. coli	5	2	100 cfu/g	1 000 cfu/g	ISO 16649-1 eller 2	Fremstillingsprocessen	Forbedringer af produktionshygiejnen og bedre udvælgelse af råvarer

2.5.2. Upasteuriseret frugt- og grønsagsaft (drikkeklar)	E. coli	5	2	100 cfu/g	1 000 cfu/g	ISO 16649-1 eller 2	Fremstillings Processen	Forbedringer af produktionshygiejnen og bedre udvælgelse af råvarer
--	---------	---	---	-----------	-------------	---------------------	-------------------------	---

Som det fremgår, specificerer kriteriedokumentet, at der ikke må findes Salmonella i spirer, snittede frugter og grønsagersager (spiseklare), samt upasteuriseret frugt- og grønsagersagsaft (drikkeklar). For spiseklare snittede frugter og grønsagersager samt drikkeklar upasteuriseret frugt- og grønsagersagsaft (drikkeklar) er der sat grænser for forekomst af generisk E. coli.

Generelt om analysemetoder

For mikrobiologiske analysemetoder generelt gælder, at EU lovgivningen refererer til de åbne horisontale referencemetoder, der udvikles, vedligeholdes og udgives i samdrægtighed mellem ISO (International Organization for Standardization) og CEN (European Committee for Standardization). I de nordiske lande er der endvidere en tradition for at anvende metoder udviklet af Nordisk Metodikkomité for Næringsmidler, NMKL.

EU lovgivningen (2073/2005) åbner for muligheden for at anvende alternative metoder, hvis de er validerede efter protokollen beskrevet i ISO16140. Resultatet af metodesammenligningen skal være tilfredsstillende, og metodesammenligningen skal være godkendt og certificeret af en anerkendt certificerings organ (F. eks NordVal, MicroVal eller AFNOR). I rutinelaboratorier anvendes alternative metoder hyppigt, ofte fordi de kan laves hurtigere end de traditionelle dyrkningsbaserede metoder.

EU har etableret referencelaboratorienetværk for forskellige mikrobiologiske agens, herunder Salmonella, Campylobacter, E. coli/VTEC, Listeria, stafylokokker, cryptosporidier m.v. Netværkene ledes af ét referencelaboratorium, og et af netværkets opgaver er, at medvirke til at udvikle metoder til anvendelse i fødevarer. Dette sker blandt andet ved at deltage i det arbejde, der udføres i regi af CEN.

Netværket kan endvidere træde i funktion i krisesituationer, hvor man i forbindelse med udbrudssituationer vil kunne lave ad hoc metoder. Dette er sket i forbindelse med VTEC O104 udbruddet i Tyskland, hvor laboratorienetværket udviklede metoder, der udnyttede epi-stammens antibiotika resistens profil.

En af de største svagheder ved laboratorieanalyser er, at man kun kan analysere begrænsede prøvestørrelser. Den typiske prøvestørrelse er 10-100 gram. Da nogle produkttyper, som for eksempel frø, der anvendes til spireproduktion, kan have en meget ujævn fordeling af mikroorganismer, kan det kræve mange analyser, hvis man skal have en rimelig grad af sikkerhed for, at et parti er fri for mikroorganismer.

Analyse metoder

Under punkt 1 og 2 er der redegjort for de patogene mikroorganismer, der hyppigt associeres med sygdom i forbindelse med frugt og grønsagersager. Det drejer sig primært om:

Enteriske bakterielle infektioner:

- Salmonella
- Campylobacter
- E. coli VTEC/STEC/Enterohæmorrhagiske E. coli
 Entero toksinproducerende E. coli (ETEC)

Shigella

Miljøbakterier

- Listeria monocytogens
- Clostridier
- Bacillus
- S. aureus

Virus

- Norovirus
- Hepatitis A

Parasitter

- Cryptosporidier
- Guardia

Det er også muligheder for at undersøge for forekomst af forskellige indikatorbakterier, herunder de Gram negative grupper, Enterobacteriaceae og coliforme bakterier, samt E. coli. I det følgende gennemgås de oplyste mikroorganismer (parametre) enkeltvis med vurdering af analysemetoder.

Salmonella

Det er relativt simpelt at undersøge for Salmonella, og udover de anerkendte referencemetode fra ISO (EN/ISO 6579) og NMKL (Nr. 71), findes der mange godkendte validerede hurtigmetoder, der fungerer effektivt til påvisning af Salmonella.

Danske undersøgelser for forekomst af Salmonella i frugt og grønsager antyder, at forekomsten er lav i dansk producerede spiseklare produkter. I perioden Maj 2009 til december 2011 undersøgte Fødevarerstyrelsen 100 partier af danske produkter, fordelt med 30 partier spirer og 33 partier bladgrønsager,

36 partier krydderurter og et parti sukkerærter. Der blev ikke fundet Salmonella i nogen af partierne (Anonym 2011). Tilbage i 1999 undersøgte Fødevarestyrelsen 437 prøver af danske frugt og grønsagsager uden at påvise Salmonella. Prøverne fordelte sig på følgende produkter: Agurker (17), Spirer (29), Grønsagsag, ikke nærmere specificeret (129), Rodfrugt (22), Salat (113), Svampe (48), Anden frugt (41), bær (38) (Anonym, 2001). Sammenfattende tyder disse data på, at forekomsten af Salmonella i Danske produkter er meget lav.

Som tidligere nævnt, er der mikrobiologiske kriterier for forekomst af Salmonella i visse typer af grønsagsager. Det er op til de enkelte medlemsstater at kontrollere om de mikrobiologiske kriterier overholdes, og data for forekomst af Salmonella rapporteres i EFSA's årlige zoonoserapport (anonym, 2011). I 2009 blev der på EU plan rapporteret 240 prøver af spirer, hvoraf 0,4% var positive, mens der blev rapporteret en forekomst på <0,1% i spiseklare snittede frugter og grønsager (N=4796). Der blev ikke påvist Salmonella i drikkeklare upasteuriseret frugt- og grønsagsagsaft (N=205).

Campylobacter

Undersøgelser for Campylobacter i fødevarer kan laves efter referencemetoder fra ISO (ISO 10272 (detection), ISO TS 272 part 1 (kvantitativ), ISO TS 10272 part 3, semikvantitativ metode)) eller NMKL (Nr. 119). Der er ISO og NMKL protokoller til kvalitativ, kvantitativ og semikvantitative analyser. Der findes også mange godkendte validerede kvalitative hurtigmetoder, der fungerer effektivt til påvisning af Campylobacter i fødevarer.

Der findes kun enkelte undersøgelser for forekomst af Campylobacter i danske produkter af frugt og grønsager. I perioden maj 2009 til december 2011 undersøgte Fødevarestyrelsen 100 partier af danske produkter fordelt med 30 partier spirer og 33 partier bladgrønsager, 36 partier krydderurter og et parti sukkerærter. Der blev fundet Campylobacter i én prøve salat og en prøve persille fra samme virksomhed (Anonym 2011).

I lande, der er sammenlignelige med Danmark, finder man som oftest lave niveauer af Campylobacter i frugt og grønsager. Der er netop publiceret et hollandsk studie (Verhoeff-Bakkenes et al., 2011), hvor der blev fundet Campylobacter i 0,25% af de undersøgte prøver. I nedenstående tabel er resultaterne for forskellige produkttyper specificeret:

Source	Number of samples	Number of samples positive for Campylobacter spp
Leafy vegetables	562	2
Fruit crops	1157	2
Root crops	196	0
Cabbage	127	0
Mushrooms	8	0

Onions, garlic	42	0
Stem and sprout crops	50	1
Mixed salads/	2549	5
Vegetables		
Vegetable-fruit mix	159	1
Fruit	11	0
Mixed fruit	779	2
Total	5640	13
Vegetables	4691	10
Vegetable-fruit mix	159	1
Fruit	790	2

Diarre fremkaldede E. coli

De diarrefremkaldende E. coli typer, der internationalt oftest associeres med udbrud med frugt og grønsager er de verotoksin producerende E. coli (VTEC) og de enterotoksin producerende E. coli (ETEC). Smittevejen for diarre fremkaldende E. coli er den fækale orale.

Ifølge SSI registreres der årligt omkring 150 tilfælde af VTEC infektioner og omkring 300 ETEC infektioner i Danmark. De fleste udbrud forekommer sporadisk. For ETEC gælder, at man tilfælde associeres med udlandsrejse. Der er ikke rapporteret VTEC udbrud med frugt og grønsager som vehikel. I modsætning hertil, har der været rapporteret ETEC udbrud (se spørgsmål 2).

Verotoksinproducerende E. coli er zootiske, mens human patogene ETEC er non-zootiske.

Internationalt er VTEC serogruppe O157 den VTEC type, der hyppigst giver sygdom hos mennesker. VTEC O157 adskiller sig i forhold til andre E. coli ved at have nogle specielle biokemiske karakteristika, der kan udnyttes diagnostisk i forbindelse med påvisning. Der er således udviklet internationalt anerkendte standard metoder til påvisning af netop denne E. coli serogruppe i fødevarer (ISO16554 og NMKL 164). Der findes også en række hurtigmetoder, der er valideret mod ISO metoden, som fungerer effektivt til påvisning af E. coli O157.

Gennem de senere år er der udført et stort arbejde i regi af CEN med henblik på at udvikle en internationalt anerkendte standardmetode til påvisning af flere typer af VTEC i fødevarer. Arbejdet er udført af en "ad hoc group", organiseret under "working group 6" i Technical Committee C 275 "Food analysis - Horizontal methods". Jeppe Boel fra Fødevarerinstitutionen har deltaget i gruppen. Der er blevet udviklet en metode, der er på tærskelen til at blive offentliggjort: VTEC: Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) belonging to O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups — Qualitative Method EN ISO TS 13136. Metoden er baseret på opformering af prøvemateriale i bouillon, efterfulgt af PCR påvisning af gener, der koder for verotoksin (vtx), samt et virulens-

gen betegnet *eae*. Hvis prøverne er screeningspositive for *vtx*, kan der yderligere undersøges for gener, der er specifikke for O grupper af *E. coli* (O26, O103, O111, O145 og O157), som hyppigt associeres med sygdom hos mennesker. Hvis prøverne er positive for en eller flere af de undersøgte gener, isoleres VTEC ved at undersøge op til 50 enkeltkolonier fra *E. coli* isolations medier.

Metoden er delvist valideret af EU referencelaboratorier netværket, der har gennemført forskellige interlaboratorie studier, for at vurdere metodens egnethed. I 2011 er der gennemført et studie, hvor metoden blev afprøvet på spinat.

I den videnskabelige litteratur er der beskrevet mange forskellige metoder til at påvise VTEC i fødevarer. Fælles for metoderne er, at de typisk er baseret på opformering og efterfølgende screening af opformeringskultur for forekomst af VTEC. Screeningen sker enten direkte, ved påvisning af toksinet, eller indirekte ved at påvise gener, der koder for toksinet. Efterfølgende isoleres VTEC så fra screeningspositive prøver ved at undersøge enkeltkolonier fra *E. coli* isolationsmedier.

VTEC er en bakterie, der findes vidt udbredt hos dyr, især drøvtyggere. Der er stor forskel på det sygdomsfremkaldende potentiale hos forskellige typer af VTEC. Nogle VTEC typer kan give meget alvorlige sygdomme og har lav infektiøs dosis, mens andre VTEC typer stort set aldrig giver anledning til sygdom (Anonym 2007). Det er således en udfordring at fortolke den sundhedsmæssige betydning af fund af VTEC i fødevarer. Men omvendt er det også klart, at der findes mange VTEC typer, der kan give anledning til så alvorlige sygdomme, at forekomst i fødevarer er helt og aldeles uønsket.

Internationalt er der rapporteret forskellige undersøgelser af frugt og grønsager for forekomst af *E. coli* O157 (Mukherjee et al., 2004; Oliveira et al., 2010). Det er dog meget sjældent, at *E. coli* O157 findes i disse produkttyper.

Der findes ingen standardmetoder til undersøgelse af fødevarer for ETEC. I den videnskabelige litteratur er der beskrevet forskellige fæno og genotypiske metoder til påvisning. I dag anvendes primært DNA baserede metoder til påvisning af toksin gener (ST og LT), samt gener, der er associeret med ETEC bakteriernes evne til at tilhæfte sig tarmepithelceller; CFAI og II. Det er muligt at screene opformeringsbouillon og på den måde teste fødevarer prøver negative for forekomst. ETEC undersøgelser af fødevarer er primært noget, der udføres i forbindelse med udbrudseftersporing, og der findes ikke gode tal for forekomst i frugt og grønsager.

Shigella

I Danmark registreres der mellem 150 og 300 tilfælde af Shigellose per år (SSI). De sporadiske tilfælde er næsten altid rejseassocierede, men fra tid til anden registreres der udbrud, der typisk er forårsaget af importerede kontaminerede frugt eller grønsagsprodukter, der er spist uden forudgående varmebehandling, se spørgsmål 2.

Der findes fire *Shigella* grupper (arter), *S. dysenteria*, *S. boydii*, *S. flexneri* og *S. sonnei*, som alle kan give sygdomme hos mennesker. *Shigella* er værtsadapterede, og med undtagelse af visse primater, er shigellose en sygdom, der kun ses hos mennesker. Smitten overføres af den fækale orale vej. Der findes mange lande, hvor shigellose forekommer endemisk. Disse lande er ofte karakteriseret ved at have dårlige sanitære systemer. Den infektiøse dosis af *Shigella* antages at være lav.

Kulturbaseret påvisning af *Shigella* i fødevarer kan ske efter referencemetoden ISO 21567. Påvisning af *Shigella* i fødevarer er vanskeligt, specielt fordi *Shigella* udviser varierende vækst på selektive me-

dier. Der anbefales derfor ofte, at der anvendes medier med forskellig grad af selektivitet. Problemet med medier med lav selektivitet er, at *Shigella* ofte bliver overvokset af ledsagefloraen.

Der findes også PCR protokoller til påvisning af *Shigella*, herunder en NMKL protokol; NMKL nr. 174: *Shigella* spp. PCR-metode for påvisning i livsmedel. I Danmark har Fødevareinstituttet, efter samråd med nordiske kollegaer, implementeret en PCR baseret protokol baseret på detektion af IPA genet (Sethabutr et al., 1993), en metode, der dog har ligget i dvale nogle år.

Det er ikke normalt at finde *Shigella* i fødevarer, og derfor er det heller ikke hensigtsmæssigt at undersøge for bakterien, med mindre man i forbindelse med udbrud, har en specifik mistanke til en konkret fødevare.

Miljøbakterier

Der findes velegnede standardmetoder, til påvisning og eller kvantificering af de vigtigste ubikvitært forekommende fødevarerborne sygdomsfremkaldende bakterier i frugt og grønsager:

Listeria monocytogenes: ISO 11290 part 1 (detektion), ISO 11290 part 2; (enumeration). NMKL nr. 136, samt en lang række godkendte validerede hurtigmetoder.

Bacillus cereus: ISO 7932 og ISO 21871, NMKL nr. 67

Clostridium perfringens: ISO 7935 og NMKL nr. 95.

Clostridium botulinum: NMKL nr. 80.

Staphylococcus aureus: ISO 6888-1-3, og NMKL nr 66

Det er ikke unormalt, at man kan finde bakterietyperne i frugt og grønsager i lave niveauer. Vurderinger af hvornår det er relevant at undersøge for de enkelte parametre, samt vurderinger af den sundhedsmæssige betydning af forekomst i fødevarer, foretages typisk *ad hoc*, idet det nærmest er umuligt at angive generelle retningslinjer for undersøgelser af frugt og grønsager.

Indikatorer

Der er en lang tradition for at anvende forskellige bakterielle indikatorer til at evaluere, om produkter har været udsat for fækal forurening, er blevet korrekt varmebehandlet, eller om der har været brud på kølekæden.

Forekomst af *E. coli* er en hyppig anvendt indikator på fækal forurening. *E. coli* er den dominerende aerobe bakterie i tarmen, og dyr og mennesker udskiller mellem 10^5 - 10^6 CFU per gram fæces. Rationalet for at anvende *E. coli* som indikator på fækal forurening er, at det naturlige levested for bakterien er tarmen hos varmblodede dyr og mennesker, mens bakterien henfalder, når den kommer udenfor tarmen. Høje niveauer af *E. coli* antages således at være korreleret med en forøget sandsynlighed for tilstedeværelse af sygdomsfremkaldende tarmbakterier, som *Salmonella*, *Campylobacter* og *VTEC*.

Der findes forskellige internationalt anerkendte metoder til kvantitative undersøgelser for forekomst af *E. coli*. I Danmark anvendes der typisk NMKL metoder (no. 96 og 125), mens der i EU lovgivningen refereres til ISO TS 16649 part 1, 2 og 3. Metoderne kan påvise af *E. coli*, hvis de er tilstede i antal på mere end 10 CFU per gram.

Som tidligere nævnt, findes der i EU's kriteriedokument 2073/2005 kriterier for forekomst af E. coli i tre typer af frugt og grønsagsprodukter; drikkeklar upasteuriseret frugt- og grønsagssaft, drikkeklar upasteuriseret frugt- og grønsagssaft og spiseklare snittede frugter og grønsager. I kriteriedokumentet angives der ikke nogen specifik begrundelse for valget af E. coli som indikatororganisme i de angivne produkttyper, men der er en reference til en "Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health (svarende til det nuværende BioHax panel) on verotoxigenic E. coli (VTEC) in foodstuffs, som blev adopteret i januar 2003. I denne "opinion" konkluderes det, at testning af slutprodukter for forekomst af VTEC O157 ikke er relevant, mens det anbefales, at gennemføre mikrobiologiske guidelines, der kan sikre at der sker en reduktion af den fækale kontamination af fødevarer, herunder forekomst i frugt og grønsager.

I litteraturen findes der mange undersøgelser, hvor frugt og grønsager er undersøgt for forekomst af E. coli og patogene mikroorganismer. Abadias et al (2008) og Oliveira et al (2010) påviste E. coli i henholdsvis 40% og 22% af prøver af frugt og grønsager, men i begge studier blev der fundet så lave forekomster af Salmonella, VTEC O157 og Campylobacter, at der ikke kunne konkluderes på sammenhængen mellem fund af E. coli og forekomst af patogene tarm bakterier. Tilsvarende observationer er gjort af Johnston et al. (2006).

I perioden maj 2009 til december 2011 undersøgte Fødevarestyrelsen 336 partier af frugt og grønsager for kvantitativ forekomst af E. coli. Resultaterne er angivet i nedenstående tabel:

Kvantitativ forekomst af E. coli i danske og importerede produkter (Anonym 2011)

Varetype	Antal partier (N)	E. coli: Partier med >100 cfu/g (%)
Babymajs	20	5 (25%)
Sukkerært	46	1 (2,2%)
Spirer, uspecifik	38	3 (7,9%)
Bladgrønsager, uspecifik	105	1 (1,0%)
Krydderurt, uspecifik	125	10 (8,0%)
Andet	2	0
Total	336	20 (6,0%)

Der blev isoleret E. coli i niveauer, der oversteg 100 cfu/g i alle de undersøgte produktgrupper. Dette forekom dog oftest i minimajs. I undersøgelsen kunne der ikke ses sammenhæng mellem fund af Campylobacter og tilstedeværelse af E. coli, idet der ikke blev fundet indhold af E. coli over 100 pr. g. i prøver fra de partier, der var kontamineret med Campylobacter. Derimod var der ret god sammenhæng mellem fund af Salmonella og tilstedeværelsen af E. coli i høje niveauer i prøver fra de fem partier krydderurter, hvorfra der blev isoleret Salmonella.

E. coli kan påvises i mange typer af frugt to grønsager. I 1999 undersøgte Fødevarestyrelsen (Anonym 2001) forskellige danske og importerede produkter for forekomst af *E. coli* med en kvalitativ metode med følgende resultater:

Kvalitativ forekomst af *E. coli* i importerede og danske produkter.

Tabel lavet fra Anonym (2001).

Produkt Type	N	Positive (%)	Importerede (%)	Dansk (%)	Ukendt oprindelse (%)
Agurker	60	3,3	7,4	0,0	0,0
Spirer	43	34,9	20,0	41,4	25,0
Babymajs	38	34,2	34,2	-	-
Grønsagersag	420	6,4	8,1	3,9	5,9
Rodfrugt	84	14,3	20,5	4,5	11,1
Salat, grøn	246	17,5	11,3	23,0	16,7
Svampe	85	10,6	5,6	16,7	0,0
Anden frugt	224	2,2	0,8	2,4	5,8
Bær	191	2,1	1,6	2,6	3,4
I alt	1391	9,3	8,3	12,4	7,0

På denne baggrund kan det konkluderes, at det er svært at dokumentere sammenhæng mellem forekomst af *E. coli* og forekomst af sygdomsfremkaldende tarmbakterier som *Salmonella*, *Campylobacter* og *VTEC O157*. Men dette forhold kan vel være betinget af, at den vide udbredelse af *E. coli* i frugt og grønsager, sammenholdt med den begrænsede forekomst af patogene tarmbakterier, gør at det er svært at vise denne sammenhæng. Men det kan også konkluderes, at undersøgelser af frugt og grønsager ofte inkluderer undersøgelser for forekomst af *E. coli*.

Det er også muligt at anvende andre typer af indikatororganismer end *E. coli* til undersøgelser af frugt og grønt. Der kan således laves undersøgelser for forekomst af Enterobacteriaceae og koliforme bakterier (laktoseforgærende medlemmer af Enterobacteriaceae). Der findes internationalt anerkendte metoder til påvisning af begge bakteriegrupper, både ISO og NMKL metoder. Indikatorerne er dog typisk uegnede til anvendelse i rå frugt og grønsager, da mange af de bakterietyper, der findes i enterobacteriaceae- og koliform grupperne også findes som en naturlig del af den mikrobielle flora i frugt og

grønsager. Men metoderne kan være velegnede til proceskontrol, for eksempel i forbindelse med blanchering af grønsager, der skal medføre en kraftig reduktion i antallet af denne indikator.

Parasitter

Cryptosporidium spp og *Giardia* spp er parasitter, der kan findes i frugt og grønsager, og som giver anledning til sygdom hos mennesker er. I årene 2006 - 2008 blev der på Statens Serum Institut konstateret ca. 200 tilfælde årligt af *Giardia* (Stensvold & Nielsen, 2009), mens der i perioden 2007- 2010 rapporteredes henholdsvis 49, 92, 35 og 25 tilfælde af cryptosporiose (Annual report 2010). Mange af de danske tilfælde er associeret med udenlandsrejse. Sygdommene er ikke anmeldeligt i Danmark, og patienter undersøges ikke rutinemæssigt for forekomst af parasitter. Det reelle antal tilfælde er derfor sandsynligvis meget højere.

Det er sjældent, at der rapporteres danske udbrud forårsaget af fødevarer. Det seneste betydende udbrud blev konstateret i 2005, hvor 99 personer blev syge af *Cryptosporidium hominis*. Epidemiologiske undersøgelser pegede på gulerødder og rød peber serveret fra buffet, som de mest sandsynlige kilder til udbruddet (Ethelberg et al., 2009). Årsagen til, at netop disse produkter var kontamineret med *Cryptosporidium*, kunne ikke fastlægges, men Ethelberg et al. (2009) antog, at den mest sandsynlige kilde til forureningen var via direkte forurening fra en person, der udskilte parasitten.

Der er usikkerhed omkring det zoonotiske potentiale af de to typer af parasitter. Ifølge Dorny et al. (2009) er der beskrevet 16 forskellige *Cryptosporidium* arter og 33 forskellige genotyper, men det er kun et mindre antal, der er zoonotiske. *Cryptosporidium parvum* anses for at være det største zoonotiske problem. Med hensyn til *Giardia* gælder det samme; det er ikke alle typer, der er zoonotiske. Begge parasitter har en lave infektiv dosis; 9-1042 *C. parvum* oocyster (Okhuysen et al., 1999) og 25-100 *Giardia* cyster (Rendtorff, 1954) kan forårsage infektion hos mennesker.

Der findes ikke internationalt anerkendte standardmetoder til påvisning af *Cryptosporidium* og *Giardia* i fødevarer, men der findes standardmetoder til undersøgelser af vand: ISO 15553:2006 Water quality - Isolation and identification of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water. I den videnskabelige litteratur findes der beskrevet mange forskellige metoder til påvisning i fødevarer, og US Food and Drug Administration angiver i deres "Bacterial Analytical Manual" metoder til påvisning af *Cryptosporidium* i frugt og grønsagersager (Detection of *Cyclospora* and *Cryptosporidium* from Fresh Produce: Isolation and Identification by Polymerase Chain Reaction (PCR) and Microscopic analysis, se link: www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm073638.htm).

Principperne bag påvisning i vand og fødevarematricer er de samme. Først elueres og opkoncentreres (oo)cyster, og derefter påvises (oo)cysterne. Opkoncentreringen af (oo)cysterne kan ske ved anvendelse af filtrering, immunomagnetisk separation, flokulering, eller gradientcentrifugering. Påvisningen af (oo)cysterne sker typisk ved anvendelse af specifikke antistoffer mærket med signalstoffer. Herefter påvises (oo)cysterne, som oftest ved brug af fluorescensmikroskopi (DIFA – direct immunofluorescence assay), men det er også muligt at anvende flowcytometri. (Oo)cyster kan også påvises ved brug af DNA baserede teknikker, herunder PCR. Ved positive fund kan der foretages arts-differentiering ved anvendelse af PCR diagnostik, og der kan laves undersøgelser for vitalitet ved at inducere excystation i laboratoriet eller foretage farvninger, der kan adskille døde og levende (oo)cyster. Endelig kan man foretage infektivitetsundersøgelser ved at pøde mus. For en mere grundig gennemgang af metoder til påvisning og karakterisering af parasitter henvises til bilag B i Miljøsty-

relsens rapport "Risikovurdering af Giardia og Cryptosporidium i vand", Miljøprojekt Nr. 1070 2006 samt oversigtsartikel af Smith og Nichlos (2010).

Der findes ikke publicerede danske undersøgelser af frugt og grønsager for forekomst af Cryptosporidium spp og Giardia spp. Det er dog ikke unormalt at finde Cryptosporidium spp og Giardia spp i frugt og grønsager, specielt i lande, hvor hygiejneniveauet er lavere end i Danmark (Smith & Nichols 2010). Men i lande, der er sammenlignelige med Danmark, kan man også finde parasitterne i frugt og grønsager. I Norge har man gennemført en undersøgelse af 475 prøver af frugt og grønsager i perioden august 1999 til januar 2001 (Robertson & Gjerde, 2001). Seks procent (29) af prøverne var positive for enten Cryptosporidium oocyster eller Giardia oocyster. Der blev påvist Cryptosporidium i 19 prøver, herunder salat og mjangbønner. Ti prøver var positive for Giardia i prøvetyper som dild, jordbær, mjangbønner, salat og radissespirer og der blev påvist (oo)cyster i produkter, der var produceret i Norge. Koncentrationerne af parasitterne var generelt lave; for Cryptosporidium fandt man mellem 1 og 6 oocyster per 100 gram og mellem 1 og 8 Giardia cyster per 100 gram.

Generelt må det konkluderes, at der findes gode, om end ikke internationalt anerkendte, metoder til påvisning af parasitter i frugt og grønsager. Men der mangler basal viden omkring betydningen af fund af Cryptosporidium spp og Giardia spp i frugt og grønsager, og med den nuværende mangelfulde viden, er det svært at vurdere den risiko, der er behæftet med at indtage forskellige typer og niveauer af parasitter via frugt og grønsager.

Slutteligt skal nævnes, Roy et al. (2004) i 1999-2001 gennemførte et case-control studie i USA, hvor det blev fundet at rå grønsager var en beskyttende faktor for cryptosporidie infektioner.

Virus

De typer af virus der hyppigst associeres med fødevarerborne sygdom hos mennesker er norovirus og hepatitis A. I den videnskabelige litteratur er der beskrevet forskellige DNA/RNA baserede PCR protokoller til påvisning af virus i frugt og grønsager, og de seneste år er der udført et stort arbejde i regi af CEN med henblik på at udvikle internationalt anerkendte standardmetoder til påvisning af virus i fødevarer. Arbejdet udføres af en "task group", benævnt TAG 4, organiseret under "working group 6" i Technical Committee C 275 "Food analysis - Horizontal methods". Anna Charlotte Schultz fra Fødevarerintitutttet deltager i arbejdsgruppen. Det forventes, at metoderne vil blive publiceret som teknisk specifikation i 2012, hvorefter de kan benyttes som reference metoder i forbindelse med implementering af viruskriterier i lovgivningen. Der er netop iværksat et interlaboratorie-baseret valideringsstudie af metoderne, som forventes færdigt i 2018, hvorefter metoderne kan publiceres som endelig standard(er).

De foreslåede standardmetoder omfatter påvisning af norovirus (NoV) genogruppe 1 og 2 samt hepatitis A (HAV) i følgende matricer: To-skallede bløddyr; bladsalat; bløde frugter (soft fruits); overflader af frugt og grønsager, køkkenmiljøer samt flaskevand. Metoderne er baseret på at virus elueres og koncentrerer fra prøverne efterfulgt af DNA/RNA oprensning og påvisning af virus specifikke RNA/DNA sekvenser ved revers transscriptase (RT)-PCR. Den foreslåede metodestandard kan udbygges til at gælde andre virus end NoV og HAV og dækker både kvantitativ og kvalitativ påvisning.

Det er nødvendigt at anvende kvantitative metoder fordi der findes virus RNA/DNA i lave niveauer i mange typer af fødevarerprodukter, specielt i toskallede bløddyr, men også i frugt og grønsager. Erfa-

ringsmæssigt ved man, at lave niveauer af virus i forskellige typer af levnedsmidler ikke giver anledning en forøgelse af antallet af rapporterede sygdomstilfælde, forårsaget af virus.

I et belgisk studie publiceret i 2011 (Stals et al., 2011) fandt man norovirus G1 og eller G2 i 18 af 75 undersøgte prøver og NoV blev påvist i hindbær, jordbær, cherry tomater og frugtsalat. Frugtprøverne blev også undersøgt for Salmonella og E. coli O157 (alle prøver negative), Enterobacteriaceae og generisk E. coli, uden at der fandtes sammenhæng mellem de bakteriologiske data og forekomst af norovirus. Den høje forekomst af norovirus i frugtprøverne tyder på, at det infektiøse potentiale af virus har været begrænset, eller at antallet af virus har været for lav til at forårsage sygdom.

Det er et problem, at detektionsmetoden er baseret på påvisning af virusets arvemateriale, som kan hidrøre fra døde eller svækkede (non-infektiøse) virus. Det er derfor svært at vurdere betydningen af fund af virus i fødevarer. EFSA's biohaz panel arbejder for tiden på at vurdere, om der på baggrund af foreliggende data for virus niveauer i toskallede bløddyr, kan etableres acceptkriterier/ aktionsgrænser for fund af virus i disse produkttyper. Resultatet af dette arbejde forventes publiceret i efteråret 2011 og vil kunne danne grundlag for yderligere risikovurderinger af fund af virus i andre typer af fødevarer, herunder frugt og grønsager.

Referencer:

Abadias M, Usall J, Anguera M, Solsona C, Viñas I (2008). Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *Int J Food Microbiol.* 123(1-2):121-9.

Anonym 2011. Kampagner og projekter – slutrapport - Kontrol af patogener i importeret og dansk spiseklart grønsager. J. nr.: 2008-20-64-00910.

Anonym 2001: Mad og mikroorganismer nr. 5 - resultater fra fire kortlægningsundersøgelser over sygdomsfremkaldende bakterier i fødevarer. Afdeling for Mikrobiologisk Sikkerhed, Institut for Fødevarer-sikkerhed og Toksikologi.

Ethelberg S, Lisby M, Vestergaard LS, Enemark HL, Olsen KE, Stensvold CR, Nielsen HV, Porsbo LJ, Plesner AM, Mølbak K. (2009). A foodborne outbreak of *Cryptosporidium hominis* infection. *Epidemiology & Infection.* 137:348-56

European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control; The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009; *EFSA Journal* 2011; 9(3):2090.

Johnston LM, Jaykus LA, Moll D, Martinez MC, Anciso J, Mora B, Moe CL. (2005). A field study of the microbiological quality of fresh produce. *J Food Prot.* 68:1840-7.

Okhuysen, P.C., Chappell, C.L., Crab, J.H., Sterling, S.R., Du Pont, H.L., 1999. Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. *J. Infect. Dis.* 180, 1275–1281.

Mukherjee A, Speh D, Dyck E, Diez-Gonzalez F. (2004). Preharvest evaluation of coliforms, *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Escherichia coli* O157:H7 in organic and conventional produce grown by Minnesota farmers. *J Food Prot.* 2004; 67:894-900.

- Oliveira M, Usall J, Viñas I, Anguera M, Gatiús F, Abadías M. (2010). Microbiological quality of fresh lettuce from organic and conventional production. *Food Microbiol.* 27:679-84
- Roy SL, DeLong SM, Stenzel SA, Shiferaw B, Roberts JM, Khalakdina A, Marcus R, Segler SD, Shah DD, Thomas S, Vugia DJ, Zansky SM, Dietz V, Beach MJ; Emerging Infections Program FoodNet Working Group. Risk factors for sporadic Cryptosporidiosis among immunocompetent persons in the United States from 1999 to 2001. *J Clin Micro.* 2004;42(7):2944-2951
- Rendtorff, R.C., 1954. The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. II. *Giardia lamblia* cysts given in capsules. *Am. J. Hyg.* 59, 209–220.
- Robertson LJ, Gjerde B. Occurrence of parasites on fruits and vegetables in Norway. *J Food Prot.* 2001 Nov;64(11):1793-8.
- Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from EFSA on monitoring of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and identification of human pathogenic VTEC types. *The EFSA Journal* (2007) 579, 1-61
- Sethabutr O, Venkatesan M, Murphy GS, Eampokalap B, Hoge CW, Echeverria P. (1993). Detection of *Shigellae* and Enteroinvasive *E. coli* by Amplification of the Invasion Plasmid Antigen H DNA Sequence in Patients with Dysentery. *Journal of Infectious Diseases* 1993:167 458-61.
- Smith HV, Nichols RA. (2010). *Cryptosporidium*: detection in water and food. *Exp Parasitol.* 2010 Jan;124(1):61-79.
- Stals A, Baert L, Jasson V, Van Coillie E, Uyttendaele M. (2011). Screening of fruit products for norovirus and the difficulty of interpreting positive PCR results. *J Food Prot.* 2011 Mar;74(3):425-31.
- Stensvold R, Nielsen HV. Tarmparasitter 2006-2008. *EPI-NYT* uge 5, 2009, publiceret 28.01.2009
- Verhoeff-Bakkenes L, Jansen HA, in 't Veld PH, Beumer RR, Zwietering MH, van Leusden FM. (2011). Consumption of raw vegetables and fruits: a risk factor for *Campylobacter* infections. *Int J Food Microbiol.* 144: 406-12.

Appendiks 3

Risici for kontaminering af frugt og grønt

Det antages, at frugt og grønt vil kunne kontamineres under flere af processerne fra Jord til Bord (– herunder dyrkning, gødsning, vanding, høst, transport, opbevaring, forarbejdning og håndtering i en gros og detaileddet). Appendikset beskriver, hvilke faktorer – tillige med disses relative betydning – der kan bidrage til kontaminering og eventuelt vækst af sygdomsfremkaldende mikroorganismer i forbindelse med håndtering af frugt og grønt.

Resumé

Risikoen for kontaminering af frugt og grønt med uønskede mikroorganismer (bakterier, virus, protozoer) fra jord til bord, afgøres af et komplekst samspil af en række faktorer gennem hele produktionskæden i forbindelse med dyrkning, gødsning, vanding, høst, opbevaring, forarbejdning/håndtering og distribution. Den største fødevarerisikoen vil opnås ved at fokusere på at forhindre overførsel af humanpatogene mikroorganismer til frugt og grønt, dels i primærproduktionen og dels i senere led produktionskæden. Mikroorganismene overføres via fækal forurening fra husdyr, den vilde fauna, eller mennesker (virus i opkast) og evt. indirekte via kontamineret vand, miljø eller udstyr. I primærproduktionen er anvendelse af husdyrgødning derfor en stor potentiel kilde til forurening med uønskede mikroorganismer. Ved gødsning af grøntsager med husdyrgødning i Danmark, anbefales det at anvende kompostet gødning (Rådets forordning (EF) nr. 834/2007 og Vejledning om økologisk jordbrugsproduktion 2010). Der synes dog ikke at være direkte lovmæssige krav til behandling af almindelig husdyrgødning, eller til minimum tidsinterval mellem udbringning af husdyrgødning og plantning/såning eller høst. I praksis anvendes både ubehandlet gylle og fast gødning (ukontrolleret kompostering). Dette er i kontrast til f.eks. USA (National Organic Farming) og det private verdensomspændende certificeringsorgan Global G.A.P. (Good Agricultural Practice), hvor der er specifikke regler mht. behandling af husdyrgødning (kontrolleret kompostering med specifikke temperatur krav) og tidsintervaller mellem udbringning og plantning/såning eller høst. Ligeledes angiver en række guidelines (FDA, 1998, 2007; Codex, 2010, WHO, 2011), at en god praksis mht. anvendelse af husdyrgødning betyder, at man IKKE benytter ubehandlet gødning, eller at man maksimerer tidsintervallet mellem anvendelse og plantning/såning eller høst.

Ved høst og i de videre led i produktionskæden frem til forbrugerne, vil der ske en håndtering som indebærer kontakt til mennesker, udstyr/miljø og vand. Denne kontakt indebærer en risiko for eksponering til uønskede mikroorganismer. Der bør være særlig fokus på personhygiejne (fækalier, opkast (virus) i denne del af produktionskæden pga. den direkte manuelle håndtering af produkter. Etablering af god hygiejne og håndterings praksis, herunder uddannelse af medarbejdere og vand af god mikrobio-

logisk kvalitet (vask, rengøring), vil mindske risikoen for smitte af produkter med uønskede mikroorganismer.

Overordnet vil den reelle smitterisiko fra eventuelt kontamineret frugt og grønt afhænge af den endelige forekomst af humanpatogene mikroorganismer i spiseklare produkter. Den endelige forekomst i produktet vil i høj grad afhænge af fysisk-kemiske faktorer (f.eks. temperatur, UV eksponering, fugtighed, næringsstoffer), der påvirker mikroorganismernes overlevelse og evt. opformering (bakterier). Konkret viden om de enkelte faktoreres betydning er fortsat mangelfulde. Desuden er forbrugeradfærd afgørende for smitterisikoen, da grøntsagstyper som indtages uden yderligere forarbejdning, udgør en langt større risiko end varmebehandlede produkter.

FØR-HØST

Fra starten af vækstperioden til høsttidspunktet, vil dyrkningsforhold, gødskning og vanding have en betydning for overførsel af humanpatogene mikroorganismer til grøntsager og bær. Mikroorganismerne overføres via fækal forurening fra husdyr, den vilde fauna, eller mennesker (virus i opkast) og evt. indirekte via kontamineret vand eller udstyr. Generelt i forbindelse med gødskning vil smitterisikoen være størst ved anvendelse af ubehandlet husdyrgødning, der er et velkendt og vigtigt reservoir for zoonotiske patogener, såsom *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157 og andre verotoxinproducerende *E. coli* (VTEC) samt *Campylobacter*. Behandling af husdyrgødning vil typisk være kompostering, hvor der sker en varmeudvikling, som er med til at sikre et henfald af patogene mikroorganismer. Henfaldet er dog betinget af at der opnås bestemte temperaturer over et givet tidsinterval (kontrolleret kompostering). Desuden vil smitterisikoen afhænge af alderen af gødningen på udbringningstidspunktet. Frisk gødning (f.eks. kontinuert input til gylletank) vil indeholde flest mikroorganismer og dermed udgøre størst risiko. Smitterisikoen vil også forøges jo tættere udbringning sker på plantning/såning og eller høst.

Udbringningsmetode/jordbehandling vil have betydning for muligheden for direkte kontakt mellem gødning og planterne og dermed også af plantetypen. Ved vanding er den mikrobiologiske kvalitet af vandet af stor betydning. Desuden vil vandingsmetoder, hvor evt. forurenede vand kommer i direkte kontakt med den spiselige del af planterne (f.eks. sprinkler), eller indirekte forårsager plask af forurenede jord, udgøre den største risiko i forhold til metoder, hvor vandet ikke kommer i direkte kontakt (f.eks. drypvanding).

Bær og grøntsager med størst eksponering til den vilde fauna, f.eks. friland versus drivhus, vil være mest udsat for smittefare. Desuden er marker, hvor der er en risiko for oversvømmelse eller afstrømning fra tilstødende (forurenede) marker, ekstra udsatte mht. smitterisiko.

Udover planternes eksponering til humanpatogene mikroorganismer, er vækst/henfald af disse mikroorganismer i og på planter af stor betydning. Meget af den nuværende viden om vækst/henfald er ba-

seret på eksperimentelle forsøg, som kan være svært at overføre til naturlige forhold. Overlevelse og potentiel opformering af humanpatogene mikroorganismer på planter, vil afhænge af typen af plante (struktur/overflade), graden af UV-lys eksponering, temperaturforhold, fugtighed og næringsstoff-tilgængelighed. Beskadigelser i plantevævet eller plantesygdomme kan eventuelt fremme koloniseringen af planter med patogener. Generelt er overlevelsestiden på planter længst for virus og dernæst bakterier og protozoer (WHO, 2006).

HØST/EFTER-HØST

Hele produktionskæden fra høst og frem til bordet indeholder mange trin, hvor råvarer alt efter produkttype, er i kontakt med mennesker, udstyr og overflader, vand og miljø (jord, støv og, fauna). I hvert af disse trin vil der kunne tilføres mikrobiel forurening. Den manuelle håndtering af produkter ved høst og forarbejdning betyder at en god personhygiejne (fækalier, opkast (virus)) er vigtig i denne del af produktionskæden. For eksempel har syge bærplukkere været årsag til udbrud med norovirus fra hindbær. Etablering af god hygiejne og håndterings praksis, herunder uddannelse af medarbejdere, vil være med til at forhindre smitte af produkter fra mennesker, udstyr, miljø og vand. En praksis med et adskilt flow mellem indgående råvarer og udgående produkter vil f.eks. mindske risikoen for krydskontaminering. Vand anvendes til mange formål, f.eks. vask, rengøring og nedkøling. Anvendelse af vand af god mikrobiologisk kvalitet vil også mindske smitterisikoen.

Som gældende før høst, er henfald/vækst af uønskede mikroorganismer i og på planter af stor betydning for den endelige smitterisiko. Hæmning af vækst, f.eks. ved nedkøling, er vigtigt for ikke at overskride den infektiøse dosis af patogenet, hvorved risikoen for human infektion mindskes. Selvom nogle forarbejdningstrin potentielt kan mindske mikrobielle risici (f.eks. vask), kontrollere mikrobiel vækst (f.eks. nedkøling) og beskytte produktet mod yderligere eksponering (f.eks. emballage), vil den største effekt mht. fødevarsikkerhed dog opnås ved helt at undgå kontaminering med uønskede mikroorganismer tilbage i primærproduktion.

Baggrund

FØR-HØST

Dyrkning af grøntsager og bær

I forbindelse med dyrkning af grøntsager og bær og på friland især, vil der være en eksponering til det omgivende miljø og herunder vilde fauna. I stil med husdyr, kan den vilde fauna være bærere af forskellige humanpatogene mikroorganismer, som udskilles i deres ekskrementer. Risikoen for at grøntsager smittes med disse vil i høj grad afhænge af prævalensen i dyrene samt udskillelsesniveaue og af dyrenes adfærd og økologi og dermed kontakt til grøntsagsmarker. Mens pattedyr typisk vil bevæge sig over kortere afstande har fugle større aktionsradius og vil derved kunne overføre patogener over større afstande.

E. coli O157 i bladgrøntsager har været årsag til fødevarerudbrud. Kvæg er det primære reservoir for dette patogen, men *E. coli* O157 og andre verotoxin-producerende *E. coli* (VTEC) er til stede i en lang række andre hovdyr (hjorte, får, geder). VTEC er også isoleret fra andre dyr, herunder gnavere, fugle (måger, gæs, stære og spurvefugle), insekter og bløddyr, som for eksempel fluer, biller og snegle (Nielsen et al, 2004). VTEC er fundet i 1,6% af vilde fugle, der lever tæt på kvæg- og svinebrug i Danmark (Nielsen et al, 2004) og selvom VTEC også er fundet i rotter og insekter er graden af transmission af VTEC fra drøvtyggere til disse dyr usikkert. Eksperimentelle undersøgelser har dog indikeret, at fluer er i stand til at overføre over $3 \log_{10}$ cfu bakterier ved hver landing (DeJusús et al, 2004). Dermed vil fluer i kontakt med kvægfæces efterfølgende kunne overføre bakterier til overflader af f.eks. grøntsager. Forekomsten af *Salmonella* i husdyr varierer afhængig af dyreart, men er normalt lav blandt vilde fugle, mens måger, som bl.a. fourager i affald (f.eks. lossepladser), har vist sig at bære *Salmonella* (Palmgren et al, 2006). *Campylobacter* forekommer også i varierende grad i husdyr, og findes ofte i vilde fugle som bl.a. krager, skader og måger. Mens *Listeria monocytogenes* er en saprofytiske organisme, der er almindeligt stede i miljøet.

Tilstedeværelsen af dyr på grøntsagsmarker kan være tilfældig, eller skyldes at de f.eks. søger føde, ly eller vand. I betragtning af fødevarerudbrudenes brede værtsspekter og usikkerhed mht. forekomst af i husdyr og vilde dyr, må dyrene antages at udgøre en smitterisiko. Selvom det sjældent har været muligt at endegyldigt fastslå, om dyr faktisk har været kilden til smitte, så vil en begrænsning af dyrs adgang til grøntsagerne reducere den potentielle eksponering. Dette indebærer også, at man bør undgå at tiltrække dyr ved f.eks. at fjerne affald. Begrænsning af dyrs adgang bliver vigtigere jo tættere på høsttidspunktet.

Husdyrgødning og ekskrementer fra den vilde fauna kan også indebære en *indirekte* risiko for forurening af afgrøder via vand forurennet gennem oversvømmelse eller afstrømning fra områder, hvorpå der er udbragt husdyrgødning/ findes ekskrementer. I USA var tunge regnskyl f.eks. skyld i at en brønd blev forurennet med gylle og dermed forårsagede høje koncentrationer af *E. coli* og *Campylobacter* i det offentlige drikkevand. Ligeledes ledte gylleafstrømning til forurening af en brønd med udbrud til følge Ebner (2008). I Danmark er der dog generelt regler mht. tidspunkt for udbringning af gylle og hvordan, især af miljøhensyn for at forhindre afstrømning til søer og vandløb. Andre indirekte kilder

kan også være forurenede vand, aerosoler og støv fra husdyrproduktion, lossepladser og spildevandsanlæg. Desuden kan indirekte kontaminering af marker ske via forurenede udstyr som f.eks. køretøjer. Den præcise betydning af de forskellige transmissionsruter er ikke beskrevet tilstrækkeligt

Gødskning af grøntsager og bær

Husdyrgødning er et velkendt og vigtigt reservoir af zoonotiske patogener, såsom *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157 og andre verotoxinproducerende *E. coli* (VTEC) samt *Campylobacter*. Gødsning med husdyrgødning udgør dermed en sandsynlig kilde til smitte af grøntsager. Både gylle typen (dyrart), udbringningsmetode, mængde og hyppighed, samt varighed fra udbringning til plantning eller høst vil påvirke risikoen for smitte af grøntsager med mikrobiologiske agens ved gødsning. Ubehandlet husdyrgødning vil udgøre en langt større risiko en behandlet husdyrgødning, hvor der sikres et henfald af patogene mikroorganismer. Behandling af husdyrgødning indebærer typisk kompostering. Ved kompostering sker en varmeudvikling, og der skal minimum opnås en temperatur på mellem 55° og 70°C i 3-15 dage (afhængig af komposteringssystemet) og der skal ske en omrøring/vending af gødningsstak undervejs.

Det præcise omfang af gødsning med husdyrgødning i dansk grøntsagsproduktion er uklart (bør være registreret i forbindelse med gødningsregnskab underlagt Plantedirektoratet), men praktiseres i særlig grad i de økologiske produktionssystemer, hvor kunstgødning er forbudt. Det er imidlertid kun i sjældne tilfælde, hvor det har været muligt at spore udbruds agens tilbage til brug af husdyrgødning. Eksempelvis lykkedes det at linke et *E. coli* O157 udbrud i babysalat mix til en enkelt avler, men man fandt ikke O157 i hverken kvæggylle eller hønsemøg, og heller ikke i vand fra den pågældende avlers marker eller brønd (Hilborn et al, 1999).

Forekomsten af patogene mikroorganismer i husdyrgødning vil i høj grad afhænge af prævalensen i pågældende dyreart samt udskillelsesniveaue, hvilket varierer over tid. Derudover vil alderen af husdyrgødningen på udbringningstidspunktet være væsentlig i forhold til niveauet af mikroorganismer. Smitterisikoen vil være størst når gødningen er frisk (f.eks. kontinuert input til gylletank) på udbringningstidspunktet. Enteriske bakterier som *E. coli* O157: H7 og *Salmonella* er i stand til at overleve i længere perioder i husdyrgødning, men overlevelsen kan spænde fra flere uger til flere måneder, og endda op til næsten 2 år (Jiang et al, 2002; Franz et al, 2005; Kudva et al, 1998). Variationerne i estimerede overlevelsestider skyldes at en række fysisk-kemiske forhold tilsyneladende kan påvirke bakteriernes overlevelsessevne i husdyrgødning. Der er indikationer på, at overlevelsen f.eks. vil mindskes med højere pH (Park og Diez-Gonzalez, 2003; Franz et al, 2005), højere fiberindhold (Franz et al, 2005), højere temperatur (Kudva et al, 1998; Himathongkham et al, 1999; Semenov et al, 2007), større temperaturudsving (Semenov et al, 2007), højere niveauer af coliforme bakterier (Franz et al, 2007a) og større iltningegrad (Kudva et al, 1998; Heinonen-Tanski et al, 1998; Shepherd et al, 2007. Semenov et al, 2008). Derudover var overlevelse af *E. coli* O157: H7 og *Salmonella* Typhimurium i husdyrgødning signifikant reduceret, når kvæget blev fodret med en lav-energi fiberrig kost (halm) i forhold til en høj-energi kost med få fibre (græs-majs ensilage) (Franz et al, 2005). Desuden så *E. coli* O157: H7 og *S. Typhimurium* ud til at overleve betydeligt længere i gylle fra malkebesætninger end i tilsvarende fast staldgødning, mens et andet studie (*E. coli* i kvæggødning) viste det modsatte (Hutchison et al, 2005;

Nicholson et al, 2005; Oliver et al. 2006). Ligeledes så der ud til at være forskel mellem gødning fra forskellige dyrearter og mellem patogene bakterier (Hutchison et al, 2005).

Udover den aktuelle forekomst af mikroorganismer i husdyrgødningen på udbringningstidspunktet, vil både udbringningsmetode, mængde og varighed fra udbringning til plantning eller høst påvirke planternes grad af eksponering. Når udbringning sker på sort jord inden såning eller plantning, vil mikroorganismernes evne til at overleve i jorden være af betydning for de efterfølgende planters eksponeringsgrad. Overlevelsestider for *E. coli* O157: H7/ *E. coli* O26, *Salmonella*, *Listeria*, *Campylobacter* og *Cryptosporidium* i jord rapporteres til at være op til hhv. 6 måneder, 3 år, 2 år, 20 dage og 3 mdr. (Islam et al, 2004; Nicholson et al, 2005; Fremaux et al, 2008). Men også i jorden er overlevelsen afhængig af de fysisk-kemiske forhold. Der er indikationer på, at overlevelsen er nedsat ved højere temperaturer (Fremaux et al, 2008), højere niveauer af mikroorganismer i jordbunden (Jiang et al, 2002; Semenov et al, 2007), lavere indhold af let tilgængelige næringsstoffer (Franz et al, 2007b; Habteselassie et al, 2007), større mikrobiel diversitet (van Elsas et al, 2007) og lavere lerindhold (Mubiru et al, 2000; Fenlon et al, 2000; Franz et al, 2007b). Ved en høj gødning-til-jord ratio var overlevelsen af *E. coli* O157: H7 nedsat, formentlig som følge af forøget mikrobiel aktivitet (Jiang et al, 2002).

Med hensyn til udbringningsmetode, ser patogener ud til at persistere i længere tid nede i jorden sammenlignet med på overfladen, sandsynligvis pga. eksponeringen til UV-lys og udtørring på overfladen (Hutchison et al, 2004). Gødningens lokalisering ned gennem i jordsøjlen har yderligere betydning mht., om der er risiko for direkte kontakt til overflader af bladgrønt, eller om det mest er rødderne, som er eksponerede (dvs. direkte kontakt for rodfrugter) (Avery et al, 2004).

Imidlertid er etablering af en direkte kobling mellem udbringning af gylle og smitte af grøntsager impliceret i fødevarerborne udbrud sjældent muligt (FAO / WHO, 2008). I et konkret tilfælde, hvor gødning fra en *E. coli* O157 inficeret kalv blev anvendt til gødskning af grøntsager i en have, blev haveejeren efterfølgende syg (Nelson, 1997). I et amerikansk udbrud med *E. coli* O157 relateret til færdigpakket spinat, pegede tilbagesporing og undersøgelse af miljøprøver på en ranch i Californien i Salinas Valley, som den mest sandsynlige kilde til udbruddet. Både pulse-field gel elektroforese (PFGE) og multi-locus variable number tandem repeat analysis (MLVA) profiler af bakterie stammen fra udbruddet matchede stammer isoleret fra lokale vildsvin og kvæg fæces (Jay et al, 2007). Det lykkedes imidlertid ikke at fastlægge, præcis hvordan spinaten blev smittet.

Vanding af grøntsager og bær

En række mikrobiologiske agens kan overføres til mennesker via forurenede vand, herunder fækalie relaterede bakterier som *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7 (VTEC), *Campylobacter* og *Yersinia* samt sjældent i DK indvoldsorm (*Ascaris lumbricoides*) og protozoer (*Giardia lamblia*/~*intestinalis*; *Cryptosporidium*) (WHO, 2006). Selvom man har fundet virus i vand er der ikke bekræftede udbrud forårsaget af vandbårne virus (Deetz et al, 1984; Jothikumar et al, 1993; Borchardt et al, 2003).

Hvilken præcis rolle vanding af grøntsager spiller mht. overførsel af sygdomme til mennesker er mindre klar. Den mikrobiologiske kvalitet af vand til vanding af grøntsager er typisk baseret på fækale indikatorer som coliforme bakterier og *E. coli*. Det er imidlertid usikkert, hvor præcis korrelationen er mellem forekomst af indikator bakterierne og humanpatogene mikroorganismer, og dermed den reelle

risiko. Ringe kvalitet af vandingsvand, dvs., med forhøjede tal af fækal coliforme bakterier, synes at være korreleret med forekomst af humanpatogene mikroorganismer på bladgrønt (Norman and Kabler, 1953). I forbindelse med specifikke udbrud, har der været epidemiologisk evidens for, at vandingsvand har medvirket til at introducere patogener i produktionsmiljøet. Eksempelvis blev et stort svensk *E. coli* O157 udbrud forårsaget af iceberg salat, kædet sammen med anvendelse af forurenede vandingsvand fra en bæk (Söderstrom et al, 2005). Desuden bekræfter eksperimentelle forsøg, at vandingsvand kan overføre humane patogener til en række bladgrøntsager og urter (Song et al, 2006; Melloul et al, 2001; Solomon et al, 2002; Amoah et al, 2005). Eksempelvis rapporterede Okafo et al.(2003) om *Salmonella* på salat som følge af forurenede vandingsvand. Edmonds og Hawke (2004) fandt *Campylobacter* på brøndkarse, der var dyrket i kontamineret vand, mens Prazak et al. (2002) fandt 8% (4/50) af kålhoveder positive for *L. monocytogenes* efter at være blevet vandet. Okafo et al (2003) observerede også, at kontamineringsgraden afhang af sæson og vejr, samt at forekomsten var ofte højere under tørre forhold, hvor vanding med vandløbsvand var hyppigere.

Ifølge risikovurderingsartiklen af Stine et al. (2005b), varierer infektionsrisikoen afhængig af afgrødetype, vandingsmetode og antal dage mellem vanding og høst. Under worst-case-scenariot, dvs. høstet og spist dagen efter sidste vanding, ville 2,5 *Salmonella* CFU/100 ml og 2.5×10^{-5} most probable number (MPN) hepatitis A virus (HAV) per 100 ml resultere i årlig infektion i 1 ud af 10.000 tilfælde. Ved at vente 14 dage fra sidste vanding til høst, ville man, pga. henfald over tid, kunne øge antallet til $5,7 \times 10^3$ *Salmonella* per 100 ml og $9,9 \times 10^{-3}$ HAV per 100 ml uden at øge årlig infektionsgrad.

Vandingsvand fra forskellige kilder

Ifølge FAO/WHO (2008) anses vand af drikkevandskvalitet, eller regnvand opsamlet i en ren beholder, for at være sikkert at vande bladgrønt med. Det er dog en forudsætning at vandingsssystemer/holdere er vedligeholdte og sikret mod forurening. Derimod er den mikrobiologiske kvalitet af overfladevand meget variabel, og generelt rangeres risikoen (stigende) for smitte med patogener som følger (Leifert et al, 2008):

1. Vand af drikkevandskvalitet eller regnvand
2. Grundvand fra dybe borer
3. Grundvand fra overfladiske brønde, som følge af f.eks. dårlig etablering eller vedligehold
4. Overflade vand, og i særlig grad vand i nærheden af dyr, beboelse og affald
5. Rå eller utilstrækkeligt behandlet spildevand

Timing mht. vanding

Intervalleret mellem den seneste vanding og høst influerer graden af smitte, eftersom patogene mikroorganismer henfalder over tid (Feachem et al, 1983; Amoah et al, 2005; Keraita et al, 2007). Ifølge WHO (2006) er overlevelsen af mikroorganismer i frisk vand og spildevand som følger (antal dage ved 20-30°C): Indvoldsorm (æg) år; protozoer (cryptosporidier) <180 d; enterovirus <120 d; termotolerante coliforme / *Salmonella* <60 d og shigella <30 d.)

Effekt af forskellige vandings systemer.

Viden mht. effekten af forskellige vandingsmetoder (sprinkler system/vandingskanon, drypvanding el. plovfurevanding) mht. forekomst af patogener på bladgrønt er fortsat mangelfulde. Vanding af salat med spildevand med hhv. drypvanding og plovfurevanding, resulterede i ens niveauer af både *E. coli* og *Salmonella* ifølge Bastos og Mara (1995). Dette i modsætning til Song et al. (2006), hvor *E. coli* og virus (PRD-1) blev reduceret hhv. 99,9% og 99% ved drypvanding under overfladen frem for plovfurevanding. Ligeledes faldt overførslen af PRD-1 virus til salat fra 4,4% til 0,02% og 0,00039% for hhv. sprinkler, plovfure- og drypvanding (Stine et al, 2005a, 2005b; Choi et al, 2004). Spray og overfladevanding med suspensioner af *E. coli* O157: H7 resulterede i påvisning i salatbladvævet (efter vask), med færrest bakterier ved drypvanding i forhold til sprinkler vanding. Ifølge SAFIR projektet (<http://www.safir4eu.org/>) var det forventet, at vanding lige under overfladen ville øge *E. coli*'s evne til at overleve pga. beskyttelse mod udtørring, UV-stråler fra solen og temperatur stress, men det generelle lave fund af *E. coli* tydede ikke på dette. Man har vist, at aerosoler dannet i forbindelse med vandingskanoner kan sprede enterobakterier og virus langt fra kilden (Tetltsch and Katzenelson, 1978, Andersen og Hald, 2001). Der er trods modsat rettede resultater, generelt enighed om at underjordisk vanding reducerer risikoen for overførsel af smitte til bladgrøntsager (Hamilton et al, 2006). For rodfrugter derimod, vil underjordisk vanding sandsynligvis udgøre den største risiko (WHO, 2011). Vandingsystemer kan desuden variere mht. risiko for indtrængning af bakterier og virus, der evt. vil persistere og under gunstige forhold vokse i forbindelse med stillestående vand (Tetltsch og Katzenelson, 1978; Jerman et al 2003).

Helt overordnet vil den mikrobiologiske kvalitet af vandingsvandet have betydning for risikoen for at overføre smittefarlige agens til grøntsager og bær. Minimering af mulige input af fækalier til vandet vil være afgørende for kvaliteten. Derudover vil selve vandingsmetoden være af betydning. Metoder der indebærer direkte kontakt mellem evt. kontamineret vand og afgrøde (f.eks. sprinkler) udgør den største risiko. I disse tilfælde vil bær og bladgrøntsager formodentlig være lige eksponerede. Mens der ved andre vandingsmetoder tættere på jordoverfladen, vil være størst risiko for grøntsager og bær, hvor den spiselige del vokser over og tæt jorden, f.eks. salater, kål, blegselleri, porrer og jordbær (bl.a. pga. større risiko for plask af forurenede vand og jord). Her vil grøntsager og bær, hvor den spiselige del vokser et stykke over jorden f.eks. tomat, agurk, peberfrugter og hindbær udgøre en mindre risiko. Nedenfor ses en inddeling af grøntsager og bær i tre kategorier primært baseret på vækstforhold da det har betydning for den eksponering de udsættes for via vanding.

"Kategorier" af grøntsager og bær:

Grøntsager hvor den spiselige del vokser i jorden f.eks. gulerødder, rødbeder, kartofler, løg:

Vanding

- Plovfurevanding i forhold til drypvanding tæt op af planten, vil sandsynligvis mindske den direkte kontaminering af underjordiske (spiselige) grøntsagsdel (WHO, 2011).
- For rodfrugter vil risikoen for smitte via vanding også influeres af patogenernes overlevelse i jorden (overlevelse i jord ved 20-30°C: indvoldsorm (æg) >1år; protozoer (cryptosporidier)

<150 dage; enterovirus <100 dage; thermotolerante coliforme / *Salmonella* <70 dage, WHO, 2006).

Rå

- Størst risiko for grøntsager som ikke vaskes og renses for jord inden spising
- Mindre risiko for grøntsager som skrælles/pilles (løg) da det vil fjerne (reducere) bakterier på overfladen
- Risikoen mindskes ved vask i rent vand, om end det indebærer en risiko for krydskontaminering

Varmebehandlet

- Minimal risiko (evt. krydskontaminering mellem rå og kogte)

Grøntsager og bær hvor den spiselige del vokser over og tæt jorden f.eks. salater, kål, blegselleri, porrer og jordbær:

Vanding

- Stor risiko for smitte af grøntsager og bær hvis vandingsmetoden gør at forurenede vandingsvand rammer planteoverflader direkte
- Indirekte risiko for smitte af afgrøde hvis vandingsmetoden resulterer i plask af forurenede jord op på planten
- Mindst risiko hvis vandingsvandet ikke kommer i direkte kontakt med planteoverflader og metoden ikke forårsager plask

Rå

- Større risiko – grøntsager og bær som ikke vaskes inden spising udgør den største risiko.

Varmebehandlet

- Minimal risiko (evt. krydskontaminering mellem rå og kogte)

Grøntsager og bær hvor den spiselige del vokser et stykke over jorden f.eks. tomat, agurk, peberfrugter og hindbær:

Vanding

- Stor risiko for smitte af grøntsager og bær hvis vandingsmetoden gør at evt. forurenede vandingsvand rammer planteoverflader direkte
- Mindre risiko hvis vandingsmetoden gør at evt. forurenede vand ikke kommer i direkte kontakt med planteoverflader
- Lille risiko for indirekte kontaminering via plask pga. afgrødens afstand til jorden

Rå

- Mellem risiko – grøntsager og bær som ikke vaskes inden spising udgør den største risiko.

Varmebehandlet

- Minimal risiko (evt. krydskontaminering mellem rå og kogte)

Mikroorganismernes overlevelse på planter

Patogene mikroorganismer deponeret på overflade af planter er udsat for en række stressfaktorer. Blandt andet ultraviolet lys fra solen, store temperaturudsving og lav relativ fugtighed, hvilket påvirker deres overlevelse (Tetltsch and Katzenelson, 1978; Beattie and Lindow, 1995; Brandl, 2006). Umiddelbart patogener sværere ved at persistere på planter end i jord, hvor konkurrerende mikroorganismer dog evt. vil øge henfaldet (Jiang, et al 2002).

Phyllospheren (den samlede overjordiske overflade af planter) er kendetegnet ved en række ekstreme og ofte svingende miljøforhold kombineret med unikke fysio-kemiske egenskaber, som typiske phyllosphere mikroorganismer har tilpasset sig og kan vokse under. Humane patogener anses normalt ikke for at være en del af den mikrobielle population i phyllospheren, men de kan forekomme her, jævnfør de fødevarebårne udbrud relateret til grøntsager (Beuchat, 2002). Undersøgelser gennemført mht. adfærd og overlevelse af humane patogener på planter har mest fokuseret på *E. coli* (stort set *E. coli* O157: H7) og *Salmonella*. Under eksperimentelle forhold er bakterier påført direkte på enten blade, rødder, frø eller til jorden vha. mange forskellige teknikker. Manglende sammenlignelighed ved mange af disse forsøg, gør det svært at komme med entydige konklusioner mht. dynamik og overlevelse af humane patogener på planter. Forskellige temperaturforhold vil typisk have en stor indvirkning på overlevelse af mikroorganismer. Lave temperaturer nedsætter typisk henfaldet, men evt. vil høje temperaturer fremme vækst af bakterier. Ifølge WHO (2006) er overlevelsen af mikroorganismer på planter ved 20-30°C som følger: indvoldsorm (æg)/virus <60 dage; thermotolerante coliforme / *Salmonella* <30 dage og shigella <10 dage protozoer (cryptosporidier) <3 dage. *E. coli* og *Salmonella* har dog overlevet på persille under naturlige forhold i hhv. 177 og 231 dage (Islam et al, 2004a, b). Sprøjtning af salatplanter med vand forurenede med *E. coli* O157: H7 resulterede i genfund af bakterien på bladene 30 dage senere (Solomon et al. 2003). I et enkelt studie observerede man, at seks humane patogener (både bakterier og virus) overlevede 14 dage i phyllospheren af cantaloupe, salat og peber under kontrollerede miljø betingelser (Stine et al, 2005). I tilfælde hvor frugt og grønt har læsioner i bladene forårsaget af plantesygdomme eller fysisk beskadigelse herunder afskæring/findeling, vil humanpatogene organismer evt. lettere kunne kolonisere og vokse på planterne (Brandl 2006). Formodentlig vil der kunne frigives næringsstoffer til fordel for de patogene bakterier, men omvendt vil plantens naturlige population af bakterier i visse tilfælde have en antagonistisk effekt på de humane patogener (Delaquis et al, 2006; Johnston et al, 2009). Med hensyn til mulig optag af patogener (*E. coli* O157 og *Salmonella*) ind i plantevævet via jord/rødder er der modstridende rapporter hvor (Wachtel et al, 2002;. Islam et al, 2004a, b;. Jablasone et al, 2005;. Jeter og Matthyse, 2005) argumenterer for og (Jablasone et al. 2005;. Sharma et al, 2009) imod.

HØST / EFTER-HØST

Både når grøntsager og bær høstes og håndteres, herunder pakning enten direkte i marken eller i pakkerum samt evt. vask og forarbejdning, er der en risiko for at introducere mikrobiel forurening fra omgivende miljø eller mennesker. Et væsentligt kendetegn ved disse operationer er, at de indebærer en betydelig kontakt mellem friske råvarer og arbejdere, mellem friske råvarer og forskellige typer af redskaber og overflader af udstyr, mellem friske råvarer og vand eller is, og endelig mellem friske råvarer og det omgivende miljø (jord, støv, insekter osv.), der alle repræsenterer potentielle muligheder for overførsel af mikrobiel forurening (FAO/WHO, 2008).

Human forurening

Manuel håndtering er almindelig både ved høst, pakning forarbejdning og distribution. Det betyder at personer tilstede ved høst og videre håndtering, både arbejdere og besøgende, der har kontakt med grøntsagerne eller udstyr kan være en kilde til forurening. Inficerede personer kan overføre patogener via den fækal-orale rute og i tilfælde af virus også via opkast. Udskillelse kan forekomme i løbet af inkubationsperioden (f.eks. hepatitis A), i løbet af infektion (f.eks. salmonellose, shigellose, viral og parasitære infektioner) eller under rekonvalescens (f.eks. salmonellose). Nogle personer kan blive raske smittebærere og fortsætte intermitterende udskillelse i måneder eller år (f.eks. salmonellose). Således kan arbejdere være uvidende om at de er smittede, eller de er ikke tilstrækkeligt syge til at standse arbejdet, inficerede personer vil ved dårlig hygiejne og / eller manglende adgang til vaskefaciliteter kunne smitte grøntsager og bær. Eksempelvis sås et udbrud med hepatitis A fra snittet salat, som var skåret af en inficeret medarbejder (Harris et al. 2003) og *Vibrio cholerae* i skåret frugt var også forbundet med dårlig hygiejnepraksis (Ackers et al, 1997). Wachtel et al. (2003) viste, at salat let kan forurennes af urene hænder. I Danmark blev udbrud med norovirus i polske frosne hindbær linket til syge bærplukkere.

Beskadigede grøntsager

Mekaniske skader på plantevævet enten utilsigtede eller ved afskæring og findeling kan skabe åbninger til indvendige overflader, hvilket er befordrende for mikrobiel kontaminering og vækst (Doyle et al, 2007). Fasthæftelse af bakterier og potentialet for infiltration, internalisering eller begge (herefter benævnt internalisering) er blevet påvist eksperimentelt og bakterier der sidder i skårne overflader kan f.eks. være vanskelige at fjerne ved efterfølgende sanitære foranstaltninger (Takeuchi et al, 2000; Takeuchi, Hassan og Frank, 2001; Saggars et al, 2008). Plantesygdomme vil også øge risikoen for kolonisering med humanopatoogene bakterier (Brandl 2006). Selvom meget af denne viden stammer fra eksperimentelle undersøgelser, indikerer det, at plantesygdomme og utilsigtede skader bør minimeres. Ikke mindst i marken, hvor der er en stor eksponering til patogene mikroorganismer fra miljøet.

Høst

Grøntsager, bær og krydderurter kan høstes med håndkraft eller mekanisk, hvor der eventuelt vil ske en sortering i hånden, fjernelse af yderblade, vask eller sprøjtning. Grøntsagerne samles enten i større beholdere, eller pakkes direkte i kasser der evt. overdækkes med plastfilm og er klar til transport. Ved emballering ude på åben mark kan der være betydelig eksponering til mikrobiel forurening fra støv og fauna. Generelt involverer disse processer mange trin, hvor råvarer er i kontakt med mennesker, over-

flader, vand og miljø (jord, støv). Nedfaldsfrugter vil være udsat for smitte fra jorden (f.eks. dyreekskrementer) og upasteuriseret juice lavet af nedfaldsfrugter har været årsag til fødevarebårne udbrud. Graden af håndtering vil typisk variere med arten. De mere sarte grøntsager, som salater og urter, vil være mere følsomme over for skader og mærker, hvilket kan fremme mikrobiel kontaminering og vækst (se ovenfor). Praksis med fjerne de yderste snavsede blade af f.eks. salathoveder ved høst vil umiddelbart være med til fjerne mikroorganismer. Der kan også potentielt ske en forringelse af fødevareresikkerheden pga. (i) afskæring skaber åbninger i plantevævet, som gør dem mere sårbare over for patogenforurening og vækst (Doyle et al, 2007), (ii) afskårne produkter går ofte direkte videre uden yderligere sortering eller kontrol, (iii) patogener der internaliseres eller hæfter sig til skårne overflader, er yderst vanskelige at fjerne ved efterfølgende sanitære foranstaltninger (iv) udstyr som anvendes i marken til at afskære afgrøder med, kan let forurenes og derved overføre smitte til afgrøder (v) de sanitære forhold i markmiljøet er langt sværere at opretholde sammenlignet med indendørs miljøer. En udbrudsundersøgelse viste, at manglende rengøring af en salat snittemaskine forårsagede smitte af efterfølgende partier med *Salmonella* (Stafford et al, 2002). Høstmaskiner der er nær i kontakt med jord, f.eks. ved høst af lavt-voksende afgrøder som f.eks. babyspinat, vil sandsynligvis let kunne forurenes med jord, og derved smitte de efterfølgende høst slet. McEvoy et al. (2008) viste, at en forurenede afskæringskniv overførte *E. coli* O157: H7 til de næste 20 salathoveder. Udover forurening med *E. coli* O157: H7 i snitfladen, så voksede bakterien også markant i afskæringsområdet inden for 4 timer ved 30°C og voksede yderligere indenfor 8 timer, mens vækst ikke forekom ved 5°C (McEvoy et al, 2008). Dette indikerer vigtigheden af at opretholde en god hygiejne mht. høstudstyr og at påbegynde afkøling hurtigst muligt, for at minimere eventuel opformering af patogene bakterier. Høstet salat transporteres ofte til kølingsanlæg og afkøles til under 5°C kort tid efter høst. Nedkøling kan evt. forsinkes på grund af afstand fra mark til køleanlæg, eller hvis den høstede mængde overstiger kapaciteten af køleanlægget. Kasser og beholdere der anvendes til de høstede produkter, vil også let kunne forurenes af planterester og jord, især hvor afgrøder høstes med rødder. Eftersom bakterier er i stand til at vokse under gunstige betingelser, og vira og parasitter kan overleve, er det vigtigt at undgå en ophobning af organisk materiale i beholdere. Især hvis de skal bruges igen, da niveauet af forurening må forventes at stige, hvis der ikke foretages en regelmæssig rengøring. Der mangler stadig viden mht. til hvilke praksis og hygiejne foranstaltninger, som er mest hensigtsmæssige ved høst. Umiddelbart bør opmærksomheden dog rettes mod høstmaskiner og udstyr der kan forurenes af jord mv., og beskadigelse af planterne samt person adgang og deres hygiejne.

Pakning - forarbejdning

Transportkasser og afgrøder, som kommer ind fra marken og ind i pakkerum og/eller forarbejdningsrum, kan være forurenede med mikroorganismer og derved fungere som vektor for forurening af miljøet. Således vil der også kunne ske en forurening af grøntsagerne under pakning og forarbejdning. Desuden vil beskadigelser af plantevævet i forbindelse med transport fra marken og under forarbejdning sandsynligvis fremme internalisering (Takeuchi et al, 2000, 2001, Beuchat, 2002, Siggers et al, 2008; CCFRA, 2007). Da beskadigede eller overmodne råvarer indebærer en risiko for forhøjede niveauer af mikrobiel forurening, som samtidig vil være vanskelig at vaske af, vil det være hensigtsmæssigt at kassere sådanne råvarer for at undgå krydskontaminering. Ligeledes vil der være stor risiko for krydskontaminering, hvis kasser og paller ikke er tilstrækkeligt rengjort, og hvis brug af gaffel-

trucks mv. ikke er begrænset i forhold til hhv. beskidte (modtagelse) og rene (forarbejdning) områder. Generelt vil et ikke-adskilt flow af indgående råvarer og udgående produkter indebære risiko for krydskontaminering.

Ved pakning og evt. primær forarbejdning i form af rensning, trimning og beskæring af grøntsagerne, vil råvarerne komme i kontakt med personale, overflader, udstyr og evt. vand. Herunder kontakt til håndteringsudstyr, transportbånd, sorteringsborde, beholdere/bokse, vandslanger osv. Johnston et al. (2006) foretog en undersøgelse af 8 pakkerifaciliteter i USA og Mexico, hvor der blev pakket 11 forskellige produkttyper, herunder grønne grøntsager og urter. For bladgrøntsager (rød mangold, majroer og grønkål) og urter (persille og koriander), var de gennemsnitlige tællinger af mikrobiologiske indikatorer lave. Tællinger af totale aerobe bakterier på produkterne hhv. før vask, under vask og efter vask gav $5,2 (\pm 1,05)$, $5,2 (\pm 1,05)$ og $5,5 (\pm 0,88)$ log cfu/g mens *E. coli* tallene alle steder var $0,7 (\pm 0,00)$ log cfu/g. Overfladerne i beholdere før vask havde signifikant højere gennemsnitlige antal total aerobe bakterier ($3,7 (\pm 1,10)$ log cfu/g) end i vaske-området ($2,5 (\pm 0,96)$ log cfu/g) og i kasserne efter vask ($3,0 (\pm 0,72)$ log cfu/g), mens alle havde *E. coli* tællinger på $0,70 (\pm 0,00)$ log cfu/g. Dårligt rengjort og vedligeholdt udstyr kan udgøre et reservoir for patogen forurening (Stafford et al, 2002). Johnston et al. (2006) observerede at antallet af *E. coli* på kål steg fra $0,7$ log cfu/g til $0,86$ cfu/g ved flytning fra transportbåndet til den endelige kasse. Prazak et al. (2002) fandt ligeledes *E. coli* og *L. monocytogenes* på transportbeholdere, transportbånd og køleoverflader i forbindelse med forarbejdning af kål i pakkerum. Eftersom almindelige typer af *L. monocytogenes* blev fundet i pakkerumsmiljøet, konkluderede de, at kontaktoverflader var en vigtig kilde til forurening, og fremhævede vigtigheden af god hygiejne i forhold til udstyr. Desuden kan der i forbindelse med overflader eventuelt dannes biofilm, som gør det endnu sværere at fjerne eller inaktivere patogene mikroorganismer (Carpentier og Cerf, 1993; Czechowski, 1991). Der er imidlertid endnu en manglende viden mht. de specifikke bidrag fra de forskellige typer af udstyr mht. krydskontaminering og evt. opformering af patogene bakterier.

Vand bruges i stort omfang i pakke- og forarbejdningsrum til vask af både af råvarer, udstyr og overflader samt til nedkøling. Den mikrobiologiske kvalitet af vand er vigtig da der for meget bladgrønt og urter ofte er tale om spiseklare produkter, hvor der ikke sker yderligere behandling, som vil kunne fjerne evt. forurening. Prazek et al. (2002) analyserede vand brugt til vask, sprøjtning og køling af kål på gårde og i pakkerum og de påviste *L. monocytogenes* i chloreret vaskevand selvom der ikke blev fundet *E. coli*.

Videre forarbejdning

For skårne bladgrøntsager og krydderurter er der yderligere en række forarbejdningstrin som afhængig af produkttype og anvendelse, inkluderer snitning, vask, desinficering, emballering og opbevaring på køl. Forarbejdning kan omfatte udskæring, rivning og snitning og dårlig håndtering i køkkener og forarbejdningsanlæg er blevet linket epidemiologisk til fødevarerudbrud. Dårlig hygiejne i forbindelse med snitning af salat har f.eks. været impliceret i udbrud af hepatitis A (Lowry et al. 1989) og *Shigella sonnei* (Davis et al, 1988). Forurenede overflader i forbindelse med forarbejdning kan resultere i krydskontaminering af råvarer. En forurenede salatsnittemaskine var f.eks. årsag til et fødevarerudbrud af *Salmonella* fra strimlet salat fra en kommerciel producent (Stafford et al, 2002). Her blev

udbrudsstammen fundet på knivene i snitemaskinen, hvilket viste, at forureningen havde persisteret i en periode minimum svarende til patienternes inkubationsperiode.

Der findes referencer for patogen forekomst i hele produkter, men generelt er der manglende sammenligninger mellem hele og skårne produkter og især for produkter fra samme parti. Selvom det forekommer logisk, at findeling af produkter vil øge sandsynligheden for mikrobiel vækst under opbevaring, var dette ikke tilfældet for salat og spinat (Doering et al, 2009). Vækst af *L. monocytogenes* var ikke signifikant forskellig på snittet og hel salat ifølge Beuchat og Brackett (1990). Delaquis et al. (2006) fandt, at anti-listerielle stoffer blev frigivet, når der blev skåret i iceberg salat. Ligeledes fandt man på frisk-skåret iceberg salat og spinat en antagonistisk effekt fra naturligt forekommende flora mod *E. coli* O157 (Johnston et al, 2009). Forskellene i vækst og overlevelse af patogener på hele og frisk-skårne bladrigte grøntsager er endnu ikke tilstrækkeligt dokumenteret og fuldt forstået.

Opbevaring - køl

Opretholdelse af produktkvaliteten og herunder friskhed, er et vigtigt element for frugt og grønt, hvor køling er et middel til at forlænge holdbarheden. For forskellige rodfrugter/knolde samt f.eks. faste kåltyper og porrer er den gavnlige effekt af køling mht. holdbarhed dog eventuel minimal. Effektiv køling indebærer, at man hurtigst muligt får reduceret varmen i grøntsagerne forud for langtidsofopbevaring. Dermed et det første skridt for at opnå en god nedkøling, at høste afgrøderne i køligt vejr (især om morgenen). Mindre avlere kan også sænke temperaturen af produkterne ved at placere dem udenfor natten over. Mere kontrollerede typer af nedkøling kan opnås med vakuumpkøling, hydro-køling, (højhastigheds-) luftkøling og knust is. Ved vakuumpkøling fordampes vand under lavt tryk og er særlig velegnet for grøntsager med stort areal i forhold til volumen. For at undgå udtørring, sprøjtes grøntsagerne evt. med vand inden vakuum. Hydrikøling foregår ved at sprøjte med koldt vand eller nedsænke produkterne i koldt vand, mens luftkøling gør brug af kold luft. Endelig kan nedkøling ske ved at placere knust is over produkterne, såfremt de ikke tager skade af kontakt med isen. Disse nedkølingsmetoder indebærer brug af vand i større eller mindre omfang, og da der typisk er direkte kontakt til produkterne, er det essentielt at vandet er af høj mikrobiologisk kvalitet. Et udbrud af shigellose blev f.eks. tilskrevet persille der kom fra et pakkerum, hvor is var fremstillet af kommunalt kloreret vand recirkuleret gennem en hydro-køler (CDC, 1999). Det tryk som er forbundet med vakuum nedkøling indebærer evt. en risiko for internalisering af patogener. Li et al (2008) viste f.eks., at vakuum nedkøling øgede internaliseringen af *E. coli* O157: H7 i salatvæv signifikant, sandsynligvis pga. ændringer i vævsstrukturer som stomata. Efterfølgende kunne de internaliserede bakterier hverken fjernes ved overflade sterilisation eller firedobbelt vask. Disse eksperimentelle undersøgelser indikerer behovet for at undgå forurening på bladene og at sikre den mikrobiologiske kvalitet af anvendt vand. Mens den præcise betydning af forskellige nedkølingsteknikker mht. eventuelt af fremme overlevelsen af patogener er endnu uklar.

I større butikskæder anvendes evt. luffugtere for at forlænge holdbarheden af frugt og grønt, hvilket indebærer fordampning der fjerner varme, hvorved der opnås en kølende effekt. Her er filter og UV-behandling af vandet med til at sikre en høj hygiejne. Længere holdbarhed af frugt og grønt betyder evt. også større risiko for brud på køle-kæden undervejs, mere tid til opformering af eventuelle patogener bakterier, samt længere eksponering til forurening for uemballerede produkter (De Roever, 1999).

Selv kort opbevaringstid kan dog forårsage vækst af patogene bakterier, hvis opbevaring sker uden køl. Eksempelvis observerede man, at bladgrøntsager og krydderurter opbevaret i forsejlet emballage med høj luftfugtighed efter én dag ved stuetemperatur (20°C) resulterede i >1 log cfu/g vækst af *E. coli* O157 (Abdul-Raouf et al, 1993) og *L. monocytogenes* (Nguyen-The og Carlin, 2000). Tilsvarende steg *Salmonella* på frisk koriander opbevaret én dag ved 22°C med 0,7 log cfu/g (Brandl og Mandrell, 2002).

Generelt vil overlevelse og vækst af mikroorganismer i forbindelse med opbevaring af grøntsager og bær både afhænge af det specifikke patogen, produkt type, temperatur, relativ luftfugtighed, atmosfære og emballage (ICMSF, 2006; Harris et al, 2003). Temperatur er dog en væsentlig faktor mht. vækst og overlevelse. Selvom nedkøling ikke fjerner eksisterende forurening, vil væksten af bakterier være nedsat. (Abdul-Raouf et al, 1993). Dermed vil køling under opbevaringen sandsynligvis nedsætte risikoen for bakterielle infektioner, især hvor vækst af patogenet er nødvendig for at opnå infektionsdosis, mens patogener med lav infektionsdosis stadig vil kunne udgøre en risiko. Eksempelvis er der vist en tydelig sammenhæng mellem niveauer af *L. monocytogenes* i spise-klare fødevarer og antal humane tilfælde (FAO / WHO, 2004). Lave temperaturer vil hæmme væksten og overlevelsen af de fleste bakterier, men psychrotrofer, herunder *L. monocytogenes* kan overleve og formere sig ved køleskabs-temperatur, selvom væksthastigheden var lavere end ved 37°C (Beuchat og Brackett, 1990; Carlin et al, 1995). Crepet et al. (2007) estimerede den gennemsnitlige forurening med *L. monocytogenes* på friske råvarer til at være mellem 0,1 og 1 cfu/100 g. Også *E. coli* har vist sig at overleve i flere dage under nedkølede forhold (Abdul-Raouf et al, 1993).

Virus har typisk en god overlevelse på friske råvarer, der er opbevaret koldt (DeRoeve, 1999; Beuchat, 1996; Konowalchuk og Spir, 1974, 1975). Rotavirus overlevede f.eks. 25-30 dage på salat, radiser og gulerødder opbevaret ved 4°C, men kun 5-25 dage uden køl (Badawy et al, 1985)

Køling er altså vigtig mht. holdbarhed og mulig vækst af bakterier (Johnston et al. 2009a). Imidlertid kan små men hyppige brud på kølekæden gennem produktionsforløbet let forekomme, f.eks. ved lastning og losning af produkter under køletransport, temperaturvariationer i køleudstyr samt korte strømsvigt og sandsynligheden for kortere afvigelser fra den optimale temperatur er høj. Effekten af disse temperaturafvigelser mht. mulighed for bakteriel vækst er dog usikre. Alligevel bør alle trin der indebærer en mulig opvarmning af produkterne forsøges minimeret, for flere bakterier vil kunne vokse ved opbevaringstemperaturer over 5°C, dog afhængig af varigheden. O157 *E. coli* viste f.eks. ikke vækst ved 5°C, men voksede ved 8°C eller derover (Abdul-Raouf et al 1993, Francis og O'Beirne, 2001; Kosaki og Isobe, 2005; Luo et al, 2008). Mens Estrada-Flores og Tanner (2005) fandt, at temperaturafvigelser inden for 4 timer med en maksimal produkt temperatur på 9°C ikke forårsagede betydelig vækst af *E. coli* på friske råvarer. Er der tale om produkter der udsættes for højere temperaturer eller i længere tid, vil det sandsynligvis øge risikoen, men den eksisterende viden er endnu mangelfuld (Tanner et al, 2005; Smale, 2004; Estrada-Flores et al, 2006; 2007).

I forbindelse med transport, opbevaring og markedsføring vil grøntsager og bær kunne forurennes ved kontakt med forurenede overflader, gennem luftstrømme i forbindelse med nedkøling og opbevaring (f.eks. beskidte fordampere), eller gennem dryp af forurenede kondensvand i køleanlæg (Evans et al, 2004). Der er kun få data mht. betydning af forskellige afsætningskanaler, men der er en tendens til at

produkter fra grønthandler butikker og bod er har højere kimtal end i supermarkeder (FAO/WHO, 2006). I en nylig undersøgelse (Valentin-Bon et al, 2008) af 100 poser af salat og spinat købt fra butikker i Washington DC, USA svingede det totale kimtal (4 til 7 log cfu/g) og coliforme bakterier (1 til 4 log MPN/g). Generelt var der en betydelig variation ikke kun mellem produkttyper, men også inden for samme produkt med ens holdbarhedsdata

Forebyggelse af mikrobiologiske risici ved frugt og grønt

Ved gødning af grøntsager med husdyrgødning i Danmark, anbefales det at anvende kompostet gødning, men det er ikke et lovmæssigt krav (Rådets forordning (EF) nr. 834/2007 og Vejledning om økologisk jordbrugsproduktion 2010. Desuden er der ingen anbefalinger for et minimum tidsinterval mellem udbringning af husdyrgødning og plantning/såning eller høst.

I USA er der regler for anvendelse af ubehandlet husdyrgødning (7 CFR 205,203; National Organic Program under USDA, United States Department of Agriculture). Ubehandlet husdyrgødning må senest udbringes 120 dage før høst af produkter, hvis den spiselige del har direkte kontakt med jordoverfladen eller jordpartikler, og senest 90 dage før høst hvis den spiselige del ikke har direkte kontakt med jordoverfladen. Behandling af husdyrgødning indebærer kompostering. Ved kompostering sker en varmeudvikling, og der skal minimum opnås en temperatur på mellem 55° og 70°C i 3-15 dage (afhængig af komposteringssystemet) og der skal ske en omrøring/vending af gødningsstak undervejs.

Også i Storbritannien er der krav til kompostering af husdyrgødning og tidsinterval mellem anvendelse og høst (Microbiological Guidance for Produce Suppliers to Chilled Food Manufacturers, 2nd ed. 2007. CFA, Chilled Food Association). Ved kompostering skal der minimum opnås en temperatur på 55° i 3 dage, og komposten skal efterfølgende gemmes mindst 3 mdr. inden anvendelse.

Ifølge Global G.A.P (Good Agricultural Practice; Control Points and Compliance Criteria Integrated Farm Assurance. Crops Base, Annex CB.1 GLOBAL G.A.P Guideline – Microbiological Hazards) som er et privat certificeringsorgan, bør intervallet mellem udbringning af husdyrgødning og høst maksimeres (minimum 60 for ubehandlet husdyrgødning).

Desuden angiver en række guidelines, at en god praksis mht. anvendelse af husdyrgødning betyder, at man IKKE benytter ubehandlet gødning eller at man maksimerer tidsintervallet mellem anvendelse og høst. Eksempelvis, "Five Keys to Growing Safer Fruits and Vegetables: Promoting Health by Decreasing microbial Contamination, WHO 2011", "Guidance for Industri, Guide to Minimize Microbial Food Safety Hazards for Fresh Fruits and Vegetables" 1998 og "Commodity Specific Food Safety Guidelines for the Production and Harvest of Lettuce and Leafy Greens", 2007 (begge fra FDA (US Food and Drug Administration) samt Codex-code of Hygienic Practice for Fresh Fruit and Vegetable , CAC/RCP 53-2003 (revideret 2010)

Referencer

Abdul-Raouf, U.M., Beuchat, L.R. & Ammar, M.S. 1993. Survival and growth of *E. coli* O157:H7 on salad vegetables. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 1999–2006.

- ACMSF [Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food. UK]. 2008, ACMSF Minutes 11 March 2008. Available at <http://acmsf.food.gov.uk/acmsfmeets/acmsf2008/acmsf110308/acmsfmin110308>
- Ackers, M., Pagaduan, R., Hart, G., Greene, K.D., Abbott, S., Mintz, E. & Tauxe, R.V. 1997. Cholera and sliced fruit: probably secondary transmission from an asymptomatic carrier in the United States. *International Journal of Infectious Diseases*, 1: 212–214.
- Amoah, P., Drechsel, P. & Abaidoo, R.C. 2005. Irrigated urban vegetable production in Ghana: sources of pathogen contamination and health risk reduction. *Irrigation and Drainage*, 54: S49–S61.
- Andersen og Hald, 2001. Risikovurdering ved anvendelse af vandingskanoner til udsprengning af gylle fortyndet med vand, Miljøprojekt Nr. 606, 2001. Miljøstyrelsen.
- Avery, L.M., Hill, P., Killham, K. & Jones, D.L. 2004. *Escherichia coli* O157 survival following the surface and sub-surface application of human pathogen contaminated organic waste to soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 36: 2101–2103.
- Badawy, A.S., Gerba, C.P. & Kerby, M.L. 1985. Survival of rotavirus SA-11 on vegetables. *Food Microbiology*, 2: 199–205.
- Bastos, R.K.X. & Mara, D.D. 1995. The bacterial quality of salad crops drip and furrow irrigated with waste stabilization pond effluent: an evaluation of the WHO guidelines. *Water Science and Technology*, 31: 425–430.
- Beattie, G.A. & Lindow, S.E. 1995. The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. *Annual Review of Phytopathology*, 33: 145–172.
- Beuchat, L.R. 2002. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables *Microbes and Infection*, 4: 413–423, 59: 204–216.
- Beuchat, L.R. 1996. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. *Journal of Food Protection*, 59: 204–216.
- Beuchat, L.R. & Brackett, R.E. 1990. Survival and growth of *L. monocytogenes* on lettuce as influenced by shredding, chlorine treatment, modified atmosphere packaging and temperature. *Journal of Food Science*, 55: 755–758, 870.
- Borchardt, M.A., Bertz, P.D., Spencer, S.K. & Battigelli, D.A. 2003. Incidence of enteric viruses in groundwater from household wells in Wisconsin. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2): 1172–1180
- Brackett, R.E. 1999. Incidence, contributing factors, and control of bacterial pathogens in produce. *Postharvest Biology and Technology*, 15: 305–311.
- Brandl, M.T. 2006. Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. *Annual Review of Phytopathology*, 44: 367–392.
- Brandl, M.T. & Mandrell, R.E. 2002. Fitness of *Salmonella enterica* serovar Thompson in the cilantro phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 3614–3621.
- Carlin, F., Nguyen-The, C. & Abreu da Silva, A. 1995. Factors affecting the growth of *L. monocytogenes* on minimally processed fresh endive. *Journal of Applied Bacteriology*, 78: 636–646.
- CCFRA. 2007. Ranking of cross-contamination vectors of ready-to-eat foods: a practical approach. CCFRA Guideline No. 54, Campden & Chorleywood Food Research Association, UK.
- CDC [Centres for Disease Control and Prevention]. 1999. Outbreaks of *Shigella sonnei* infection associated with eating fresh parsley – United States and Canada, July–August 1998. *MMWR – Mortality and Morbidity Weekly Report*, 48: 285–289.
- Codex. 2010. Codex-code of Hygienic Practice for Fresh Fruit and Vegetable, CAC/RCP 53-2003 (revideret 2010)
- Crepet, A., Albert, I., Dervin, C. & Carlin, F. 2007. Estimation of microbial contamination of food from prevalence and concentration data: application to *Listeria monocytogenes* in fresh vegetables. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 250–258.

- Carpentier, B. & Cerf, O. 1993. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *Journal of Applied Bacteriology*, 75: 499–511.
- Choi, C., Song, I, Stine, S. et al. (2004). Role of irrigation and wastewater: Comparison of subsurface irrigation and furrow irrigation. *Water Sci. Technol.* 50, 61–68.
- Czechowski, M.H. 1991. Biofilms and surface sanitation in the food industry. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 8:453-454.
- Davis, H., Taylor, J.P., Perdue, J.N., Stelma, G.N., Humphreys, J.M., Rowntree, R. & Greene, K.D. 1988. A shigellosis outbreak traced to commercially distributed shredded lettuce. *American Journal of Epidemiology*, 128: 1312–1321
- Deetz, T.R., Smith, E.M., Goyal, S.M., Gerba, C.P., Vollet, J.J., Tsai, L., Dupont, H.L. & Keswick, B.H. 1984. Occurrence of rotavirus and enterovirus in drinking and environmental waters in a developing nation. *Water Research*, 18: 567–572.
- DeJusús, A., Olsen, A., Bryce, J. & Whiting, R. 2004. Quantitative contamination and transfer of *Escherichia coli* from foods by houseflies, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). *International Journal of Food Microbiology*, 93: 259–262.
- Delaquis, P.J., Wen, A., Toivonen, P.M.A. & Stanich, K. 2006. Evidence of an antilisterial factor induced by wounding of iceberg lettuce tissues. *Letters in Applied Microbiology*, 42: 289–295.
- De Roever, C. 1998. Microbiological safety evaluations and recommendations on fresh produce. *Food Control*, 9: 321–347.
- Doering, H.A, Harrison, M.A., and Morrow, R.A. Hurst, W.C. and Kehr, W.L. 2009. Use of the systems approach to determined the fate of *Escherichia coli* O157:H7 on fresh lettuce and spinach. *Journal of Food Protection*, 72: 1560-1568.
- Doyle, M., Beuchat, L., Erickson, M., Riley, D., Zhang, G. & Ma, L. 2007. Subsurface contamination and internalization of *Escherichia coli* O157:H7 in pre-harvest lettuce. Available at <http://www.freshexpress.com/research/research.asp#r1> (Accessed on 8 May 2008).
- Edmonds, C. & Hawke, R. 2004. Microbiological and metal contamination of watercress in the Wellington region, New Zealand – 2000 survey. *Australian and New Zealand Journal of Public Health*, 28(1): 20–26.
- Estrada-Flores, S., Eddy, A. & Smale, N. 2006. Evaluation of the thermal performance of five refrigerated vans. pp. 369–377, in: Proceedings of the Conference "Innovative Equipment and Systems for Comfort and Food Preservation", Auckland, NZ. International Institute of Refrigeration. Comm B2, E1 with C2, D1, D2.
- Estrada-Flores, S. & Platt, G. 2007. Electricity usage in the Australian cold chain. *Food Australia*, 59(8): 382–394.
- Estrada-Flores, S. & Tanner, D.J. 2005. Temperature variability and prediction of food spoilage during urban delivery of food products. In: [Proceedings] of the III International Symposium on Applications of Modelling as an Innovative Technology in the Agri-Food Chain; MODEL-IT. *ISHS Acta Horticulturae*, 674: 63–69.
- Evans, J.A., Russell, S.L., James, C. & Corry, J.E.L. 2004. Microbial contamination of food refrigeration equipment. *Journal of Food Engineering*, 62: 225–232.
- FAO/WHO [World Health Organization]. 2004. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: technical report. *Microbiological Risk Assessment Series*, No. 5. 98 p.
- FAO/WHO [Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization]. 2008. Microbiological hazards in fresh leafy vegetables and herbs: Meeting Report. *Microbiological Risk Assessment Series* No. 14. Rome. 151pp.
- FDA (US Food and Drug Administration), 1998. Guidance for Industri, Guide to Minimize Microbial Food Safety Hazards for Fresh Fruits and Vegetables

- FDA (US Food and Drug Administration), 2007. Commodity Specific Food Safety Guidelines for the Production and Harvest of Lettuce and Leafy Greens
- Feachem, R.G., Bradley, D.J., Garelick, H. & Mara, D.D. 1983. *Sanitation and Disease - Health Aspects of Excreta and Wastewater Management*. John Wiley & Sons.
- Fenlon, D.R., Ogden, I.D., Vinten, A. & Svoboda, I. 2000. The fate of *Escherichia coli* and *E. coli* O157 in cattle slurry after application to land. *Society for Applied Microbiology* (Symposium series supplement), 88: 149S–156S.
- Franz, E., van Diepeningen, A.D., De Vos, O.J. & van Bruggen, A.H.C. 2005. Effects of cattle feeding regimen and soil management type on the fate of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enteric* serovar typhimurium in manure, manure-amended soil, and lettuce. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 6165–6174.
- Franz, E., Klerks, M.M., De Vos, O.J., Termorshuizen, A.J. & van Bruggen, A.H.C. 2007a. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* stx1, stx2, eaeA and rfbE genes and survival of *E. coli* O157:H7 in manure from organic and low-input conventional dairy farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 2180–2190.
- Franz, E., Semenov, AV., Termorshuizen, AJ., de Vos, OJ., Bokhorst, JG. & van Bruggen, A.H.C. 2007b. Manure-amended soil characteristics affecting the survival of *E. coli* O157:H7 in 36 Dutch soils. *Environmental Microbiology*, 10: 313–327.
- 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.
- Fremaux, B., Prigent-Combaret, C., Delignette-Muller, M.L., Mallen, B., Dothal, M., Gleizal, A. & Vernozy-Rozand, C. 2008. Persistence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 in various manure-amended soil types. *Journal of Applied Microbiology*, 104: 296–304.
- Habteselassie, M., Bischoff, M., Blume, E., Applegate, B., Reuhs, B., Brouder, S. & Turco, R.F. 2007. Environmental controls on the fate of *Escherichia coli* in soil. *Water, Air and Soil Pollution*, 190: 143–155.
- Hamilton, A.J., Stagnitti, F., Premier, R., Boland, A.M. & Hale, G. 2006. Quantitative microbial risk assessment models for consumption of vegetable crops irrigated with reclaimed water. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 3284–3290.
- Harris, L.J., Farber, J.N., Beuchat, L.R., Parish, M.E., Suslow, T.V., Garrett, E.H. & Busta, F.F. 2003. Outbreaks associated with fresh produce: incidence, growth and survival of pathogens in fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2S: 78–141.
- Heinonen-Tanski, H., Niskanen, E.M., Salmela, P. & Lanki, E. 1998. *Salmonella* in animal slurry can be destroyed by aeration at low temperatures. *Journal of Applied Microbiology*, 85(2): 277–281.
- Himathongkham, S., Bahari, S., Riemann, H. & Cliver, D. 1999. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* in cow manure and cow manure slurry. *FEMS Microbiology Letters*, 178: 251–257.
- Hilborn, E D, J. H. Mermin, P.A. Mshar, J.L. Hadler, A. Voetsch, C. Wojtkunski, M. Swartz, R. Mshar, M.-A. Lambert-Fair, .A. Farrar, M. K. Glynn, L. Slutske 1999. A Multistate Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infections Associated With Consumption of Mesclun Lettuce ARCH INTERN MED/VOL 159, AUG 9/23, 1758-1764.
- Hutchison, M.L., Walters, L.D., Moore, T., Thomas, D.J.I. & Avery, S.M. 2005. Fate of pathogens present in livestock wastes spread onto fescue plots. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 691–696.
- Hutchison, M.L., Walters, L.D., Moore, T., Crookes, K.M. & Avery, S.M. 2004. Effect of Length of Time before Incorporation on Survival of Pathogenic Bacteria Present in Livestock Wastes Applied to Agricultural Soil *Applied and Environmental Microbiology* 70: 5111–5118
- ICMSF. 2006. *Microorganisms in Foods 3: Microbial Ecology of Foods*. Vol.1. Factors affecting life and death of microorganisms. Academic Press, New York, USA.

- Islam, M., Morgan, J., Doyle, M.P., and Jiang, X. (2004a) Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in manure compost amended soil and on carrots and onions grown in an environmentally controlled growth chamber. *J Food Prot* 67: 574–578.
- Islam, M., Doyle, M.P., Phatak, S.C., Millner, P., and Jiang, X. (2004b) Persistence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on leaf lettuce and parsley grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *J Food Prot* 67: 1365–1370.
- Jerman, J., Spencer, L. & Duran, N. 2003. Microbial quality degradation of treated effluent during distribution of crop irrigation. American Society for Microbiology Annual meeting. Abstract 03:GMA- 1764-ASM.
- Jeter, C., and Matthyse, A.G. (2005) Characterization of the binding of diarrheagenic strains of *E. coli* to plant surfaces and the role of curli in the interaction of the bacteria with alfalfa sprouts. *Mol Plant Microbe Interact* 18: 1235–1242.
- Jablasone, J., Warriner, K. & Griffiths, M. 2005. Interactions of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* plants cultivated in a gnotobiotic system. *International Journal of Food Microbiology*, 99: 7–18.
- Jay, M.T., Cooley, M., Carychao, D., Wiscomb, G.W., Sweitzer, R.A., Crawford-Miksza, L., Farrar, J.A., Lau, D.K., O'Connell, J., Millington, A., Asmundson, R.V., Atwill, E.R. & Mandrell, R.E. 2007. *Escherichia coli* O157:H7 in feral swine near spinach fields and cattle, central California coast. *Emerging Infectious Diseases*, 13: 1908–1911.
- Jiang, X., Morgan, J. & Doyle, M.P. 2002. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in manure-amended soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 2605–2609.
- Johnston, L.M., Jaykus, L.A., Moll, D., Anciso, J., Mora, B. & Moe, C.L. 2006. A field study of the microbiological quality of fresh produce of domestic and Mexican origin. *International Journal of Food Microbiology*, 112: 83–95.
- Johnston, M.A., Harrison, M.A., and Morrow, R.A. 2009. Microbial antagonists of *Escherichia coli* O157:H7 on fresh-cut lettuce and spinach. *Journal of Food Protection*, 72: 1569–1575.
- Jothikumar, N., Aparna, K., Kamatchiammal, S., Paulmurugan, R., Saravanadevi, S. & Khanna, P. 1993. Detection of hepatitis E virus in raw and treated wastewater with the polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(8): 2558–2562.
- Keraita, B., Konradsen, F., Drechsel, P. & Abaidoo, R.C. 2007. Reducing microbial contamination on wastewater-irrigated lettuce by cessation of irrigation before harvesting. *Tropical Medicine and International Health*, 12(Suppl. 2): 8–14.
- Konowalchuk, J. & Spiers, J.L. 1974. Recovery of coxsackievirus B5 from stored lettuce. *Journal of Milk and Food Technology*, 37: 132–134.
- Konowalchuk, J. & Spiers, J.L. 1975. Survival of enteric viruses on fresh vegetables. *Journal of Milk and Food Technology*, 38: 469–472.
- Koseki, S. & Isobe, S. 2005. Prediction of pathogen growth on iceberg lettuce under real temperature history during distribution from farm to table. *International Journal of Food Microbiology*, 104: 239–248.
- Kudva, I.T., Blanch, K. & Hovde, C.J. 1998. Analysis of *Escherichia coli* O157:H7 survival in ovine or bovine manure and manure slurry. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 3166–3174.
- Leifert, C., Ball, K., Volakakis, N. & Cooper, C. 2008. Control of enteric pathogens in ready-to-eat vegetable crop in organic and 'low input' production systems: a HACCP-based approach. *Journal of Applied Microbiology*, 105(4): 931–950.
- Li, H., Tajkarimi, M. & Osburn, B.I. 2008. Impact of vacuum cooling on *Escherichia coli* O157:H7 infiltration into lettuce tissue. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 3138–3142.

- Luo, Y., McEvoy, J.L., He, Q., Shen, L., Vico, I. & Conway, W.S. 2008. Growth of *Escherichia coli* O157:H7 on commercially packaged fresh-cut salads. Presentation T4-10, at the International Association for Food Protection Annual Meeting, 3–6 August 2008, Columbus, Ohio, USA. Abstract available at: <http://www.foodprotection.org/meetingsEducation/IAFP%202008/2008%20Technical%20Abstracts.pdf> (Accessed 25 October 2008).
- Lowry, P.W., Levine, R., Stroup, D.F., Gunn, R.A., Wilder, M.H. & Konigsberg, C. 1989. Hepatitis A outbreak on a floating restaurant in Florida, 1986. *American Journal of Epidemiology*, 129: 155–164.
- McEvoy, J.L., Luo, Y., Conway, W., Zhou, B. & Feng, H. [2008 In press]. Potential of *Escherichia coli* O157:H7 to grow on field-cored lettuce as impacted by post-harvest storage time and temperature. *International Journal of Food Microbiology*, In press.
- Melloul, A.A., Hassani, L. & Rafouk, L. 2001. *Salmonella* contamination of vegetables irrigated with untreated wastewater. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(2): 207–209.
- Mubiru, D.N., Coyne, M.S. & Grove, J.H. 2000. Mortality of *Escherichia coli* O157:H7 in two soils with different physical and chemical properties. *Journal of Environmental Quality*, 29: 1821–1825.
- Nguyen-The, C. & Carlin, F. 2000. Fresh and processed vegetables. pp. 620–684, in: B. Lund, T. Baird-Parker and G.W. Gould (editors). *The Microbial Safety and Quality of Food*. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland, USA.
- 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.
- Norman, N.N. & Kabler, P.W. 1953. Bacteriological study of irrigated vegetables. *Sewage and Industrial Wastes*, 25: 605–609.
- Okafo, C.M., Umoh, V.J. & Galadima, M. 2003. Occurrence of pathogens on vegetables harvested from soils irrigated with contaminated streams. *The Science of the Total Environment*, 311: 49–56.
- Palmgren, H., Aspán, A., Broman, T., Bengtsson, K., Blomquist, L., Bergström, S., Sellin, M., Wollin, R. & Olsen, B. 2006. *Salmonella* in black-headed gulls (*Larus ridibundus*): prevalence, genotypes and influence on *Salmonella* epidemiology. *Epidemiology and Infection*, 134: 635–644.
- Park, G.W. & Diez-Gonzalez, F. 2003. Utilization of carbonate and ammonia-based treatments to eliminate *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium DT104 from cattle manure. *Journal of Applied Microbiology*, 94: 675–685.
- Prazak, A.M., Murano, E.A., Mercado, I. & Acuff, G.R. 2002. Prevalence of *Listeria monocytogenes* during production and post-harvest processing of cabbage. *Journal of Food Protection*, 65: 1728–1734.
- Saggers, E.J., Waspe, C.R., Parker, M.L., Waldron, K.W. & Brocklehurst, T.F. 2008. *Salmonella* must be viable in order to attach to the surface of prepared vegetable tissues. *Journal of Applied Microbiology*, 105(5): 1239–1245.
- Semenov, A.V., van Bruggen, A.H.C., van Overbeek, L., Termorshuizen, A.J. & Semenov, A.M. 2007. Influence of temperature fluctuations on *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in cow manure. *FEMS Microbiology Ecology*, 60: 419–428.
- Shepherd, M.W. Jr., Liang, P., Jiang, X., Doyle, M.P. & Erickson, M.C. 2007. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 during on-farm dairy manure-based composting. *Journal of Food Protection*, 70: 2708–2716.
- Semenov, A.V., Franz, E., van Bruggen, A.H.C. & van Overbeek, L. 2008. Influence of Oxygen on Survival and Quantification of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Serovar Typhimurium in Manure and Slurry. Pre-

- sented at the Technical Sessions (T1-05) of the 95th IAFP Annual Meeting, Columbus, Ohio, USA, 3 – 6 August, 2008. Available at: <http://www.foodprotection.org/meetingsEducation/IAFP%202008/2008%20Technical%20Abstracts.pdf>
- Sharma, M., Ingram, D.T., Patel, J.R., Millner, P.D., Wang, X., Hull, A.E., and Donnenberg, M.S. (2009) A novel approach to investigate the uptake and internalization of *Escherichia coli* O157:H7 in spinach cultivated in soil and hydroponic medium. *Journal of Food Protection* 72: 1513–1520.
- Solomon, E.B., Yaron, S. & Matthews, K.R. 2002. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 397–400.
- Solomon, E.B., Pang, H.J., and Matthews, K.R. (2003) Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce plants following spray irrigation with contaminated water. *J Food Prot* 66: 2198–2202
- Song, I., Stine, S.W., Choi, C.Y. & Gerba, C.P. 2006. Comparison of crop contamination by microorganisms during subsurface drip and furrow irrigation. *Journal of Environmental Engineering*, 132(10): 1243–1248.
- Stafford, R.J., McCall, B.J., Neill, A.S., Leon, D.S., Dorricott, G.J., Towner, C.D. & Micalizzi, G.R. 2002. A statewide outbreak of *Salmonella bovis* phage type 32 infection in Queensland. *Communicable Disease Intelligence*, 26: 568–573.
- Stine, S., Song, I., Choi, C. & Gerba, C. 2005. Application of microbial risk assessment to the development of standards for enteric pathogens in water used to irrigate fresh produce. *Journal of Food Protection*, 68: 913–918.
- Söderstrom, A., Lindberg, A. & Andersson, Y. 2005. EHEC O157 outbreak in Sweden from locally produced lettuce, August–September 2005. *Euro Surveill* 10(38): Article 1. Available at: <http://www.eurosurveillance.org/ew/2005/050922.asp#1> (Accessed 25 October 2008).
- Takeuchi, K., Hassan, A.N. & Frank, J.F. 2001. Penetration of *Escherichia coli* O157:H7 into lettuce as influenced by modified atmosphere and temperature. *Journal of Food Protection*, 64: 1820–1823.
- Takeuchi, K., Matute, C., Hassan, A. & Frank, J. 2000. Comparison of the attachment of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, and *Pseudomonas fluorescens* to lettuce leaves. *Journal of Food Protection*, 63: 1433–1437.
- Tanner, D.J., Estrada-Flores, S., Smale, N.J. & Amos, N.D. 2005. Maintaining quality during the transport of fresh foods: using innovation for improvement. Proceedings of the IRHACE [Institute of Refrigeration, Heating and Air-conditioning Engineers of New Zealand] Conference. CD-ROM, Paper 2-01. 8 p.
- Tetltsch, B. & Katzenelson, E. 1978. Airborne enteric bacteria and viruses from spray irrigation with wastewater. *Applied and Environmental Microbiology*, 36(2): 290–296.
- Valentin-Bon, I., Jacobson, A., Monday, S.R. & Feng, P.C.H. 2008. Microbiological quality of bagged cut spinach and lettuce mixes. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(4): 1240–1242.
- van Elsas, J.D., Hill, P., Chronakova, P., Grekova, M., Topalova, Y., Elhottova, D. & Kristuvek, V. 2007. Survival of genetically marked *Escherichia coli* O157:H7 in soil as affected by soil microbial community shifts. *ISME Journal*, 1(3): 204–214.
- Wachtel, M.R., Whitehand, L.C. & Mandrell, R.E. 2002. Prevalence of *Escherichia coli* associated with a cabbage crop inadvertently irrigated with partially treated wastewater. *Journal of Food Protection*, 65(3): 471–475.
- WHO. 2006. WHO guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater. Wastewater use in agriculture. WHO, Geneva, Switzerland.
- WHO. 2011. Five Keys to Growing Safer Fruits and Vegetables: Promoting Health by Decreasing microbial Contamination, WHO, Geneva, Switzerland.

Appendiks 4

Referencer

Referencer (Afsnit 3 og 4)

Berger, C.N., Shaw, R.K., Brown, D.J., Mather, H., Clare, S., Dougan, G., et al. (2009a) Interaction of *Salmonella enterica* with basil and other salad leaves. *ISME J* 3: 261–265.

Domingues A. R., S. M. Pires, T. Halasa, T. Hald. Source attribution of human salmonellosis using a meta-analysis of case-control studies of sporadic infections (revised manuscript submitted to *Epidemiology and Infection* June 2011)

Evers E G, Van Der Fels-Klerx H J, Nauta M J, Schijven J F and Havelaar A H (2008). *Campylobacter* source attribution by exposure assessment. *Int J Risk Assess Manag*, 8, 174-190.

FDA (2003). Quantitative assessment of relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. Available from <http://www.foodsafety.gov/~dms/lmr2-toc.html>.

Hald T, S M Pires (2011). "Attributing the burden of foodborne disease to specific sources of infection" in *Tracing pathogens in the food chain*. Eds. S Brul, P M Fratamico and T A McMeekin. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition No. 196. ISBN 1 84569 496 1.

Lynch M. F., R. V. Tauxe and C. W. Hedberg (2009). The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: risks and opportunities. *Epidemiology and Infection*, 137: 307-315.

McBride G, Meleason M, Skelly C, Lake R, van der Logt P and Collins R (2005). Preliminary relative risk assessment for *Campylobacter* exposure in New Zealand: 1. National model for four potential human exposure routes; 2. Farm environmental model. NIWA Client Report: HAM2005-094. Available at <http://www.zoonosesresearch.org.nz/reports/PreliRelativeriskAssessment.pdf> [Accessed February 9, 2010]

Nauta, M. and Christensen, B. 2011 The impact of consumer phase models in microbial risk analysis. *Risk Analysis* 31:255-265.

Nauta, M.J., Fischer, A.R.H., Van Asselt, E.D., De Jong, A.E.I, Frewer, L.J. and De Jonge, R., 2008. Food Safety in the Domestic Environment: the effect of consumer risk information on human disease risks. *Risk Analysis*, 28, 179-192.

Pires S M (2009). Attributing human salmonellosis and campylobacteriosis to animal, food and environmental sources. PhD Thesis. ISBN 978-87-7611-311-7. Faculty of Life Sciences, University of Copenhagen, Denmark.

Pires S M, Evers E G, van Pelt W, Ayers T, Scallan E, Angulo F J, Havelaar A, Hald T and the Med-Vet-Net Workpackage 28 Working Group (2009). 'Attributing the human disease burden of foodborne infections to specific sources'. *Foodborne Pathog Dis*, 6(4), 417-24.

van Asselt ED, Fischer A, de Jong AEI, Nauta MJ, de Jonge R, 2009. Cooking Practices in the Kitchen—Observed Versus Predicted Behavior. *Risk Analysis* 29(4), pp. 533-540.

van Asselt ED, de Jong AEI, de Jonge R, Nauta MJ. Crosscontamination in the kitchen: Estimation of transfer rates for cutting boards, hands and knives. *Journal of Applied Microbiology*, 2008; 105(5):1392–1401.

Referencer (afsnit 8)

Adams MR, Hartley AD, Cox LJ. Factors affecting the efficiency of washing procedures used in the production of prepared salads. *Food Microbiology* 1989;6:69-77.

Anon ADVISORY COMMITTEE ON THE MICROBIOLOGICAL SAFETY OF FOOD: Fresh produce: Agency advice on re-washing ready to eat leafy salads. ACM/891, UK Food Standards Agency, 2008

Beuchat LR and Jee-Hoon Ryu Produce Handling and Processing Practices Emerging Infectious Diseases Vol. 3, No. 4, October–December 1997

Daisuke N et al. Efficacy of Chlorine and Acidified Sodium Chlorite on Microbial Population and Quality Changes of Spinach Leaves *FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE* Volume 6, Number 5, 2009

Danyluk MD og Schaffner DW Quantitative Assessment of the Microbial Risk of Leafy Greens from Farm to Consumption: Preliminary Framework, Data, and Risk Estimates *Journal of Food Protection*, Vol. 74, No. 5, 2011, Pages 700–708

Lund BM. Bacterial spoilage. In: Dennis C, editor. *Post-harvest pathology of fruits and vegetables*. London: Academic Press; 1983. p. 219.