

Klostridios hos slaktkyckling - betydelsen av olika typer av *Clostridium perfringens*

Statsveterinär Björn Engström, Avdelningen för lantbrukets djur, Statens veterinärmedicinska anstalt, 751 89 Uppsala

Sammanfattning – slutsatser

- ❖ Toxintypning av *C. perfringens* (CP) - isolat utvecklades med PCR som metod för att detektera följande toxingener: alfa-, beta-, beta2-, epsilon- och iota- samt entero- och theta-toxinerna.
 - Alla Nordiska CP-isolat från fjäderfä var av typ A, några få hade även beta2 genen, vilken är vanlig hos grisisolat. Theta-genen förekom i alla undersökta isolat oavsett om de isolerats från friska eller sjuka djur.
- ❖ Sekvensering av beta2-genen visade att genen hos kycklingsisolaten skiljde sig från de isolerade från gris på ett sätt som tyder på att den inte är lika aktiv. Detta och den låga prevalensen tyder på att beta2-toxinet inte är någon patogenitetsfaktor för kyckling.
- ❖ Det genetiska släktskapet studerades med hjälp av PFGE (pulsfältgelelektrofores) som utvecklades och jämfördes med AFLP ("amplified-fragment length polymorphism"). De visade sig vara likvärdiga metoder när det gäller bedömning av släktskap.
 - Det var en stor genetisk variation hos CP-isolaten speciellt i friska besättningar som inte hade fått koccidiostatika.
 - I flockar med utbrott av NE eller leverskador hittades ett fåtal subtyper av CP i tarm eller lever, men olika flockar hade nästan alltid olika subtyper. Det tyder på att det inte finns några få patogena CP-stammar som ofta återfinns vid sjukdomsutbrott.
 - Kycklingsisolaten liknade inte isolat från andra tama eller vilda djur med enterit.
- ❖ *C. perfringens* typ A hade god överlevnad vid en simulerad transport av prover och toxingenerna var stabila även vid förvaring i rumstemperatur i aerob miljö. Att toxingenerna är stabila visar att man kan lita på att typningsresultaten är korrekta.
- ❖ En antibiotikaresistenstest utvecklades med en buljongspädningsmetod i mikrotitterplattor.
 - Inga av de nordiska isolaten var resistenta mot den jonofora koccidiostatikan narasin. Däremot var fler svenska CP-isolat resistenta mot tetracykliner än de norska och danska.
- ❖ En studie av flockar utan koccidiostatika genomfördes i samarbete med Norge med PFGE för att undersöka den genetiska variationen hos CP. De var en stor diversitet hos CP-isolat i de subkliniskt infekterade kycklingarna och mönstret talade inte för att någon speciell subtyp var mer patogen än andra.

Bakgrund

Ett av den moderna slaktkycklinguppfödningens stora problem är klostridios. Problem med klostridios förekommer även hos t ex kalkon- och strutskycklingar. Klostridios är ett multifaktorellt lidande som inträffar då *Clostridium perfringens* snabbt förökas i tunntarmen och producerar toxiner. Klostridios förekommer i klinisk form med akuta utbrott av **nekrotiserande enterit (NE)** och som subkliniska fall med NE och ***Clostridium perfringens*-relaterad hepatit (CPH)**. De olika formerna av klostridios leder till hög dödlighet respektive dålig foderkvot och kassationer vid slakt. Resultatet är lidande för djuren och ekonomiska förluster för djurägaren.

NE har påvisats i de flesta slaktkycklingproducerande länder. Subklinisk NE är mindre känd beroende på diagnostiska svårigheter, men har troligen stor ekonomisk betydelse. CPH upptäckts vid besiktningen på slakteriet och finns rapporterad från flera länder och har periodvis varit ett stort problem i Norden. Under de senaste åren har man i Norge även isolerat CP från muskelmagar med skadad slemhinna.

Klostridios hos slaktkyckling är ett komplext problem.

Vad är känt om hur klostridios uppkommer?

C. perfringens (CP) är en sporbildande Gram-positiv bakterie som finns i kycklingarnas miljö och många kycklingar har varierande mängder CP i tarmkanalen, utan att de förorsakar någon skada.

När CP går in i en kraftig tillväxtfas startar en **exotoxin**-produktion av bl a alfa-toxin som förorsakar tarm- och leverskador och i kliniska fall en intoxication. Det är känt att patogeniteten, som främst är relaterad till bakteriens toxinproduktion, varierar mellan olika CP-stammar.

Vissa CP-stammar bildar **enterotoxin** när de vegetativa bakterierna sporulerar i tarmen. Dessa enterotoxiner framkallar matförgiftning hos människa och diarré hos hund och svin.

Förekomsten av enterotoxin producerande stammar är emellertid låg hos domesticerade djur. Patogenesen för klostridios hos slaktkyckling är således oklar och ytterligare kunskap behövs inom detta område för att kunna förebygga klostridios i dess olika former.

Graden av skador i tarm och lever vid klostridios beror troligen både på den stora tillväxten av CP och på vilka mängder toxiner av olika slag som bildas i tarmen/gallgångar. Studie av CPs olika egenskaper är därför grundläggande för att förstå patogenesen för klostridios.

Alternativ till tillväxtbefrämjande antibiotika och koccidiostatika

Klostridios har länge kontrollerats med foderantibiotika och jonofora koccidiostatika med antibiotisk effekt riktad mot grampositiva bakterier bl a CP och därför har relativt lite forskning bedrivits för att hitta alternativ till antibiotika.

Det finns nu anledning att intensifiera forskningen för att finna hållbara alternativ till såväl tillväxtbefrämjande antibiotika och koccidiostatika för att förebygga klostridios hos slaktkyckling.

De flesta forskningsgrupper har hittills studerat faktorer som predisponerar för utbrott av klostridios. I detta projekt har vi studerat bakterien *C. perfringens* och några egenskaper som kan ha betydelse för sjukdomens uppkomst.

De insamlade CP-isolaten har undersökts med avseende på sina genetiska och fenotypiska egenskaper. En studie av en flock under hela uppfödningen syftade till att se vilka subtyper av CP som förekommer under olika skeden av uppfödningen och i samband med skador i olika organ.

Material och metoder

Provtagning och bakteriologiska undersökningar

Prov togs från blindtarm, tunntarm och lever från både friska kycklingar och kycklingar med sjukliga förändringar från försök och fältet. Proven uttogs vid obduktion eller slakt av kycklingar. Proven odlades med avseende på CP. Proven odlas enligt standardrutiner. Typiska kolonier identifierades med hjälp av kolonitutseende och biokemiska tester. Stammar typade till CP sparades i -70° C.

Molekylärbiologisk typning

De sparade bakteriestammarna typades med flera olika molekylärbiologiska metoder. CP-stammar klassificeras i dag i fem olika toxintyper (A, B, C, D och E) baserat på vilka av de fyra exotoxinerna alfa, beta, epsilon och iota de producerar. Varje toxintyp korrelerar med en viss sjukdomsbild hos djur. Denna toxintypning har tidigare utförts med en neutralitetstest på möss.

Denna grundtypning utfördes med en multiplex PCR enligt Engström *et al.* (2003). Dessutom har vi använt ytterligare PCR-tester för detektion av ytterligare tre toxingener; beta2-toxin, enterotoxin beskrivna av Engström *et al.* (2003) och theta-toxin.

“Fingeravtrycksmetoden” PFGE (pulsfältgelelektrofores) utfördes enligt Engström *et al.* (2003) med hjälp av enzymet *SmaI*. Denna metod har vi också jämfört med AFLP (“amplified-fragment length polymorphism”), som också utfördes enligt Engström *et al.* (2003).

Jämförelse av CP-isolat från olika andra djurslag mm

Sparade CP-isolat från gris, häst, får och vilda djur, men även matförgiftningsfall på människa och slam från reningsverk undersöktes med PCR och PFGE för att jämföra dessa genetiskt och för att se om det fanns någon genetisk likhet mellan CP isolat som orsakar enteriska sjukdomar hos olika djur och matförgiftningsstammar (Johansson *et al.*, manus, 2006).

Överlevnad och stabilitet vid transport

För att studera hur CP överlever provhanteringen simulerades en transport med en känd mängd CP på bomullspinnar förvarade i tranporthylsor med Amies medium under olika lång tid och vid olika temperaturer. Vi valde en stam av toxintyp B som hade alla toxingener. Dessutom undersöktes med PCR om olika toxingener fanns kvar i provet efter transporten eller efter att de förvarats i vanlig luft på laboratoriebanken under olika lång tid. För undersökningen om hur stabil bakterien är i rumsmiljö användes även en av våra isolat med beta2-genen i en särskild studie för att se om även denna plasmidburna gen fanns kvar. Metoder enligt Johansson *et al.* (2005).

Sekvensering av beta2-genen

Beta2 toxin genen sekvenserades och sekvenserna jämfördes med tidigare deponerade sekvenser av genen i genbank enligt Johansson *et al.* (manus, 2006).

Jäsning av kolhydrater

Förmågan att jäsa olika kolhydrater kan vara en virulensfaktor. De flesta CP-isolat har samma jäsningsmönster. Man har emellertid tidigare visat att det med hjälp av 7 olika kolhydrater går att differentiera olika CP-isolat. Vi testade jäsningsförmågan hos CP-isolat enligt dessa tidigare studier.

Hemolysmönster hos olika CP isolat

Hemolysmönster hos olika isolat studerades med tre olika blodagarplattor med blod från häst, nöt och får. Både alfatoxin och flera “minor toxins”, främst theta toxinet har en hemolytisk effekt.

Antibiotikaresistens hos olika CP-isolat

Isolat från slaktkyckling från Sverige, Danmark och Norge studerades. Vi använde en buljongspädningsmetod för CP (Johansson *et al.*, 2004). Vi använde i denna studie mikrotiterplattor - VetMIC (VetMIC Ent_mo och VetMIC Ent), med 12 olika antibiotika inklusive koccidiostatikan narasin.

Detektion av toxiner som produceras av CP

Metoder för mätning av mängden alfa-toxin som olika CP-isolat producerar har beskrivits av flera, som använt indirekta ELISA tester. Vi testade ett kommersiellt ELISA-kit (Enterotoxaemia Elisa kit, Bio-X, Bruxelles, Belgium) för att se om den fungerar som en kvalitativ test av alfa toxin i CP kulturer. Rent alfatoxin användes för att göra standardkurva.

Studier i slaktkycklingbesättningar uppfödda utan koccidiostatika

I slaktkycklingbesättningar där försök görs med uppfödning utan jonofor koccidiostatika togs prov från kycklingar med och utan tecken på klostridios och från kycklingarnas omgivning. Prov togs även vid slakt. En första pilotundersökning utfördes i Skåne 2002. En större fältstudie, med slaktkycklingar som föds upp utan koccidiostatika, genomfördes i samarbete med Magne Kaldhusdal, Veterinærinstituttet i Oslo. Det var en epidemiologisk studie med typning av *C. perfringens* isolerade från miljön (foder, inredning, strö, foder, vatten), den daggamla kycklingen och från kycklingar som togs ut slumpvis en gång per vecka under

uppfödningen. Varje vecka avlivades tio kycklingar, obducerades och prov togs från blindtarm och de organ som hade sjukliga förändringar (muskelmage och tunntarm). Prov togs också från kycklingar med lever- eller tarmskador när de slaktades. Tre flockar följdes på detta sätt. CP isolerades antingen på SVA eller Veterinärinstitutet och sparades på SVA i avvaktan på toxintypning och PFGE-analys. Isolaten relaterades till de patologianatomiska förändringar som konstaterats i varje organ som isolaten härstammat från. Tre isolat sparades från varje odling.

Resultat och diskussion

Insamling av prover och isolering av *C. perfringens*

Prov anlände från olika gårdar och slakterier för isolering av CP från vitt skilda typer av fjäderfä och klinisk bakgrund.

Från våra nordiska grannländer Norge och Danmark har vi fått isolat för jämförande studier. SVA sparar även isolat av CP från andra djurslag.

Molekylärbiologisk typning – PCR, sekvensering av gener

Utveckling av PCR för exotoxinerna alfa-, beta-, beta2-, epsilon-, iota-toxiner enterotoxingenen utfördes under projektets början och publicerades: Engström *et al.*, (2003). Alla undersökta isolat tillhörde toxintyp A, men två av dem hade också genen för **beta2**-toxinet, vilket är första gången som detta setts i isolat från kyckling. **Enterotoxin**-genen detekterades **inte** hos något av isolaten, det var i enlighet med tidigare studier där man sett en låg prevalens av enterotoxin-genen hos djur. Ingen av isolaten kunde således tillverka enterotoxin, vilket innebär att de inte förorsakar denna typ av matförgiftning hos människa. En PCR utvecklades även för **theta**-toxingenen eftersom även detta toxin rapporterats vara sjukdomsframkallande. Testen fungerar bra och alla 60 isolat från både friska och sjuka kycklingar som undersöktes bar på genen. Därför gjordes inga fler tester.

Multiplex PCR har sedan använts för att undersöka en rad nya isolat från utbrott av NE från södra Sverige, Norge och Danmark. Alla isolat har varit av toxin-typ A. I dessa studier hade ytterligare 4 svenska, 2 norska och 5 danska isolat dessutom **beta2**-toxin genen (ej publicerade resultat). Eftersom beta2-toxin genen trots allt är så pass sällsynt hos isolaten från kyckling så tror vi inte att denna egenskap har så stor betydelse för utveckling av sjukdom hos kycklingar jämfört med tex svin.

För att jämföra kycklingisolat med just beta2-genen med isolat från andra djurslag och bli en matförgiftningsfall från Tierp, gjordes en studie med sekvensering av beta2-genen (Johansson *et al.*, manus 2006). Dessa sekvensanalyser av beta2 toxin genen delade in de svenska isolaten i tre olika grupper; grisisolat, isolat från övriga djur och isolat från matförgiftningsfall.

Jämförelse av svenska sekvenser med deponerade sekvenser i genbank visade att det fanns två olika evolutionära grupper av denna toxingen. Kycklingisolaten hamnar i en grupp med isolat som tidigare har visat sig vara oförmögna att uttrycka beta2 toxinet (Vilei, *et al.* 2005).

Detta faktum, tillsammans med att det är så sällsynt med beta2-gener hos isolat isolerade från sjuka kycklingar, indikerar att de svenska kycklingstammarna med beta2 toxin-genen troligtvis inte heller kan uttrycka toxinet dvs. producera toxinet.

Alfatoxinet torde vara det toxin som ensamt eller tillsammans med theta-toxinet förorsakar sjukdom hos kyckling.

PFGE (Puls-fält-gel-elektrofores) isolat från olika besättningar

De båda metoderna PFGE och AFLP utvecklades och jämfördes i första studien (Engström *et al.*, 2003). Den visar att dessa två metoder är jämbördiga. PFGE valdes för fortsatta studier. Studien visade att CP-isolaten kunde uppdelas i ett stort antal subtyper. Isolaten från fall av NE och leverskador hos slaktkyckling tillhörde samma genetiska subtyp om de kom från samma flock. Däremot isolerades oftast CP av olika subtyp från de olika flockarna.

Från friska försökskycklingar som fötts upp utan koccidiostatika isolerades däremot flera olika subtyper av CP från samma kyckling och även från samma organ.

En dansk studie av isolat av CP från slaktkyckling visade också en stor genetisk variation på samma sätt. De påvisade 44 olika subtyper med PFGE (Nauerby, 2003). När vi jämförde 20 danska isolat tillhörande 20 olika subtyper med alla våra isolat (14 subtyper) så visade det sig att endast ett danskt isolat tillhörde en subtyp som vi också funnit i Sverige (ej publicerade resultat). I Belgien har man nyligen gjort en liknande studier med PFGE (Gholamiandekhordi *et al.* 2005). Även där såg man stor diversitet hos CP-isolat mellan olika slaktkycklingflockar medan varje sjuk flock hade samma klon även om antalet undersökta bakterie var litet i varje flock. Även i Belgien sågs olika subtyper i de friska flockarna, men de hade bara två isolat per flock.

Man kan drar en gemensam slutsats från dessa tre studier: Det finns en mycket stor genetisk variation hos denna bakterie i friska flockar, men även mellan sjuka flockar. Däremot sågs oftast samma subtyp i flera sjuka kycklingar i samma besättning.

Fenotypiska undersökningar

Flera fenotyptester har utvärderats:

- ❖ **Hemolysutseende** på olika blodagarplattor. Dessa har varierat i form av utbredning och intensitet mellan olika isolat. Fårblodplattor gav bäst resultat. Vi ansåg emellertid att det inte fanns någon skillnad mellan isolat av olika genotyper och gjorde ingen större undersökning med denna metod.
- ❖ **Jäsningsmönster** för olika kolhydrater. CP-isolaten hade varierande förmåga att jäsa en av de testade sockerarterna (sorbitol). Vi bedömde emellertid att detta inte hade någon praktisk nytta vid typning. (Bilaga 3, 2002)
- ❖ **Toxinproduktion:** Försök gjordes för att utveckla en metod (ELISA) för att mäta olika CP-isolats förmåga att producera toxiner. Vi lyckades inte få tillförlitliga resultat med denna test trots flera försök. En Belgisk studie visade med samma teknik som vi prövat att det i den inte fanns någon skillnad i alfatoxinproduktion in vitro mellan CP-isolat från sjuka och friska kycklingar (Gholamiandekhordi *et al.* 2005). Hofshagen och Stenwig (1992) fann däremot, med äldre teknik, att bakteriens toxinproduktion varierar mellan olika CP-stammar beroende på om de härrörde från friska eller sjuka fåglar. Den belgiska studien var inte helt övertygande och annan teknik behövs troligen för att få fullt tillförlitliga resultat. Sådan studie rymdes inte i detta projekt.

En test utvecklades och en studie genomfördes:

Antibiotikaresistens: Studien av antibiotikaresistens mot 12 olika antibiotikum inklusive narasin, det mest använda jonofora koccidiostatik i Sverige. Femtioåtta olika svenska *C. perfringens*-isolat har jämförts med tjugofyra norska och tjugo danska isolat. Resultatet visade att alla isolaten var känsliga för narasin och flera andra användbara antibiotikum utom tetracyklin. Resistens gentemot tetracyklin varierade mycket mellan de tre länderna; Sverige (76%), Danmark (10%) and Norge (29%). Dessa skillnader i antibiotikaresistens kan inte kopplas till förbrukningen av tetracyklin, eftersom Sverige inte använt mer tetracyklin än Norge och Danmark.

I 80% av de tetracyklinresistenta isolaten, detekterades de två generna *tetA(P)* and *tetB(P)* medans i 20% av isolaten hittades bara *tetA(P)* genen. Tetracyklin resistens genen *tetM* vilken är vanligt förekommande i andra bakterier återfanns inte i någon av de resistenta isolaten (Johansson *et al.*, 2004).

En belgisk studie (Martel *et al.*, 2004) av CP isolerade från fjäderfå visade liknade resultat; alla testade jonofora koccidiostatika hade god effekt mot belgiska kycklingisolat.

Under 2005 inträffade en rad utbrott med NE i södra Sverige. Resistensundersökning gjordes på flera isolat men alla var känsliga för narasin, vilket visar att det inte var resistens mot koccidiostatikan som var orsaken till utbrotten.

Trots lång tids användning av narasin så har den fortfarande god effekt mot CP.

C. perfringens stabilitet och överlevnad:

En studie med **simulering av transport av prover** till laboratoriet under olika temperaturer och tider. Överlevnaden var lika god i rumstemperatur som i kylskåp. Många har antytt att plasmidgener försvinner på väg till laboratoriet eller i aerob miljö på laboratoriet. Därför undersöktes om de plasmidburna toxingenerna beta, epsilon och iota samt beta2, fanns kvar efter förvaring i rumstemperatur i vanlig rumsluft. Med PCR kunde vi återfinna alla toxingener- de var oväntat stabila (Johansson *et al.* 2005).

Det innebär att vi kan lita på att toxintypningen är korrekt; inga toxingener försvinner på vägen till laboratoriet.

Studie i slaktkycklingflockar uppfödda utan koccidiostatika med PFGE

En förstudie gjordes i Skåne i ett försök utan koccidiostatika. Där sågs för första gången subklinisk NE i Sverige och isolat från denna kyckling kunde jämföras med dem från den stora Norska studien.

I Norge isolerades CP för denna studie från tre gårdar (tabell 1) och gård B valdes ut för vidare PFGE-undersökning eftersom det inträffade även klinisk NE på den gården och flest fall av subklinisk NE och leverskador vid slakten.

Tabell1. Tre fältförsök i Norge med uppfödning av slaktkyckling utan koccidiostatika

Försök	Miljöisolat innan kycklingar sattes in	Isolat NVI från obducerade kycklingar	Slaktisolat	Totalt
1. A	41	38	11	90
2. B	41	112	16	169
3. C	32	71	20	123
Summa	114	221	47	382

Laboratorietesterna blev kraftigt fördröjda på grund av olika tekniska problem på laboratoriet, vilket gör att resultaten inte ännu bearbetas till manus. De flesta testerna är nu klara. Något manus har inte hunnit göras varför diskussionen här tyvärr blir summarisk.

Representativa isolat typades med PFGE för att se om någon speciell subtyp återfanns under uppfödningen. Resultatet av analysen av proven från kyckling med subklinisk NE, muskelmageskador och två kycklingar, som kom in döda och slaktprov ses i tabell 2. Ingen NE sågs före 23 dagars ålder. Flertalet kycklingar hade enbart subklinisk NE eller muskelmageskador eller både och. Prov togs också från blindtarmen.

Det visade sig vara en stor genetisk variation hos isolat från olika kycklingar vid olika åldrar i denna flock. Tre isolat testades från varje odling och många gånger sågs flera olika subtyper från samma prov. Någon kyckling hade samma subtyp i både tunntarm och blindtarm (H), andra hade många olika subtyper (ex J). De självdöda med tarm- respektive leverskada hade var sin subtyp i olika organ. Flera subtyper var vanligare och återkom flera gånger och även vid slakt (10, 23) och en (23) återfanns i tarmen hos en självdöd kyckling med NE. Tabell 2 Resultat PFGE av tre isolat från samma prov.

Endast muskelmageskador

Individ	Ålder (dagar)	Organ*	PFGE typer
A	6	M	18, 17, 18

A	6	B	17, 17, 17
B	6	B	1, 1,
C	14	M	19, 19, 19
C	14	B	6, 17, 17
D	30	M	23, 23, 23
D	30	B	24, 24, 24

Subklinisk NE

Slakteriprov

Individ	Ålder (dagar)	Organ*	PFGE typer	Prov	PFGE typ	Organ*
E	23	T	8, 8, 8	1	4	L
E	23	M	1,3,7	2	11	L
F	30	T	10, 10, 15	3	10	L
F	30	M	15,16	4	10	L
F	30	B	10, 10, 10	5	10	L
G	30	T	5, 21, 22	6	23	L
G	30	B	18, 21, 21	7	12	T
H	30	T	10, 10, 10	8	14	T
H	30	B	10, 10,10	9	23	T
I	30	T	13, 13, 13			
J	30	T	23, 24, 25			
J	30	B	7, 23, 23			
J	30	M	1, 20, 20			

Klinisk sjuka med NE / CPH

Individ	Ålder (dagar)	Organ*	PFGE typer
K	30	T	23,23,23
K	30	B	24,24,24,
L	30	L	9,9,9,

*M = muskelmage, T = tunntarm, L = lever

Eftersom kycklingarna med subklinisk NE avlivades vid provtagningen vet vi inte om de skulle ha utvecklat klinisk sjukdom senare i livet. I många flockar ses subklinisk NE utan kliniska utbrott men det är omöjligt att säga om någon speciell subtyp av CP ger allvarligare skador i denna studie.

Vår tidigare studie (Engström *et al.*, 2003) liksom den danska (Nauerby, 2003) och belgiska (Gholamiandekhordi *et al.*, 2005) visade att en eller två subtyper isolerats från kycklingar som dött av NE vid sjukdomsutbrott i en flock. Då hade bara enstaka isolat undersökts och flockarna hade fått jonofor koccidiostatika. Här undersöktes många isolat och ett stort antal individer under hela uppfödningen, vilket ger en mer fullständig bild av klostridiepopulationen. Denna genetiska variation vid subklinisk infektion liknade mer den vi såg hos friska kycklingar (Engström, *et al.*, 2003) även om variationen var mindre. När analysen av miljöproven innan insättningen, prov från kycklingar innan insättning och ströprov från nästa insättning är klara kommer en publikation med jämförelse av dessa isolat och dem i kyckling.

Resultatförmedling

Publikationer

1. Engström, B.E., Fermér, C., Lindberg, A., Saarinen, E., Båverud, V. and Gunnarsson, A., (2003). Molecular typing of isolates of *Clostridium perfringens* from healthy and diseased poultry. *Veterinary Microbiology* 94:225-235.
2. Johansson, A., Greko, C., Engström, B.E. and Karlsson, M., (2004). Antibiotic susceptibility of Swedish isolates of *Clostridium perfringens* from poultry, and distribution of tetracycline resistance genes. *Veterinary Microbiology* 99:251-247.
3. Johansson, A., Engström, B.E., Frey, J., Johansson, K-E. and Båverud, V., (2005). Survival of *Clostridium perfringens* during simulated transport and stability of some plasmid-borne toxin genes under aerobic conditions. *Acta Veterinaria Scandinavia*. 46:241-247.

Artiklar ännu ej publicerade

4. Johansson, A., Aspan, A., Bagge, E., Engström, B.E. & Johansson, K.-E. Genetic diversity of *Clostridium perfringens* type A isolates from different sources. Manus 2006.
5. Johansson, A., Aspan, A., Kaldhusdal, M., Johansson, K-E. & Engström, B.E. Clonal relationship of *C. perfringens* isolated from broilers affected by subclinical or clinical necrotic enteritis. (manus mars 2006)

Material finns även för ännu en artikel där isolaten från miljön jämförs med dem från kycklingarna för att se om smittkällan kan identifieras.

Föredrag eller poster

- XII Congress of the World Poultry Veterinary Association in Cairo 2002. (Genetisk typning av *Clostridium perfringens*) bilaga 1
- Concerted action Genus Clostridium, meeting in Liège, jan 2002. (Föreläsning om klostridios hos fjäderfä, bilaga 2)
- Concerted action Genus Clostridium, meeting in Salisbury, nov 2002. (presentation av arbete med jäsning av olika kolhydrater) bilaga 3
- Concerted action Genus Clostridium, meeting in Parma okt 2003 (presentation av antibiotikaresistensstudien och provtransportstudien) bilaga 4 och 5
- Nordiska forskarmöten under temat alternativ till foderantibiotika i kyckling och svinuppfödning (AFAC):
 - Uppsala: september 2000 – presentationer från olika grupper och externa specialister.
 - Uppsala: april 2001 – diskussion om framtida forskningsarbete mellan Sverige, Norge och Danmark
 - Oslo: oktober 2001- presentationer från olika grupper och externa specialister.
 - Forskarkurs i Foulum, Danmark 2002 – laboratoriekurs och presentationer från olika grupper och externa specialister.
 - Århus september 2004 – presentation av resultaten från projektet..
- Presentation av projektet vid miniseminarium hos SLF oktober 2001
- Presentation av projektet vid Svensk Fågels stämma i Nässjö april 2004

Referenser

På grund av brist på utrymme utelämnas externa referenser som fanns i projektplanen i avsnitten bakgrund och material och metoder. Här finns referenser från avsnittet resultat och diskussion

Gholamiandekhordi, A. R., Ducatelle, R., Heyndrickx, M., Haesebrouck, F. and van Immerseel, F. (2005). Molecular and phenotypical characterisation of *Clostridium*

perfringens isolates from poultry flocks with different disease status. *Vet. Microbiol.* (accepted)

Hofshagen, M. and Stenwig, H. (1992). Toxin production by *Clostridium perfringens* isolated from broiler chickens and capercailliers (*Tetrao urogallus*) with and without necrotizing enteritis. *Av. Dis.* 36: 837-843.

Nauerby, B., Pedersen, K. and Madsen, M. (2003). Analysis by pulsed field gel electrophoresis of the genetic diversity among *Clostridium perfringens* isolates from chickens. *Vet. Microbiol.*, 94:257-266.

Martel, A., Devriese, A., Cauwerts, K., De Gussem, K., Decostere, A. And Haesebrouck, F., (2004) Susceptibility of *Clostridium perfringens* strains from broiler chickens to antibiotics and anticoccidials. *Av. Path.*, 33 3-7.

Tschirdewahn, B Notermans S, Wernars K Untermann, F. (1991): The presence of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains in faeces of various animals. *Int J Food Microbiol.*, 14:175-8.

Vilei, E.M., Schlatter, Y., Perreten, V., Straub, R., Popoff, M.R., Gibert, M., Grone, A. and Frey, J., (2005) Antibiotic-induced expression of a cryptic *cpb2* gene in equine beta2-toxigenic *Clostridium perfringens*. *Mol Microbiol.*, 57:1570-81.