

Campylobacter hos slaktkyckling. Utveckling av diagnostik, studier av kontamination och spridningsvägar samt identifiering av virulenta stammar.

BAKGRUND

Campylobacter är den vanligaste orsaken till bakteriellt betingad magtarmsjukdom hos människa i Sverige. Campylobacter-infektion är anmälningspliktig enligt smittskyddslagen. Det årliga antalet fall med Campylobacter ökade under 1990-talet fram till 2001, då totalt cirka 8500 fall rapporterades. Sedan dess har omkring 7000 fall rapporterats årligen, varav 30-40% smittats i landet (www.smittskyddsinstitutet.se). Minst 90 % av alla fallen är infekterade med *C. jejuni*, men även *C. coli*, och andra s.k. termofila Campylobacter-arter kan orsaka sjukdom hos människa. Infektion med Campylobacter är en zoonos, dvs kan på naturlig väg överföras mellan djur och människa. Kyckling och kycklingprodukter anses utgöra en viktig smittkälla men människa kan även smittas av opastöriserad mjölk, kontaminerat vatten eller genom direkt kontakt med djur (1, 17).

Ett femårigt övervakningsprogram för Campylobacter hos slaktkyckling, finansierat av Svensk Fågel AB och Statens Jordbruksverk (delvis via EU-medel) startades 1 juli, 2001 (Swedish surveillance programme for Campylobacter in broilers). Detta program ersatte ett tidigare program som Svensk Fågel AB bedrivit sen 1991. Det nya programmet har varit mer provtagningsintensivt samtidigt som vissa förändringar gjorts vad gäller rutiner för transport, provhantering och analysteknik. Från varje slaktgrupp togs i det nya programmet även halsskinnsprov. Under det första halvåret med det nya programmet erhöles en högre prevalens positiva slaktgrupper, baserat på kloakprover, jämfört med i föregående program. Resultat visade också att slaktgrupper kunde vara mer eller mindre ”genominfekterade”, dvs alla fåglar var inte positiva vid slakt, något som man enligt tidigare undersökningar ansett vara regel. Analys av prover från halsskinn som togs i det nya programmet, visade att 27% av slaktgrupperna hade positiva halsskinn under perioden juli – december, 2001. Resultat som erhöles från det nya Campylobacter-programmet visade på behovet att djupare analysera epidemiologin kring Campylobacter i slaktkycklingproduktionen.

Traditionellt används odlingsmetoder med selektiva substrat för att påvisa och identifiera Campylobacter. Både detektion och karaktärisering är komplicerade på grund av bakteriens speciella tillväxtkrav (13). Med gängse använd NMKL-metod (14) tar det minst tre dygn för att påvisa Campylobacter i ett kliniskt prov. Odlingarna är också utrymmes och arbetskrävande, och kräver inkubering i mikroaerofil miljö. Med tanke på den stora mängd prover som tas inom ramen för Campylobacterprogrammet, skulle det vara en fördel med en mer automatiserad och snabbare process. På senare år har molekylära eller DNA-baserade tekniker utvecklats för artidentifiering (4) och karaktärisering under artnivå, s.k. subtypning (eller fingerprinting), vilket är nödvändigt för att man ska kunna spåra smittkällor och följa smittvägar. För subtypning under artnivå har makrorestriktionsprofilering med hjälp av pulsfält-gel-elektrofores (PFGE) blivit något av en ”golden standard” (15). Detektion av Campylobacter med hjälp av PCR har visat sig mer komplicerat, bl.a. beroende på problemet med att preparera fram DNA från faeces och kloakprover. Men sannolikt blir s.k. realtids-PCR den metod som kommer att användas framöver (12).

Man har påvisat flera egenskaper, s.k. virulensfaktorer, hos Campylobacter som anses eller misstänks vara involverade i sjukdomsprocessen. Det råder dock oenighet om vilka faktorer som egentligen är nödvändiga för att orsaka sjukdom hos människa (18). Det är också oklart om alla stammar av *C. jejuni*, (som är den Campylobacter-art man oftast finner hos patienter) har dessa egenskaper eller om det bara är speciella typer eller kloner som kan etablera sig hos

människa och ge upphov till sjukdom. För att öka kunskapen om vilken betydelse *Campylobacter* från olika ursprung har som smittkälla till människa, behöver man subtypa och virulensstypa *Campylobacter*-stammar av olika ursprung, t.ex. från kyckling, och jämföra med patientisolat.

Som titeln på detta *Campylobacter*-projektet anger, spänner det över flera områden med syfte att både utreda faktorer bakom kolonisation och kontamination av slaktkyckling och spridningsvägar för *Campylobacter*, samt genetisk karaktärisering och diagnostikutveckling. I ansökan delades projektet upp i fem delstudier (A – E), och resultatredovisningen följer denna uppdelning.

Projektet har varit knutet till *Campylobacter*programmet. Inom ramen för programmet (alltså ej finansierat av SLF) har vissa delstudier gjorts som kompletterat SLF-projektet. Även andra finansiärer, t.ex. Ivar och Elsa Sandbergs stipendiefond, har bidragit till vissa delar av projektet. Delar av projektet ingår i Ingrid Hanssons doktorandprojekt. Ingrid Hansson är veterinär vid Avdelningen för Bakteriologi, SVA, och ansvarig för organisation och analys av proverna i *Campylobacter*programmet.

MATERIAL OCH METODER

Epidemiologiska analyser

Omkring 130 slaktkycklinguppfödare är medlemmar i Svensk Fågel AB. Dessa producerar årligen mellan 3000 och 4000 slaktgrupper som har provtagits inom det nya *Campylobacter*programmet.

Uppfödarbesök och enkätundersökning.

En person (Ingrid Hansson) besökte 37 uppfödare för enkätundersökningen under 2004-2005. Uppfödarna var utvalda med hänsyn till att få en geografisk spridning och även spridning över olika slakterier. Ett specialutformat frågeformulär användes (Bilaga 1) för att jämföra förhållanden hos uppfödare som aldrig, respektive ofta, levererar *Campylobacter*positiva flockar och med syfte att utreda riskfaktorer för att en flock ska bli *Campylobacter*-positiv. Baserat på hur stor andel *Campylobacter*-positiva slaktgrupper som levererats under 3-årsperioden 1 juli 2001 – 30 juni 2004, fördelades uppfödarna på tre kategorier:
”sällan eller aldrig”, dvs <10% av levererade slaktgrupper hade varit positiva, n = 15
”ibland”, dvs 10-30% av levererade slaktgrupper hade varit positiva, n = 8
”ofta”, dvs > 30% av levererade slaktgrupper hade varit positiva, n = 14

I enkäten ingick frågor som rör typ av strömmaterial, ventilationens placering, användning av sprinkler, antal dörrar mellan utomhus och kycklingarna, etc. Vidare ingick frågor av bedömningskaraktär såsom risk vid hantering av döda kycklingar, återkontaminering av gödsel och allmän ordning på gården, mm (Bilaga 1).

Laboratorieanalyser

Prover

I *Campylobacter*programmet togs rutinmässigt kloakprover och halsskinnsprover vid slakt, samt en del andra prover, t.ex. miljöprover, sockprover och prover från transportlådor. Metoder för provtagning, provtransport och laboratorieanalys har beskrivits ingående i programmet samt i två artiklar som har publicerats (5, 6).

Detektion och identifiering av Campylobacter

Odlingsmetod och fenotypisk identifiering

För prover inom ramen för Campylobacterprogrammet, användes rutinmässigt den av Nordisk Metodik Kommitte för Livsmedel (NMKL) beskrivna odlingsmetoden (14), och traditionell fenotypning för identifiering (13).

Genotypisk identifiering

För artidentifiering av stammar som undersöktes inom ramen för SLF-projektet användes en s.k. PCR/REA metod som både identifierar och differentierar mellan de termofila Campylobacter-arterna (4).

Realtids-PCR

En publicerad metod som utvecklats i Danmark (12), modifierades och anpassades till befintlig utrustning för att utvärdera om den är lämplig att använda för detektion av Campylobacter i kloakprover. Totalt analyserades 396 poolade kloakprover från Campylobacterprogrammet under 2004 och 2005. DNA extraherades från kloakproverna med hjälp av en robot (BioRobot EZ1). I PCR reaktionen tillsattes reaktionsmix, två primers för amplifiering av Campylobacter-DNA och en "fluorescensprob", som binder till det amplifierade gensegmentet och som leder till en ljussignal vid viss våglängd. PCR-reaktionen utfördes i en Rotor-Gene 3000™ kopplad till en dator för bearbetning av analysresultat med programmet Software version Rotorgene 5.0. Vid realtids-PCR kan reaktionsförloppet följas i realtid på dataskärmen. I positiva prover, dvs där det finns Campylobacter-DNA, sker snabbt en amplifiering vilken ger upphov till en fluorescenssignal efter några amplifieringscykler. Detta ses på skärmen som en kurva som växer fram och hos positiva prover når ett tröskelvärde vid ett visst s.k. Ct-värde (t.ex. vid Ct = 35). Negativa prover ger ingen signal alls eller kan ge signal väldigt sent, t.ex. efter 37-40 cykler. Alla prover analyseras i duplikat.

Genotypisk karaktärisering, subtypning

Makrorestriktionsprofilering med pulsfält-gel elektrofores, PFGE:

Den av EU-nätverket "Campynet" standardiserade metoden för PFGE av SmaI-klyvda stammar användes (<http://campynet.vetinst.dk>). Bearbetning och analys av PFGE data gjordes med hjälp av GelComparII (6, 10)

SmaI – PFGE databas för identifiering av vanligt förekommande Campylobacter jejuni subtyper

Urval av stammar: ett Campylobacter-isolat per varannan positiv flock under februari, maj, augusti och november år 2002 och 2003 valdes ut för subtypning. Urvalsförfarandet innebar att Campylobacterisolat kom från provtagningar vid alla slakterier och från kycklingar från mer än 80% av alla producenter som levererat positiva slaktgrupper under de aktuella perioderna. Totalt 206 isolat testades, varav 197 (96%) identifierades som C. jejuni, resterande var C. coli. Makrorestriktionsprofilering utfördes enligt ovan med SmaI enzym samt i vissa fall med ytterligare ett enzym, KpnI.

RESULTAT

A. Fördjupad epidemiologisk analys av faktorer av betydelse för att en flock är infekterad med Campylobacter.

Analys av resultat och erfarenheter från det första årets provtagning inom det nya Campylobacterprogrammet har publicerats (5).

En sammanställning över provresultat från Campylobacterprogrammet 2001-2005 ses i nedanstående tabell

År	Antal slaktgrupper	Positiva slaktgrupper		Slaktgrupper med enbart positiva halsskinn (kloakprov neg)
		Kloak	Halsskinn	
2001 (obs 6 mån)	2140	23%	27%	9%
2002	3842	20%	24%	7%
2003	3224	18%	21%	6%
2004	3019	14%	19%	7%
2005	2975	13%	18%	6%

Resultaten från provtagning inom Campylobacterprogrammet ligger delvis till grund för utformning av de olika delstudierna i projektet, bl.a. för utformning av enkätundersökningen.

Uppfödarbesök och enkätundersökning.

Resultaten som redovisas här är preliminära, då endast delar av de frågor som ingick i enkäten redovisas. En djupare analys och noggrann granskning av resultaten ska göras för att kunna göra riktiga tolkningar. De 37 uppfödarna som besöktes bor i 7 olika län och levererar kycklingar till de 5 största slakterierna i Sverige. Antalet hus hos uppfödarna varierade mellan 1 och 9. Preliminära resultat tyder på att uppfödare som sällan eller aldrig levererade Campylobacter-positiva slaktgrupper hade:

- Färre antal kycklinghus
- Oftare hus belägna i skogsbygd
- Längre avstånd till andra animalieproducerande djur
- Oftare singel på gårdsplanen
- Oftare luftintag via skullen
- Fler antal dörrar mellan kycklingstall och utomhus
- Bättre fungerande hygienbarriärer
- Bedömdes oftare ha en god allmän ordning

Preliminärt tycks andra faktorer vara av mindre betydelse, t.ex. hur många personer som sköter djuren, antal dagar som stallet är tomt mellan två kycklingomgångar, strömmaterial, hur länge uppfödaren har producerat kycklingar och om skötaren är man eller kvinna.

B. Hur Campylobacter introduceras i en flock före slakt är till stor del okänt.

I det nya Campylobacterprogrammet har slaktgrupper påvisats där endast 1 eller 2 av de fyra poolade kloakproverna är positiva, vilket tyder på att inte alla kycklingarna är infekterade i slaktgruppen. För att utreda om kycklingarna kunde bli kontaminerade under transport till slakteri provtogs rengjorda och desinfekterade transportlådor vid två slakterier under september-oktober 2002. Samtidigt togs prov på stall före transport av de kycklingar som skulle fraktas i de aktuella lådorna. I 69 av de 122 (57%) provtagna partierna av transportlådor påvisades Campylobacter. Stor skillnad påvisades mellan slakterierna, vid det ena slakteriet var 28% och vid det andra var 85% av provtagna partier med transportlådor positiva. Resultat av provtagning av kycklingarna före transport jämfördes med den gängse slakteriprovtagningen. Tjugosex slaktgrupper, med negativa kloakprover vid provtagning före transport, fraktades i lådor där Campylobacter påvisats. Hos 11 av dessa 26 slaktgrupper

(42%) kunde *Campylobacter* påvisas vid slakteriprovtagningen. Med subtypning kunde i 4 av de 11 fallen samma SmaI profil påvisas hos *Campylobacter* från transportlådor och från slakteriprovtagningen. Fyra av 27 (15%) slaktgrupper, negativa före transport och transporterade i negativa lådor, var positiva vid slakteriprovtagningen. *Campylobacter*-positiva transportlådor bedömdes vara en riskfaktor för att slaktgrupper skulle vara positiva vid slakt (relativ risk (RR) = 2,9, 95% CI 1,1 – 7,3, P = 0,03). Studien har publicerats (6). Den var delvis finansierad med medel från Ivar och Elsa Sandbergs stipendiefond.

C. Kontamination på slakteri, ett problem med konsekvenser för konsumenter.

Slaktgrupper som har negativa kloakprover men positiva halsskinnsprover, bedöms vara kontaminerade på slakteriet. Subtypning med PFGE kunde i några fall styrka misstanken om kontaminering från föregående positiv slaktgrupp genom att påvisa samma subtyp hos den positiva slaktgruppen som hos den efterföljande kloakprovsnegativa gruppen. Kontamination av slaktkroppar med *Campylobacter* från tarmen (från den ”egna” slaktgruppen) sker också och i en gemensam studie med Livsmedelsverket (SLV) studerades om och hur länge *Campylobacter* överlevde längs slaktprocessen inklusive kylning med olika system samt om samma subtyp kunde påvisas i kloak, halsskinn och på slaktkroppar. Studien visade att ju fler av de fyra kloakproven som var positiva, desto större mängd *Campylobacter* kunde påvisas i sköljproven av slaktkroppar som var uttagna efter slakt (9). Resultat av subtypning tyder på att det i hög grad är samma subtyper som finns i kloakproverna som på slaktkroppen. Men från halsskinnsprover liksom slaktkroppar erhöles ibland unika subtyper som inte överensstämde med kloakproverna (11). Den sistnämnda studien finansierades främst med medel från ÄK-Livs, Nordiska Ministerrådet.

D. Framtagande av ny laboratoriemetodik, realtids-PCR, för snabbare, säkrare och billigare diagnostik.

Resultaten från denna delstudie är preliminära och kommer att bearbetas ytterligare för publicering. Efter de inledande testerna bestämdes preliminärt att gränsvärde för positivt prov skulle ligga på Ct-värdet 35. Gränsen för detektion av *Campylobacter* i ren suspension (metodens känslighet), motsvarade 5 bakterier i PCR-reaktionen. Specificitetstest med olika *Campylobacter*-arter visade att de termofila *Campylobacter*erna *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, *C. helveticus*, samt *C. hyointestinalis* gav positiva resultat. Hög koncentration av *C. mucosalis* och *Arcobacter* species gav också resultat som kan tolkas som positiva. Från *Campylobacter*programmet testades 396 kloakprover, varav 137 var odlingspositiva och 259 odlingsnegativa. 127 av de 137 odlingspositiva (93 %) gav klart positiva Ct-värden, två var helt negativa och 8 gav Ct-värden som låg på gränsen till vad som ansågs positivt eller de två rören gav motstridiga värden. Av de 259 odlingsnegativa, var 256 realtids-PCR negativa (99 %), och tre var positiva.

E. Användning av subtypning med modern molekylärgenetisk teknik för att spåra spridning av *Campylobacter* till kyckling och människa.

Subtypning genom makrorestriktionsprofilering med PFGE gjordes av många isolat i de olika delstudierna. En konsekvent användning av det standardiserade Campynet-protokollet möjliggjorde jämförelse av resultat från olika studier, även mellan olika laboratorier.

En databas upprättades för SmaI- PFGE-subtyper som förekommer i kloakprover från *Campylobacter*programmet. Subtyning av de 197 *C. jejuni* isolaten resulterade i 66 olika SmaI-profiler. Mer än hälften, 108/197 (55%), hörde till någon av 10 subtyper (SmaI 1 – SmaI 10) som benämndes vanliga subtyper. Kriteriet som sattes upp för att en subtyp skulle kallas vanlig, var att minst 5 isolat skulle ha identiskt bandmönster. Hur de 108 isolaten fördelade

sig på subtyper, hur många olika slakterier och djurägare de kom från och under vilka tidsperioder de isolerats, visas i nedanstående tabell:

SmaI subtyp	Antal isolat	Från slakteri (antal)	Från uppfödare (antal)	Tids-period/er
typ 1	8	1	4	nov 2002
typ 2	29	4	17	aug 2002; feb, maj, aug 2003
typ 3	5	2	3	maj, aug 2002
typ 4	5	2	2	nov 2002
typ 5	8	4	7	maj, aug, nov 2002; aug 2003
typ 6	5	2	4	aug 2003
typ 7	7	3	4	aug 2002; nov 2003
typ 8	7	2	4	aug 2003
typ 9	17	1	4	feb, maj, aug 2002
typ 10	17	5	11	aug, nov 2002; aug, nov 2003

Klyvning med ytterligare ett restriktionsenzym, KpnI, visade att SmaI typ 1, typ 7, typ 8 och typ 9 fortfarande gav identiska bandmönster vilket tyder på att dessa subtyper är klonala. De sex andra SmaI-typerna gav vid KpnI-klyvning upphov till 2 eller flera bandmönster, vilket tyder på att dessa bestod av två eller flera subtyper eller kloner av *C. jejuni*.

Jämförelse med patientisolat från människor som smittats i Sverige, visade att de i kloakprover vanligt förekommande SmaI-typerna 2, 5, 6 och 8 överensstämde med de som ofta ses hos patientisolat (10). Resultaten har presenterats vid en konferens (www.medvetnet.org) och kommer även att publiceras i en artikel.

DISKUSSION

Under det föregående programmet för *Campylobacter* hos slaktkyckling minskade den årliga prevalensen *Campylobacter*-positiva slaktgrupper till cirka 10% i slutet av 90-talet. Någon motsvarande minskning av antalet inhemska humanfall sågs däremot inte, tvärtom sågs en viss ökning under motsvarande period. Mot denna bakgrund utformades det nya programmet med syfte att genom ökad kunskap om *Campylobacter*epidemiologin kunna vidta åtgärder för att ytterligare minska förekomsten av *Campylobacter* hos slaktkyckling och även få en reduktion av antalet (inhemska) humanfall.

Resultaten av provtagning inom det nya programmet har gett mer ingående information om *Campylobacter* hos slaktkyckling. Även om majoriteten av positiva slaktgrupper (75%) hade hög ”inom-flock-prevalens”, dvs alla 4 poolade kloakprov var positiva, så fanns det slaktgrupper som bara hade 1, 2 eller 3 kloakprov positiva av de 4. Utländska undersökningar, liksom tidigare svenska (2, 8) har hävdade att när en flock blir infekterad, sprids smittan så snabbt att hela flocken är koloniserad vid tidpunkten för slakt. Genom att analysera ett större antal prover (tidigare undersöktes bara 1 poolat kloakprov) kunde förekomsten av grupper med låg ”inom-flock-prevalens” påvisas. Möjliga förklaringar till låg inom-flock-prevalens kan vara att *Campylobacter*-smittan har introducerats väldigt sent i flocken, kanske bara några dagar före slakt, eller att bakterien inte har lyckats sprida sig särskilt snabbt. En annan möjlighet är att kycklingarna har varit negativa på stall, men att delar av slaktgruppen blivit kontaminerad i transportlådorna på väg till slakteriet.

Genom rutinmässig provtagning av halsskinn på slakteri har också värdefull information erhållits om omfattningen av kontamination av slaktkroppar på slakteri. Slaktgrupper med positiva halsskinn kan innebära att motsvarande slaktkroppar är kontaminerade när de når konsumenten (5).

Tidigare undersökningar av riskfaktorer för att slaktkyckling ska infekteras med *Campylobacter* har visat att introduktion kan ske med människa, djur, vatten, via ventilation, insekter mm (3, 17). I detta projekt har valts att göra en ingående uppfödarbesök- och enkätundersökning för att undersöka förhållanden hos uppfödare som i princip alltid producerar kycklingar fria från *Campylobacter* och hos uppfödare vars andel *Campylobacter*-positiva slaktgrupper överstiger 30%. Studien baseras på ett säkrare material jämfört med den tidigare svenska studien (3), bl.a. utgjorde resultat från tre års provtagning grunden för indelning i respektive kategori. Preliminära resultat tyder på att vissa faktorer eller förhållanden kan pekas ut som har betydelse för risken att *Campylobacter*-smitta ska komma in i stallarna, t.ex. vad som finns i husens närområde, antal kycklinghus och ventilationens placering, mm. Förståelse för och strikt tillämpning av hygienbarriärer bedömdes också ha stor betydelse. Resultaten ska bearbetas noggrant för att statistiskt säkerställa preliminärt funna samband.

Enkätstudien har också kopplats till en inom *Campylobacter*programmet företagen provtagningsstudie ”*Campylobacter*s förekomst i och utanför kycklingstallar 2004” (7). Inom ramen för den senare studien deltog 31 av de 37 uppfödare som ingår i enkätundersökningen. Dessa tog sockprover utanför stallarna, i förrum, i stallarna samt av vatten, foder, ventilation (inluft och utluft) och insekter. Prover togs varje vecka samt samma dag eller dag före slakt. Det fanns ingen statistisk signifikant skillnad i förekomst av *Campylobacter* i prover tagna utomhus hos uppfödare som ofta respektive sällan levererade *Campylobacter*-positiva slaktgrupper. Denna uppgift styrker uppfattningen om den stora betydelsen av att tillämpa strikta hygienbarriärer. Subtypning av *Campylobacter*isolat från studien har gjorts för att se om man kan följa smittspridning från utsidan och in i stallarna.

Resultaten från provtagningsstudien tillsammans med enkätundersökningen kommer att ge ingående och specifik kunskap om *Campylobacter* epidemiologin i svensk slaktkycklingproduktion. Ett intressant fynd som gjorts är att efter att besöken har gjorts, har några av uppfödarna haft en betydligt lägre andel *Campylobacter*-positiva slaktgrupper jämfört med under de första tre åren.

När det gäller kontamination av slaktkyckling under transport till slakteri, visade provtagning att minst hälften av transportlådorna innehöll *Campylobacter*, trots att de var rengjorda och desinfekterade. Provtagning av kycklingar före ilastning i transportlådorna och jämförelse med slakteriprovtagning visade att risken för att man skulle finna *Campylobacter* vid provtagningen på slakteri var högre för kycklingar som transporterats i lådor som testats positiva för *Campylobacter* jämfört med de som lastats i negativa lådor. Med subtypning kunde samma subtyp av *Campylobacter* påvisas hos några misstänkt lådkontaminerade kycklinggrupper som i motsvarande parti transportlådor. Resultaten från denna studie belyser risken att man med otillräckligt rengjorda transportlådor även kan sprida andra patogener.

Att det under själva slaktprocessen kan ske kontaminering av slaktkropparna är ett välkänt fenomen, speciellt från slaktgrupper som bär på höga halter *Campylobacter* i tarmen (2, 16). Den i samarbete med SLV genomförda studien kunde dels konfirmera tidigare resultat (9), dels visa att det oftast var samma subtyp(er) som uppträdde i prover från kloak, halsskinn och hela slaktkroppar från samma flock. Inga resultat tydde på förekomst av speciellt känsliga

subtyper som försvann under slaktprocessen. De i SmaI-databasen identifierade ”vanliga” subtyperna, var också vanligt förekommande på slaktkropparna (11).

Andelen slaktgrupper som blir kontaminerade på slakteri visade sig variera mycket mellan olika slakterier. Variationen var 3% till 26% mellan de olika slakterierna under det första året med det nya Campylobacterprogrammet (5). Några mindre studier gjordes som med hjälp av subtypning kunde styrka misstanken att kloakpositiva slaktgrupper kunde vara orsak till att efterföljande kloakprovsnegativa slaktgrupper blev kontaminerade. I några fall förekom dock kontamination av slaktgrupper under perioder då inga positiva kycklingar hade slaktats de senaste 7- 14 dagarna. Frågan uppstod om det kunde röra sig om resistent Campylobacter-typer med speciella egenskaper som gjorde det möjligt att överleva länge i slakterimiljö. Men i de här aktuella fallen berodde troligen fynden på att man i det ena fallet hade slaktat fjäderfä som ej hörde till Campylobacterprogrammet (som alltså ej provtas) före den aktuella halsskinnspositiva gruppen och i det andra fallet hade man fryst ner kycklingar som skulle styckas (från förmodligen positiva slaktgrupper) och tinat kropparna i spinnchiller under samma dag som aktuell kloakprovsnegativ slaktgrupp slaktades.

Kontamination på slakteri kan innebära risk för konsumenter och vetskapen om att det vid vissa slakterier är en relativt hög andel slaktgrupper som kontamineras på detta sätt är ett observandum som förtjänar uppmärksamhet. Det vore önskvärt att närmare utreda orsaker till slakterikontamination i syfte att kunna åtgärda problemet.

För diagnostik av Campylobacter har under de senaste åren olika system rapporterats som bygger på Realtids-PCR (12). I faeces finns en mängd störande substanser som kan hämma själva PCR-reaktionen och orsaka falskt negativa resultat. En effektiv DNA-preparering före själva PCR-analysen är därför avgörande för resultatet. Realtids-PCR-analysen är automatiserad så att amplifieringsteg och detektion sker i samma reaktionsrör i en speciell apparat. På så vis undviker man risken för kontamination med PCR-produkter. Jämfört med traditionell odling är analysen är mindre arbetskrävande och snabbare och kan utföras inom loppet av en dag.

Den här använda metoden visade sig vid test av kloakprover i transportsubstrat mycket specifik och överensstämelsen mellan resultat av negativa odlingsprover och Realtids-PCR var mycket god. Realtids-PCR positiva resultat av odlingsnegativa prover kan tyda på en högre känslighet hos PCR-metoden. De odlingspositiva prover som gav negativa eller oklara PCR-resultat, kan ha olika orsaker: proverna kan ha innehållit ytterst få bakterier som behövde anrikning för att ge positivt odlingsresultat, PCR-analyserna gjordes på prov i transportmedium, före anrikning. De oklara/negativa resultaten kan också bero på att hämmande substanser inte eliminerades vid DNA prepareringen och en annan typ av robot kan behövas för att säkerställa effektiv DNA extraktion. Resultaten behöver dock bearbetas ytterligare för att säkert fastställa gränsvärde för positivt prov.

Inom projektet har en databas för SmaI subtyper upprättats för Campylobacter som förekommer i kloakprover. Syftet var att få klarhet i om vissa subtyper av Campylobacter (jejuni) är speciellt vanligt förekommande hos kyckling, om dessa är samma som man isolerar från sjuka människor, om vissa subtyper kan återfinnas i speciella typer av prover eller om vissa subtyper uppvisar speciella egenskaper som kan ha betydelse för bakteriens virulens. Ett ytterligare syfte var att skapa en nomenklatur för subtyper som var vanligt förekommande hos kyckling. Resultaten visade att mer än hälften av isolaten hörde till någon av de 10 subtyper (SmaI 1 – SmaI 10) som benämndes vanliga SmaI subtyper. Vissa subtyper förekom under en begränsad tid och i begränsat område, t.ex. SmaI typ 1, medan t.ex SmaI 7 var mera spridd både i tid och rum. SmaI typ 9 isolerades endast från slaktgrupper som slaktades vid ett visst

slakteri under februari, maj och augusti 2002 och som kom från 4 olika uppfödare. Detta kan tyda på en spridning via slakteriet till de fyra uppfödarna. Det kan också tyda på att denna subtyp hade en särskild förmåga att hålla sig kvar i miljön och lätt koloniserade kycklingarna. Vid jämförelse med patientisolat från människor som smittats i Sverige, kan man se många Smal typer från kycklingstammarna som överensstämmer med de som ses hos humanstammar. Smal typerna 2, 5, 6 och 8 är dessutom typer som vid en tidigare studie bedömdes som vanligt förekommande bland inhemska humanisolat från år 2000 (10). Studier planeras för att undersöka virulens och sjukdomsframkallande egenskaper hos i första hand de identifierade vanligast förekommande subtyperna Smal 1 – Smal 10.

Referenser

1. Altekruse SF, Stern NJ, Fields PI, Swerdlow DL. 1999. *Emerg. Infect. Dis.* 5:28-35
2. Berndtson E, Emanuelsson U, Engvall A, Danielsson-Tham ML. 1996a. *Prev. Vet. Med.* 26: 167-185.
3. Berndtson E, Danielsson-Tham ML, Engvall A. 1996b. *Int. J. Food Microbiol.* 32:35-47.
4. Fermér C, Engvall EO. 1999. *J. Clin. Microbiol.* 37: 3370-3373.
5. Hansson I, Engvall EO, Lindblad J, Gunnarsson A, Vågsholm I. 2004. *Vet Rec* 155: 193 – 196.
6. Hansson I, Ederoth M, Andersson L, Vågsholm I, Olsson Engvall E. 2005. *J. Appl. Microbiol.* 99: 1149-1157.
7. Hansson I, Andersson L, Vågsholm I, Olsson Engvall E. 2006. Manuscript.
8. Jacobs-Reitsma WF, van de Giessen AW, Bolder NM, Mulder RWAW. 1995. *Epidemiol. Infect.* 114:413-421.
9. Lindblad M, Hansson I, Vågsholm I, Lindqvist R. 2006. *J. Food Protection.* In press.
10. Lindmark H, Harbom B, Thebo L, Andersson L, Hedin G, Osterman B, Lindberg T, Andersson Y, Westöö A, Olsson Engvall E. *J. Clin Microbiol.* 2004, 42: 700-706.
11. Lindmark H, Diedrich C, Andersson L, Lindqvist R, Olsson Engvall E. 2006. Manuscript.
12. Lund M, Nordentoft S, Pedersen K, Madsen M. 2004. *J. Clin Microbiol* 42: 5125 – 5132.
13. Nachamkin I. 1995. *Campylobacter and Arcobacter.* In: *Manual of Clinical Microbiology*, eds Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, pp 113-117. Washington DC: ASM Press.
14. Nordic Committee on Food Analysis. 1990. NMKL document 119, 2nd ed. Nordic Committee on Food Analysis. Oslo, Norway. <http://www.nmkl.org>
15. On SLW, Nielsen EM, Engberg J, Madsen M. 1998. *Epidemiol. Infect.* 120: 231-237.
16. Rivoal K, Denis M, Salvat G, Colin P, Ermel G. 1999. *Lett. Appl. Microbiol.* 29: 370-374.
17. Shane SM. 2000. *Rev. Sci. Tech.* 19: 376-395.
18. Van Vliet AHM, Ketley JM. 2001. *J. Appl. Microbiol.* 90, 45S- 56S.

Publikationer inom ramen för projektet:

Hansson I, Engvall EO, Lindblad J, Gunnarsson A, Vågsholm I. 2004. Surveillance programme for *Campylobacter* species in Swedish broilers, July 2001 to June 2002. *Veterinary Record* 155: 193 – 196.

Hansson I, Ederoth M, Andersson L, Vågsholm I, Olsson Engvall E. Transmission of *Campylobacter* spp to chickens during transport to slaughter. 2005. *J. Applied Microbiology* 99: 1149 –1157.

Hansson I, Vågsholm I, Andersson L, Olsson Engvall E. Temporal relationships between *Campylobacter* presence in the surroundings and broiler flock status. Manuscript.

Projektpresentationer vid internationella och nationella konferenser (seminarier):

Hansson I, Olsson Engvall E, Lindblad J, Gunnsarsson A, Vågsholm I. One-year study of Campylobacter in broilers in Sweden. SVEPM Annual Conference, UK. 2003. (poster)

Hansson I. Epidemiological studies and development of practical control measures for Campylobacter in broiler flocks, 2nd Annual Meeting, 29 May 2003, London.

Hansson I, Ederoth M, Andersson L, Vågsholm I, Olsson Engvall E. Role of contaminated transport crates for transmission of Campylobacter to chickens during transport to slaughter. CHRO, Århus, Denmark, 2003. (poster)

Olsson Engvall E, Hansson I, Andersson L, Vågsholm I, Lindmark H. Campylobacter jejuni in broilers. Identification of common clones by PFGE genotyping. Med-Vet-Net General Meeting, Winchester, UK, 2005. (poster)

Hansson I, Vågsholm I, Olsson Engvall E. Campylobacter in and around broiler houses. CHRO, Gold Coast, Australia, 2005. (poster)

Hansson I. Survival and persistence of Campylobacters in poultry farm environments and suggested control measures, 1st Annual Meeting, 28 October 2005, Bristol, UK

Övrig resultatförmedling till näringen:

- Möte med representanter från näringen och Avdelningen för idisslar och svinsjukdomar, SVA. Fagerudd, Enköping, 23 oktober 2002. (Ingrid Hansson)

- Svensk Fågels årsstämma, muntlig presentation Campylobacter programmet och projekt, Nässjö 26 mars 2004 (Ingrid Hansson)

- Svensk Fågels stämma, Nässjö 26 mars, 2004. ”Slaget mot Campylobactererna” (Eva Olsson Engvall)

- VSG-möte, Veterinärer på fjäderfäslakterier, Nässjö 23-24/4 2004 (Ingrid Hansson)

- Svensk Fågels Bransch möte, Jönköping, 20 oktober 2005 (Ingrid Hansson)

- Stiftelsen Lantbruksforskning årsredovisning och projektkatalog 2003, sid 44-45. Tryckår 2004. ”På väg mot Campylobacter-fria kycklingar” (Eva Olsson Engvall)

- Resultatförmedling vid möten med Campylobacterprogrammets nämnd (4 ggr/år) (Ingrid Hansson, Eva Olsson Engvall)

- Presentation i databasen ”Ekologiskt lantbruk, forsknings-, försöks- och utvecklingsprojekt i Sverige” www.cul.slu.se/database/sve (Projekt ID 222) (Eva Olsson Engvall)

Presentation av det svenska Campylobacterprogrammet (Ingrid Hansson) vid följande möten:

- Workshop on ”Analytical Methods in the Epidemiology of Zoonoses”, 23rd to 24th October 2003, in Berlin at the Federal Institute for Risk Assessment (BfR).

- Workshop on “Interventions aimed at reducing the risk of acquiring *Campylobacter* from poultry products”, by the Nordic Councils of Ministers, 9th to 11th October 2003, Reykjavik,

- Swedish Seminar on Possibilities for Campylobacter Risk Management, Stockholm, 28-29 October, 2004, Ministry of Agriculture, Food and Consumer Affairs Sweden.

- Nordic Meeting on Advances in the Identification of Risk Factors for *Campylobacter* Pre-harvest Contamination of Chicken Broilers, 12-13 April 2005, Uppsala, Sweden

- Campylobacter-dag vid SVA, 19 januari 2004

- Möte med Avdelningen för Fjäderfä, SVA. Presentation av resultat från Campylobacterprogrammet, Stabby prästgård, Uppsala 11 november 2002