Slutrapport
Projekt: *Campylobacter* hos slaktkyckling. Studier av eventuella samband mellan tidig introduktion i flocken och hög koncentration av *Campylobacter* på slaktkroppar.

Bakgrund

Campylobacter är den vanligaste bakteriella orsaken till diarrésjukdom hos människa i Sverige liksom i de flesta andra i-länder. Inom EU rapporteras årligen nästan 200 000 personer som insjuknat i campylobacterios, vilket är fler än antalet fall med salmonella-infektion.

Campylobacter finns i tarmen hos flera djur, främst hos fåglar och infektionen är en s.k. zoonos dvs den kan smitta mellan djur och människa. Kyckling och kyckling-produkter anses utgöra en viktig smittkälla för människa och smitta sker via direktkontakt, konsumtion av otillräckligt värmebehandlat kött eller via korskontamination av andra livsmedel.

I Sverige har *Campylobacter* hos slaktkyckling systematiskt övervakats sedan 1990-talet i olika s.k. *Campylobacter*-program som letts av Svensk Fågel AB. Under åren 2001 till 2005, var programmet delfinansierat av EU. Provtagning inom programmet utfördes på slakteri och bestod av prover från kloak/caecum samt halsskinn. Alla prover analyserades vid Statens Veterinärmedicinska Anstalt, SVA, Uppsala.

I anslutning till programmet gjordes flera extra studier, delvis finansierade av Stiftelsen Lantbruksforskning. Resultaten har publicerats i internationella vetenskapliga tidskrifter, samt presenterats vid nationella och internationella kongresser och vid möten med näringen. Resultaten har även legat till grund för Ingrid Hanssons doktorsavhandling (25 maj 2007).

Erhållen kunskap under perioden för *Campylobacter*-programmet 2001-2005:

- Prevalensen *Campylobacter*-positiva slaktkycklinggrupper sjönk successivt under perioden
- En stor variation mellan uppfödare sågs: ca 50% av uppfödarna producerade 90% av alla positiva slaktkyckling-grupper, medan cirka 25% av uppfödarna producerade *Campylobacter*-fria kycklingar under hela året.
- Transportcontainrar utgjorde en riskfaktor för att slaktkycklingar skulle kontamineras med *Campylobacter* på väg till slakteriet
- Andra riskfaktorer var dålig ordning/bristfälliga hygienbarriärer på gården, delad slakt och andra livsmedelsproducerande djur på gården

Under senare år har man diskuterat betydelsen av mängden *Campylobacter* på slaktkyckling-kroppar och menar att en högre halt *Campylobacter* kan utgöra en risk för att människa ska drabbas av campylobacterios, medan en låg halt av *Campylobacter* kanske inte utgör någon risk. Visserligen anses infektionsdosen för människa vara låg, men man har ändå i undersökningar, speciellt i Holland, visat att det är slaktkroppar med hög grad av kontaminering som utgör riskfaktor.

Kontaminering av slaktkroppar från både positiva och negativa flockar kan ske under slaktprocessen. Troligen blir kontamineringen högre ju mer *Campylobacter* som finns i tarmen hos kycklingarna. Frågan är om tidpunkten för kolonisering under uppfödningen är relaterad till mängden *Campylobacter* i tarmen och om denna i sin tur kan påverka graden av kontamination vid slakt. Om det är så att kycklingar som koloniserats tidigt under

uppfödningen har högre koncentrationer i tarmen jämfört med de som koloniseras sent kunde man hantera tidigt koloniserade flockar speciellt för att minska riskerna med kontamination av slakteri och slaktkroppar.

Traditionell bakteriologisk odling är den vanligaste metoden för detektion och kvantifiering av *Campylobacter* hos slaktkyckling. Moderna molekylära metoder baserade på polymerase chain reaction (PCR) – teknik ger snabbare och säkrare resultat. Flera PCR-baserade metoder har publicerats och används för forskningsändamål. Trots flera fördelar med dessa, är de inte validerade och det krävs en hel del arbete med att justera och anpassa tekniken till det egna laboratoriet och till olika typer av provmaterial.

Syftet med detta projekt var att undersöka om tidpunkten då slaktkycklingar koloniseras med *Campylobacter* (på besättningsnivå) har samband med mängden *Campylobacter* på slaktkycklingkroppen efter slakt. Ett annat syfte var att jämföra en realtids-PCR med traditionell odlingsteknik för detektion och kvantifiering av *Campylobacter* i slaktkropparna.

Material och metoder

Provtagning, provmaterial
Provtagning genomfördes 2006 i juli – oktober, under den period då andelen *Campylobacter* -positiva slaktkycklingflockar är som störst.

Sockprover. För att undersöka om en flock var infekterad med *Campylobacter* före slakt togs sockprov i kycklingflockarna vid två tillfällen, en vecka före slakt samt samma dag som kycklingarna levererades till slakt. Provtagningen utfördes med hjälp av tubsock som fuktades med Cary-Blair transport medium före provtagning, sockorna sattes därefter ovanpå ordinarie skodon. Provtagningen utfördes under ordinarie arbete i stallarna. Efter avslutad provtagning togs sockorna av och placerades i en plastpåse och ytterligare Cary-Blair transportmedium tillsattes. Proven skickades samma dag till SVA för analys.

Caecumprover. Inom ramen för *Campylobacter* -programmet togs även caecumprover (blindtarmar) från alla slaktkycklinggrupper på slakteriet. Tio blindtarmar provtogs från varje flock, blindtarmarna poolades i en burk till ett prov/flock och skickades till SVA för analys.

Sköljprov från slaktkyckling-kroppar. På slakteriet togs från samma kycklingflockar som provtagits med sockprover, 1 slaktkycklingkropp i mitten av slaktgruppen för kvantifiering av *Campylobacter*. Kycklingen placerades i en plastpåse, 400 ml buffrat peptonvatten (BPV) tillsattes och plastpåsen med kycklingen i skakades väl i cirka en minut, sköljvätskan tömdes i en plastflaska vilken därefter skickades i kylväska till SVA för analys.

Analysmetoder

Sockprov placerades i en stomacherpåse, ca 90 ml Preston anrikningsbuljong tillsattes, och provet inkuberades i 42.0°C i 24 ± 3 timmar i anaerobklocka för mikroaerofil miljö med CampyGen. Därefter utfördes ytspridning på Preston agar (selektivt medium). Preston agarn inkuberades i 42.0 + 0.5°C i 48 ± 3 timmar i anaerobklocka för mikroaerofil miljö med CampyGen.

Blindtarmarna lades på plastat pappret, utsidan av blindtarmarna desinficerades med sprit som sprayades på och fick avdunsta. Därefter skars ett snitt med skalpell vid den stängda delen av

blindtarmen. Blindtarmsinnehåll från de 10 blindtarmarna från samma kycklinggrupp överfördes med hjälp av en steril ögla (10 µl) till en petriskål. Innehållet blandades väl i petriskålen och med hjälp av samma ögla odlades blindtarmsinnehållet på en modifierad charcoal-cefoperazone deoxycholate agar (mCCDA) -platta som inkuberades i 42.0 + 0.5°C i 48 ± 3 timmar i anaerobklocka för mikroaerofil miljö med CampyGen.

Sköljprov från slaktkyckling-kroppar. Påvisande och kvantifiering av *Campylobacter* i sköljvätska gjordes med bakteriologisk odling samt realtids-PCR.

Odling . 10-stegsspädningar av sköljvätskan gjordes, 1 ml av sköljvätskan och spädningarna racklades ut på en stor mCCDA (14 cm Ø) platta som inkuberades i 42.0 + 0.5°C i 48 ± 3 timmar i anaerobklocka för mikroaerofil miljö med CampyGen. Antalet colony forming units (cfu) per ml bestämdes. Detektionsgräns: 1 cfu/ml sköljvätska ($\log_{10} = 0,0$).

Realtids-PCR. Sköljvätska förvarades i – 20 ºC tills provinsamlingen avslutats. Från sköljvätskan analyserades 1 ml och 10 ml med realtids-PCR som baserades på ett protokoll som beskrivits av Josefsen et al (Applied and Environmental Microbiology 2004, 70, 3588-3592). För extraktion av *Campylobacter* - DNA krävdes dock att ett helt nytt protokoll sattes upp. För extraktion av DNA fördelades provmaterialet i två portioner; 1 ml sköljprov (centifugerades vid 13000 g (14000 rpm) under 7 min) respektive 10 ml (centrifugerades vid 4863 g (5000 rpm) under 5 min). Pelletarna löstes upp i 200 µl G2-buffert (ingår i DNA tissue kit, Qiagen). Volymen 200 µl prov processades i en robot, EZ1 (Qiagen) med EZ1 DNA tissue kit och förvarades därefter i 20 ºC.

Reagenser i PCR-reaktionen:
2x TaqMan® Universal PCR master mix, Applied Biosystems
BSA 20mg/ml, Roche
Forward primer OT-1559, Cybergene AB
Reverse primer 18-1, Cybergene AB
Campylobacter probe: Fam-TGT CAT CCT CCA CGC GGC GTT GCT GC-Tamra, MWG-Biotech AG
IAC probe: Vic-TTC ATG AGG ACA CCT GAG TTG A-Tamra, Applied Biosystems
IAC (Internal Amplification Control) 124 bp, DNA Technology A/S

Kontroller:
Standard innehållande CCUG 11284 *C. jejuni* i fyra olika koncentrationer: $8,6x10^{-3}$, $8,6x10^{-4}$, $8,6x10^{-5}$ och $8,6x10^{-6}$ ng/µl, som sattes i triplikat
NTC, non-template control och NTC-IAC, non-template control utan IAC

Realtids-PCR analys:
Alla prover analyserades som triplikat i ett ABI 7500 instrument.

Analys av data gjordes i 7500 System SDS (Sequence Detection Software) Software version 1.3.1.21 Applied Biosystems
ROX användes som passiv referens.
Gränsvärde för FAM bestämdes automatiskt och för VIC bestämdes det manuellt.

Tolkning av analysresultat:
Positivt resultat: 2 eller 3 av de tre reaktionerna gav ett Ct-värde under 40 för FAM
Negativt resultat: 2 eller 3 av de tre reaktionerna gav ett Ct-värde över 40 för FAM

eller inget värde alls, samtidigt som Ct-värdet för VIC var under 40.
Om IAC inte amplifieras i negativa prover kan resultatet bero på inhibering och ge ett falskt negativt resultat.

Resultat

Totalt togs prov från 220 flockar(slaktgrupper). Från 198 flockar inkom alla fyra typer av prover: sockprov en vecka före slakt (204 flockar), sockprov åtta timmar före slakt (213 flockar), prov från blindtarm i samband med slakt (217 flockar), sköljprov från hel kyckling vid slakt (212 flockar).

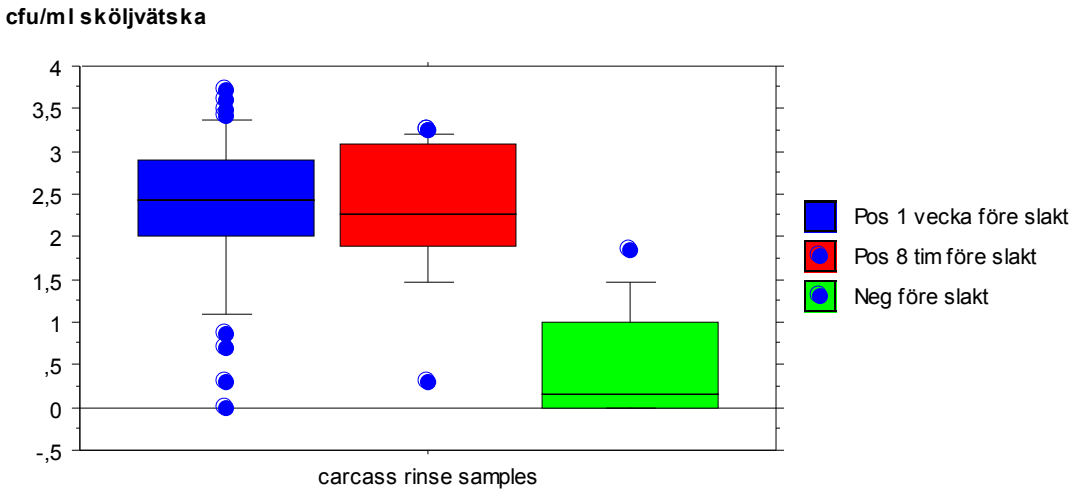
Resultat av bakteriologisk odling

Av de 198 flockarna påvisades *Campylobacter* i 42 (21 %) av flockarna i sockproven som togs i kycklingstallarna en vecka för slakt samt i 60 (30 %) av flockarna i sockproven som togs i stallarna inom 8 timmar före transport till slakt. I 11 (7 %) flockar påvisades *Campylobacter* endast på slakterinivå, vilket tolkades som slakterikontaminering (Tabell 1). I 127 av flockarna kunde inte *Campylobacter* påvisas vid något av provtagningstillfällena.

Tabell 1. Antalet *Campylobacter* - positiva kycklingflockar och provtagningstillfälle då Campylobacter påvisades första gången, samt medelvärdet (log_{10}) av antalet *Campylobacter* i sköljprov från kyckling uppdelat på de fyra olika slakterierna som deltog i studien.

Slakteri/	**Pos 1 vecka före slakt**		**Pos 8 tim före slakt**		**Pos endast vid slakt**	
antal prov	Antal	Medelvärde	Antal	Medelvärde	Antal	Medelvärde
A/61	4	1,2 cfu/ml	2	1,7 cfu/ml	0	-
B/93	13	2,2 cfu/ml	13	2,5 cfu/ml	9	0,5 cfu/ml
C/40	23	2,7 cfu/ml	3	1,8 cfu/ml	0	-
D/4	0	-	0	-	2	0,6 cfu/ml
Totalt/198	**42**	**2,4 cfu/ml**	**18**	**2,3 cfu/ml**	**11**	**0,5 cfu/ml**

En jämförelse utfördes mellan kycklingflockar som var koloniserade med *Campylobacter* en vecka före slakt med de som var negativa en vecka före slakt, men där *Campylobacter* kunde påvisas vid samma dag som kycklingarna transporterades till slakt. Både flockar som var positiva en vecka före slakt och de som påvisades positiva samma dag som de slaktades hade signifikant högre halter *Campylobacter* i slaktkropparna, jämfört med de som blivit kontaminerade vid slakt (Figur 1). Tittar man på medelvärdena så tyder resultaten på att ingen signifikant skillnad kunde påvisas i mängden *Campylobacter* på kycklingkropparna mellan de flockar som blivit koloniserade minst en vecka före slakt, jämfört med de som blev koloniserade sista dagarna före slakt. Dock var de högsta halterna som påvisades ($log_{10} \geq 3,5$) från flockar som var koloniserade vid provtagningen en vecka före slakt (Figur 1).



Figur 1. Sköljprov av kycklingar från 198 flockar, med en jämförelse av mängden *Campylobacter* på slaktkroppen från kycklingar där *Campylobacter* påvisats på uppfödarnivå en vecka före slakt med dem som blivit koloniserade dagarna före slakt samt flockar där *Campylobacter* inte påvisats på uppfödarnivå men på slakterinivå. Boxarna visar värden mellan 25:e och 75: percentilen. Så kallade extremvärden vilka ligger utanför 10:e percentilen respektive 90:e percentilen visas som punkter i figuren.

Resultat av realtids-PCR

Denna del av projektet avsåg att jämföra resultaten mellan konventionell odling och realtids-PCR för detektion och kvantifiering av *Campylobacter* i sköljprov från slaktkroppar. För att kunna jämföra ett högre antal positiva sköljprov med höga antal cfu/ml, undersöktes mer än en slaktkropp per slaktgrupp från vissa producenter som ofta levererar *Campylobacter* -positiva slaktgrupper. Antalet positiva slaktkroppar som anges här överensstämmer därför inte med det som anges under ”Resultat av bakteriologisk odling”.

Totalt analyserades 148 sköljprover med realtids PCR och konventionell odling. I 64 prover påvisades *Campylobacter* respektive *Campylobacter*-DNA med både odling och realtids-PCR, medan 71 prover blev negativa med båda metoderna. För 13 prover gav odling och PCR olika resultat. För 135 (91,2%) av de 148 proverna överensstämde analysresultaten avseende detektion av *Campylobacter*.

Av de 148 proverna var 77 positiva med någon eller båda metoderna. Antalet positiva prover var högre med realtids-PCRen som gav 72 positiva resultat (93,5%), medan odlingsmetoden gav 69 positiva resultat (89,6%).

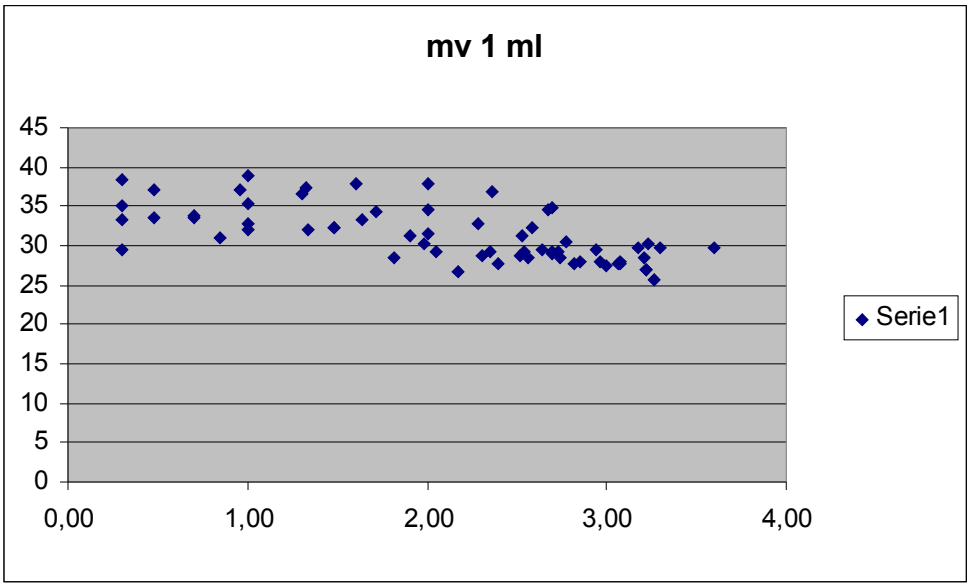
Med odling påvisades *Campylobacter*- halter mellan 1 cfu och 4000 cfu per ml sköljvätska och med PCR gav de positiva proverna Ct-värden som varierade mellan 25 och 39. Ingen skillnad i resultat sågs mellan prover som preparerats från 1 ml och 10 ml-portionerna av sköljvätska, förutom att för positiva prover gav 10 ml-proven ofta något lägre Ct- värde.

Åtta prover som var positiva med realtids-PCR, var negativa med odling. Ct- värdena för dessa prover var alla > 30. Två av proverna var positiva vid odling med två andra metoder (”ISO” och ”NMKL”) som testades parallellt men inom ramen för en annan studie (ej SLF). Enligt dessa metoder, innehöll proverna låga halter *Campylobacter* ($\log_{10}$ = 0,70 – 1,48 cfu/ml).

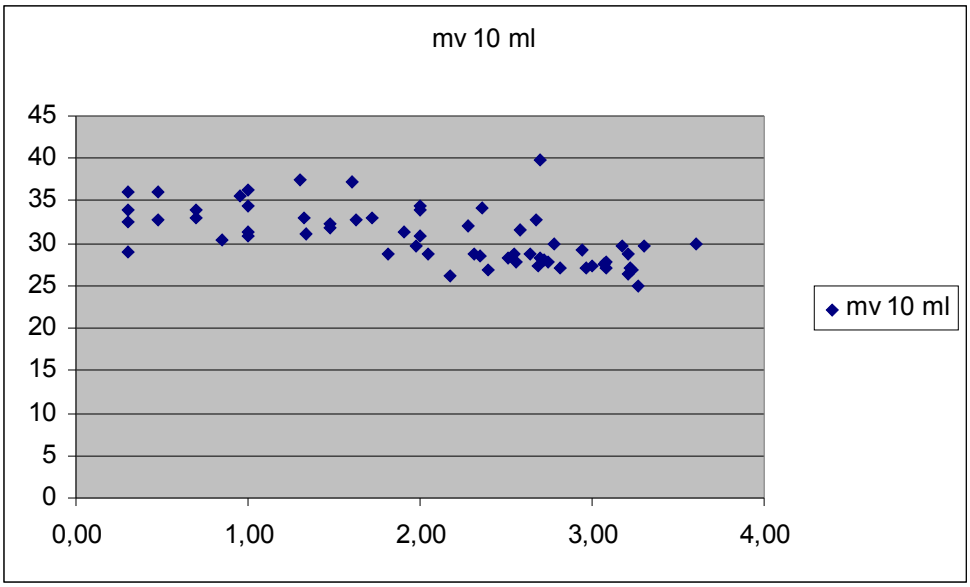
Fem prover var positiva vid odling men negativa med realtids-PCR. Proverna innehöll låga halter av *Campylobacter* (log_{10} = 0,0 – 1,08 cfu/ml). Fyra av proverna odlades även enligt ISO och NMKL med negativa resultat.

Från 3 prover påvisades endast 1 cfu *Campylobacter*/ml sköljvätska. Dessa var alla negativa med realtids-PCR. Prover som innehöll 2 – 10 cfu/ml var oftast positiva men fick höga Ct-värden med realtids-PCRen.

Ct-värden kunde inte korreleras direkt till mängden *Campylobacter* i ett prov, men en tendens kunde ses att prover med höga halter, cfu log_{10} värden på omkring 3 eller mer, hade Ct-värden 25- 30, medan prover med låga halter hade Ct-värden > 30. Dessutom varierade värdena mer för prover med låga halter (Figur 2).



Figur 2A



Figur 2B

Figur 2. Prover som bedömts positiva med både odlingsmetod och realtids-PCR.
2A visar resultat från PCR på DNA extraherat från 1 ml- portioner och 2B visar resultat av 10-ml portioner av sköljproven.
Y-axel: Ct-värden, X-axel: cfu (log_{10})/ml.

Diskussion

Resultaten från detta projekt bekräftar tidigare fynd som visar att med ökad ålder så ökar risken att kycklingarna ska bli koloniserade med *Campylobacter*. Under slutet av uppfödningsperioden ökar foder och vattenintag samtidigt som ventilationen ökas i stallarna. Dessa faktorer kan ha betydelse för den ökning av antalet positiva flockar som sågs vid det sista provtagningstillfället före slakt jämfört med provtagningen en vecka före slakt. Vid jämförelse av halter med *Campylobacter* på slaktkropparna fanns ingen signifikant skillnad mellan de flockar där *Campylobacter* kunde påvisas en vecka före slakt jämfört med de där *Campylobacter* påvisades vid samma dag som de transporterades till slakt. Att de högsta halterna uppmättes från några flockar som visats positiva vid provtagningen en vecka före slakt är dock ett observandum. Vid den här studien togs endast prov vid två olika tillfällen under uppfödningen och det går därför inte att avgöra om de som var positiva 1 vecka före slakt varit positiva i flera veckor, eller om de som var positiva vid sista provtagningstillfället varit koloniserade i flera dagar. För att kunna avgöra tidpunkten för kolonisation krävs att flockarna provtas med tätare intervall än vad som gjorts i denna studie.

En betydelsefull observation är att en signifikant lägre mängd *Campylobacter* påvisades hos de flockar som var negativa i prover tagna före slakt (besättningsnivå) jämfört med de som var positiva vid provtagningar före slakt. Det tyder på att kontamination under transport och under slaktprocessen av flockar som är negativa på besättningsnivå, leder till lägre halter på slaktkropparna. Resultaten från denna studie visar att om man avser att styra slakten eller hantering av slaktkroppar från positiva flockar för att minska kontaminationsgraden, så bör man veta resultat av prover tagna så sent som möjligt, helst samma dag som kycklingarna ska transporteras till slakt.

Den jämförande studien av odling och realtids-PCR visade en god överensstämmelse mellan de två metoderna och att realtids-PCRen troligen är en något känsligare metod för detektion av *Campylobacter* i sköljprov. Ett samband mellan mängd *Campylobacter* och Ct- värden kunde ses, prover med låga halter av *Campylobacter* hade höga Ct- värden (> 30) och varierade mycket. Ju högre halter *Campylobacter* i provet, desto lägre Ct- värden. Ett Ct-värde på 25-30 var så gott som alltid från ett sköljprov med cirka 1000 eller mer cfu *Campylobacter* per ml. En stor fördel med realtids-PCR är att man gör hela analysen i ett slutet system, utan att analysera PCR-produkterna separat, som vid traditionell PCR. Tekniken innebär också en identifiering av *Campylobacter* utan att man behöver göra några specifika tester som man måste göra vid odlingmetoder.
Vid analys av stora mängder prov kan det vara en fördel att använda realtids-PCR, men vid små provserier är kostnader för reagenser och apparatur för höga för att kunna konkurrera med traditionell odlingsmetodik

Man har i internationella studier hävdat att just höga halter av *Campylobacter* i slaktkroppar utgör risk för att människa ska drabbas av *Campylobacter* -infektion. Frågan är om man kan bestämma och komma överens om ett gränsvärde för vilken mängd *Campylobacter* som behövs för att utgöra risk och vad som kan accepteras som ”ofarligt” i slaktkroppar och

kycklingkött. Om man i framtiden sätter upp sådana gränsvärden kommer det att innebära att kvantifiering av *Campylobacter* i slaktkyckling/kött blir en efterfrågad analys som med fördel kan göras med hjälp av realtids-PCR.

Publikationer

Ingrid Hansson. Title of thesis: Bacteriological and Epidemiological Studies of *Campylobacter* spp. in Swedish Broilers. PhD in Bacteriology 2007. Faculty of Veterinary Medicine and Animal Sciences Swedish University of Agricultural Sciences (SLU).

Harbom, B., Olsson Engvall, E., Pudas, N., Svensson, L**.** & Hansson, I., Comparison of three methods for enumeration of *Campylobacter* in broiler carcasses. Zoonoses and Public Health, 54, suppl 1, 2007. P089. (14th International Workshop on Campylobacter, Helicobacter and Related Organisms, CHRO, The Netherlands 2th September- 5th September 2007).

Resultatförmedling

Resultaten från projektet har presenterats vid seminarier, möten, konferenser för såväl branchfolk som forskare samt i Ingrid Hanssons doktorsavhandling vilken försvarades den 25 maj 2007.