

Salmonellasmitta i rasthagar – smittspridare till hästar och miljö

BAKGRUND

Salmonellainfektion hos svenska hästar har blivit vanligare (Zoonosrapport 2004, 2007, SJV 2005, SVA 2005, SVA 2006), även om det i andra länder är ett betydligt större problem än vad det nu är i Sverige (Singh m.fl., 2007; Ward m.fl., 2005). Det ökande antalet internationella och nationella transporter vid avel, uppfödning, träning, tävling och handel med hästar ökar risken för salmonellasmitta i vårt land. Salmonellainfektion är en viktig orsak till sjuklighet, kroniskt lidande och död hos föl och en vanlig komplikation när hästar måste vistas på djursjukhus (oavsett orsak till vistelsen). Vuxna hästar är ofta subkliniskt infekterade och salmonella utskiljs intermittent under en längre tid, vilket gör infektionen svår att upptäcka (Clarke och Gyles, 1983). Eftersom salmonella är en zoonos och hästar hanteras mycket av människor, både vuxna och barn, så är salmonellasmitta bland hästar en allvarlig risk för folkhälsan. Smittrisker till människor är extra stor från subkliniskt infekterade hästar. Sjukdomsutbrott av salmonella eller påvisande av smittan får dessutom ofta stora ekonomiska konsekvenser för djurhållaren. Förutom de kostnader som själva sjukdomen ger i form av veterinärvård, kastningar, etc. läggs oftast restriktioner på anläggningens verksamhet, in- och uttransport av djur, markanvändning m.m.

I många stallar är isoleringen av nyanlända hästar bristfällig och en nyintroducerad smitta sprids då snabbt. Rasthagar i anslutning till stall är ofta små och utnyttjas hårt med kraftigt gödselinblandning och upptrampad mark som följd. Endast undantagsvis sker regelbunden mockning eller preparation av underlaget med t.ex. dränering, grusning, marknät, etc. Gödsel från infekterade hästar utgör den största risken för smittspridning (Clarke och Gyles, 1993). Rasthagarna är av stor betydelse för spridning och bevarande av smittan i anläggningen samt kan även vara en källa för spridning av smitta till andra hästar och till miljön. Många stallar har begränsad tillgång till mark vilket gör att tomhållning respektive sanering av rasthagar är problematisk. Alternativ mark för utevistelse saknas ofta. Tomhållning kan därför leda till praktiska, ekonomiska och juridiska problem, både vad gäller djurskydds- och smittskyddsaspekter.

Salmonella i miljön har god förmåga till överlevnad och kan under gynnsamma förhållanden även tillväxa (Mitscherlich och Marth, 1984). Otillräcklig kunskap finns dock om hur länge smittan finns kvar i den markmiljö som karaktäriserar hästrasthagar och hur man ska gå tillväga för att bryta smittspridningen. Ett sätt att avdöda salmonellabakterier är behandling med släckt kalk (kalciumhydroxid, $\text{Ca}(\text{OH})_2$). Vid kalktillsats som ger ett pH-värde på över 12 inaktiveras mikroorganismer i gödseln. Det krävs dock att det höga pH-värdet uppehålls under en viss tid för att inte de biologiska processerna ska återupptas. pH-nivån sjunker successivt och kommer att normaliseras, men när det sker beror på hur mycket kalk som tillsätts. (Tullander, 1982) Fram till att pH normaliserats är det viktigt att tomhålla hagen, dels p.g.a. smittrisk men även p.g.a. risken för frätskador på hästarnas hud och hovar.

Målsättningen med detta projekt har varit att studera överlevnaden av salmonella i hästgödselbemängd jord, med och utan tillsats av kalk. En ökad kunskap om hur länge smittan finns kvar i gödselbemängd mark samt hur smittspridningen kan brytas kan vara till stöd för hästnäringen vid hantering och sanering av salmonellaförorenade rasthagar.

MATERIAL OCH METODER

Försökupplägg

Studien har utgjorts av fyra delförsök (I-IV). Delförsök I-III har varit inkubationsstudier som utförts i laboratorieskala inomhus vid temperaturerna 4 och 14°C. Delförsök IV har varit ett lagringsförsök som delvis utförts utomhus.

En bakteriestam av *Salmonella* Typhimurium nyligen isolerad från hästgödsel vid Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA), användes som försöksorganism. I försöket inkluderades även bakterien *Enterococcus faecalis* som kontrollorganism. Inför varje försöksstart odlades bakterierna i näringsbuljong (Nutrient broth) över natt vid 37 °C. Färsk hästgödsel samlades in från friska hästar i anslutning till försöksstart. Gödseln förvarades i kyl och användes inom en vecka. Provtogs ut för analys för att garantera att gödseln var naturligt fri från salmonella. Två olika jordtyper har använts, en med hög sandhalt och en med hög lerhalt. Jordarna analyserades med avseende på innehåll av mineralämnen, organiskt kol, pH, askhalt och torrsubstans och förvarades i frysfrys tills de användes i försök. Inför varje försöksstart tinades jord över natt i 4°C.

Vid försöksstart preparerades (spikades) hästgödseln med de 2 bakteriestammar som ingår i studien, i en såpass hög koncentration att en eventuell avdödning lätt kunde följas med kvantitativ odling av uttagna prov ($>10^8$ CFU/g gödsel). Efter bakterietillsats blandades hästgödseln med sand- eller lerjord. I de olika försöken har gödsel blandats med jord i förhållandena 1:9, 1:1 och 9:1 baserat på vikt/vikt. Jord/gödselblandningen fördelades sedan i så pass många 100 mL falconrör som behövdes för varje försöksomgång. Falconrören hade lufthål i locken och placerades i provrörställ i respektive lagringstemperatur.

Vid varje provtagningstillfälle utfördes en kvantitativ analys av både *Salmonella* och kontrollorganismen genom direktodling på selektivt media efter att en spädningsserie (1:9) utförts. Därefter beräknas antalet kolonier (CFU= colony forming unit) per gram prov. Detektionsgränsen är 1×10^2 antal bakterier per gram prov. Dessa metoder är baserade på NMKL-metod (Nr 71 5e upplagan, 1999 samt Nr 68 3e upplagan, 2003), som av SVA anpassats för detektion av *Salmonella* Typhimurium samt *Enterococcus faecalis* i jord- och gödselprov.

Delförsök I

Detta försök syftade till att utvärdera effekten på överlevnaden av salmonella av olika sätt att tillsätta kalk till gödselbemängd jord. De två olika jordtyperna mixades med spikad hästgödsel i förhållandet 1:1 och fördelades i falconrör, som beskrivet ovan. Sedan tillsattes 1% kalk i form, av kalciumhydroxid ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), på följande tre sätt:

- 1) Totalinblandning av kalk i jord/gödselmixen
- 2) Kalk tillsatt på ytan av jord/gödselmixen som sedan vattnades med 15.5 ml vatten (motsvarande 25 mm ”regn” d.v.s. 25 l/m^2)
- 3) Kalkslam lagt på ytan av jord/gödselmixen

Totalinblandning skedde i plastpåsar, som sedan återfördes till falconrören. Som kontroll utfördes även en alternativ behandling i form av enbart luftning av jord/gödselblandningen, d.v.s manuell omblandning av prov utan kalktillsats. Proven lagrades i 14°C och provtagning skedde dag 0, 2, 6 och 15. Mängden salmonella analyserades enligt beskrivning ovan.

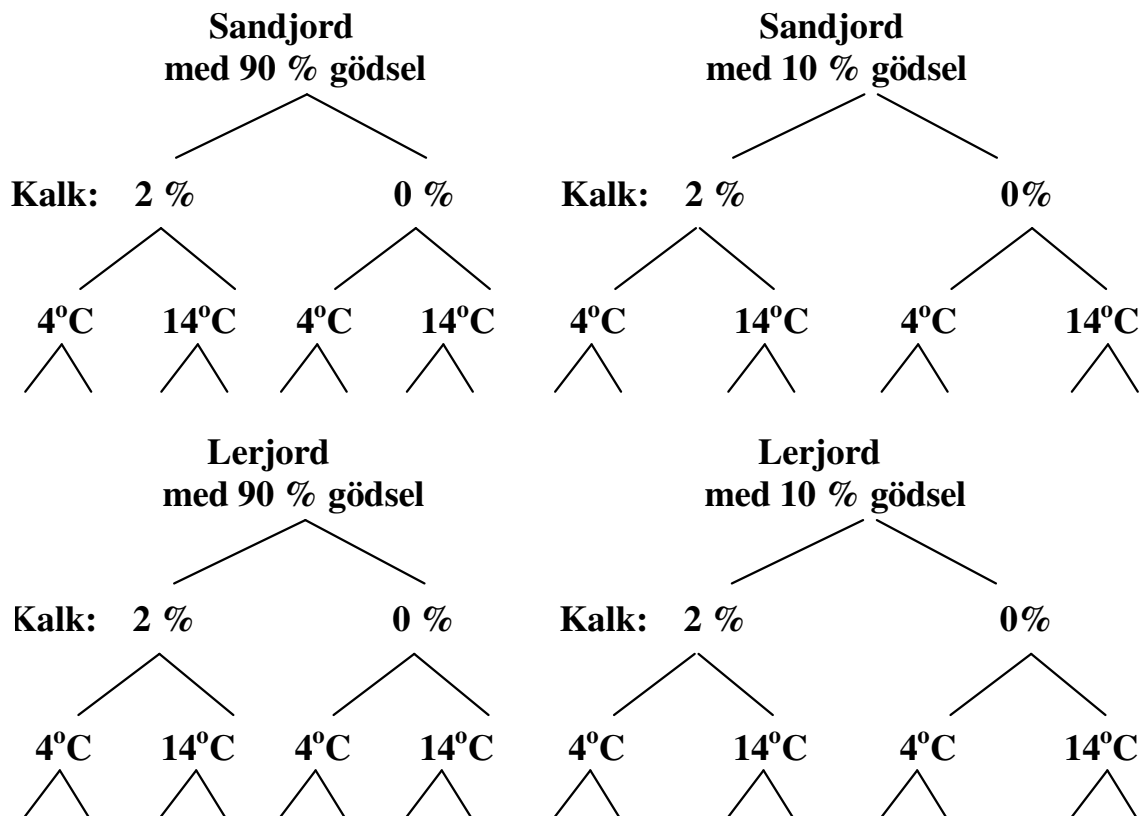
Delförsök II

Detta försök syftade till att mer utförligt studera hur pH i jord/gödsel blandade i olika proportioner påverkades efter tillsats av olika mängder kalk. En pH-profilstudie utfördes för att identifiera den kalktillsats där pH stannar över 12 i minst 7 men max 14 dagar, vilket bör motsvara optimala förhållanden för sanering av en hästrasthage.

Jord/gödsel i förhållandena 1:9, 1:1 och 9:1 för respektive sand och lerjord, totalinblandades med 1%, 1.5%, 2% eller 4% kalk. Proven lagrades därefter i 14°C. Jord/gödselprover med kalktillsats på 2 % lagrades även i 4°C. Mätning av pH gjordes dag 0, 1, 2, 3, 4, 7, 10, 14, 21 och 28.

Delförsök III

Effekten av totalinblandning av 2% kalk på överlevnaden av salmonella samt kontrollorganismen följdes kvantitativt vid två olika lagringstemperaturer (14°C samt 4°C) i sand- respektive lerjord. Under försöksperioden har provtagning skett dag 0, 1, 3, 6, 14, 21 och 28. Förutom analys av bakterier mättes jord/gödselblandningens pH vid varje provtagning. Alla behandlingar utförs i duplikat, enligt försöksuppläggning nedan (Figur 1).



Figur 1. Schematisk bild över försöksupplägget i delförsök III.

Delförsök IV

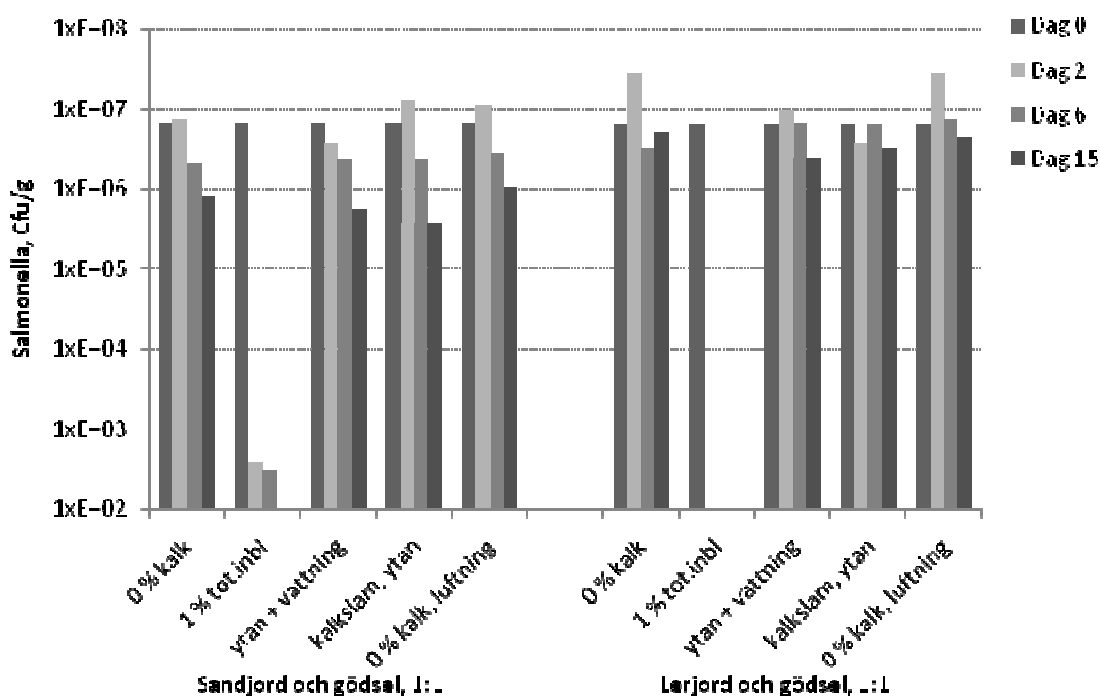
Överlevnaden av salmonella i gödselbemängd jord (1:1) utan tillsats av kalk studerades under 4 månader. Proven lagrades i tillslutna inkubationskärl förvarade ytligt nergrävda i marken utomhus, samt i luftade kärl vid 4 och 14°C inomhus. Vid förvaringen utomhus har temperaturen följts kontinuerligt med en temperaturlogger. Över försöksperioden har prov tagits efter 1 vecka samt 2, 3, 4, 5 och 6 månaders lagring. Proven har analyserats kvantitativt

för analys av salmonella enligt ovan nämnda metod. Även pH har mätts på jord/gödselblandningen vid varje provtagningstillfälle.

RESULTAT

Delförsök I

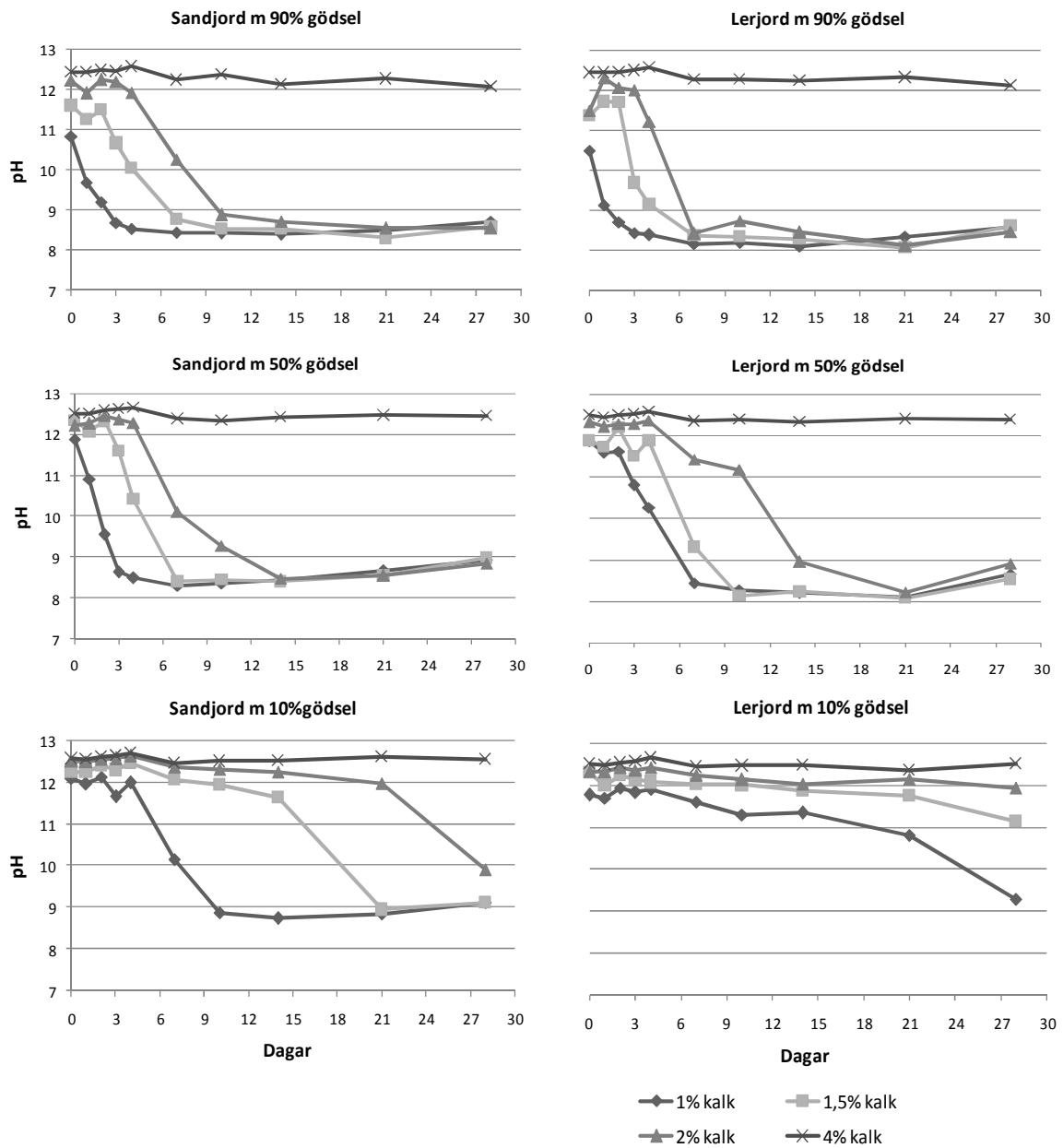
Sättet att applicera kalk visade sig ha stor betydelse för den avdödande effekten på salmonella (Figur 2). I både gödselbemängd sand- och lerjord (1:1) visade sig endast totalinblandning av kalk ha avdödande effekt på salmonella (Figur 2). I den totalinblandade lerjorden detekterades ingen salmonella efter dag 0 medan små mängder detekterades fortfarande dag 2 och 6 i den totalinblandade sandjorden. I sandjorden detekterades ingen salmonella vid provtagningsdag 15. Övriga sätt att applicera kalk visade ingen skillnad i avdödning jämfört med att endast lufta jord/gödselblandningen, vilket gav liten effekt i sandjorden och ingen effekt i lerjorden (Figur 2).



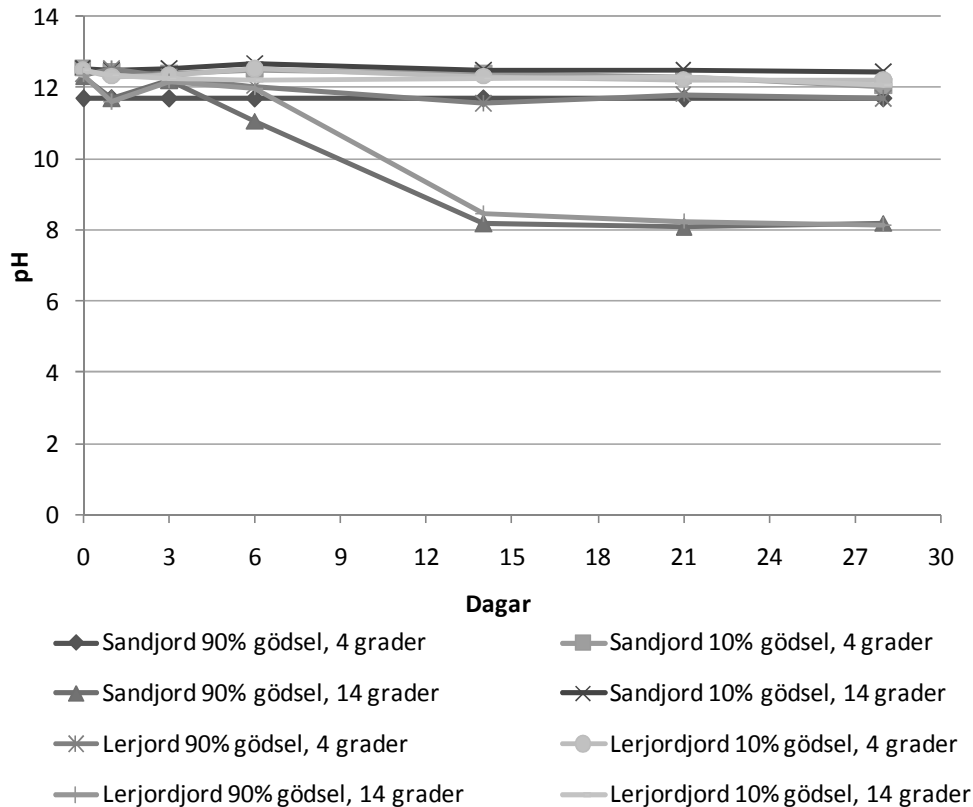
Figur 2. Överlevnad av salmonella vid olika kalkbehandlingar samt vid luftning utan kalk.

Delförsök II

Alla kalktillsatser gav en initial höjning av pH från cirka 7.4 (okalkad gödselbemängd sandjord) och 7.9 (okalkad gödselbemängd lerjord) till cirka pH 12 (Figur 3). Vid 14 °C visade det sig att mängden gödsel som jorden blandats med påverkade pH-profilen i jord/gödselblandningen. Ju högre andel gödsel desto snabbare normaliserades (sänktes) pH-värdet. Vid 90% gödsel var det bara proven med 4% kalk som fortfarande hade ett pH kring 12 efter 7 dagars lagring. Detta höga pH bestod även vid försökstidens slut efter 28 dagars lagring. Vid 10% gödselhalt bibehölls ett högt pH-värde under minst 14 dagar vid kalkhalterna 1.5%, 2% och 4%. Vid 4°C och 2% kalkhalt bibehölls ett pH på 12 under hela försökstiden, oberoende av gödselmängd och jordtyp (Figur 4).



Figur 3. pH i sand- och lerjord med olika gödselhalt (10%, 50% och 90%) och kalkhalt (1%, 1.5%, 2% och 4%) lagrat i 28 dagar vid 14°C.

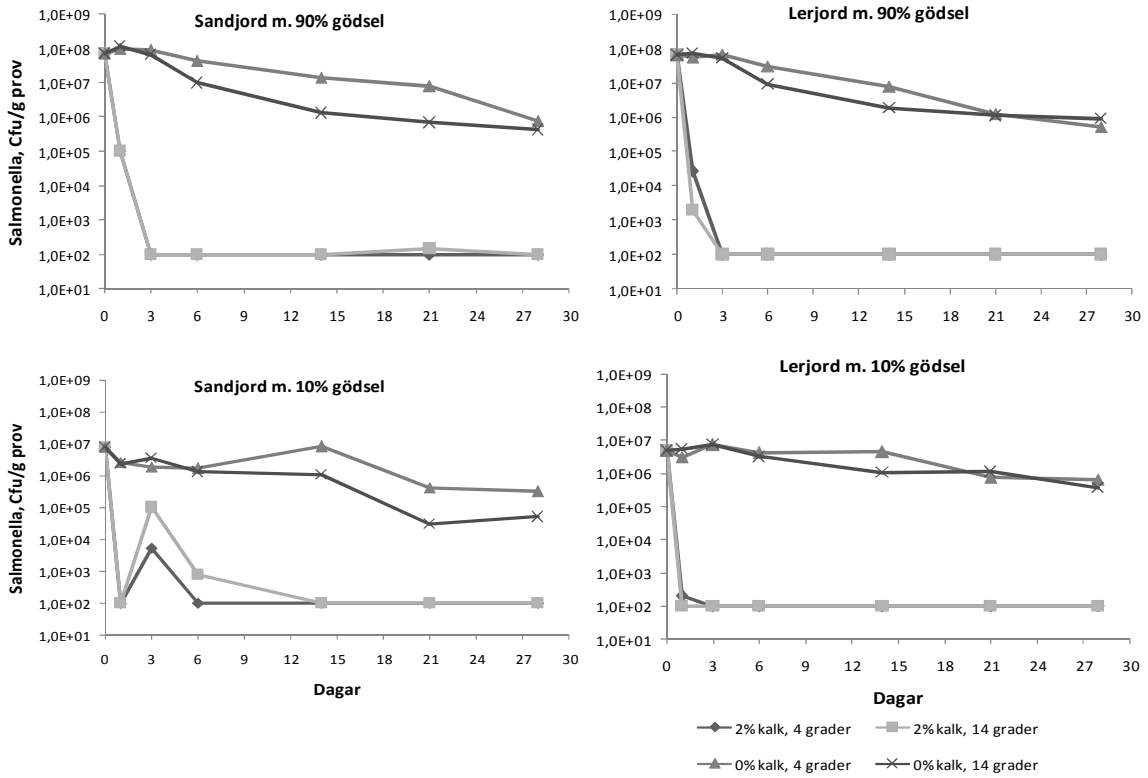


Figur 4. Jämförelse av pH i sand- och lerjord med olika gödselhalt och 2% kalk lagrat i 28 dagar vid 4 respektive 14°C.

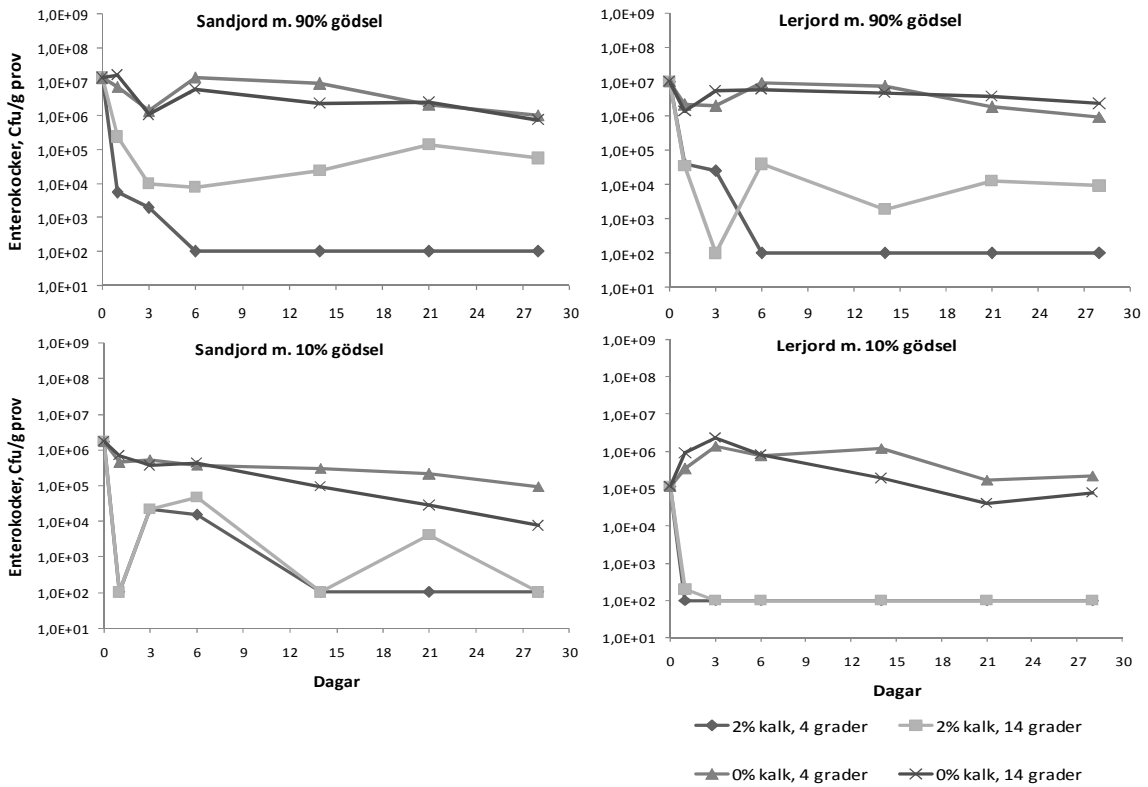
Delförsök III

I alla prover med 2% kalkinblandning skedde en snabb avdödning av salmonella, oberoende av jordtyp och lagringstemperatur (Figur 5). Vid 90% gödselhalt har antalet salmonella sjunkit under detektionsgränsen för analysmetoden efter lagring i mellan ett och tre dygn. Vid 10% gödseltillsats detekteras inga salmonella efter 1 dygns lagring i lerjorden. I sandjorden finns salmonella kvar i proverna efter både tre och sex dygns lagring, men kunde inte längre detekteras vid provtagningstillfället efter 14 dygn. I prov utan kalktillsats sjunker antalet salmonella långsamt under hela försöksperioden på 28 dagar. Vid försökets slut finns det fortfarande kvar höga mängder salmonella i de obehandlade kontrollerna.

För enterokocker gav 2% kalkinblandning en delvis långsammare avdödning än vad det gjorde för salmonella (Figur 6). Vid 90% gödselmängd syns en tydlig effekt av lagringstemperaturen, vid 4°C gick det inte att detektera några enterokocker från provtagningsdag 6 medan det fortfarande fanns i relativt hög mängd enterokocker kvar efter 28 dagar vid 14°C. Vid 10% gödselmängd fanns inga enterokocker vid provtagningsdag 1 i lerjorden. I sandjorden med 10% gödsel finns inte heller några enterokocker detekterade vid dag 1, men de dyker upp igen vid dag 3 och 6. På samma sätt som för salmonellan sjunker antalet enterokocker långsamt under hela försöksperioden i de obehandlade kontrollerna, för att fortfarande finnas kvar i hög mängd vid försökets slut efter 28 dagar.



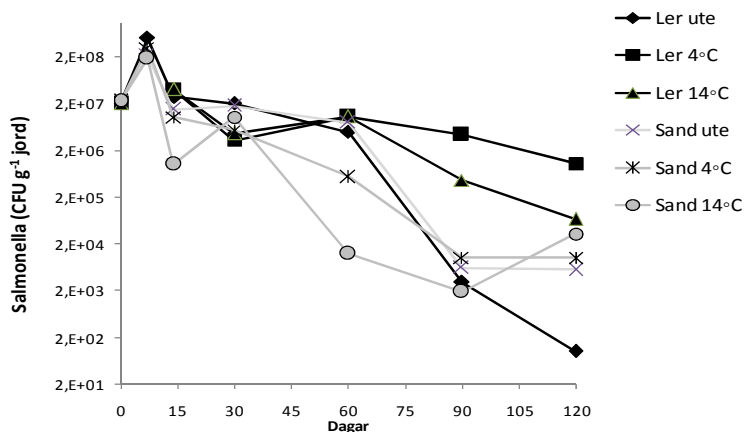
Figur 5. Avdödning av salmonella i sand- respektive lerjord vid 90 och 10% gödselhalt och 2% kalkhalt vid 4 respektive 14°C.



Figur 6. Avdödning av enterokocker i sand- respektive lerjord vid 90 och 10% gödselhalt och 2% kalkhalt vid 4 respektive 14°C.

Delförsök IV

Efter 4 månaders lagring utan kalktillsats är det endast i gödselbemängd lerjord som förvarats utomhus som mängden *Salmonella* sjunkit under detektionsgränsen (Figur 7). I övriga prov finns fortfarande relativt höga halter *Salmonella* kvar, även om det skett en gradvis minskning under lagringsperioden.



Figur 7. Avdödning av salmonella i sand- respektive lerjord med 50% gödselhalt utan tillsats av kalk.

DISKUSSION

Denna studie har visat att behandling med släckt kalk (kalciumhydroxid, $\text{Ca}(\text{OH})_2$) är ett effektivt sätt att sanera salmonellakontaminerad mark. För att få en effektiv avdödning krävs att kalk tillsätts i sådan mängd att höga pH-värden uppnås. Resultaten visar att en kalktillsats som ger ett pH-värde på över 12 avdödar mikroorganismer i gödselbemängd jord. Därtill krävs att den höga pH-nivån bibehålls i åtminstone en vecka, detta för att förhindra återväxt av salmonella. Under påverkan av koldioxid från luften kommer pH-nivån successivt att sjunka i både jord och gödsel, för att slutligen normaliseras. Men tiden detta tar beror på ett flertal faktorer. I detta projekt identifierades faktorer som mängden kalk som tillsats, lagringstemperaturen och halten gödsel i proportion till jord

För att undvika risken för frätskador på hästars hud och hovar är det viktigt att tomhålla en sanerad hästrasthage till dess att pH har normaliserats. Eftersom många stallar har begränsad marktillgång är det bra om tiden för tomhållning av rasthagar i samband med sanering är så kort som möjligt. Optimala förhållanden är således att ett högt pH erhålls under cirka en veckas tid, för att säkerställa att all salmonella är avdödad, och sedan en relativt snabb normalisering av pH, så att hagen åter kan tas i bruk. Denna studie har visat att en kalkbehandling på cirka 2% i flera fall medför att optimala förhållanden för sanering av salmonella uppnås. Mängden gödsel i förhållande till jord har dock visat sig ha påverkan på pH. Gödsel, som till stor del består av organiskt material, har en buffrande effekt som gör att pH-värdet sjunker snabbare. I kraftigt gödselbemängda rasthagar kommer därför en större mängd kalk att behövas vid en eventuell sanering. Men i fall med hög andel jord i förhållande till gödsel visade det sig att 2% kalk var en för hög kalktillsats. I dessa fall sågs ingen normalisering av pH, som förblev högt under hela försöksperioden på 28 dagar. Således kommer det vid sanering att behövas anpassning av mängden tillsatt kalk för att inte fördröja möjligheten att släppa hästar i hagen igen. Ett praktiskt problem inför en sanering av en

salmonellakontaminerad hage kommer vara svårigheten att bedöma halten gödsel i hagen, och därmed vilken kalkmängd som ska användas. Dessutom är inte gödseln jämt spridd över markytan i en rasthage, utan är oftast koncentrerat till vissa delar av hagen. Problemet kan till viss del kringgås om rasthagen kan mockas och harvas innan kalkning sker. Detta försök har även visat att pH-värdet normaliseras snabbare vid en högre temperatur, vilket också måste beaktas i utomhusförsök så man kan optimera halten kalk vid en eventuell sanering.

Denna studie har visat att en effektiv avdödning av salmonella i hästgödselbemängd jord sker redan efter en till ett par dagar efter tillsats av kalk. Detta kan jämföras med en överlevnad i flera månader upp till över ett år utan kalktillsats i gödselbemängd jord (Plym-Forsell och Ekesbo, 1996; Gray och Fedorka-Cray, 2001; Nyberg m.fl.). Det är dock viktigt att uppnå en pH-höjning i hela det kontaminerade materialet för att kalkbehandlingen ska vara en effektiv metod för avdödning av salmonella. Resultaten från denna studie visade endast avdödning av salmonella efter att kalken blandats in ordentligt i materialet som ska saneras. De övriga metoderna för applicering av kalk gav endast en pH-höjning lokalt där kalken kom i kontakt med jord/gödselblandningen, i övriga delar av materialet skedde ingen förändring av pH. I de delar där pH inte är höjt kommer salmonella att överleva, för att sedan återinfektera resten av materialet när pH efter hand normaliseras. Enterokocker, som användes som kontrollorganism, hade en något bättre överlevnad än salmonella i proven med hög gödselhalt, men de två organismerna svarade likvärdigt på kalkning i prov med låg gödselhalt.

Jordarten har inte visat sig påverka överlevnaden av vare sig salmonella eller enterokocker i detta försök. Viss skillnad sågs dock mellan de två jordarnas pH-profil. Detta kan bero på att olika jordarter kan ha olika buffrande effekt, men även på skillnader i jordarnas struktur. Sandjorden som användes var väldigt finfördelad, vilket underlättade inblandningen av kalk, medan lerjorden var mer aggregerad. På samma sätt kommer olika jordar ha olika struktur även i verkliga hästrasthagar. I detta försök har totalinblandningen av kalk skett i plastpåsar, genom att finfördela materialet för hand, vilket naturligtvis är lättare om jord- och gödselstruktur är så lite aggregerad som möjligt. För att ta reda på hur man på ett rimligt sätt ska kunna homogenisera materialet i stor skala krävs vidare studier. En annan viktig fråga inför en sanering av en salmonellakontaminerad hage är hur djupt kalken ska blandas ner, vilket kan bero på strukturen och hur upptrampad/-blandad jorden och gödseln är i hagen.

En kraftigt gödselbemängd hästrasthage är inte lämpligt vare sig ur smittspridningssynpunkt eller för en eventuell sanering. Hög halt av gödsel från infekterade hästar medför större risk att salmonella kvarstår i rasthagen. Dessutom krävs mer kalk vid sanering. Eftersom salmonellainfektion ofta förlöper subkliniskt hos hästar, och det sällan tas prov, så är antagligen antalet rapporterade fall en grov underskattning av det antal hästar som faktiskt urskiljer salmonella. I preventivt syfte är det därför viktigt med en regelbunden mockning av hagar för att hålla gödselmängden nere. Rutiner behövs för hantering av både hästar och markytor när rasthagar är kontaminerade. För att undvika problem när kalkningen av rasthagar ska utföras i salmonellasmittade besättningar måste praktiska rekommendationer för hantering och behandling av kontaminerade rasthagar utarbetas. Dessa rekommendationer bör baseras på att kalkning har testats och utvärderats utomhus i större skala. Detta kommer att genomföras under 2009-2010 i ett fortsättningsprojekt finansierat av Stiftelsen Svensk Hästforskning.

REFERENSER

- Clarke, R.C., Gyles, C.L. 1993. Salmonella. In: Pathogenesis of bacterial infections in animals. Eds. Gyles C.L. and Thoen, C.O. 2nd Ed. Iowa State University Press, Ames sid 133-153.
- Gray, J.T., Fedorka-Cray, P.J. 2001. Survival and infectivity of Salmonella Choleraesuis in swine feces. Journal of Food Protection, 64:945-949.
- Mitscherlich, E., Marth, E.H. 1984. Microbial Survival in the Environment. Springer Verlag, Berlin, Germany.
- Nyberg, K., Vinnerås, B., Ottoson, J., Aronsson, P., Albihn, A. Fate and survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium in manure amended soil studied in an outdoor lysimeter experiment. Manuscript in preparation
- Plym-Forsell, L., Ekesbo, I. 1996. Survival of Salmonella in urine and dry faeces from cattle – an experimental study. Acta Veterinaria Scandinavica. 37:127-131.
- Singh, B.R. m.fl. 2007. Prevalence of multi-drug-resistant Salmonella in Equids maintained by low income individuals and on designated equine farms in India. Journal Equine Veterinary Science 27:266-276.
- Tullander, V. 1982. Quicktime treatment of Sludge, Disinfection of Sewage Sludge: Technical, Economic and Microbiological Aspects. Edited by A.M. Bruce, A.H. Havelaar & P. L'Hermite
- Ward, M.P., Alinovi, C.A., Couetil, L.L., Wu, C.C., 2005. Evaluation of a PCR to detect Salmonella in faecal samples of horses admitted to a veterinary teaching hospital. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 17:118-123.

PUBLIKATIONER OCH ÖVRIG RESULTATFÖRMEDLING TILL NÄRINGEN

- Albihn, A., Ehrenberg, M., Nyberg, K., Stjernberg-Lewerin, S., Vinnerås, B. 2008. Salmonella hos häst - sällsynt men besvärligt. Ridsport, Avelsextra:58.

<http://www.sva.se/sv/navigera/Forskning/Forskningsomraden/Salmonellasmitta-i-hastrasthagar/>

Muntlig presentation för Nationella Stiftelse och forskningsstiftelsen den 21 jan. 2009.