

Slutrapport för projektet: *Clostridium botulinum* och botulinumtoxin i svenska slaktkycklingbesättningar

BAKGRUND

Botulism är ett förlamningstillstånd som uppkommer efter förgiftning med nervgiftet botulinum-neurotoxin (BoNT). Det finns sju olika typer av BoNT (A-G). Av dessa är i första hand typerna A, B och E kända som orsak till botulism hos människa medan typerna C och D främst orsakar botulism hos fåglar och däggdjur. BoNT produceras i bakteriecellen under tillväxt av den sporbildande bakterien *C. botulinum* och verkar genom att blockera överföringen av nervimpulser till muskulatur. Till dags dato har samtliga internationellt rapporterade utbrott av botulism i kycklingbesättningar förorsakats av förgiftning med BoNT typ C eller mosaikvarianten typ C/D. Även de svenska utbrotten har i samtliga fall förorsakats av BoNT typ C eller C/D. Förgiftning hos tamhöns och andra fåglar uppkommer efter peroralt intag av toxin (via blindtarmsträck från förgiftade fåglar eller via förgiftade kadaver) eller bakterier/bakteriesporer. I experimentella försök har man visat att det kan räcka med så lite som 10 sporer av toxinproducerande *C. botulinum* typ C för att initiera en s.k. toxikoinfektion med endogen bakterietillväxt och toxinproduktion. Bakterietillväxt och toxinproduktion sker i blindtarmen där en mindre mängd toxin resorberas. Den huvudsakliga resorptionen av toxin sker dock i tunntarmen efter peroralt intag av blindtarmsträck med innehåll av både toxin och bakterieceller. Blindtarmsträcket från en infekterad kyckling utgör därmed infektions- och toxinkälla både för kycklingen själv och för kycklingar i dess närhet.

SYFTE OCH STRATEGI

Syftet med projektet har varit att

- kartlägga förekomst och utbredning av den toxinbildande bakterien *Clostridium botulinum* av typ C, C/D i svenska slaktkycklingbesättningar,
- utforska sambandet mellan förekomst av toxinbildande bakterier i tarm och toxin i blod
- undersöka förekomst av botulinumtoxin i blod hos sjuka och friska kycklingar,
- söka identifiera smittkällor,
- bidra till utveckling av metoder för isolering och genetisk karakterisering av toxinbildande *C. botulinum* bakterier .

Projektet har omfattat:

1. Kartläggning av bakteriens förekomst i kycklingbesättningar
2. Projektstudier i anslutning till utbrott och kartläggningar
3. Forsknings- och utvecklingsprojekt för diagnostik av aviär botulism

1. KARTLÄGGNING AV BAKTERIENS FÖREKOMST I SLAKTKYCKLINGBESÄTTNINGAR

Förekomst av toxinbildande *C. botulinum* i slaktkycklingbesättningar har kartlagts genom att analysera bakteriens förekomst i kycklingarnas blindtarmar. Tio tarmar per slaktgrupp undersöktes med en för ändamålet utvecklad PCR analys (se 3.1). Eftersom flera faktorer kan påverka bakteriens spridning och fördelning inom en avdelning - toxinbildande bakterier kan introduceras i en flock vid olika tidpunkter under uppfödningstiden, rörelsemönstret i en flock förändras med stigande ålder, etc. – blir beräkning av antalet tarmar som behövs för att kunna påvisa bakterien inom en flock en avvägningsfråga. Med antagandet om en 25 % -tig prevalens kan, enligt statistiska beräkningar, bakterien påvisas med 95 % säkerhet vid uttag och analys av 10 tarmar per flock.

Kartlägningsstudierna genomfördes i två omgångar: 22/5-4/8 2006 samt 22/9-4/3 2009-2010, den senare som en uppföljande kartläggning.

Material och metoder

• *Provtagning*

Vid 2006 års kartläggning utgjordes undersökningsmaterialet av blindtarmar som skickats in för Campylobacterprogrammets räkning. I omedelbar anslutning till denna provtagning omhändertogs blindtarmarna, förpackades en och en och placerades därefter i -70 C frys för den fortsatta undersökningen med PCR.

2009-10 års kartläggning kom att omfatta samtliga besättningar med slakt på Guldfågel AB i Mörbylånga respektive Lagerbergs i Sölvesborg som undersöktes 2006, med undantag av en besättning som har upphört sedan dess. Dessutom undersöktes kycklingar från 3 besättningar med slakt vid Kristianstad slakteri som varit positiva vid kartläggningen 2006.

Undersökningarna 2009-2010 genomfördes i samarbete med personal på respektive slakteri. Utöver tarmar provtogs också blod från sammanlagt 12 kycklingar per slaktgrupp fördelat på fyra rör. Vid ankomst till SVA förpackades tarmar en och en och frystes in för PCR analys. Blod centrifugerades och serum frystes in för senare toxinanalyser.

• *Analys*

Undersökningar för att påvisa *C. botulinum* typ C och C/D utfördes enligt följande: Ett gram tarmmaterial (innehåll och tarmmaterial) upphettas för att avdöda befintliga bakterieceller. Materialet odlas därefter i en syrefattig (anaerob) miljö för att kvarvarande sporer skall kunna utvecklas till bakterieceller. DNA extraheras och analyseras därefter med PCR-metodik (se 3.1)

Resultat

• *2006 års kartläggning*

I nedanstående tabell redovisas resultatet av 2006 års provtagning. ”Positiva” står för påvisande av toxinbildande *C. botulinum* typ C alternativt C/D.

Slakteri	Antal positiva besättningar/ antal undersökta besättningar	Antal positiva slaktgrupper (avdelningar)/ antal undersökta slaktgrupper (avdelningar)
Knäred	0/7	0/10
Båstad	0/9	0/14
Falkenberg	0/17	0/46
Valla	1/23	1/56(90)
Mörbylånga	4/19	5/77
Sölvesborg	6/12	21/44
Kristianstad	3/35	4(5)/87(105)
Totalt:	14/122	31(32)/332(384)

2006 års undersökningar visade att toxinbildande bakterier kunde påvisas hos kyckling i 31 av sammanlagt 332 provtagna slaktgrupper.

• *2009-10 års kartläggning*

I nedanstående tabell redovisas resultatet av 2009-10 års provtagning.

Slakteri	Antal positiva besättningar/ antal undersökta besättningar	Antal positiva slaktgrupper (avdelningar)/ antal undersökta slaktgrupper (avdelningar)
Mörbylånga	2/19	2/74
Sölvesborg	2/11	5/47
Kristianstad	2/3	8/14(15)
Totalt:	6/33	15/135(136)

Vid kartläggningen 2009-10 kunde positiva slaktkycklingar påvisas i 15 slaktgrupper av 135 undersökta. En jämförelse mellan 2006 och 2009-10 års provtagningar visar en påtaglig minskning av antalet positiva slaktgrupper vid Sölvesborg slakteri; från 21 till fem. Antalet positiva slaktgrupper vid Mörbylånga slakteri minskade från 5 positiva 2006 till 2 positiva 2009-10. Tio besättningar som var positiva 2006 blev negativa vid 2009-10 års kartläggning.

Tre av 2006 års positiva besättningar var återigen positiva, medan tre negativa besättningar 2006 blev positiva 2009-10. Se vidare nedanstående sammanställning.

- *Bakterieförekomsten i positiva besättningar från 2006 och 2009-10 års kartläggningar*

Nedanstående sammanställning ger information om omfattningen av de toxinbildande bakteriernas förekomst i de positiva kartläggningsbesättningarna. Dels ges information om antalet positiva slaktgrupper av antalet undersökta slaktgrupper per besättning, dels information om hur många av provtagna tarmar (10 st.) per slaktgrupp som var positiva. Respektive besättning betecknas med slakterinamn följt av en romersk siffra.

Besättning	2006		2009-10		Utbrott datum
	Antal positiva slaktgrupper (avdelningar)/ antal undersökta	Antal positiva tarmar av 10 undersökta per slaktgrupp	Antal positiva slaktgrupper (avdelningar)/ antal undersökta	Antal positiva tarmar av 10 undersökta per slaktgrupp	
Valla I.	1/1	1	e. u.	e. u.	
Mörbylånga I.	1/5	1	0/5	-	
Mörbylånga II.	2/8	1,1	0/8	-	
Mörbylånga III.	1/6	4	0/6	-	
Mörbylånga IV.	1/6	1	0/6	-	
Mörbylånga V.	0/8	-	1/8	1	
Mörbylånga VI.	0/8	-	1/8	1	
Sölvesborg I.	1/4	1	0/4	-	
Sölvesborg II.	4/10	4, 9, 2,1	0/10	-	aug. 2004
Sölvesborg III.	1/2	1	0/2	-	
Sölvesborg IV.	5/5	10, 10, 10, 9, 9	2/5	2, 2	okt. 2006
Sölvesborg V.	6/6	8, 2, 2, 8, 9, 8	0/6	-	
Sölvesborg VI.	4/5	1, 2, 10, 7	0/5	-	aug. 2003
Sölvesborg VII.	0/3	-	3/6	1, 8, 1	
Kristianstad I.	1 (2)/1(2)	1	0/1(2)	-	
Kristianstad II.	1/6	1	5/6	10, 10, 4, 1, 1	
Kristianstad III.	2/6	2,1	3*/7	6, 2, 10	nov.2007

e. u. ej undersökt

* ej samma avdelningar som 2006

Diskussion

Kartläggningarna har påvisat bakteriens förekomst i 17 av sammanlagt 122 provtagna besättningar (varav 33 har provtagits vid två tillfällen). Sju besättningar utmärker sig genom att flera avdelningar ($\geq 40\%$) inom respektive besättning varit positiva. Bland dessa besättningar återfinns man också en hög andel positiva tarmar per 10 provtagna tarmar. Tre besättningar var positiva vid båda kartläggningstillfällena (markerade med gult). Fyra kartläggningspositiva besättningar har också haft konfirmerade utbrott.

Resultaten från kartläggningsstudierna visar att toxinbildande *C. botulinum* typ C, C/D bakterier förekommer i svenska slaktkycklingbesättningar men i begränsad omfattning.

Resultaten visar också att förekomsten inte är beständig. Ett fåtal besättningar har varit positiva vid båda kartläggningstillfällena och därtill drabbade av utbrott. I dessa fall kan man förmoda att bakterien, på grund av olika omständigheter, (omgivande miljö, stallens utformning, etc.) kommit att bli mer eller mindre stationär. Å andra sidan har kartläggningarna också visat att besättningar med en omfattande bakterieförekomst vid första undersökningstillfället har varit negativa vid den uppföljande undersökningen.

2. POJEKTSTUDIER I ANSLUTNING TILL UTBROTT OCH KARTLÄGGNINGAR

Bakgrund

I anslutning till botulismutbrott under projektiden har organmaterial samlats in för fortsatta laboratorieundersökningar. Även det insamlade tarmmaterialet från kartläggningarna samt serum från den uppföljande kartläggningen har använts till undersökningar för att söka svar på olika frågeställningar.

- *Botulismutbrott 2003-2010*

Nedanstående tabell redovisar antal konfirmerade utbrott från och med det första konfirmerade utbrottet i augusti 2003 fram till och med 2010 års utbrott. Antalet besättningar anges inom parentes.

Antal konfirmerade utbrott (antal besättningar) 2003-2010							
2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
1	4 (3)*	-	3 (3)*	11 (9)	21 (13)	4 (3)	2 (2)

* 2 kycklingbesättningar samt en föräldrabesättning

Sammanlagt drabbades 26 kycklingbesättningar av ett eller flera utbrott under åren 2003-2010. Sjuttion utbrottsbesättningar var negativa vid 2006 års kartläggning (dvs. *C. botulinum* typ C, C/D kunde inte påvisas), en av dessa hade ett utbrott 2004, övriga efter 2006. Två utbrottsbesättningar var negativa både vid 2006 och 2009-10 års kartläggning, men drabbades av utbrott 2007. Av resterande sju utbrottsbesättningar var fyra positiva i samband med kartläggning, tre utbrottsbesättningar förekom inte i någon av kartläggningarna.

- *Botulismutbrottet 2008*

Under perioden februari till och med december 2008 inträffade det hittills största antalet utbrott under ett och samma år med sammanlagt 21 konfirmerade utbrott fördelade på 13 olika besättningar. Majoriteten utbrott inträffade på anläggningar inom ett geografiskt begränsat område och med slakt på Valla slakteri.

2.1 Undersökning av toxin och toxinbildande *C. botulinum* typ C, C/D bakterier hos kyckling med botulism/misstänkt botulism

Material och metoder

För att verifiera en botulismmisstanke tas blod regelmässigt ut för konfirmerande toxinanalys. Under 2008 och vid några enstaka tidigare utbrottstillfällen har också tarm och ibland lever från kycklingar med symptom provtagits. Organmaterialet har därefter analyserats avseende *C. botulinum* typ C/C-D med PCR (blindtarm, lever) och i förekommande fall också använts för odlings- och isoleringsförsök av bakterien (se vidare 3.2).

Resultat

Nedanstående tabell är en sammanställning av resultat från konfirmerande toxinanalyser samt bakteriologiska undersökningar (PCR-analys respektive odling) utförda i samband med botulism/misstänkt botulism.

Tidpunkt utbrott	Toxin	Toxinbildande bakterier		Odling
		Blindtarm	Lever	
maj 06	C-D	påvisat	ej undersökt	
jan. 07	C-D	påvisat	påvisat	isolat från lever
sept. 07	C-D	påvisat	ej undersökt	isolat från tarm
okt. 07 I.	C-D	påvisat	ej undersökt	
okt. 07 II.	C-D	påvisat	ej undersökt	
feb. 08 I.	C	påvisat	påvisat	isolat från lever
feb. 08 II.	ej påvisat	ej påvisat	ej undersökt	
feb. 08 III.	ej påvisat	påvisat	ej undersökt	
feb. 08 IV.	C	påvisat	påvisat	isolat från lever
feb. 08 V.	C-D	påvisat	ej undersökt	isolat från tarm
feb. 08 VII.	C	påvisat	påvisat	isolat från lever
feb. 08 VIII.	C-D	påvisat	ej undersökt	
mars 08 I.	C	påvisat	ej undersökt	
mars 08 II.	C	påvisat	ej undersökt	
mars 08 III.	C-D	påvisat	ej undersökt	
mars 08 IV.	C-D	påvisat	påvisat	isolat från lever
april 08 I.	C-D	påvisat	ej påvisat	
april 08 II.	C-D	påvisat	ej undersökt	isolat från tarm
april 08 III.	ej påvisat	ej påvisat	ej undersökt	
april 08 IV.	ej påvisat	ej påvisat	ej undersökt	
juli 08 I.	C-D	påvisat	ej undersökt	isolat från tarm
juli 08 II.	ej påvisat	ej påvisat	ej undersökt	

Diskussion

Resultaten visar ett entydigt samband mellan förgiftning med botulinumtoxin och förekomst av toxinbildande bakterier - i samtliga fall med konfirmerad botulism, har toxinbildande *C. botulinum* typ C, C/D kunnat påvisas. Kopplingen mellan bakterieförekomst och förekomst av toxin visar också på att botulism uppkommit till följd av en toxikoinfektion.

2.3 Undersökning av blod med avseende på botulinumtoxin i samband med slakt av friska kycklingar efter ett botulismutbrott

Vid fyra olika utbrott mellan åren 2006-2007 kunde uppföljande provtagning för toxinanalys genomföras i samband med slakt av slaktgrupper som vid någon tidpunkt under uppställningsperioden drabbats av botulism. Tidsintervallet mellan utbrott och slakt var 5, 13, 14, respektive 3 dygn. Som jämförelse provtogs och analyserades också blod från 10 slaktgrupper utan tidigare rapporterad botulism.

Resultat

Undersökningarna visade på förekomst av toxin hos kyckling från en av fyra undersökta slaktgrupper. Halten toxin var 100 gånger lägre vid slaktprovtagningen jämfört med provtagningen i samband med utbrottet 5 dygn tidigare.

Vid provtagning av en efterföljande slaktgrupp uppstallad inom samma avdelning som ovanstående positiva slaktgrupp kunde inget toxin påvisas. Inte heller kunde toxin påvisas vid jämförande analys av blod från slaktgrupper utan rapporterad botulism.

Diskussion

Provtagningen i samband med slakt är slumpvis utförd med risk för utspädningseffekter eftersom blod från flera slaktkroppar samlas upp i ett rör. Trots detta har toxin kunnat påvisas i blod uttaget från en av fyra botulismdrabbade slaktgrupper vid normalslakt efter genomgången utbrott.

2.4 Undersökningar avseende förekomst av toxinbildande C. botulinum bakterier hos friska kycklingar efter ett botulismutbrott

I anslutning till 2008 års utbrott genomfördes provtagningar vid Valla slakteri av slaktgrupper från avdelningar där utbrott konstaterats samt av slaktgrupper uppstallade i samma avdelningar vid senare tidpunkt. Syftet var att analysera förekomst av toxinbildande bakterier i samband med slakt av friska kycklingar från avdelningar med genomgången botulismutbrott samt att ta reda på förekomst av bakterien hos kycklingar i en slaktgrupp som stallats upp i samma avdelning som en föregående slaktgrupp med konstaterad botulism, efter rengöring och sanering.

Material och metoder

Provtagning av kycklingar utfördes i anslutning till slakt vid Valla slakteri. I likhet med tidigare kartläggningar provtogs tio tarmar per slaktgrupp (=avdelning) och skickades in till SVA för PCR-analys.

Resultat

Nedanstående tabell sammanfattar resultaten från provtagningarna i anslutning till 2008 års botulismutbrott.

Uppfödare/ Avdelning	Utbrotts- datum	Slaktdatum efter utbrott	Antal positiva tarmar av 10 provtagna	Datum för slakt av efterföljande slaktgrupp	Antal positiva tarmar av 10 provtagna
I./A	080305	080314	4	080702	0
I./B	080218	080313	10	080703	2
I./C	080225	080313	2	080703	0
I./D	080218	080313	9	080704	0
II./2	080217	080307*	0	080627	0
III./1	080216	080306*	0	080626	0
IV./4	080226	080324*	1	090714	0
V./5	080710	080717	1	Provtagning ej utförd	-
VI./4	080326	080415	0	080610	0
VII./vänster	080416	080416	10	080610* 080804	0 0
VIII./3	080210	Provtagning ej utförd	-	080724	0
IX./1	080704	080717	4	Provtagning ej utförd	-
IX./2	080704	080718	10	Provtagning ej utförd	-

*sammanslagen slakt med avdelning utan rapporterad botulism

Resultaten visar förekomst av toxinbildande bakterier hos symptomfria kycklingar från 8 av 12 undersökta slaktgrupper vid slakt **efter ett botulismutbrott**. Två av de fyra negativa slaktgrupperna provtogs vid en sammanslagen slakt med annan avdelning, vilket kan betyda att färre än 10 kycklingar från utbrottsavdelning blev provtagna.

Diskussion

Undersökningarna visar att andelen slaktgrupper med förekomst av toxinbildande bakterier är betydligt högre jämfört med resultaten från kartlägningsstudierna, ca 67 % jämfört med ca 10 %. Vid undersökningen av slaktgrupper som uppstallats i avdelning där botulism konfirmerats hos föregående slaktgrupp, kunde toxinbildande bakterier endast påvisas hos kyckling från en av elva provtagna slaktgrupper. Om förhållandena varit likartade vid en nästkommande uppställning av kyckling i de avdelningar där utbrott inträffat skulle risken för ett nytt utbrott sannolikt vara mycket stor. Dessutom borde andelen slaktgrupper med förekomst av toxinbildande bakterier vara betydligt högre än vad som var fallet. Avsaknad av utbrott, frånvaro av toxinbildande bakterier i undersökta tarmar från efterföljande slaktgrupper tyder på minskad förekomst alternativt avsaknad av toxinbildande bakterier från tidigare botulismutbrott. Dessa resultat visar att vidtagna rengörings- och saneringsåtgärder efter utbrotten har varit framgångsrika.

2.5 Jämförande undersökningar avseende *C. botulinum* typ C, C/D hos kyckling från besättningar utan rapporterad botulism provtagna vid Valla slakteri 2008

Utöver provtagningar i anslutning till utbrotten under 2008 provtogs också kycklingar från besättningar som inte drabbats av botulism. Syftet med denna provtagning var att jämföra förekomst av toxinbildande bakterier i slaktgrupper från besättningar utan rapporterad botulism med slaktgrupper från besättningar där botulism inträffat vid något tidigare tillfälle under året.

Material och metoder

Under en och samma månad, juni 2008, provtogs kycklingar från sammanlagt 8 besättningar, vid Valla slakteri. Provtagningen omfattade 10 blindtarmar per slaktgrupp som efter ankomst till SVA analyserades med avseende på toxinproducerande *C. botulinum* typ C, C/D.

Resultat

Bakterien kunde inte påvisas i någon av de undersökta slaktgrupperna.

2.6 Undersökningar avseende botulinumtoxin i blod vid normalslakt av slaktgrupp utan rapporterad botulism

Som tidigare redovisats föreligger viss risk för att botulinumtoxin fortfarande kan förekomma i blod hos kycklingar i en slaktgrupp som vid någon tidpunkt före slakt drabbats av ett botulismutbrott (se 2.3). För att få svar på frågan om toxin också kan förekomma hos kyckling i en slaktgrupp utan tidigare rapporterad botulism provtogs, utöver blindtarm, också blod från slaktade kycklingar vid 2009-10 års kartläggning.

Material och metoder

För att minimera antalet toxinanalyser undersöktes endast blod från slaktgrupper där *C. botulinum* typ C, C/D kunde påvisas. Ett av fyra uttagna blodprov (= samlingsprov från tre kycklingar) per slaktgrupp undersöktes. I två fall där toxinbildande bakterien kunde påvisas i samtliga analyserade tarmar från en och samma slaktgrupp, undersöktes samtliga fyra blodprov på förekomst av toxin. Syftet med denna utökade analys var att ta reda på andelen positiva prov av uttagna prov inom en slaktgrupp där toxinbildande bakterier återfunnits i 10 av 10 undersökta tarmar.

Resultat

I nedanstående tabell sammanfattas resultaten från utförda toxinanalyser

Besättning/slaktgrupp	Antal positiva tarmar av 10 undersökta	Resultat toxinanalys (antal undersökta prov)
Mörbylånga V./hus 3	1	ej påvisat (1)
Mörbylånga VI./hus 4	1	ej påvisat (1)
Sölvesborg IV./hus 2	2	ej påvisat (1)
Sölvesborg IV./hus 3	2	ej påvisat (1)
Sölvesborg VII./avd. 7	1	ej påvisat (1)
Sölvesborg VII./avd. 8	8	ej påvisat (1)
Sölvesborg VII./avd. 9	1	ej påvisat (1)
Kristianstad II./hus 1	10	påvisat i 4 prov (4)
Kristianstad II./hus 2	10	ej påvisat
Kristianstad II./avd. 1	1	ej påvisat
Kristianstad II./avd. 3	1	ej påvisat
Kristianstad II./avd.4	4	ej påvisat
Kristianstad III./avd. C	2	ej påvisat
Kristianstad III./avd. D	10	påvisat i 2 prov (4)
Kristianstad III./avd. E	6	ej påvisat

Diskussion

Det går inte att utesluta att ytterligare prov från ovanstående slaktgrupper skulle ha blivit positiva om de hade undersökts eftersom endast ett av fyra blodprov togs ut för toxinanalys per slaktgrupp, med undantag av två slaktgrupper där samtliga fyra blodprov undersöktes. I synnerhet gäller det slaktgrupper med påvisade toxinproducerande bakterier i flertalet undersökta tarmar.

Resultaten visar att botulinumtoxin kunde påvisas i två slaktgrupper båda med förekomst av toxinbildande bakterier i 10 av 10 undersökta tarmar. En så stor andel positiva tarmar indikerar en omfattande spridning av bakterien inom en slaktgrupp och därmed ökad potentiell risk för utbredd toxikoinfektion och utveckling av botulism. Att kycklingarna inte uppvisade symtom på botulism vid tidpunkten för slakt kan förklaras med att toxinhalterna låg under den nivå som krävs för att ge symtom hos kyckling. Sammantaget visar undersökningarna att toxin kan förekomma hos kyckling även vid normalslakt. Risken för toxikoinfektion med produktion av toxin ökar med ökad förekomst av toxinbildande bakterier. Man bör därmed vara medveten om

att tecken på botulism inom en slaktgrupp under uppställningstiden också kan innebära en risk för toxinförekomst hos kyckling i samband med slakt.

2.7 Undersökning av foder i anslutning till utbrott

Redan på ett tidigt stadium riktades misstankar mot fodret som en tänkbar smittkälla i samband med 2008 års utbrott. En enkätundersökning som distribuerades till drabbade uppfödare under 2008 och som besvarades av 7 av dessa ger också stöd för en sådan misstanke. När Avdelningen för foder, SVA genomförde en studie 2004-2005 framkom att klostridiesporer kunde återfinnas i 12 % av uttagna prov från pelleterat fjäderfäfoder. Den analysmetod som användes var inte specifik för *C. botulinum* men visade ändå att tillverkningsprocessen inte hade kapacitet att helt inaktivera sporer av *Clostridium spp* i foderråvarorna.

Material och metoder

Sammanlagt undersöktes ett 40-tal foderprov från 10 besättningar, i de flesta fall uttagna i form av provpåsar (förslutet prov av foder som bifogats aktuell foderleverans) eller som prov från aktuellt foder uttaget utanför smittade djurstallar. Från varje provpåse/foderprov uttogs 10 prov för undersökning avseende *C. botulinum* typ C, C/D. Själva analysen omfattar flera steg och inkluderar upphettning i buljong (70°C 15 min.), anrikning i specialmedium, följt av DNA extraktion och PCR-analys.

Resultat

Toxinproducerande *C. botulinum* typ C, C/D kunde påvisas i två foderprov. Ett foderprov togs ut som provpåse med tillväxtfoder i samband med besök av den först drabbade besättningen i februari 2008. Det andra foderprovet togs ut direkt från foderfabriken, från samma foderbatch som levererats till den tredje i ordningen av botulismdrabbade besättningar.

Diskussion

Undersökningar har visat att bakteriesporerna tycks vara mycket ojämnt fördelade i foder. Utvärdering av metoden har dessutom visat att det krävs ca 100-1000 bakteriesporer per gram för att kunna påvisa bakterien i foder medan det kan räcka med 10-100 bakterier per gram för att påvisa bakterien i ett organmaterial. Sannolikt beror metodens lägre känslighet vid analys av foder på konkurrerande närvaro av andra sporbildande bakterier. Ett negativt resultat vid analys av foder utesluter därmed inte närvaro av sporer i tillräcklig mängd för utveckling av botulism mot bakgrund av att så lite som 10 sporer kan räcka för att initiera en toxikoinfektion hos kyckling. Ovanstående resultat är unika i ett internationellt perspektiv. Det finns bara ett fåtal internationella rapporter om fynd av *C. botulinum* typ C i foderprov uttagna i samband med botulismutbrott i fjäderfäbesättningar. Med något undantag har fodret i dessa fall provtagits inom själva anläggningen under pågående botulismutbrott, varför kontaminering med t.ex. avföring från smittade fåglar inte har kunnat uteslutas.

Utöver ovanstående två positiva foderprov har toxinbildande *C. botulinum* typ C, C/D hittills kunnat påvisas i ytterligare två fall i anslutning till botulismutbrott i fjäderfäbesättningar.

3. FORSKNINGS- OCH UTVECKLINGSPROJEKT FÖR DIAGNOSTIK AV AVIÄR BOTULISM

3.1 Utveckling av PCR metodik för diagnostik av *C. botulinum* typ C och mosaikvarianten typ C/D

Bakgrund

Vid flertalet av de svenska utbrotten har förgiftning med både BoNT typ C och D kunnat diagnosticeras. Samma mönster har också rapporterats från Japan där det första fallet av botulism hos slaktkyckling inträffade 1977. Genetiska analyser av isolat från de japanska utbrotten har visat att toxingenen hos den bakterie som förorsakat aviär botulism, till två tredjedelar utgörs av sekvenser för botulinum neurotoxin (BoNT) C och till en tredjedel av

sekvenser för BoNT D. Det toxin som produceras av denna *C. botulinum* typ C/D bakterie är alltså en bland- eller s.k. mosaikform av toxin C och D.

Den PCR metod, en s.k. realtids-PCR, som utvecklats för att användas i kartlägningsstudierna har utformats så att den täcker in både genen för BoNT C och BoNT C/D. Ett positivt PCR-resultat innebär alltså att påvisad gensekvens härrör från en *C. botulinum* bakterie som antingen kan vara av typ C eller av typ C/D. Projektet har finansierats med medel från dåvarande Djurskyddsmyndigheten respektive Myndigheten för samhällsskydd och beredskap. Organmaterialet härrör från provtagningar i anslutning till Botulismprojektet.

Material och metoder

Utveckling och utvärderingen av analysmetoden genomfördes med användning av blindtarmar provtagna vid utbrott samt kända bakteriestammar inklusive olika typer av *C. botulinum* stammar. Blindtarmsproverna härrörde från två slaktkycklingsbesättningar (utbrott 2006 respektive 2007) samt en föräldravesättning (utbrott 2004). För att fastställa om positiva resultat utgjordes av bakterier av typ C/D eller C, kompletterades realtids-PCR undersökningarna med konventionella PCR analyser specifika för BoNT C genen, BoNT D genen, samt BoNT C/D genen.

Resultat

Realtids-PCR analysen av blindtarmsprov från samtliga tre utbrott visade förekomst av bakterier av typ C alternativt C/D. Med kompletterande konventionella PCR-analyser kunde dessutom fastställas att påvisade *C. botulinum* bakterier var av typ C/D.

Diskussion

Utvecklingen av realtids-PCR analysen för *C. botulinum* typ C, C/D har möjliggjort storskaliga undersökningar och var en förutsättning för genomförandet av kartläggningarna. Studien är den första europeiska studien som redovisar förekomst av toxinbildande *C. botulinum* typ C/D i anslutning till botulismutbrott.

3.1 Genetisk karaktärisering och jämförande studier av aviära *C. botulinum* typ C, C/D isolat

Med medel från bl.a. SLF/Botulismprojektet har en omfattande studie genomförts vid enheten för Bakteriologi, SVA, för att isolera, odla och genetiskt karaktärisera olika aviära *C. botulinum* typ C, C/D stammar samt för att undersöka det epidemiologiska sambandet mellan dessa.

Material och metoder

Tretton olika bakterieisolat från fågel ingick i studien. Nio av dessa utgjordes av bakteriestammar isolerade från blindtarm eller lever provtagna i samband med utbrott i svenska slaktkycklingbesättningar 2007 (2 besättningar varav en med utbrott i januari och den andra i september - oktober), respektive 2008 (7 besättningar). Resterande bakteriestammar utgjordes av tre isolat från gråtrut samt ett isolat från slaktkyckling från ett utbrott i Norge. Efter odling och isolering av *C. botulinum* bakterierna från organmaterialet utfördes PCR analyser för karaktärisering av BoNT genen enligt utvecklad metodik (se ovan), samt sekvensanalyser av 16S rRNA genen. Fortsatta analyser för kartläggning av bakterieisolaten utfördes med hjälp av två olika etablerade identifieringsmetoder som modifierats och anpassats till undersökningsmaterialet, pulsfältgel- elektrofores (PFGE), respektive ”randomly amplified polymorphic DNA” (RAPD) analys. PFGE-typningen baseras på fragment av bakteriens DNA-molekyl framtagna med specifika restriktionsenzym, medan RAPD-analysen är en typ av PCR analys med slumpvis amplifiering av små DNA-segment med identiska primers. Erhållna DNA-fragment separeras och visualiseras därefter med gelelektrofores.

Resultat

- *Karaktärisering av BoNT gen*

Av 13 aviära isolat blev 12 positiva i realtids-PCR. Det 13:e isolatet var initialt diagnostiserat som positivt men blev senare negativt, sannolikt beroende på att bakterien förlorade bakteriofagen med genen för BoNT C, C/D, i samband med odling. Kompletterande PCR-analyser visade att 9 av de 12 realtids-PCR positiva isolaten var av C/D-typ. För övriga tre PCR-realtids positiva isolat kunde inte några resultat erhållas med de kompletterande konventionella PCR-analyserna, vilket kan förklaras med att realtids-PCR är känsligare än konventionell PCR.

- *16S rRNA sekvensering*

Av de nio isolaten från svenska slaktkycklingbesättningar hade de sju isolaten från 2008 års utbrott samt isolatet från utbrottet i september-oktober 2007 identiskt sekvenseringsmönster liksom isolaten från gråtrut samt det norska botulismutbrottet. Isolatet från botulismutbrottet i januari 2007 uppvisade däremot ett annat sekvenseringsmönster.

- *Subtypning av C. botulinum typ C, C/D isolat med PFGE och RAPD*

Den fortsatta typningen av de aviära isolaten med PFGE och RAPD metoderna visade att samtliga isolat från 2008 års utbrott samt isolatet från september – oktober 2007 var så gott som identiska, medan isolatet från utbrottet i början av 2007 skilde sig helt från övriga isolat. Den genetiska subtypningen visade också att isolaten från gråtrut samt det norska utbrottet överensstämde med isolerade bakteriestammar från 2008 års utbrott.

Diskussion

Överensstämmelse i det genetiska mönstret mellan olika isolat pekar på ett gemensamt ursprung. Den stora skillnaden mellan isolatet från januari 2007 och övriga isolat kan peka på en ny tillkommen infektionskälla under 2007. Studien är begränsad till att omfatta isolat från och med 2007. Det går därför inte att göra någon jämförelse med utbrott från tidigare år. Med studien har dock ett genetiskt utgångsläge samt metoder etablerats för framtida epidemiologiska undersökningar i samband med botulismutbrott.

PUBLIKATIONER

- *Botulism on a broiler breeder farm in Sweden*, Gunilla Blomqvist, Eva Berndtson, Desirée S. Jansson, Viveka Båverud, Björn Engström, abstract and poster No: WVPC2007-03-09 WVPC Congress, Beijing, China 2007.
- *Comparative analysis of Clostridium botulinum type C isolates from botulism outbreaks in swedish broiler farms*, Skarin H., Blomqvist G., Lindberg A., Aspán, A. and Båverud V., abstract 6th ClosPath International Conference, Rome 19-23 oktober 2009.
- *Surveillance for Clostridium Botulinum type C or C/D in Swedish broilers*, Blomqvist G., Skarin H., Lindberg A., Båverud V. and Engström B., abstract and poster P2-A1, 16th WVPC Marrakesh, Morocco 2009.
- *Molecular characterization and comparison of Clostridium botulinum type C avian strains*. Hanna Skarin, Anna Lindberg, Gunilla Blomqvist, Anna Aspán and Viveca Båverud 2010. Avian Pathology 39 (6), 511-518.
- *Real-time PCR for Clostridium botulinum type C neurotoxin (BoNTC) gene, also covering a chimeric C/D sequence-application on outbreaks of botulism in poultry*, Lindberg A., Skarin H., Knutsson R., Blomqvist G., Båverud V (2010). Vet. Microbiol. Nov 20:146 (1-2):118-23
- *A prevalence study on Clostridium botulinum at Swedish broiler farms*, manuscript in preparation.
- *Outbreaks of botulism in poultry farms in Sweden*, manuscript in preparation.