

‘Wetenschappelijke ondersteuning van een prenormatief onderzoek in de voedingssector in het kader van een duurzame ontwikkeling’

**STUDIE VAN *SALMONELLA* EN
CAMPYLOBACTER KRINGLOPEN BIJ DE
PRODUCTIE VAN BRAADKUIKENS**

Eindverslag

Wetenschappelijke partners:

- Prof. Dr. L. De Zutter, Universiteit Gent
- Dr. L. Herman, Dr. M. Heyndrickx, DVK-CLO
- Prof. Dr. J. P. Butzler, UMC Sint Pieter, VUB
- Dr. D. Vandekerckhove, CODA

INHOUDSTAFEL

| | |
|---|----|
| <u>EXECUTIVE SUMMARY</u> | 3 |
| <u>RATIONALE AND OBJECTIVES</u> | 3 |
| <u>TASK DESCRIPTION</u> | 3 |
| <u>RESULTS</u> | 4 |
| <u>CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS</u> | 5 |
| <u>OPERATIONELE SAMENVATTING</u> | 7 |
| <u>PROBLEEMSTELLING EN DOELSTELLING VAN HET ONDERZOEK</u> | 7 |
| <u>TAAKOMSCHRIJVING</u> | 7 |
| <u>RESULTATEN</u> | 8 |
| <u>BESLUITEN EN AANBEVELINGEN</u> | 9 |
| <u>1. SITUERING VAN HET ONDERWERP</u> | 11 |
| <u>2. PARTNERS</u> | 14 |
| <u>3. TAAKOMSCHRIJVINGEN</u> | 15 |
| <u>4. HET UITGEVOERDE ONDERZOEK</u> | 18 |
| <u>4.1. ONDERZOEK VAN BRAADKUIKENTOMEN VANAF DE BROEIERIJ TOT IN HET SLACHTHUIS</u> | 18 |
| <u>4.1.1. Materiaal en methoden</u> | 18 |
| <u>4.1.2. Algemeen overzicht van de contaminatie met Salmonella en Campylobacter</u> | 24 |
| <u>4.1.3. Gedetailleerde resultaten betreffende de Salmonella contaminatie</u> | 25 |
| <u>4.1.4. Gedetailleerde resultaten betreffende de Campylobacter besmetting</u> | 58 |
| <u>4.2. ONDERZOEK NAAR DE CONTAMINATIE VAN GEREINIGDE TRANSPORTCONTAINERS</u> | 83 |
| <u>4.2.1. Materiaal en methoden</u> | 83 |
| <u>4.2.2. Resultaten</u> | 84 |
| <u>4.3. ONDERZOEK NAAR DE ROL VAN TRANSPORTCONTAINERS EN SLACHTHUIZEN IN DE CONTAMINATIE VAN BRAADKUIKENKARKASSEN</u> | 84 |
| <u>4.3.1. Materiaal en methoden</u> | 85 |
| <u>4.3.2. Resultaten</u> | 85 |
| <u>4.4. BEPALING VAN DE GEVOELIGHEID VAN DE ISOLATIEMETHODE VOOR HET OPSPOREN VAN CAMPYLOBACTER</u> | 92 |
| <u>4.4.1. Materiaal en methoden</u> | 92 |
| <u>4.4.2. Resultaten</u> | 92 |
| <u>5. BESLUITEN VAN HET SALMONELLA EN CAMPYLOBACTER KETENONDERZOEK BIJ BRAADKIPPEN</u> | 94 |
| <u>6. VALORISATIE VAN HET ONDERZOEK</u> | 96 |
| <u>6.1. VERSPREIDING VAN DE RESULTATEN AAN DE BETROKKEN SECTOR</u> | 96 |
| <u>6.2. VERSPREIDING VAN RESULTATEN VIA SYMPOSIA EN TIJDSCHRIFTEN</u> | 97 |
| <u>Lezingen</u> | 97 |
| <u>Posters</u> | 97 |
| <u>Publicatie in vaktijdschrift</u> | 98 |
| <u>6. REFERENTIES</u> | 99 |

Executive summary

Rationale and objectives

The last decade is characterized by a dramatic increase of human cases of salmonellosis and campylobacteriosis in most Western countries. Figures of epidemiological research indicate that about 10 % of human salmonellosis and nearly all campylobacteriosis cases are caused by consumption of contaminated poultry meat. Together with the increase of these two important human food infections, an important persistence of these pathogens is noticed in the production chain of poultry meat. A control program against the presence of *Salmonella* and *Campylobacter* in poultry products has to consider a reduction of the contamination in the whole production chain.

Salmonella and especially *S. Enteritidis* can infect hatching eggs and can so be transmitted from the parent poultry flock to the broiler. This is called vertical transmission. *Salmonella* can also be transmitted horizontally from the environment to the broiler. A policy, focusing only on the vertical transmission by clinical treatment and eradication of the *Salmonella* positive parent flocks, is not effective when the horizontal transmission is not controlled. Literature shows that risk factors for horizontal transmission are fluctuating over time and differ in function of the geographical location of the poultry farms. The research of this project aims to identify the most important *Salmonella* contamination routes in the broiler production chain and to formulate recommendations for an efficient combative program.

The situation differs for *Campylobacter* because this pathogen is only horizontally transmitted to the broilers. Only limited information is available in literature about the *Campylobacter* contamination routes to broilers and poultry meat products and this project aims to add to this knowledge.

Antibiotic resistance patterns often arise in human pathogens and constitute a considerable danger for public health. These resistance patterns are not well known for *Salmonella* and *Campylobacter* isolated from the production chain of poultry meat in Belgium.

Task description

To achieve the objectives of the project a multidisciplinary partnership has been established with the University of Ghent, Veterinarian faculty, Prof. Dr. L. De Zutter (RUG), the Agricultural research centre, Department of animal product quality, Dr. L. Herman and Dr. M. Heyndrickx (DVK-CLO), the Centre for research in veterinary medicine & agrochemistry, Dr. D. Vandekerckhove (CODA) and the UMC Sint-Pieter, Prof. Dr. J.-P. Butzler.

In the period from april 1998 tot march 2000, the *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of 18 broiler flocks was followed in detail from the hatchery to the cooled carcasses in the slaughterhouse (see scheme).

Scheme of the production chain. The shaded zones are studied in this project by the indicated partners.

| Production chain | Parent flocks | Hatchery | Broiler farm | Slaughterhouse |
|------------------|---------------|------------------------------------|---|---|
| Sampling time | | day 22 | 6 weeks 3 samplings | Transport Slaughtering process |
| Sampling of | | one-day old chicks, environment | transport of chicks hygiene of rearing house, animals and environment during rearing | Transport containers Carcasses organs |
| Partners | | DVK-CLO | | RUG |

The *Salmonella* and *Campylobacter* isolates were collected, typed with molecular methods (DVK-CLO and RUG) and from a representative amount of strains, the antibiotic resistance profile was determined (UMC Sint Pieter). The obtained results were analysed by epidemiological statistical methods (CODA).

Results

For the isolation of *Salmonella*, methods with an enrichment in Rappaport Vassiliadis (RV), in 'Diagnostic semi-solid *Salmonella* agar' (Diassalm) and in 'Modified Semi-solid Rappaport-Vassiliadis' media (MSRV) were compared. In total 3150 samples were analysed and a combination of selective enrichment in RV and Diassalm reached a sensitivity of more than 99 %.

Vertical transmission of *Salmonella* was demonstrated in 2 and maybe in 3 flocks. *S. Enteritidis* was isolated from broken egg shells in the hatchery and from the trayliners obtained after transport of one-day old chicks. These strains did not persist in the animals during rearing. *S. Hadar*, isolated from the trayliners did not persist in the broilers. From each of 4 houses a different serotype of *Salmonella* was isolated before arrival of the one-day old chicks: *S. Virchow*, *S. Blockley*, *S. Hadar* and *S. Infantis*. Only the *S. Hadar* and *S. Blockley* contaminations persisted by the animals during rearing. Overshoes were found positive in 10 of the 18 flocks during rearing and obtained a *Salmonella* positive status. The *Salmonella* status was most sensitively determined by the overshoe method. The results indicated, however, that different pairs of overshoes have to be taken to reach a representative sensitivity. In the farm environment, a high contamination level (11 of the 18 farms were positive) was found. In 4 flocks *Salmonella* was isolated from the feed: 2 *S. Mbandaka*, 1 *S. Blockley* and one non-typable isolate. *S. Blockley* persisted in the animals. The most important infection of the broiler flocks happened during the 2 first weeks of rearing, the amount of positive flocks decreased during further rearing. In 12 of the 18 flocks, antibiotics were administered to the broilers during the rearing period. Antibiotic usage influenced the amount of positive overshoes and caecal drops significantly ($p = 0,02$). The intake of movable material in the house after cleaning and disinfection was identified as most important factor for horizontal transmission of *Salmonella* during rearing ($p = 0,08$). The hygiene of the houses, other animals on the farm (inclusive domestic animals, insects, spins, rodents and birds), ditch water, puddles and other surfaces in the environment of the house did not function as a significant source for *Salmonella*. Also the amount of houses on the farm did not influence significantly the *Salmonella* infection of the animals.

With pulsed field gel electrophoresis (PFGE) several *Salmonella* serotypes could be further subdivided in genomic types. *S. Mbandaka* showed the greatest diversity in types; however, only one genomic type was sporadically found in the animals of 2 flocks. In 2 successive flocks in the same broiler house of a rearing farm, the same *S. Hadar* genomic type was dominantly found in the animals; this type can be considered as highly virulent in chickens. This type was already present in the environment before arrival of the one-day-old chicks of the first followed flock. On this rearing farm, another *S. Hadar* genomic type was also present in the environment and in the house before arrival of the one-day-old chicks of the following flock, but this type was not found in the animals and is thus possibly not or less virulent for chickens. The *S. Enteritidis* isolates from the 2 hatcheries and 2 flocks belonged to 2 different genomic types. In one of these flocks, the same *S. Enteritidis* genomic type was isolated from the animals during the whole rearing period. In the other flock, firstly 2 other serotypes were isolated from the animals, and then after 6 weeks rearing a genetically changed *S. Enteritidis* strain (acquisition of a megaplasmid). In a flock followed on a circulation farm, the animals were contaminated with a dominant and a sporadic genomic type of both *S. Blockley* and a non-typeable serotype. The dominant types were transferred to the animals by insufficient hygiene in the house before arrival of the one-day-old chicks, as well as to other houses by footwear. In 2 other flocks, transfer of the same genomic type of a certain serotype could also be demonstrated, respectively between houses and (probably) via feed to the animals.

At the slaughterhouse level, more *Salmonella* positive samples were isolated. No significant correlation was found between the infection during rearing and the contamination of the slaughtered carcasses. The positive faeces from the transport boxes are mostly derived from the transport boxes themselves. The identity of the slaughterhouse was identified as the most determinative factor for the contamination of the carcasses. Analysis indicated that neither the *Salmonella* status of the flock, nor the evisceration

technique nor the time of slaughtering (slaughtered first or not) had a significant influence. Additional research showed that during slaughtering the feathers were found almost systematically contaminated with *Salmonella* even from flocks with a negative status. In some slaughterhouses the carcasses were already highly contaminated with *Salmonella* after plucking. Further processing resulted in a reduction of this contamination. From molecular typing with PFGE, it could be deduced that in only 5 flocks carcasses were contaminated with the same strain as isolated from the live animals. In one flock, carcasses were contaminated with a *S. Hadar* strain which was before only isolated from faeces of a dog on the rearing farm; possibly, unloading of the flock for slaughter can be responsible for this contamination.

No *Salmonella* isolate showed resistance for cefratroxin, ciprofloxacin and kanamycin. About 30% of the isolates were resistant for streptomycin, ampicillin, amoxicillin and tetracyclin, about 12% for nalidixic acid and trimethoprim/sulfamethoxazole. Of the isolates, 42% were resistant for at least 1 antibiotic, 11% for 5 antibiotics. It was striking that all 49 *S. Hadar* strains were resistant for at least 2 antibiotics and most of these were resistant for 3 to 5 antibiotics.

Campylobacter was not found in the hatchery and by the one-day old chicks. Also no isolates were obtained from the rearing house before the arrival of the chicks. The *Campylobacter* status during rearing of the broilers was most sensitively determined by the analysis of caecal drops. The infection of broiler flocks increased continuously during the rearing time. Seven flocks in total were positive for *Campylobacter*; in all cases, *Campylobacter jejuni* was found, in only 1 flock also *Campylobacter coli* was found. In the environment of the house, *Campylobacter* was isolated in 11 flocks. The movable material and especially the footwear of the farmer were determined as significant risk factor ($p = 0,036$). The administration of antibiotics reduced the shedding of *Campylobacter* by positive animals. This effect was however not significant as it was for *Salmonella*.

From typing with PFGE and *flaA*-restriction analysis, it followed that each flock was contaminated with its own *C. jejuni* genomic type. *C. jejuni* is thus genetically a very heterogeneous species. The drinking water was frequently contaminated with the same genomic type as found in the animals, which can cause a further spread of the contamination in the flock. In 2 flocks, the animals were contaminated with several *C. jejuni* genomic types; in one of these flocks, 4 types succeeded each other during rearing. Transfer of the same genomic type from the environment or between houses (probably via footwear) could be demonstrated in several flocks.

After slaughtering, 12 flocks were positive for *Campylobacter* in the caecum content and 13 on the carcasses, which indicate an extra contamination during the slaughtering phase. This extra contamination was not correlated with the identity of the slaughterhouse and started by the transport of the animals. The contamination of the carcasses was clearly correlated with the contamination of the animals during rearing and not with the applied evisceration technique and with the time of slaughtering (slaughtered as first flock or not).

None of the 178 tested *Campylobacter* strains were resistant for amoxicillin/clavulaanzuur 2/1 and only 1 strain for gentamycin. For many antibiotics an intermediary resistance was established. About 27% of the strains were resistant for ciprofloxacin, nalidixic acid or tetracyclin, about 8.5% for erythromycin or ampicillin. Only 6% of the strains were resistant for all tested antibiotics, 13 % were resistant for only 1 antibiotic, 27% for 2, 10% for 3, 2 strains for 4 and 1 strain for 5 antibiotics.

Conclusions and recommendations

- For the isolation of *Salmonella* from poultry related samples, a combination of selective enrichment in RV and Diasalm reached a sensitivity of more than 99%.
- Vertical transmission of *Salmonella* still occurs, which indicates the importance of further efforts to control contamination in the parent flocks.

- Our results show clearly that there is a decrease of the relative importance of the first stages in production and an increase of the relative importance of the last stages (transport of broilers and slaughter). The extensive contamination during rearing is easily transferred from the environment to the broilers in the poultry house. It is important to correctly use the hygiene gate and to decontaminate the footwear.
- *Salmonella* contamination in a flock is most sensitively determined by the overshoe method. For this more than 2 pairs of overshoes has to be taken on different sampling times during rearing. Especially the use of antibiotics during rearing decreases the presence of *Salmonella* in the faeces and in the overshoes and has to be considered in control programs.
- The investigation of the presence or absence of *Salmonella* in certain samples and even serotyping are not always sufficient for the exact determination of contamination sources. In many cases, only molecular typing gives the necessary information for epidemiological links. Pulsed field gel electrophoresis with the use of the appropriate enzymes (*Xba*I and *Not*I) is a technique with sufficient resolution for the serotypes encountered in broilers amongst which the clonal serotype *S. Enteritidis*.
- Faeces from transportcontainers cannot be used to detect a *Salmonella* and *Campylobacter* contamination in flocks presented in the slaughterhouse. These faeces samples can be contaminated by insufficiently cleaned and disinfected containers.
- No correlation exist between the status of the flocks and the contamination of the carcasses in the slaughterhouse. The identity of the slaughterhouse is of significant importance for the carcass contamination with *Salmonella*. An obvious contamination takes place during the first stage of the slaughtering process. The evisceration method and the time of slaughtering (slaughtered as first flock or not) do not have an important influence on the contamination of the final product.
- *Campylobacter* was not isolated from one-day old chicks and in the hatchery. The hygiene of the poultry house did not seem to play an important role in the contamination of the flock. *Campylobacter* is clearly transmitted to the animals during rearing from the environment with the footwear as most important vector. Also the drinking water is an important vector for further spreading of the contamination. This indicates the importance of an efficient hygiene gate and a correct disinfection of the footwear and of the drinking water.
- The presence of *Campylobacter* contamination in a flock is most sensitively investigated by the analysis of caecal drops. The amount of positive drops increases continuously during rearing of a positive flock. As a consequence, the best moment to determine the status of the flock is just before slaughtering. Each positive flock can be contaminated with a different *C. jejuni* genomic type; some flocks can be even contaminated with several (successive) types. The administration of antibiotics during rearing has a reducing effect on the presence of *Campylobacter* in caecal drops. This effect is not significant and more limited than found for *Salmonella*.
- The *Campylobacter* contamination during rearing is quite correlated with the contamination of the final product. This contrasts with the *Salmonella* results. The identity of the slaughterhouse is not a significant factor for the final carcass contamination with *Campylobacter*. Nevertheless, an extra contamination of the broilers is noticed during transport and during the slaughtering process, which indicates the importance of hygiene during these steps. The evisceration method and the time of slaughtering (slaughtered as first flock or not) do not have a significant influence on the contamination of the final product.
- *Salmonella* and *Campylobacter* isolates are both showing a considerable antibiotic resistance. Of the *Salmonella* strains 42% were resistant for at least 1 antibiotic, 11% of the strains were resistant for 5 antibiotics. The very high resistance of *S. Hadar* isolates is striking. Of the *Campylobacter* isolates 94% were resistant for at least 1 antibiotic, 2 strains were resistant for 4 and 1 strain for 5 antibiotics.

Operationele samenvatting

Probleemstelling en doelstelling van het onderzoek

In de Westerse wereld wordt de laatste decennia een dramatische toename vastgesteld van menselijke salmonelloses en campylobacterioses. Cijfers van epidemiologische onderzoeken tonen aan dat ongeveer 10 % van de menselijke salmonelloses en nagenoeg alle campylobacterioses te wijten zouden zijn aan consumptie van besmet pluimveevlees. Naast een stijging van deze twee belangrijke voedselinfecties bij de mens wordt een grote persistentie vastgesteld van deze pathogenen in de productieketen van pluimveevlees. Een bestrijdingsprogramma tegen de aanwezigheid van *Salmonella* en *Campylobacter* in pluimveeproducten moet een verlaging van de besmetting in de volledige productieketen nastreven.

Salmonella en vooral *S. Enteritidis* kan het broedei besmetten en zo overgaan van het moederdier naar het mestkuiken. Dit noemt men de verticale transmissie. Daarnaast is er ook een horizontale overdracht van *Salmonella* vanuit de omgeving naar de mestkuikens mogelijk. Een éézijdige bestrijding van de verticale transmissie via klinische behandeling en aflachting van *Salmonella* positieve moederdieren heeft geen zin als de horizontale besmetting onvoldoende onder controle is. Uit de literatuur blijkt dat de risicofactoren voor horizontale transmissie evolueren in de loop van de tijd en verschillen naargelang de geografische ligging van de pluimveebedrijven. Het onderzoek van dit project beoogt de belangrijkste besmettingsroutes van *Salmonella* in de productieketen van braadkuikens in kaart te brengen en aanbevelingen te geven voor een efficiënte bestrijding.

De situatie voor *Campylobacter* is verschillend omdat er alleen horizontale overdracht naar de mestkuikens aangetoond werd. Over het algemeen wordt in de literatuur slechts beperkte informatie weergevonden over de besmettingsroutes van *Campylobacter* bij braadkippen en pluimveevlees en beoogt dit project dit hiaat aan te vullen.

Vaak ontstaan er antibiotica resistentie patronen die een groot gevaar kunnen vormen voor de volksgezondheid. Deze resistentiepatronen bij *Salmonella* en *Campylobacter* isolaten uit de productieketen van pluimveevlees zijn weinig gekend in België en dit project beoogt deze kennis aan te vullen.

Taakomschrijving

Om de gestelde doelstellingen te bereiken werd een multidisciplinair partnerschap samengesteld bestaande uit de Universiteit Gent, Faculteit Diergeneeskunde, Prof. Dr. L. De Zutter (RUG), het Centrum voor Landbouwkundig Onderzoek, Departement voor de Kwaliteit van Dierlijke Producten, Dr. L. Herman en Dr. M. Heyndrickx (DVK-CLO), het Centrum voor Onderzoek in Diergeneeskunde en Agrochemie, Dr. D. Vandekerckhove (CODA) en het UMC Sint-Pieter, Prof. Dr. J.-P. Butzler.

In de periode van april 1998 tot maart 2000 werd de *Salmonella* en *Campylobacter* contaminatie bij 18 braadkuikentomen in detail gevolgd vanaf de broeierij tot en met de gekoelde karkassen in het slachthuis (zie onderstaand schema).

Schema van de productieketen. Zones in het grijs werden in het project onderzocht door de partners.

| Productieketen | Ouderdieren | Broeierij | Braadkuikenmesterij | Slachthuis |
|-------------------|-------------|----------------------------|---|---|
| Bemonsteringstijd | | dag 22 | 6 weken 3 bemonsteringen | transport slachtproces |
| Bemonstering van | | ééndagskuikens omgeving | transport van kuikens hygiëne van stallen dieren en omgeving gedurende opgroei | transportcontainers karkassen organen |
| Partners | | DVK-CLO | | RUG |

De *Salmonella* en *Campylobacter* isolaten werden verzameld, getypeerd met moleculaire technieken (DVK-CLO en RUG) en van een representatief deel van de stammen werd het antibiotica resistentieprofiel bepaald (UMC Sint Pieter). De verkregen dataset werd verwerkt via epidemiologische statistische technieken (CODA).

Resultaten

Voor de isolatie van *Salmonella* werden methodes met een verrijkingstap in Rappaport Vassiliadis (RV), in 'Diagnostic semi-solid *Salmonella* agar' (Diasalm) en in 'Modified Semi-solid Rappaport-Vassiliadis' media (MSRV) vergeleken. In totaal werden 3150 monsters getest en bleek een combinatie van selectieve aanrijking in RV en Diasalm een sensitiviteit van meer dan 99% te bereiken.

Verticale transmissie van *Salmonella* werd aangetoond in 2 en misschien in 3 tomen. *S. Enteritidis* werd geïsoleerd uit eierschalen in de broeierij en uit de inlegvellen tijdens het transport van de ééndagskuikens. Deze stammen persisteerden bij de dieren tijdens de opfok. *S. Hadar*, geïsoleerd uit de inlegvellen bleek niet te persisteren bij de dieren. Vóór de komst van de ééndagskuikens werd uit 4 stallen telkens een verschillende serotype van *Salmonella* geïsoleerd: *S. Virchow*, *S. Blockley*, *S. Hadar* en *S. Infantis*. Slechts de *S. Hadar* en *S. Blockley* besmettingen persisteerden bij de dieren tijdens de opfok. In totaal leverden 10 van de 18 tomen positieve overshoes tijdens de opkweek en kregen een *Salmonella* positieve status. De *Salmonella* status werd duidelijk het gevoeligst bepaald door de 'overshoe'-methode. Het onderzoek toonde evenwel aan dat meerdere paren overshoes vereist zijn om een representatieve gevoeligheid te bereiken. In de omgeving van de boerderijen werd een hoog besmettingsniveau (11 van de 18 bedrijven positief) vastgesteld. In 4 tomen werd een *Salmonella* stam uit het voeder geïsoleerd: 2 *S. Mbandaka*, 1 *S. Blockley* en een niet typeerbaar isolaat. De *S. Blockley* persisteerde verder bij de dieren. De belangrijkste besmetting van tomen braadkuikens vond plaats tijdens de eerste 2 weken van de opkweek, tijdens de verdere opkweek daalde het aantal positieve tomen. Gedurende de opfok werd in 12 van de 18 tomen antibiotica aan de dieren toegediend. Antibioticagebruik bleek een significante invloed ($p=0,02$) te vertonen op het aantal positieve overshoes en cecale drops. De belangrijkste factor voor horizontale transmissie van *Salmonella* tijdens de opkweek bleek het binnenbrengen van verplaatsbaar materieel na reiniging en desinfectie in de stallen ($p = 0,059$). Hierbij bleek vooral het schoeisel van de boer belangrijk te zijn ($p = 0,08$). De stalhygiëne, andere dieren op de boerderij (inclusief huisdieren, insecten, spinnen, knaagdieren en vogels), slootwater, plassen en andere oppervlakken in de omgeving van de stal fungeerden niet als significante bron van *Salmonella*. Ook het aantal stallen op de boerderij had geen significante invloed op de *Salmonella* besmetting van de dieren.

D.m.v. pulsed field gel elektroforese (PFGE) konden verschillende *Salmonella* serotypes verder onderverdeeld worden in genomische types. *S. Mbandaka* vertoonde de grootste diversiteit in types. Er werd slechts 1 genomisch type sporadisch teruggevonden in de dieren van 2 tomen. In 2 opeenvolgende tomen in dezelfde stal van een mestbedrijf werd hetzelfde *S. Hadar* genomisch type dominant teruggevonden in de dieren; dit type kan als hoogvirulent voor kippen beschouwd worden. Dit type was reeds aanwezig in de omgeving voor aankomst van de ééndagskuikens van de eerst gevolgde toom. Op dit mestbedrijf was nog een ander *S. Hadar* genomisch type aanwezig in de omgeving en in de stal voor aankomst van de ééndagskuikens van de tweede gevolgde toom, doch dit type werd niet teruggevonden in de dieren en is dus mogelijks niet of minder virulent voor kippen. De *S. Enteritidis* isolaten uit de 2 broeierijen en 2 tomen behoorden tot 2 verschillende genomische types. Terwijl bij de ene toom hetzelfde *S. Enteritidis* type gedurende de gehele opfok uit de dieren werd geïsoleerd, werden bij de andere toom eerst 2 andere serotypes en pas na 6 weken opfok een genetisch gewijzigde *S. Enteritidis* stam (verwerving van een megaplasmide) uit de dieren geïsoleerd. In een toom gevolgd op een circulatiebedrijf waren de dieren besmet telkens met een dominant en een sporadisch genomisch type van *S. Blockley* en van een niet-typeerbaar serotype. De dominante types werden overgedragen naar de dieren door onvoldoende hygiëne in de stal voor aankomst van de ééndagskuikens, alsook naar andere stallen via schoeisel. In 2 andere tomen kon eveneens overdracht van hetzelfde genomisch type van een bepaald serotype aangetoond worden, respectievelijk tussen verschillende stallen en (waarschijnlijk) vanuit het voeder naar de dieren.

Op het slachthuisniveau vertoonden nog meer tomen positieve monsters voor *Salmonella*. Er werd geen correlatie gevonden tussen de contaminatie gedurende de opkweekperiode en de contaminatie van de geslachte karkassen. De positieve feces uit de transportcontainers weerspiegelden vooral de besmetting van de transportcontainers zelf. De identiteit van het slachthuis was de meest bepalende factor voor de contaminatie van de karkassen. Uit analyse bleek, dat noch de *Salmonella* status van de toom, noch de gebruikte evisceratietechniek, noch het tijdstip van slachting (toom als eerste geslacht of niet) een significante invloed had. Uit moleculaire typering met PFGE volgde dat slechts bij 5 tomen de karkassen ook waren besmet met dezelfde stam als bij de levende dieren. Bij één toom waren de karkassen besmet met een *S. Hadar* stam die op het mestbedrijf enkel uit de hondenefeces was geïsoleerd; het uitladen van de toom kan hier verantwoordelijk zijn voor deze besmetting.

Geen enkele *Salmonella* stam was resistent voor cefratroxine, ciprofloxacin en kanamycine. Ongeveer 30% van de stammen was resistent voor streptomycine, ampicilline, amoxicilline of tetracycline, ongeveer 12% voor nalidixinezuur en trimethoprim/sulfamethoxazole. Van de stammen waren 42% resistent voor ten minste 1 antibioticum, 11% van de stammen was resistent voor 5 antibiotica. Opvallend was dat alle 49 *S. Hadar* resistent waren voor minstens 2 antibiotica en de het overgrote deel van de stammen voor 3 tot 5 antibiotica.

Campylobacter werd niet aangetoond in de broeierij en bij ééndagskuikens. Ook kon in de stal vóór de komst van de ééndagskuikens geen *Campylobacter* worden aangetoond. De *Campylobacter* status gedurende de opkweek van de braadkuikens werd duidelijk met de grootste gevoeligheid bepaald door het testen van cecale drops. De besmetting van tomen braadkuikens steeg met een zekere regelmaat gedurende de gehele opfoktijd. In totaal bleken de kippen in 7 tomen positief voor *Campylobacter*; in alle gevallen betrof het *Campylobacter jejuni*, slechts 1 toom was ook besmet met *Campylobacter coli*. In de omgeving van de stal werd in 11 tomen *Campylobacter* geïsoleerd. Het verplaatsbaar materiaal en vooral het schoeisel van de boer blijkt een significante risicofactor te zijn ($p=0,036$). Het toedienen van antibiotica blijkt een reducerend effect te hebben op de uitscheiding van *Campylobacter* kiemen bij positieve dieren. Dit effect ($p = 0,139$) is echter niet significant zoals bij *Salmonella*.

Uit typering met PFGE en *flaA*-restrictie-analyse volgt dat elke toom besmet was met een eigen *C. jejuni* genomisch type. *C. jejuni* is bijgevolg een genetisch zeer heterogeen species. In het drinkwater werd frequent hetzelfde genomisch type teruggevonden als in de dieren, wat een verder verspreiding in de toom kan veroorzaken. In 2 tomen waren de dieren besmet met meerdere *C. jejuni* genomische types; in één van deze tomen volgden 4 types elkaar op tijdens de opfok. Overdracht van hetzelfde genomische type vanuit de omgeving of tussen stallen (waarschijnlijk via schoeisel) kon in verschillende tomen aangetoond worden.

Na het slachten waren 12 tomen *Campylobacter* positief in de cecuminhoud en 13 op de karkassen wat wijst op een bijkomende besmetting tijdens de slachthuisfase. Deze extra besmetting is niet gecorreleerd met de identiteit van het slachthuis en begint bij het transport van de dieren. De besmetting van de karkassen is duidelijk gecorreleerd met de besmetting van de dieren tijdens de opfok en niet met de gebruikte evisceratietechniek en met het tijdstip van slachten (als eerste geslacht of niet).

Geen enkele van de 178 onderzochte *Campylobacter* stammen was resistent voor amoxicilline/clavulaanzuur 2/1 en slechts 1 stam voor gentamycine. Bij *Campylobacter* werd voor veel antibiotica een intermediaire resistentie vastgesteld. Ongeveer 27% van de stammen waren resistent voor ciprofloxacin, nalidixinezuur of tetracycline, ongeveer 8,5% voor erythromycine of ampicilline. Slechts 6% van de stammen was gevoelig voor alle antibiotica, 13% was resistent voor slechts 1 antibioticum, 27% voor 2, 10% voor 3, 2 stammen voor 4 en 1 stam voor 5 antibiotica.

Besluiten en aanbevelingen

- Voor de isolatie van *Salmonella* uit pluimvee gerelateerde stalen bleek een combinatie van selectieve aanrijking in RV en Diasalm een sensitiviteit van meer dan 99% te bereiken.
- Verticale overdracht van *Salmonella* komt nog steeds voor wat het belang aantoont van verdere inspanningen bij de moederdieren.

- Wat de risicofactoren voor *Salmonella* besmetting tijdens de opfok betreft, tonen onze resultaten duidelijk een verminderd relatief belang van de eerste stadia in de productieketen en een toename van het relatief belang van de laatste stadia (transport van de kuikens en slachting). De aanzienlijke besmetting gedurende de opkweek wordt overgedragen vanuit de omgeving naar de dieren in de stal. Het is van groot belang de hygiënepoort correct te gebruiken en het schoeisel te ontsmetten.
- *Salmonella* besmetting in een toom wordt het meest gevoelig aangetoond met de ‘overshoe’ methode. Hierbij moeten meer dan 2 paar ‘overshoes’ onderzocht worden op verschillende tijdstippen tijdens de opfok. Vooral het gebruik van antibiotica gedurende de kweek vermindert de aanwezigheid van *Salmonella* in de feces en de ‘overshoes’.
- Het nagaan van de aan- of afwezigheid van *Salmonella* in bepaalde stalen en zelfs serotypering zijn soms niet voldoende om exact de contaminatiebronnen op te sporen. In vele gevallen geeft enkel moleculaire typering de noodzakelijke informatie om epidemiologische verbanden te leggen. Pulsed field gel elektroforese met het gebruik van de geschikte restrictie-enzymen (*XbaI* en *NotI*) is een techniek met een voldoende resolutie voor de in braadkippen voorkomende serotypes waaronder ook het klonale serotype *S. Enteritidis*.
- Mest uit transportcontainers kan niet gebruikt worden voor het opsporen van een *Salmonella* en *Campylobacter* contaminatie bij de aangevoerde braadkuikens in het slachthuis. Immers deze monsters kunnen besmet worden door onvoldoende gereinigde en ontsmette transportcontainers.
- De *Salmonella* besmetting gedurende de opkweek is niet nauw verbonden met de besmetting van het eindproduct. De identiteit van het slachthuis is belangrijk voor de uiteindelijke karkasbesmetting met *Salmonella*. Een opmerkelijke contaminatie vindt plaats tijdens het eerste deel van het slachtproces. De evisceratietechniek en het tijdstip van de slachting (eerste geslacht of niet) hebben geen belangrijke invloed op de besmetting van het eindproduct.
- *Campylobacter* werd niet aangetoond bij de ééndagskuikens en in de broeierij. De hygiëne van het huis schijnt geen belangrijke rol te spelen in de besmetting van een toom. *Campylobacter* wordt duidelijk overgedragen naar de dieren tijdens de opfok vanuit de omgeving met het schoeisel als belangrijke vector. Ook het drinkwater zorgt voor een verdere verspreiding van de besmetting. Dit wijst op het belang van een efficiënte hygiënesluis en een correcte ontsmetting van het schoeisel en van het drinkwater.
- De meeste gevoelige methode om de aanwezigheid van *Campylobacter* besmetting in een toom te onderzoeken, bleek de analyse van ‘cecale drops’. Bij een positieve toom stijgt het aantal positieve cecale drops gestaag tijdens de opfok. Dit heeft voor gevolg dat de status van de toom het best wordt bepaald juist vóór het slachten. Iedere positieve toom kan besmet zijn met een eigen *C. jejuni* type; sommige tomen kunnen zelfs besmet zijn met verschillende (opeenvolgende) genomische types. Het gebruik van antibiotica gedurende de kweek heeft een reducerend effect op de aanwezigheid van *Campylobacter* in de cecale drops. Dit effect is niet significant en geringer in vergelijking met het effect op de uitscheiding van *Salmonella* in de feces.
- De *Campylobacter* besmetting gedurende de kweek is vrij nauw verbonden met de besmetting van het eindproduct. Dit is in tegenstelling tot de bevindingen voor *Salmonella*. De identiteit van het slachthuis is geen significante factor voor de uiteindelijke karkasbesmetting met *Campylobacter*. Toch treedt er tijdens het transport en het slachten van de kippen een bijkomende besmetting op van de kippen en de karkassen wat het belang aantoont van hygiëne tijdens het transport en het slachten. De evisceratietechniek en het tijdstip van de slachting (eerste geslacht of niet) hebben geen belangrijke invloed op de besmetting van het eindproduct.
- Zowel bij de *Salmonella* als bij de *Campylobacter* isolaten werd een aanzienlijke antibiotica resistentie vastgesteld. Van de *Salmonella* stammen waren 42% resistent voor ten minste 1 antibioticum, 11% van de stammen waren resistent voor 5 antibiotica. Opvallend was de zeer hoge resistentie bij *S. Hadar*. Van de *Campylobacter* stammen waren 94% resistent voor ten minste 1 antibioticum, 2 stammen waren resistent voor 4 en 1 stam voor 5 antibiotica.

1. Situering van het onderwerp

De grootschaligheid van de huidige opfokmethodes draagt bij tot een verhoogde persistentie van pathogenen in en rond intensieve veebedrijven. Op dit moment worden een groot aantal voedselinfecties ten gevolge van de consumptie van vlees in het algemeen en van vlees en producten van gevogelte in het bijzonder, vastgesteld. Beide trends zijn nauw met elkaar verbonden en twee micro-organismen spelen hierbij een belangrijke rol: *Salmonella* en *Campylobacter*.

De laatste decennia werden gekenmerkt door een dramatische toename van menselijke gevallen van salmonellose en campylobacteriose in de meeste Westerse landen (bv. in het Verenigd Koninkrijk is het aantal gevallen van *Campylobacter* infecties toegenomen van 15000 in 1983 tot 54987 in 1999. In een aantal van deze landen wordt evenwel de laatste jaren een reductie van het aantal *Salmonella* infecties (bv. in Denemarken een daling van 5015 gevallen in 1997 tot 3268 gevallen in 1999 (Anon., 2000) vastgesteld als gevolg van een terugdringing van de *Salmonella* contaminatie bij nutsdieren. In tegenstelling hiermee tonen de verzamelde gegevens van het *Salmonella* en *Shigella* referentiecentrum van het WIV voor België een stijgende tendens tot op heden. Van 6092 gevallen in 1986 is het aantal gevallen opgelopen tot 15774 in 1999. Deze stijging is hoofdzakelijk te wijten aan de sterke stijging van het aantal infecties veroorzaakt door *S. Enteritidis* (van 4,9% in 1986 tot 66,5% in 1999, Ducoffre, 2000). In de periode 1986-2000 is het aantal gevallen van humane *Campylobacter* infecties gestegen van 2350 tot 6990. Het aantal ziektegevallen voor beide pathogenen is zeker onderschat gezien het onvolledig onderzoeken en melden van individuele ziektegevallen en dit zeker bij campylobacteriose.

Cijfers van epidemiologische onderzoeken in Denemarken (bacteriofaag type en DNA vingerafdrukken) (Anon., 2000) tonen aan dat ongeveer 10 % van de oorzaken van menselijke *Salmonella* gevallen in 1999 te wijten was aan besmet vlees van gevogelte. In de Verenigde Staten, schat men dat ongeveer 50 % van de *Salmonella* infecties te wijten is aan de consumptie van vlees van gevogelte en producten van gevogelte (Henson, 1997). Het behandelen en consumeren van besmet pluimveevlees wordt beschouwd als belangrijke risicofactor voor *Campylobacter* infecties (Pearson et al, 2000; Shane, 2000; Hanninen et al., 2000).

In tegenstelling tot meerdere van de ons omringende landen, werd totnogtoe in België geen diepgaand onderzoek uitgevoerd naar de oorzaak van de stijging van salmonellose en campylobacteriose gevallen, noch naar de precieze herkomst van deze pathogenen. Evenwel zijn sinds 1997 voor België cijfers beschikbaar over het voorkomen van o.a. *Salmonella* en *Campylobacter* op diverse soorten vers vlees bij de productie. Het besmettingspercentage van braad- en soepkipkarkassen op slachthuisniveau bedroeg in 1999 respectievelijk 37% en 92% voor *Salmonella* en 75% en 90% voor *Campylobacter* (Daube & De Zutter, 2000). Het voorkomen van *Salmonella* in Belgische leghennentomen werd geschat op 30% met een hoge prevalentie voor *S. Enteritidis* (72% van de isolaten), het voorkomen in braadkuikentomen zou 36% bedragen met enkel 14% van de isolaten geïdentificeerd als *S. Enteritidis* (Monitoring Programma 1997, Veterinaire Diensten – Ministerie van Middenstand en Landbouw). Een epidemiologisch onderzoek in het Verenigd Koninkrijk toonde aan dat 76 % van de 49 onderzochte tomen positief waren voor *Campylobacter* (Humphrey et al., 1993). Het voorkomen van *C. jejuni* in braadkuikentomen en op braadkuikenkarkassen is zeer hoog en werd door een Duitse studie geschat op respectievelijk 45,9% en 43% (Atanassova & Ring, 1999).

Omwille van het belang van de salmonellose en campylobacteriose problematiek en het duidelijke verband met de besmetting van pluimveevlees hebben diverse landen al initiatieven genomen om de besmettingsgraad van voedingsmiddelen te verminderen. De problematiek werd ook al besproken in verschillende werkgroepen van de WHO (WHO verslag, 1994). Om de consument te beschermen heeft de EU de Zoönose 92/117/EEC uitgevaardigd. Deze richtlijn beschrijft enkel de effectieve maatregelen voor de bestrijding van *S. Enteritidis* en *S. Typhimurium* bij ouderdieren.

De Scandinavische landen hebben een bewakingsprogramma opgezet om *Salmonella* te weren uit hun pluimveestapel. Om dit te verwezenlijken worden in deze landen sinds vele jaren gegevens verzameld aan de hand van een intensieve monitoring van de verschillende stappen in de pluimveesector. Dit brengt met zich mee, dat in deze landen de besmettingsgraad van het gevogelte vrij goed gekend is.

Bewakingsprogramma's voor *Salmonella* werden ook in Nederland gestart (Van De Giessen et al., 1992). Voor *Campylobacter* werd de situatie eveneens grondig bestudeerd. In Nederland is men in het midden van de jaren 90' opgestart met het "Plan van Aanpak" waarbij een in- en uitgangscntrole in broeierijen, vleeskuikenbedrijven en slachthuizen op de aanwezigheid van *Salmonella* en *Campylobacter* plaatsvindt, gevolgd door hygiënische maatregelen. (Westendorp, 1997). Dit Plan resulteerde in een substantiële reductie van *Salmonella* in pluimveeproducten.

Naargelang de invasiviteit van de *Salmonella* kiemen is, naast de horizontale overdracht, de verticale transmissie van het moederdier naar het mestkuiken mogelijk. Een éézijdige bestrijding van de verticale transmissie via klinische behandeling en afslachting heeft echter geen zin indien de horizontale besmetting niet onder controle is. Bij het verder terugdringen van *Salmonella* infecties in Denemarken, blijkt inderdaad dat een bepaald percentage van de bedrijven positief blijft scoren, wat volgens onderzoek eerder te wijten zou zijn aan persistentie van de infectie via kringlopen dan aan nieuwe infecties via verticale transmissie (Baggesen et al., 1992; Brown et al., 1992). In diverse studies werd getracht deze kringlopen te ontrafelen en risicofactoren voor *Salmonella* contaminatie op te sporen. Volgende risicofactoren voor horizontale transmissie worden vermeld:

1. Onvoldoende reiniging en desinfectie van hokken welke aanleiding kan geven tot een contaminatie van de volgende opgezette toom
2. Slechte bedrijfshygiëne
3. Contaminatie van het voeder
4. Aantal hokken op het bedrijf
5. Opkweek in de herfst
6. Kevers en knaagdieren op het bedrijf.

Uit de literatuur blijkt, dat de bijdrage van risicofactoren evolueert in de loop van de tijd en verschilt naargelang de geografische ligging van de pluimveebedrijven.

Om de *Salmonella* besmetting van pluimveevlees op een efficiënte manier onder controle te krijgen, is het van primordiaal belang onderzoek uit te voeren naar risicofactoren voor *Salmonella* contaminatie bij de productie van pluimvee. Hierbij is het aangewezen om gebruik te maken van gesofisticeerde moleculaire typeringstechnieken om kringlopen op een wetenschappelijk gefundeerde wijze te ontrafelen.

De situatie voor *Campylobacter* is verschillend omdat er alleen horizontale overdracht aangetoond werd. Bij een studie in Nederland werd inderdaad gewezen op een horizontale

transmissie van *Campylobacter* vanuit de omgeving als de meest waarschijnlijke wijze van overdracht (Jacobs-Reitsma et al., 1995). Epidemiologische onderzoeken tonen aan dat de tomen braadkuikens besmet zijn met *C. jejuni* (Reitsma, 1994). *Campylobacter* vrije tomen worden enkel vastgesteld op bedrijven waar een uitzonderlijk hoog niveau van hygiëne wordt aangehouden. Tomen zouden besmet worden als de dieren 2 tot 7 weken oud zijn en de infectie wordt snel verspreid naar de meeste dieren van de toom (Reitsma, 1994, Evans & Sayers, 2000, Gregory et al., 1997) Evans & Sayers (2000) vonden geen evidentie voor overleving van *Campylobacters* in braadkuikenhokken na een goede reiniging en desinfectie. Zij vonden een correlatie tussen de *Campylobacter* besmetting van de dieren en de aan- of afwezigheid van effectieve hygiëne barrières zoals de algemene kwaliteit van het hok, het gepast gebruik van ontsmettingsbakken voor de laarzen en een hoog hygiëneniveau van de uitrusting voor drinkwater. Het belang van een goede ontsmetting van de laarzen in de hygiënesluis werd ook vermeld door Humphrey et al. (1993). Op boerderijen met geïnfecteerde tomen werd *Campylobacter* ook geïsoleerd uit varkens, laarzen en vogels (Gregory et al., 1997; Craven et al., 2000). In de meeste gevallen resulteren infecties bij de dieren in een besmetting van het eindproduct zonder dat er tijdens het slachtproces iets aan kan worden verholpen. Vele auteurs spreken van een *C. jejuni* besmetting van braadkuikens in de detailhandel die varieert van 20-100 % (Anon., 1994).

Vaak ontstaan er antibiotica resistentie patronen die een groot gevaar kunnen vormen voor de volksgezondheid. De kennis omtrent deze resistentiepatronen bij *Salmonella* en *Campylobacter* en inzonderheid hun voorkomen op braadkuikens (gedurende de hele productiecycclus) is onvoldoende gekend in België. Anderzijds situeert de problematiek van antibiotica resistentie zich ook in de overdracht naar het milieu waarbij andere voedingsmiddelen (groenten, vis en schaaldieren) besmet kunnen worden door resistente *Salmonella* bacteriën. Bovendien kan via plasmiden en fagen tengevolge van transductie (DNA persistentie in het milieu) deze antibiotica resistentie overgedragen worden op andere *Salmonellastammen* en zelfs op andere micro-organismen (Schmieger et al., 1997; Novick, 1981), waardoor deze problematiek een nog grotere dimensie dreigt te krijgen.

In de meeste landen wordt multipole antibiotica resistentie bij *Salmonella* een groot probleem. Meer dan 90 % van de *Salmonella* stammen, geïsoleerd uit vis en schelpdieren en onderzocht op resistentie t.o.v. 10 antibiotica waren resistent aan bacitracine, penicilline en novobiocine. Meer dan 95 % van deze stammen waren afkomstig van monsters verzameld in gebieden met een hoge besmettingsgraad door de dichte nabijheid van dierlijke en menselijke activiteiten waar antibiotica dikwijls toegepast worden (Hatha & Laksgmanaperumalsamy, 1995). Ook gegevens van Frankrijk wijzen erop, dat multipole antibiotica resistentie vaak voorkomt bij stammen afkomstig van vee en pluimvee (Martel & Coudert, 1993).

Dat de situatie ernstig wordt, blijkt uit het feit dat in de Verenigde Staten, het Verenigd Koninkrijk, Oostenrijk en Duitsland een stijgend aantal gevallen van voedselvergiftiging gemeld werden via een nieuw type van *S. Typhimurium*. Dit *S. Typhimurium* DT104 type is resistent voor ten minste 5 verschillende antibiotica. In 1996 is dit type verantwoordelijk geweest voor 20% van de menselijke *Salmonella* gevallen in het Verenigd Koninkrijk. Dit type toont een verhoogde sterfte (3%) in vergelijking met andere *Salmonella* stammen (Humphrey T., PHLS Exeter, personal communication).

Het probleem van de resistentie van antibiotica van *Campylobacter* is voor het grootste deel geconcentreerd op de resistentie t.o.v. quinolone. Deze resistentie is enorm toegenomen de laatste jaren (tot 30%) door het gebruik van deze antibiotica in de medische humane en dierlijke sector. Dit type antibioticum behoort tot de meest efficiënte bij het kweken van gevogelte. Men

ontdekte ook resistentie voor nalidixinezuur in de helft van de stammen die geïsoleerd waren van afvalwater van slachthuizen (Koenraad et al, 1995).

Om wetenschappelijke informatie te verwerven omtrent het relatief belang van de horizontale en verticale overdracht van *Salmonella* en de horizontale overdracht van *Campylobacter* in België, had dit project de bedoeling om volgende gegevens te verzamelen:

1. De aanwezigheid van *Salmonella* en *Campylobacter* bij braadkuikens van broeierij tot en met het karkas dat het slachthuis verlaat.
2. Het relatief belang van verticale en horizontale overdracht van *Salmonella* bij de contaminatie van pluimveevlees.
3. Eenduidig opsporen van horizontale contaminatiebronnen voor *Salmonella* en *Campylobacter* door gebruik te maken van moleculaire typeringstechnieken.
4. Ontwikkeling van efficiënte methoden voor het opsporen van *Salmonella* en *Campylobacter* bij pluimvee.
5. Bepaling van antibiotica resistentie bij geïsoleerde *Salmonella* en *Campylobacter* stammen.

De verkregen resultaten dienen als basis om zowel de bevoegde autoriteiten als de betrokken sector te sensibiliseren voor het probleem en hen aan te zetten om efficiënte maatregelen te treffen om de contaminatie van braadkuikens op een significante wijze te reduceren. Ook dient het een aanzet te zijn tot het opzetten van objectieve informatie van de consument omtrent de gevaren van pluimveevlees en mogelijk te nemen maatregelen bij de bereiding ervan.

2. Partners

Bij het project waren de 4 volgende partners betrokken:

- Prof. Dr. L. De Zutter, Vakgroep Diergeneeskundig Toezicht op Eetwaren, Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent, Salisburylaan 133, 9820 Merelbeke, Tel: 09/2647455; Fax: 09/2647491; e-mail: Lieven.Dezutter@rug.ac.be
Coördinator van het project
- Dr. L. Herman, Dr. M. Heyndrickx en Dr. K. Grijspeerdt, Departement voor de kwaliteit van dierlijke producten en transformatietechnologie – Centrum voor Landbouwkundig Onderzoek, Ministerie van Middenstand en Landbouw, Brusselsesteenweg 370, 9090 Melle; Tel: 09/2723000; Fax: 09/2723001; e-mail: L.Herman@clo.fgov.be; M.Heyndrickx@clo.fgov.be
- Dierenarts D. Vandekerckhove, Centrum voor Onderzoek in Diergeneeskunde en Agrochemie (CODA), Campus 'Diergeneeskunde', Groeselenberg 99, 1180 Brussel
- Prof. Dr. J.-P. Butzler en L. Vlaes, U.M.C. Sint-Pieter, Microbiologie, Hoogstraat 322, 1000 Brussel

3. Taakomschrijvingen

Om de gestelde doelstellingen te bereiken werd de *Salmonella* en *Campylobacter* contaminatie bij verschillende braadkuikentomen in detail gevolgd vanaf de broeierij tot en met de gekoelde karkassen in het slachthuis (zie onderstaande schema).

Schema van de productieketen (zones in het grijs werden in het onderzoek opgenomen)

| Productieketen | Ouderdieren | Broeierij | Braadkuikenmesterij | Slachthuis |
|-------------------|-------------|----------------------------|---|---|
| Bemonsteringstijd | | dag 22 | 6 weken 3 bemonsteringen | transport slachtproces |
| Bemonstering van | | ééndagskuijens omgeving | transport van kuijens hygiëne van stallen dieren en omgeving gedurende opgroei | transportcontainers karkassen organen |

Volgende taken werden in het projectvoorstel beschreven :

TAAK 1 : Analyse van de levende braadkuijens

a) Broeierij

In de broeierij werden alleen deze ééndagskuijens die verder gevolgd werden bemonsterd. Om kruiscontaminatie te vermijden werden de betrokken uitkipkasten als eerste van de dag geopend. Tevens werden monsters genomen van de omgeving in de broeierij. Alle monsters werden onderzocht op *Salmonella*, terwijl een beperkt aantal monsters ook onderworpen werden aan een *Campylobacter* onderzoek.

b) Braadkuikenmesterij

Voor de aankomst van de ééndagskuijens werd de stal getest op de aanwezigheid van persisterende *Salmonella* en *Campylobacter* afkomstig van het voorgaande toom. Ook werden de omgeving van de stal en eventueel andere aanwezige dieren op het bedrijf bemonsterd. Op dezelfde dag werden na aankomst van de ééndagskuijens monsters genomen van de inlegvellen uit de transportbakken. Tijdens de opkweek (totale duur 6 weken) werden de dieren 3 maal (op week 2, 4 en een paar dagen voor het transport naar het slachthuis) bemonsterd. Hiervoor werd de stal bemonsterd met overshoes en cecale mest werd verzameld. Om mogelijke contaminatiebronnen op te sporen werd telkens ook de omgeving in en rond de stal, andere dieren op het bedrijf (inclusief insecten) alsook het voeder en het drinkwater van de dieren getest op de aanwezigheid van beide pathogenen.

TAAK 2 : Analyse in het slachthuis

a) Effect van transport

Om het gevolg van stress gedurende het transport op de uitscheiding van *Salmonella* en *Campylobacter* te evalueren, werden faeces uit de transportcontainers onderzocht op *Salmonella* en *Campylobacter*. Bovendien werd van 60 braadkippen de lever onderzocht op *Salmonella*. Invasieve *Salmonella* zouden kunnen teruggevonden worden in dit orgaan, terwijl de mest

negatief zou zijn. Cecuminhoud van dezelfde dieren werd gebruikt voor het opsporen van *Campylobacter*.

b) Bepaling van de besmettingsgraad van het eindproduct

Teneinde kruiscontaminatie met andere geslachte tomen te vermijden werd ernaar gestreefd om de betrokken tomen als eerste toom te laten slachten. Indien dit niet het geval was werd dit genoteerd. Van iedere toom werden monsters (nek en borstvel) genomen van 30 tot 60 gekoelde braadkippen voor onderzoek op *Salmonella* en *Campylobacter*. Dit laatste werd uitgevoerd om een grondig inzicht te bekomen van de uiteindelijke besmetting van de consumentklare braadkippen. Niettegenstaande de *Salmonella* en *Campylobacter* status van braadkuikens het beste kan worden geëvalueerd door intacte ceca te verzamelen, kan de slachtomgeving eveneens gecontamineerd zijn en zo een kruiscontaminatie veroorzaken op het eindproduct.

TAAK 3 : Analyse van de braadkippen op het niveau van de consument (geëlimineerde taak zie wijzigingen taken)

Om een objectief beeld te verkrijgen van de mate en de hoeveelheid waarin besmetting van braadkippen met *Salmonella* en *Campylobacter* aanwezig zijn juist voor consumptie, werd voorgesteld om onderzoek uit te voeren op monster afkomstig van grootkeukens (centrale keuken RUG, CLO, RAC Ter Plaeten). Deze bemonsteringen zouden in principe onafhankelijk van de voorgeschiedenis van de braadkuikens uitgevoerd worden. Deze bepalingen zouden toelaten om een beeld te verkrijgen van de omstandigheden waaronder de braadkippen zouden bewaard worden om zo de kans op uitgroei en bijgevolg het consumentenrisico te bepalen.

TAAK 4 : ‘Challenge’ testen in vivo consument (geëlimineerd taak zie wijzigingen taken)

‘Challenge’ testen worden uitgevoerd om een realistisch overzicht te krijgen van het effect van opslag gedurende de distributie op de kwantitatieve besmettingsniveau van *Salmonella* en *Campylobacter* van de braadkippen. Aangezien het moeilijk is om te beschikken over braadkippen die volledig *Salmonella* en *Campylobacter* vrij zijn, zouden braadkippen artificieel besmet worden met een hoog aantal van beide pathogenen (10E3 en/of 10E6) om het effect van natuurlijke besmetting teniet te doen. Het tempo van de groei, overleving of afdoding zou kwantitatief bepaald worden bij verschillende bewaartemperaturen (5, 10 en 20 °C).

TAAK 5: Moleculaire typering van *Salmonella* en *Campylobacter*

Epidemiologisch onderzoek laat toe de oorsprong van een besmetting en de verschillende wegen waarlangs deze besmetting zich verspreidt na te gaan. Dit onderzoek is bijgevolg zeer belangrijk om de verschillende stappen in de kringlopen van *Salmonella* en *Campylobacter* te volgen. Met behulp van deze kennis kunnen dan maatregelen ontwikkeld worden om deze besmetting onder controle te krijgen, zodat het risico van een *Salmonella* of *Campylobacter* infectie bij de consument sterk wordt gereduceerd of (indien mogelijk) geëlimineerd. Bij dit onderzoek zijn typeringstechnieken van essentieel belang om pathogene micro-organismen tijdens het gehele proces te volgen en duidelijk te maken op welke plaatsen bepaalde stammen voorkomen en persisteren. Micro-organismen kan men typeren door middel van fenotypische kenmerken (serotypering, biotypering, faagtypering) en genotypische kenmerken. Genetische of moleculaire typering geeft de mogelijkheid tot hoge resolutie typering van geïsoleerde isolaten zodat een discriminatie binnen een serotype of zelfs een faagtype tot op stamniveau mogelijk wordt. Bovendien laat dergelijke typering toe om databanken met gedigitaliseerde vingerafdrukken op te bouwen. De vingerafdrukken van meerdere isolaten kunnen d.m.v. gespecialiseerde software

snel en objectief vergeleken en gegroepeerd worden, zodat epidemiologische en fylogenetische verwantschappen kunnen vastgelegd worden.

In deze taak werden *Salmonella* en *Campylobacter* isolaten, verzameld tijdens taak 1 en 2, getypeerd door een combinatie van 2 verschillende moleculaire technieken, welke aanbevolen zijn om een geschikte stamdifferentiatie te bekomen.

TAAK 6: Bepaling van antibioticaresistentie

De antibiotica resistentie van stammen, geïsoleerd in alle stadia van de productieketen, werd getest. De relatie tussen de aanwezigheid van antibioticaresistente *Salmonella* en *Campylobacter* stammen en het gebruik van antibiotica in preventieve diergeneeskunde in de pluimveesector werd geëvalueerd.

TAAK 7: Verwerking van de resultaten

In onderling overleg tussen de 4 partijen, werden de resultaten verwerkt. In het eindrapport worden suggesties geformuleerd voor wijzigingen in het zoönosebeleid m.b.t. de aanpak van de *Salmonella* en *Campylobacter* problematiek. Tevens worden ook aanbevelingen naar voren gebracht i.v.m. het hygiëne- en het milieubeleid in broeierijen, mestbedrijven en slachthuizen, zodat de kringloop kan onderbroken worden. Uiteindelijk wordt de vraag gesteld in hoeverre het parallelle gebruik van antibiotica in menselijke en dierlijke geneeskunde nog te verantwoorden is.

Tijdens het project werd op basis van de bekomen resultaten een aantal wijzigingen in het voorgestelde onderzoek uitgevoerd. Deze wijzigingen werden door de verantwoordelijke opdrachthouder van DWTC goedgekeurd.

- Na de analyse van 8 tomen, geslacht in 2 slachthuizen, werd een belangrijk effect van het slachthuis op de besmetting van het eindproduct vastgesteld. Om deze bevinding verder te evalueren werd beslist om de volgende tomen in zoveel mogelijk slachthuizen te laten slachten. Dit had voor gevolg, dat het niet meer mogelijk was om opeenvolgende tomen in dezelfde hokken te volgen, vermits deze tomen geleverd moesten worden aan zelfde slachthuizen.
- Op basis van de resultaten van de mest uit transportcontainers werd een onderzoek opgestart naar de besmetting van gereinigde transportcontainers met *Salmonella* en *Campylobacter*. De resultaten van dit laatste onderzoek en de resultaten bekomen in de slachthuizen verantwoordden een bijkomend onderzoek waarbij de mogelijke rol van transportcontainers bij de besmetting van de getransporteerde tomen werd onderzocht. Voor dit onderzoek werden bijkomende tomen opgevolgd, getransporteerd onder speciale voorwaarden en geslacht. Gedurende het transport en de slachting werden monsters genomen om de besmettingsroute gedurende het transport en de slachting te evalueren. Naar aanleiding van dit extra onderzoek, werd beslist om taak 3 te elimineren (zie hierboven).
- Dit project leverde zoveel *Salmonella* en *Campylobacter* isolaten op (vooral in de slachthuizen) dat om financiële redenen en tijdsgebrek het niet mogelijk was om alle isolaten te genotyperen. Er werd beslist om enerzijds het aantal te typeren isolaten te beperken en te werken met een representatief aantal isolaten van elke toom. Anderzijds werd beslist met akkoord van de DWTC om taak 4 niet uit te voeren en meer tijd te besteden dan gepland aan de moleculaire typering (taak 5).

4. Het uitgevoerde onderzoek

4.1. Onderzoek van braadkuikentomen vanaf de broeierij tot in het slachthuis

Het doel van dit project was het onderzoek van *Salmonella* en *Campylobacter* besmettingsroutes bij de productie van braadkippen. Vanaf de opstart van de onderzoeksactiviteiten werd met de volgende zaken rekening gehouden:

- De dieren moesten gedurende de volledige productieketen gevolgd worden. Dit betekende dat stalen dienden genomen te worden vanaf de broeierijen tot en met consumptieklare karkassen in het slachthuis.
- Niet enkel dienden stalen genomen te worden van de dieren, maar ook van de omgeving om besmettingsbronnen op te sporen.
- Bemonsteringen moesten op een regelmatige basis uitgevoerd worden om te weten te komen op welke tijdstippen dieren besmet geraakt zijn.
- Om kruiscontaminatie door voorgaande besmette tomen tijdens het slachten te vermijden diende ernaar gestreefd te worden de betrokken tomen als eerste te laten slachten.
- Detectie van de bronnen en het verloop van besmettingen bij braadkippen zou gebaseerd worden op de moleculaire typering van de bekomen isolaten.
- Voor het opsporen van antibiotica resistentie kon enkel een representatief aantal isolaten van beide pathogenen onderzocht worden. Voor dit onderzoek werd gebruik gemaakt van een subset van stammen welke genotypisch geanalyseerd werden. Dit laat toe om zo veel mogelijk informatie over de betrokken isolaten te bekomen.

4.1.1. Materiaal en methoden

Monsternames

Gedurende de periode april 1998 tot maart 2000 werden 18 tomen van braadkippen van broeierij tot slachthuis opgevolgd. In totaal werden hierbij 7 broeierijen, 17 braadkuikenmesterijen en 9 pluimveeslachthuizen betrokken. In 1 mesterij werden 2 opeenvolgende tomen (toom 6 en 7) in een zelfde stal gevolgd.

In de broeierijen werden de uitkippkasten, waarin zich de ééndagskuikens bevonden die zouden gevolgd worden, als eerste van de werkdag geopend ten einde kruiscontaminatie in de broeierijen van de betrokken toom kuikens te voorkomen. Onmiddellijk na het openen van deze kasten werd een aanvang genomen met de bemonsteringen. Monsters werden genomen van zowel kuikens als broedafval tijdens het rapen van de ééndagskuikens. Tevens werd de omgeving in de broeierij bemonsterd. Voor de bemonstering van oppervlakken werd gebruik gemaakt van vochtige swabs. De verschillende soorten monsters genomen in de broeierijen staan vermeld in Tabel 1a.

Tabel 1a: Soorten stalen per categorie bij de levende dieren

| Categorie | Genomen stalen |
|-----------|--|
| Broeierij | uitkippkasten; kratten met kuikens; propere, lege kratten; ventilatiewater; eierschalen (continu genomen bij het afrapen van de kuikens, 4 |

| | |
|--|---|
| | gepoolede stalen); dons, natte dons genomen van ventilatieleidingen, droge dons genomen van muren en vloer, niet uitgebroede eieren; inlegvellen (continu genomen bij het afrapen; 4 pools van 20 stalen); muren en deuren van incubatoren; formaline bakje; overshoes in de broeierij; ingewanden en dooierzak van ongeveer 20 zieke of dode kuikens |
| Transport | Inlegvellen (20 stalen) |
| Hygiëne stal (dag 1) | Swabs van ventilatiesysteem, verwarmingssysteem, muren, leidingen, gaten en spleten in muren en vloer, nippels of waterbakjes, voederbakjes; water uit nippels of waterbakjes, voeder, overshoes, nat stro of natte houtschilfers |
| Voeder en water in stal (dag 14-42) | Water; voeder uit bakjes; swabs van muren en vloer; ventilatiesysteem; nat stro of natte houtschilfers; nat voeder |
| Dierlijk materiaal in stal (dag 1-42) | Invertebraten; knaagdieren; mest; veren |
| Verplaatsbaar materiaal (dag 1-42) | Propere schoenen apart gehouden voor de stal; vuile schoenen; kruiwagen; kar; ladder; spade; reinigingsmateriaal; radio |
| Dierlijk materiaal uit omgeving (dag 1-42) | faecaal materiaal van andere dieren; mesthoop; verspreide mest; overshoes of schoenen uit andere stallen; invertebraten; dode kuikens; melk van zieke koe, mosselschelpen ... |
| Niet-dierlijk materiaal uit de omgeving (dag 1-42) | Desinfectiebak in hygiënesluis; lege vaten; regenwater; water uit sloot; water uit plassen; afgereden gras; composthoop van huishoud- en tuinafval; grassilage; maï ssilage; drinkwater van andere dieren; overshoes; houtkrullen... |
| Voeder (dag 14-42) | swabs van voedercontainer; vers voeder uit container |
| Gouden standaard (dag 14-42) | Caecale drops (ongeveer 5 pools van 10 stalen); overshoes (ongeveer 6 paar) genomen in de stal |

Tabel 1b: Soorten stalen per categorie bij het slachten

| Categorie | Genomen stalen |
|----------------------------|---|
| Contaminatie t.g.v. kippen | faecaal materiaal in transportcontainers; caecuminhoud uit darmpakket (60 stalen) |
| Lever | Lever (60 stalen) |

| | |
|-----------------------|--|
| Karkassen na slachten | Nek en borsthuid na koelen (30 of 60 stalen) |
|-----------------------|--|

Voor de aankomst van de kuikens op de boerderij, werd zowel de stal als de omgeving (inclusief andere dieren aanwezig op de boerderij) van de stal bemonsterd. De genomen stalen staan vermeld in Tabel 1a. Oppervlakken werden bemonsterd met de swabmethode. Na aankomst van de kuikens werden ten minste 20 inlegvellen uit de transportkratten verzameld.

Gedurende de opkweekperiode werd de boerderij 3 keer bezocht (op dag 14, 28 en juist (max. een paar dagen) voor het transport van de dieren naar het slachthuis). Telkens werden ongeveer 50 gepoolde cecale droppings verzameld en werd de bedding in de stal bemonsterd door meerdere keren met overshoes door de stal te wandelen. Hierbij werd ervoor gezorgd, dat iedere gang van de stal werd doorkruist. Bovendien werden nog andere monsters, zoals vermeld in Tabel 1a, verzameld. Bij ieder bezoek werd ook de omgeving van de stal bemonsterd (zie Tabel 1a). Het schoeisel van de boer (gebruikt buiten de stal waar de kuikens zitten worden verder in de tekst aangeduid als 'vuil', deze gebruikt enkel binnen de stal worden aangeduid als 'proper') werd gespoeld met 250 ml van Buffered Peptone Water in steriele plastic zakken.

Aan de kweker werd gevraagd om de 2 dagen een monster te nemen van het voeder aan de uitgang van de silo. Deze monsters werden bij het volgende bezoek meegenomen naar het laboratorium. Bij ieder bezoek werd navraag gedaan betreffende het gebruik van antibiotica.

De braadkippen werden geslacht op een leeftijd van ongeveer 42 dagen. Steeds werd aan het slachthuis gevraagd de betrokken toom als eerste van de dag te slachten. Bij een aantal tomen werd niet ingegaan op deze vraag en werd de toom tussen andere tomen in geslacht. In het slachthuis werden onmiddellijk voor het slachten van de dieren gepoolde monsters genomen van de feces in de transportcontainers. Tevens werden darmpakketten en nekhuid van gekoelde karkassen verzameld (Tabel 1b).

De monsters werden onmiddellijk na het nemen in steriele plastic zakken of in steriele potjes overgebracht en vervolgens in koelboxen geplaatst. Na het beëindigen van de monsternamen werden de monsters vervoerd naar het laboratorium voor onmiddellijke bacteriologische analyse.

Bacteriologische analyse

De genomen monsters werden onderzocht op de aanwezigheid van *Salmonella* en/of *Campylobacter* zoals vermeld in Tabel 1a en 1b.

Analyse van de monsters voor *Salmonella*

Eierschalen (50 g), dons (125 g), eieren (25 g), inlegvellen (20 stukjes van verschillende kratten), 3 overshoes, feces van verschillende dieren (25 g), water van de desinfectiebak (25 ml), mesthoop (25 g/ 25 ml), natte grondbedekking uit de stal (25 g), feces van transportcontainers (25 g), swabs (10), een pool van 10 levers (25 g) en kippenhuid (25 g) werden geïncubeerd in 225 ml 'Buffered Peptone Water' (BPW). Ingewanden en dooierzakken van 10 kuikens, drink- en ventilatiewater (40 ml), een pool van ongeveer 10 cecale drops (ongeveer 16 g), voeder (125 g), insecten, containers met dode kuikens op de boerderij (40 ml) and en slootwater (40 ml) werden geïncubeerd in 125 ml, 360 ml, 150 ml, 375 ml, 25 ml, 360 ml en 360 ml BPW, respectievelijk.

Van ieder darmpakket werd een stuk lever gepreleveerd en in ontsmettingsalcohol gelegd voor desinfectie. Vervolgens werd van 10 stukjes lever 2 g op aseptische wijze afgesneden en gepoeld

tot 1 monster. Dit onderzoek van de lever werd ingelast naar aanleiding van een discussie met Dr. Bolder gedurende een bezoek van de partners aan het DLO-Instituut (Lelystad, Nederland) voor het project opgestart werd. Bovendien werd van ieder darmpakket één cecum afgesneden en in ontsmettingsalcohol gelegd voor desinfectie. Uit 10 ceca werd telkens op aseptische wijze 1 g inhoud gepoold tot één monster.

BPW werd gebruikt als vooraanrijking voor *Salmonella*. Na 16-20u incubatie bij 37°C werd 0,1ml van deze culturen overgeënt op de selectieve verrijkmingsmedia Rappaport-Vassiliadis (RV) (9,9 ml), 'Diagnostic semi-solid *Salmonella* agar' (Diasalm) en 'Modified Semi-solid Rappaport-Vassiliadis' media (MSRV). Als alternatief werd 0.2 ml aanrijkingscultuur overgeënt in 1,8 ml RV in een microcentrifugebuisje.

Na 24 u incubatie bij 42°C werd RV en de verdachte zones van Diasalm en MSRV medium uitgestreken op het selectief agar medium Xylose Lysine Desoxycholate (XLD). Vermoedelijke kolonies werden bevestigd door biochemische testen (RUG) of door PCR (DVK-CLO). Verschillende verrijkmingsmedia werden gebruikt om een maximum aantal positieve stalen te bekomen. De keuze van de verrijkmingsmedia is op volgende gegevens gebaseerd: 1/RV wordt gebruikt in de Scandinavische referentiemethode (NMKL), 2/ 0,2 ml van BPW wordt toegevoegd aan 1,8 RV in een tube van een microcentrifuge omdat dit goede resultaten gaf in het vorig DWTC project 'Ontwikkeling van een ééndagsmethode voor het opsporen van *Listeria monocytogenes* en *Salmonella*'. 3/ Diasalm wordt bij routine-analyses gebruikt in de laboratoria van partner 1 en 2 en leverde meer positieve stalen op dan RV en 4/ MSRV gaf goede resultaten in een vergelijkende studie uitgevoerd door partner 1 en werd aanbevolen in Nederland.

Analyse van de monsters voor *Campylobacter*

Na manuele menging van ieder monster van de gepoolde cecale drops, van de feces uit de transportcontainers en van de gepoolde cecuminhoud werd direct een entoog uitgestreken op het selectiemedium medium Charcoal Cefoperazone Desoxycholate Agar (CCDA). Tevens werd na toevoeging van BPW en homogenisatie een entoog van dit medium uitgestreken op CCDA. Alle monsters van de slachthuisfase en een deel van de monsters van de levende fase (cecale drops, ventilatiewater, drinkwater, propere en vuile schoenen, faecaal materiaal andere dieren op de boerderij, nat stro, water uit de ontsmettingsbak, mesthoop, vocht uit de mesthoop, plassen, ingewanden en dooierzak van dode en zieke kuikens, veren, ton afval van dode kuikens) werd ook aangerijkt voor *Campylobacter* in het verrijkmingsmedium Preston (5ml of 5 g materiaal in 45 ml Preston; ongeveer 100ml water werd gefiltreerd over een 0,22µm filter en aangerijkt in 20 ml Preston). Na 24 en 48 u micro-aërofiële incubatie bij 42°C werd dit medium overgeënt op CCDA. Na 24 en 48 u micro-aërofiële incubatie bij 42°C werden deze selectieve platen onderzocht op de aanwezigheid van verdachte kolonies. Species-identificatie werd uitgevoerd met een multiplex PCR ontwikkeld op basis van beschreven primers.

PCR bevestiging van vermoedelijke *Salmonella* en *Campylobacter* isolaten

De bacteriële cellen werden gesuspenseerd in 100 µl H₂O en gecentrifugeerd voor 2 min bij 13000g. De pellet werd gesuspenseerd in 100 µl 0,05 M NaOH, 0,125% SDS en verhit voor 17 min. bij 90°C.

Voor *Salmonella* PCR werden de specifieke primers ST11 (5' AGCCAACCATTGCTAAATT GGCGCA 3') en ST15 (5' GGTAGAAATTCCTCCAGCGGGTACTG 3') (annealingtemperatuur, AT = 57°C) beschreven door Aabo et al. (1993) gebruikt. Voor *Campylobacter* identificatie op genus niveau werd het primerpaar C412F (5'GGATGACACTTTTCGGAGC3')- C1288R (5'CATTGTAGCACGTGTGTC3') (AT = 55°C) gebruikt zoals beschreven door Linton et al. (1996). Identificatie van *C. jejuni* en *C. coli* gebeurde door de primerparen Col3.3

(5'GGTATGATTTCTACAAAGCGAG3') - COL4.4 (5'ATAAAAGACTATCGTCGCGTG3') (voor *C. coli*; AT = 63°C) en JEJ3.3 (5'GAAGAGGGTTTGGGTGGTG3')- JEJ4.4 (5'AGCTAGCTTCGCATAATAACTTG3') (voor *C. jejuni*; AT = 63°C) (Linton et al., 1997) en door COL1 (5'AGGCAAGGGAGCCTTTAATC3') - COL2 (5'TATCCCTATCTA CAAATTCGC3') (voor *C. coli*; AT = 56°C) en JUN3 (5'CATCTTCCCTAGTCAA GCCT3') - JUN4 (5'AAGATATGGCACTAGCAAGAC3' (voor *C. jejuni*; AT = 56°C) (Van der Plas, TNO-voeding, Nederland, persoonlijke mededeling).

PCR werd uitgevoerd in een eindvolume van 50 µl met 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 1,5 mM MgCl₂, 0,5% Tween-20, 0,01% gelatine, 200 µM van elke dNTP, 1,5 U AmpliTaq DNA polymerase (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA), 50 pmol van elke primer en 1 µl cellysaat. Het mengsel werd onderworpen aan een 30 cycli amplificatie in een thermocycler. De eerste cyclus werd voorafgegaan door een denaturatie voor 1 min bij 95°C. Elke cyclus bestond uit een denaturatie voor 15 s bij 95°C, annealing voor 15 s bij de bovenaan aangeduide annealingstemperatuur, en elongatie voor 30 s bij 72°C. Tenslotte werd na de laatste cyclus een elongatie voor 8 min bij 72°C uitgevoerd.

PCR producten werden geanalyseerd op een 1,5% (w/v) Seakem ME agarose gel (FMC Bioproducts, Rockland, ME, USA).

Bij twijfel werd de identiteit van *Campylobacter* isolaten bevestigd via een sequentie bepaling van het 16S ribosomale DNA. Hiervoor werden in een PCR met AT = 59°C de volgende forward primers in PCR gebruikt: 16F27, pA (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3', positie 8-27), 16F536, PD (5'CAGCAGCCGCGGTAATAC3', positie 519-536) en de reverse primers: 16R519, PD (5'GTATTACCGCGGCTGCTG3', positie 536-519), 16R1522, pH (5'AAGGAGGTGATCCAGCCGCA3', positie 1541-1522) (LMG-cultuurcollectie, persoonlijke mededeling). Het PCR product werd gezuiverd met de High Pure Product Purification kit (Boehringer) en de sequentie werd bepaald d.m.v. de ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) met de primers pA en pH. Na zuivering met NaOAc/Ethanol precipitatie werden de sequentiereacties gescheiden op de ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). De identificatie gebeurde op basis van homologie met gekende sequenties in de EMBL databank.

Moleculaire typering van de isolaten

Het genomisch microbiële DNA werd voor typeringsdoeleinden geëxtraheerd met de methode beschreven door Pitcher et al. (1989). De isolaten van het slachthuis werden getypeerd via REP-PCR startend van een ruw cellysaat (zie PCR bevestiging boven).

Van iedere toom braadkuikens werden *Salmonella* isolaten getypeerd op 2 niveaus. Op het eerste niveau werden alle isolaten van de broeierijen en boerderijen en een representatief aantal afkomstig uit de slachthuisfase getypeerd m.b.v. REP-PCR (Herman et al., 1998). De vingerafdrukken werden gegroepeerd met GelCompar 4.1 in groepen overeenkomend met het serotypeniveau zoals bevestigd door partner 2 in een overeenstemmend onderzoek. Eén of enkele vertegenwoordigers van elke groep werden naar het *Salmonella* Referentiecentrum in het CODA (Ukkel, België) gestuurd voor klassieke stereotypering. Op deze manier kon het serotype bepaald worden voor (bijna) alle onderzochte isolaten.

Op het tweede typeringsniveau werden alle isolaten betrokken van de broeierijen en van de boerderijen alsook een representatief deel van de stammen uit de slachthuizen. Uit de slachthuisfase werden deze stammen verder getypeerd die behoren tot hetzelfde serotype als deze geïsoleerd op de boerderij of die binnen hetzelfde slachthuis bij verschillende tomen

werden aangetroffen. Voor het tweede typeringsniveau werd 'pulsed field gel electrophoresis' (PFGE) toegepast, waarbij gebruik gemaakt werd van de volgende restrictie-enzymen: *XbaI*, *NotI*, *SpeI* en *BlnI*. Tevens werd een RAPD analyse uitgevoerd op een selectie van de isolaten die behoren tot 1 serotype door gebruik te maken van RAPD Ready-To-Go Beads en de primers 23L (5'AGGGAACGAG3'), OPB-17 (5'CCGAAGCTGC3'), P1254 (5'AATCGGGCTG3') en OPA4 (5'CCGCAGCCAA3') (Lin et al., 1996) volgens het protocol bijgeleverd bij de beads (Amersham Pharmacia Biotech). Plasmid isolatie uit *S. Enteritidis* stammen werd uitgevoerd volgens de methode van Platt et al. (1986). De plasmiden werden gescheiden in een 0,6% (w/v) seakem LE agarose gel (FMC Bioproducts).

Alle *Campylobacter* isolaten afkomstig van de broeierijen en boerderijen werden getypeerd door een combinatie van *flaA* typering en PFGE. Deze techniek werd ook toegepast op een beperkt aantal slachthuisisolaten, afkomstig van 2 tomen. In de *flaA* typering werd het PCR geamplifieerde *flaA* gen onderworpen aan een restrictieanalyse met de enzymen *DdeI* en *HinI*. De typering maakte gebruik van de primers CJUNF (5'GGATTTTCGTATTAACACAAATGGTGC3') en CJUNR (5'CTGTAGTAATCTTAAACATTTTG3') met aan AT = 55°C (Nachamkin et al., 1993). In de PFGE analyse werd gebruik gemaakt van de enzymen *SmaI* en *KpnI* voor digestie.

Bepaling van antibioticaresistentie

Van *Salmonella* en *Campylobacter* werden bij respectievelijk 210 en 177 isolaten de antibiotica resistentie opgespoord. Voor dit onderzoek werd gebruik gemaakt van *Salmonella* isolaten waarop een genotypisch onderzoek uitgevoerd werd. Voor *Campylobacter* werden genetisch getypeerde stammen uit de boerderijfase geselecteerd, terwijl uit de slachthuisfase een selectie werd gemaakt van de stammen, geïdentificeerd d.m.v. PCR.

Voor de bepaling van de antibiotica resistentie werd gebruik gemaakt van de E-test strips van Oxoid. De *Salmonella* stammen werden op volgende antibiotica getest: ampicilline, amoxicilline, ceftriaxone, chloramphenicol, ciprofloxacine, kanamycine, nalidixinezuur, streptomycine, tetracycline en trimethoprim/sulfamethoxazole 1/19. De *Campylobacter* stammen werden op de volgende antibiotica getest: erythromycine, ampicilline, ciprofloxacine, nalidixinezuur, tetracycline, gentamycine en amoxicilline-clavulaan zuur 2/1. Het onderzoek werd uitgevoerd zoals voorgeschreven door de fabrikant. Als voedingsbodem werd voor *Salmonella* Mueller-Hinton agar gebruikt en voor *Campylobacter* Mueller-Hinton agar met 5% schapenbloed.

Statistische analyse van de bekomen resultaten

Meer dan honderd verschillende soorten monsters werden genomen van de tomen, de stallen en omgeving. Deze werden gegroepeerd in 9 categorieën voor de levende fase en 4 categorieën voor de slachthuisfase (zie Tabel 1b). De invloed van het aantal stallen en het gebruik van antibiotica op de status van de tomen werd tevens onderzocht. Voor de analyse werd gebruik gemaakt van de univariate logistische regressie met als afhankelijk variabele de status van de toom. De volgende onafhankelijke variabelen werden gebruikt : het aantal stallen en de 9 categorieën van de levende fase waarbij het aantal positieve monsters in rekening werd gebracht. De overblijvende onafhankelijke variabele zoals het gebruik van antibiotica was dichotomisch. Het effect van het gebruik van antibiotica op het aantal positieve overshoes en cecale drops werd getest met ANOVA. De correlatie tussen de omgevingsmonsters en monsters van dierlijk oorsprong in de stal enerzijds en overshoes en cecale drops anderzijds werd onderzocht met de bootstrapped correlatie, daar de variabelen niet beantwoorden aan de eisen nodig van het uitvoeren van een Pearson's correlatie. Om de simultane invloed van de verschillende categorieën, antibiotica gebruik en het aantal stallen op het aantal positieve overshoes en cecale

drops te testen, werd het beste lineair model bepaald. SPSS 8.0 voor Windows werd gebruikt als software. Bootstrapping werd uitgevoerd met S-Plus 4.0 voor Windows.

Karkascontaminatie werd gedefinieerd als de proportie besmette karkassen na slachten. De significantie van de isolatie uit faecaal materiaal afkomstig van transportcontainers in relatie met de karkasbesmetting werd getest d.m.v. de bootstrapped correlatie omdat deze variabele niet beantwoordt aan de eisen nodig voor een Pearson's correlatie. De invloed van de status van de tomen, de darm-evisceratiemethode, de volgorde waarin de tomen werden geslacht (eerst of niet) en de identiteit van het slachthuis op de karkaskwaliteit werd getest via ANOVA. De gebruikte software was SPSS 8.0 voor Windows.

4.1.2. Algemeen overzicht van de contaminatie met *Salmonella* en *Campylobacter*

In totaal werden 18 tomen opgevolgd vanaf de broeierij tot en met het gekoelde karkas in het pluimveeslachthuis. Een overzicht van de bekomen resultaten is weergegeven in Tabel 2.

Uit de resultaten blijkt, dat op boerderijniveau zowel *Salmonella* als *Campylobacter* in ongeveer de helft van de tomen kon teruggevonden worden. In 3 gevallen waren de ééndagskuikens reeds *Salmonella* positief bij aankomst op de boerderij. Anderzijds werd in veel gevallen een besmetting van de omgeving op het bedrijf vastgesteld. De aanwezigheid van *Salmonella* en *Campylobacter* in de omgeving houdt een potentieel gevaar in voor de besmetting van de braadkuikens in de stal. Eens de dieren overgebracht naar het slachthuis, vond er een verdere stijging plaats van de *Salmonella* en *Campylobacter* contaminatie, welke leidde tot een contaminatie van karkassen afkomstig van negatieve tomen.

Tabel 2: Overzicht van *Salmonella* en *Campylobacter* contaminatie bij de productie van 18 tomen braadkuikens

| | + tomen | |
|-----------|-------------------|----------------------|
| | <i>Salmonella</i> | <i>Campylobacter</i> |
| Broeierij | 1 | 0 |

| | | | |
|-------------|---------------|-----------|-----------|
| Transport | | 2 | NB |
| Mestbedrijf | hygiëne stal | 4 | 0 |
| | voeder | 4/14 | NB |
| | omgeving stal | 11 | 11/16 |
| | stal dieren | 10 | 7 |
| Slachthuis | krattenmest | 12/16 | 14/17 |
| | lever | 6/18 | NB |
| | cecum | NB | 12/18 |
| | kippenhuid | 13 (>10%) | 12 (>10%) |

NB: niet bemonsterd

4.1.3. Gedetailleerde resultaten betreffende de *Salmonella* contaminatie

Efficiëntie van de verschillende *Salmonella* isolatiemethoden

Voor de isolatie van *Salmonella* werden verschillende methodes gebruikt en vergeleken: twee methodes met een vloeibare verrijkingstap in RV en twee methodes met een verrijking, gebaseerd op de beweeglijkheid van *Salmonella*, in de semi-solid media Diasalm en MSR/V (Tabel 3). In totaal werden 3150 monsters getest. Een monster werd positief bevonden wanneer *Salmonella* geïsoleerd werd met ten minste één van de isolatiemethodes.

De gevoeligheid van de verschillende methoden liep zeer sterk uiteen. De hoogste gevoeligheid werd bekomen met de semi-solid aanrijking: 93,9 % met Diasalm en 79,2% met MSR/V. Met het traditioneel gebruikte aanrijkmiddel RV werd slechts bij 53,3% van de positieve monsters *Salmonella* geïsoleerd. Door combinatie van RV (10ml en 2ml) en Diasalm werd een sensitiviteit van meer dan 99% bekomen.

Dit is het eerste onderzoek waarbij Diasalm werd getest op zo een groot aantal monsters. Voor MSR/V werden reeds verschillende resultaten gepubliceerd. In een interlaboratoriumonderzoek vond De Zutter et al. (1991) voor natuurlijk besmette voedingsmiddelen een gevoeligheid van 96% voor MSR/V en 90% voor RV. Anderzijds vonden Wiberg en Norberg (1996) een hogere gevoeligheid voor de isolatie van *Salmonella* van natuurlijk besmet voedsel met RV (99%) in vergelijking met MSR/V (87%).

Deze resultaten toonden aan dat verrijkingsmedia op basis van de beweeglijkheid van *Salmonella* superieur zijn aan het vloeibare verrijkingsmedium RV. Combinatie van beide types van verrijkingsmedia maakt het mogelijk om niet beweeglijke stammen op te sporen (Holbrook et al., 1989).

Tabel 3: Gevoeligheid van verschillende methoden voor het opsporen van *Salmonella*

| Medium & Incubatie tijd | Aantal monsters | Aantal positieve monsters | Aantal positieve monsters met dit medium | Gevoeligheid |
|-------------------------|-----------------|---------------------------|--|--------------|
| Diasalm 24h | 3150 | 784 | 736 | 0.939 |

| | | | | |
|-------------|------|-----|-----|-------|
| MSRV 24h | 342 | 48 | 38 | 0.792 |
| RV 24h | 2848 | 653 | 400 | 0.613 |
| RV 2ml 24h | 2945 | 661 | 352 | 0.533 |
| RV 10ml 48h | 583 | 52 | 24 | 0.462 |

Bepaling van de *Salmonella* status van de tomen gedurende de kweek

De *Salmonella* status van een toom werd bepaald aan hand van de analyseresultaten uitgevoerd op monsters genomen in de stal op de leeftijd van 14, 28 en 42 dagen. Indien uit één van deze monsters een *Salmonella* stam kon geïsoleerd worden, werd de toom als positief beschouwd.

De *Salmonella* status gedurende de opkweek van de braadkuikens werd duidelijk met de grootste gevoeligheid bepaald door de 'overshoe'-methode (Tabel 4). Geen extra tomen werden positief bevonden bij het testen van cecale drops, proper schoeisel van de boer, voeder en drinkwater in de stal, dode kuikens of strooisel. Het onderzoek toonde evenwel aan, dat bij gebruik van de 'overshoe'-methode meerdere paren overshoes vereist zijn om de aanwezigheid van *Salmonella* in een toom efficiënt te kunnen aantonen.

Tabel 4: Efficiëntie van monstertypes voor de bepaling van de *Salmonella* status van een toom

| Monster | Aantal onderzochte tomen | Gevoeligheid |
|------------------|--------------------------|--------------|
| Overshoes | 18 | 1,000 |
| Proper schoeisel | 14 | 0,750 |
| Cecale drops | 17 | 0,667 |
| Dode kuikens | 8 | 0,600 |
| Voeder stal | 17 | 0,500 |
| Drinkwater stal | 17 | 0,222 |
| Strooisel stal | 3 | 0,500 |

Voorkomen van *Salmonella* tijdens de productie van braadkuikens

Salmonella werd aangetoond bij 3 tomen ééndagskuikens: van één toom (toom 9) waren eierschalen in de broeierij positief en van 2 andere tomen (toom 3 en 8) werden de inlegvellen van de transportbakken positief bevonden (Tabel 5). Bij toom 3 kon verder tijdens de opkweek van de dieren geen *Salmonella* meer aangetoond worden. Van beide andere tomen waren de overshoes positief op de leeftijd van 14 dagen.

Tabel 5: Voorkomen van *Salmonella* in de productieketen van 18 tomen braadkuikens

| Toom/ Stallen* | Broeierij | Transport | Boerderijfase | | | | | Slachthuisfase | | |
|-------------------|-----------|-----------|---------------|------------------|------------------|--------|----------------|--------------------------|---------|--------------------|
| | | | Antibiot. | Stal- hygiëne | Stal omgeving | Voeder | Status toom | Transport- containers | Nekhuid | Code slachthuis |
| 1/1 | 0/20** | 0/4 | - | 1+/16 | 0/3 | 0/10 | 0/28 | 0/6 | 60+/60 | 1*** |
| 2/1 | 0/19 | 0/4 | 1x | 0/11 | 0/6 | 0/4 | 1+/31 | 0/6 | 1+/60 | 0 |
| 3/3 | 0/19 | 1+/3 | 2x | 0/11 | 1+/11 | 0/6 | 0/29 | 5+/6 | 60+/60 | 1*** |
| 4/1 | 0/16 | 0/5 | 2x | 0/9 | 0/2 | 1+/13 | 0/29 | 2+/6 | 0/60 | 0 |
| 5/1 | 0/20 | 0/4 | 1x | 0/9 | 0/31 | 0/2 | 0/32 | 2+/6 | 58+/60 | 1 |
| 6/3 | 0/16 | 0/4 | - | 0/15 | 20+/34 | 0/4 | 22+/25 | 6+/6 | 30+/30 | 1 |
| 7/3 | 0/9 | 0/2 | - | 1+/12 | 10+/24 | ND | 20+/43 | 5+/6 | 28+/30 | 1 |
| 8/3 | 0/19 | 2+/2 | 3x | 1+/8 | 4+/15 | 0/5 | 10+/29 | 1+/6 | 3+/60 | 0*** |
| 9/3 | 1+/19 | 0/2 | - | 0/13 | 5+/17 | 0/1 | 7+/23 | 0/6 | 11+/60 | 0*** |
| 10/8 | 0/18 | 0/2 | 1x | 5+/15 | 13+/20 | 1+/12 | 28+/28 | 6+/6 | 47+/47 | 2 |
| 11/1 | 0/15 | 0/2 | 1x | 0/9 | 0/30 | 1+/16 | 0/27 | NB | 19+/60 | 3 |
| 12/1 | 0/19 | 0/2 | - | 0/6 | 0/31 | 0/8 | 0/24 | 4+/6 | 14+/60 | 4 |
| 13/3 | 0/16 | 0/2 | - | 0/10 | 4+/21 | 0/6 | 0/30 | 3+/6 | 10+/60 | 5 |
| 14/2 | 0/14 | 0/2 | 1x | 0/9 | 1+/26 | 0/6 | 0/21 | NB | 10+/60 | 6*** |
| 15/5 | 0/10 | 0/2 | 4x | 0/11 | 7+/28 | 0/3 | 1+/27 | 3+/6 | 19+/60 | 6 |
| 16/1 | 0/23 | 0/3 | 2x | 0/14 | 0/27 | 0/13 | 5+/48 | 3+/6 | 20+/30 | 7*** |
| 17/4 | 0/35 | 0/2 | 1x | 0/12 | 1+/38 | 0/3 | 1+/34 | 0/6 | 2+/30 | 8 |
| 18/1 | 0/15 | 0/2 | 1x | 0/9 | 1+/36 | 1+/3 | 6+/31 | 1+/6 | 3+/30 | 3 |
| Tot. + | 1 + | 2 + | 12 + | 4 + | 11 + | 4 + | 10 + | 12 + | 17 + | |
| Tot. - | 17 - | 16 - | 6 - | 14 - | 7 - | 14 - | 8 - | 6 - | 1 - | |

* : nummer van de toom/aantal stallen op de boerderij

** : aantal *Salmonella* positieve monsters op het totaal aantal onderzochte monsters

*** : toom niet als eerste geslacht

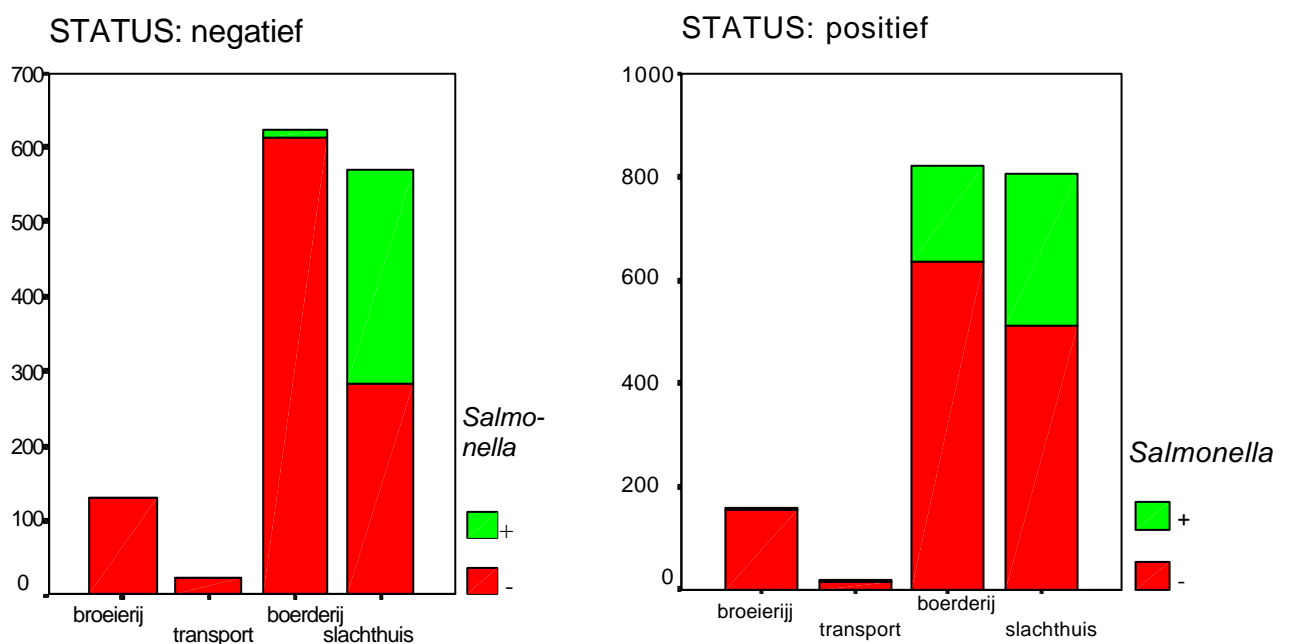
NB: niet bepaald

Tabel 6: Detectie van *Salmonella* tijdens de opkweek van braadkuikens

| Leeftijd dieren | Aantal tomen met positieve overshoes |
|-----------------|--------------------------------------|
| 14 dagen | 9 |
| 24 dagen | 7 |
| 42 dagen | 6 |
| Alle leeftijden | 10 |

In totaal leverden 10 van de 18 tomen positieve overshoes en kregen een *Salmonella* positieve status. In de omgeving van de boerderijen werd een hoog besmettingsniveau (11 van de 18 bedrijven positief) vastgesteld. De belangrijkste besmetting van tomen braadkuikens vond vooral plaats tijdens de eerste 2 weken van de opkweek. Tijdens de verdere opkweek daalde het aantal tomen opnieuw, waarbij overshoes positief werden bevonden (Tabel 6).

Op het slachthuisniveau vertoonden nog meer tomen positieve monsters (feces uit transportcontainers en karkassen) voor *Salmonella*. Een beperkt aantal levers werden positief bevonden. Typering van de geïsoleerde stammen wees uit, dat het steeds niet-invasieve serotypes betrof. Er dient dan ook aangenomen te worden, dat de kuikens geen drager waren van *Salmonella* maar dat de levers gecontamineerd werden tijdens het evisceratieproces. Blijkbaar was de gebruikte desinfectie van de genomen levermonsters in het laboratorium onvoldoende. Met deze resultaten wordt dan ook verder geen rekening gehouden. Er werd geen correlatie gevonden tussen de contaminatie gedurende de opkweekperiode en de contaminatie van de geslachte karkassen (Figuur 1). Het slachthuis bleek de bepalende factor voor de contaminatie van de karkassen.

Figuur 1 : Isolatie van *Salmonella* bij de productie van braadkuikens in functie van de status van de tomen

Tabel 7: Resultaten van univariatie analyses op de *Salmonella* gegevens van 18 tomen braadkuikens

| Afhankelijk variabele | Onafhankelijk variabele | Type analyse | Correlatie | 95 % Betrouwbaarheidsgrens | P-waarde |
|--|------------------------------------|--------------------|------------|-------------------------------|----------|
| % overshoes/cecale drops positief voor <i>Salmonella</i> | Hygiëne stal | Bootstrapped corr. | 0.61 | 0.06 – 0.96 | / |
| | Voeder en water in stal d 14-42 | Bootstrapped corr. | 0.88 | 0.39 – 0.92 | / |
| | Dierlijk materiaal omgeving | Bootstrapped corr. | 0.64 | 0.09 – 0.89 | / |
| | Niet dierlijk materiaal omgeving | Bootstrapped corr. | 0.56 | 0.11 – 0.85 | / |
| | Gebruik van antibiotica | ANOVA | / | / | 0.02 |
| Toom status | Voeder en water in stal d 14-42 | Log. regressie | / | / | 0.02 |
| | Voeder in stal d 14-42 | Log. regressie | / | / | 0.02 |
| | Water in stal d 14-42 | Log. regressie | / | / | 0.10 |
| | Verplaatsbaar materiaal | Log. regressie | / | / | 0.06 |
| | Schoeisel | Log. regressie | / | / | 0.08 |
| % gecontamineerde karkassen | Identiteit slachthuis | ANOVA | / | / | < 0.01 |
| | % contaminatie transportcontainers | Bootstrapped corr. | 0.62 | 0.037 - 0.89 | |

Bepaling van risicofactoren voor *Salmonella* contaminatie

Statistische analyse van de *Salmonella* gegevens liet toe om risicofactoren voor de besmetting bij de productie van braadkuikens te bepalen. Een overzicht van deze resultaten is weergegeven in Tabel 7.

Met de bootstrapped correlatietechniek werden significante relaties gevonden tussen enerzijds het percentage positieve overshoes en cecale droppings en anderzijds de stalhygiëne, voeder en drinkwater in de stal en zowel dierlijk als niet-dierlijk materiaal bemonsterd in de omgeving. Met de one-way ANOVA werd een significante invloed ($p=0,02$) van het gebruik van antibiotica op het aantal positieve overshoes en cecale drops gedurende de opkweek van de kuikens vastgesteld (Figuur 2). Van de 9 onderzochte groepen monsters met univariante logistieke regressie was slechts de contaminatie van het voeder en het drinkwater in de stal significant gerelateerd met de status van de toom. Verdere analyse toonde aan, dat de subgroep 'monsters voeder' in de stal verantwoordelijk was voor deze significante relatie met de p -waarde van 0,02. De watermonsters hadden geen significante invloed ($p = 0,10$). Het dient echter opgemerkt te worden dat het voeder in de stal weliswaar kan beschouwd worden als een bron van verspreiding van de besmetting in de stal maar initieel meestal besmet werd door *Salmonella* gecontamineerde feces van kuikens. Een andere potentiële factor voor horizontale transmissie van *Salmonella* tijdens de opkweek bleek het binnenbrengen van verplaatsbaar materieel na reiniging en desinfectie in de stallen ($p = 0,059$). Verdere verdeling van deze groep in schoeisel t.o.v. ander materieel toonde een vermogen om de status van de toom te beïnvloeden met $p = 0,08$. Voor de contaminatie van ééndagskuikens (broeierij), het transport van de dieren en het aangeleverd voeder kon geen significante invloed aangetoond worden. In tegenstelling tot de resultaten van de bootstrapped correlatie, vertoonde de stalhygiëne, andere dieren, inclusief huisdieren en andere dieren zoals insecten, spinnen, knaagdieren en vogels op de boerderij (dierlijk materiaal omgeving), dierlijk materiaal in de stal, slootwater, plassen en ander oppervlakken in de omgeving van de stal (niet dierlijk omgeving) geen significant effect. Bovendien waren zowel dierlijk materiaal in de omgeving en dierlijk materiaal in de stal niet significant met de one-way ANOVA met status als afhankelijke variabele.

Het aantal stallen op de boerderij had geen significante invloed op de status van de toom met de univariante logistieke regressie.

De identiteit van het slachthuis (ANOVA, $p < 0,01$) en de contaminatie van de dieren tijdens het transport (*Salmonella* positieve feces uit de transportcontainers, bootstrapped $r = 0,62$) waren de voornaamste risicofactoren voor de contaminatie van het eindproduct (Figuur 3). De gegevens laten duidelijk zien dat de contaminatiegraad van de karkassen afhankelijk was van de slachthuizen waar de dieren geslacht werden. Zo werd bij de slachting van *Salmonella* positieve tomen in slachthuis 0 geen verhoging van de *Salmonella* contaminatie van de karkassen waargenomen, terwijl in slachthuis 1 bijna alle karkassen onafhankelijk van de status van de geslachte toom positief werden bevonden. In 2 andere slachthuizen (slachthuis 3 en 6) lag de contaminatiegraad van de karkassen afkomstig van positieve en negatieve tomen in dezelfde grootte-orde.

Bij slachting van de meeste tomen werden ook karkassen van de volgende of de vooafgaande geslachte toom bemonsterd. Over de *Salmonella* status van deze tomen was echter geen informatie beschikbaar. In de meeste gevallen lag het percentage *Salmonella* positieve karkassen

van de volgende/voorafgaande tomen in dezelfde grootte-orde als deze van de gevolgde toom en was dus ook afhankelijk van het slachthuis waar de dieren geslacht werden (Tabel 8).

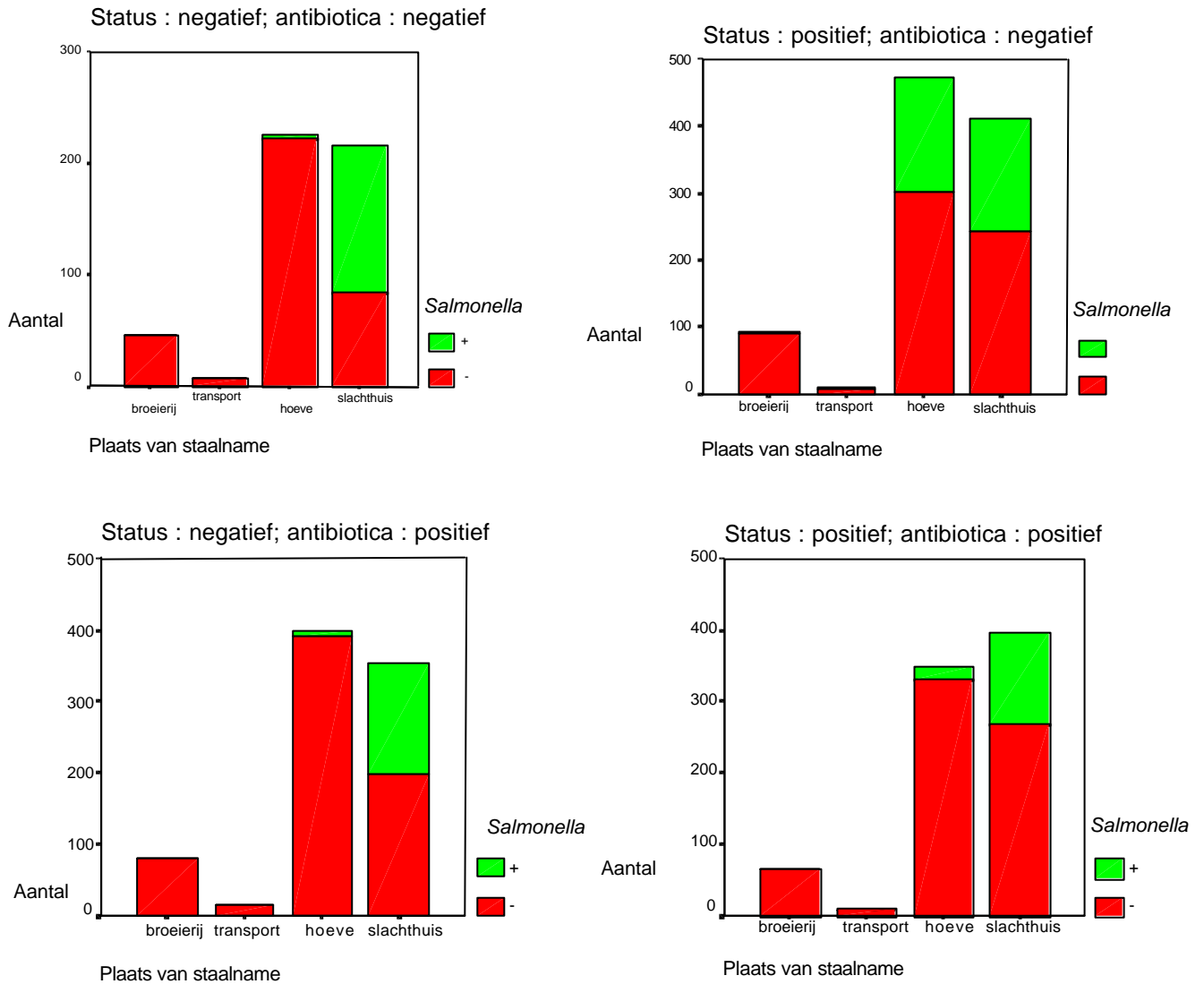
Tabel 8: Percentage *Salmonella* positieve karkassen van gevolgde en volgende/voorafgaande geslachte tomen

| Toom | Slachthuis | Betrokken toom | Volgende/voorafgaande* toom |
|------|------------|----------------|-----------------------------|
| 1 | 1 | 100 | NB |
| 2 | 0 | 2 | NB |
| 3 | 1 | 100 | 100* |
| 4 | 0 | 0 | NB |
| 5 | 1 | 97 | NB |
| 6 | 1 | 100 | 100 |
| 7 | 1 | 93 | 100 |
| 8 | 0 | 5 | 20* |
| 9 | 0 | 18 | NB |
| 10 | 2 | 100 | 100* |
| 11 | 3 | 32 | 10 |
| 12 | 4 | 23 | 5 |
| 13 | 5 | 73 | 85 |
| 14 | 6 | 16 | NB |
| 15 | 6 | 32 | 40 |
| 16 | 7 | 67 | 80* |
| 17 | 8 | 7 | 0 |
| 18 | 3 | 10 | 15 |

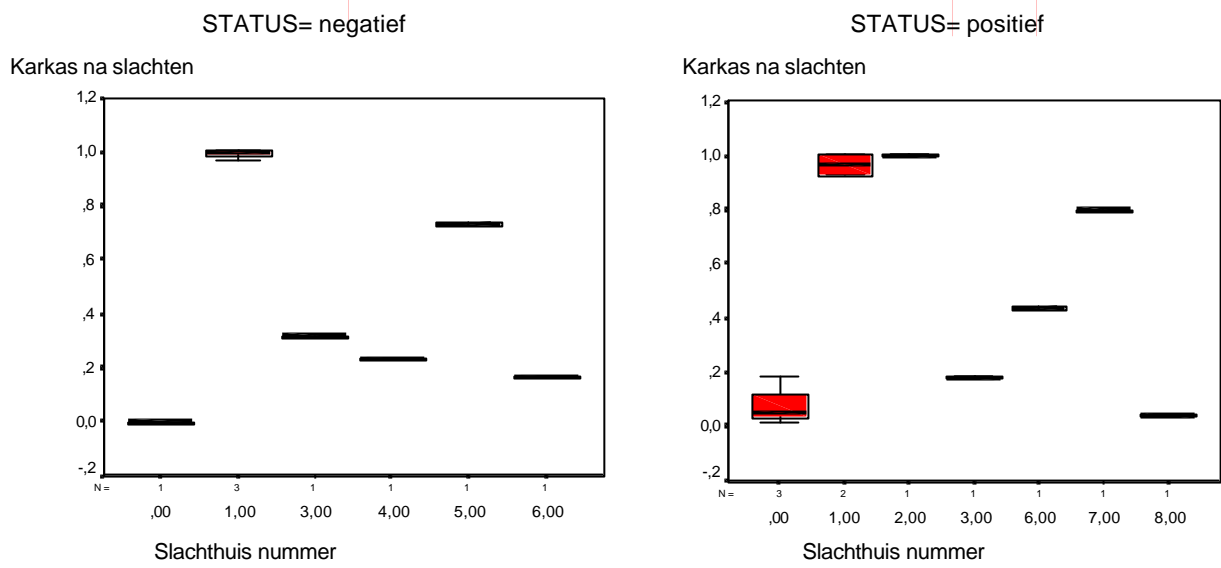
NB: niet bepaald

Uit verder onderzoek bleek ook dat de gevonden positieve feces uit de transportcontainers niet zozeer een weerspiegeling is van de contaminatie van de dieren, maar van de *Salmonella* contaminatie van de transportcontainers, die gebruikt werden om de dieren over te brengen naar het slachthuis (zie punt 4.3). Uit analyse bleek verder dat noch de *Salmonella* status van de toom, noch de gebruikte evisceratietechniek (Figuur 4), noch het tijdstip van slachting (toom als eerste geslacht of niet) (Figuur 5) een significante invloed had.

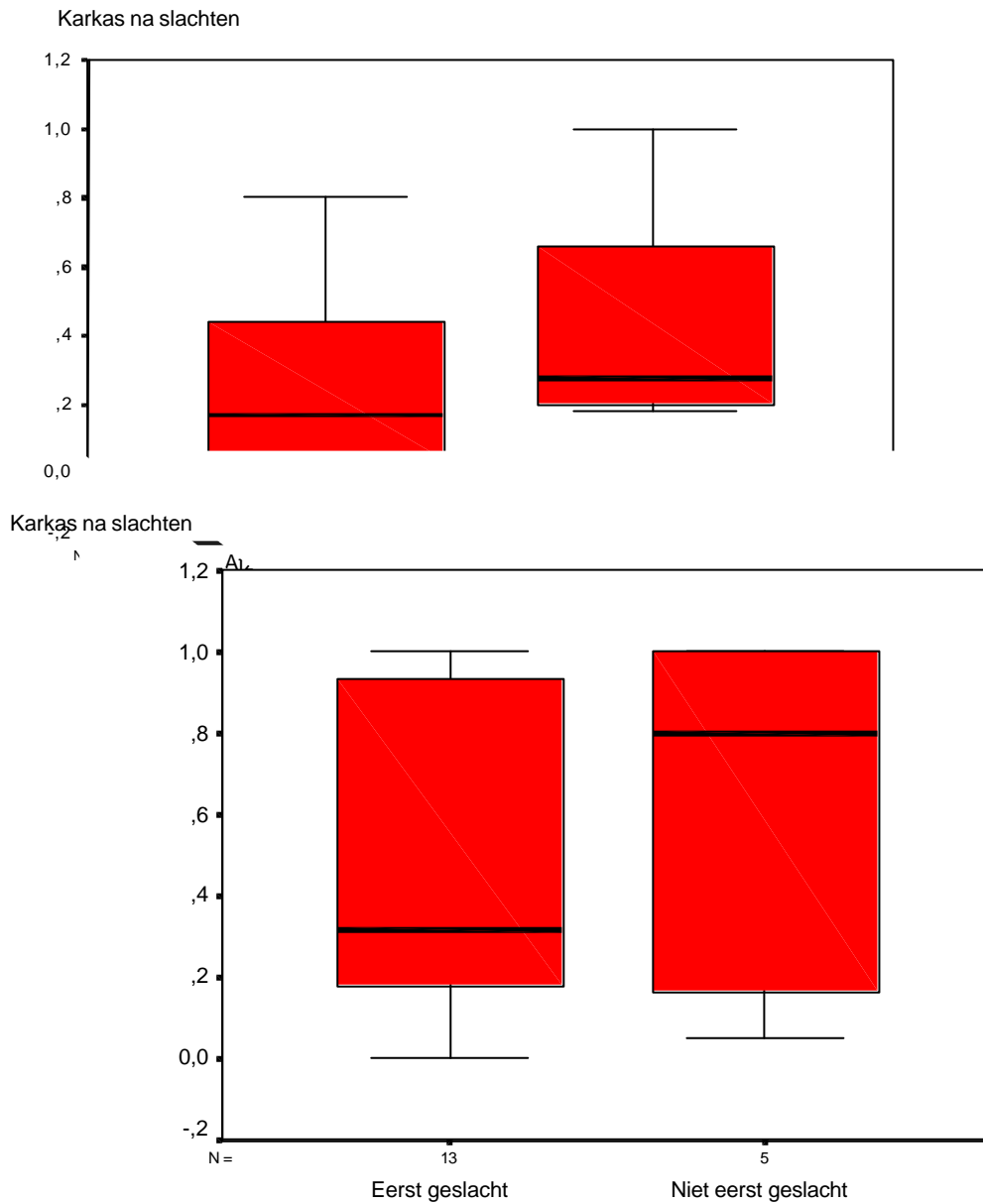
Figuur 2 : Isolatie van *Salmonella* bij de productie van braadkuikens in functie van de status van de tomen en het antibioticagebruik tijdens de opkweekperiode



Figuur 3 : Isolatie van *Salmonella* positieve karkassen in functie van de status van de toom en de identiteit van het slachthuis



Figuur 4: Isolatie van *Salmonella* positieve karkassen in functie van de toegepaste evisceratietechniek in het slachthuis



Figuur 5: Isolatie van *Salmonella* positieve karkassen in functie van het tijdstip van slachting van de tomen (geslacht als eerste of niet)

Tabel 9: *Salmonella* serotypes bij de productie van 18 tomen braadkuikens

| Toom/ Slachthuis | Broeierij Transport | Hygiëne stal | Dieren | Voeder | Stal niet dieren Omgeving | Transport- containers | Slachthuis |
|---------------------|------------------------|--------------------|---------------------------------------|--------------------|---|---|---|
| 1/1 | | <i>S. Infantis</i> | | | | | <i>S. Blockley</i> <i>S. Indiana</i> <i>S. Bredeney</i> <i>S. niet typ.*</i> |
| 2/0 | | | <i>S. Agona</i> | | | | <i>S. Typhimurium</i> |
| 3/1 | <i>S. Hadar</i> | | | | <i>S. Mbandaka</i> | <i>S. Blockley</i> | <i>S. Montevideo</i> <i>S. Brandenburg</i> <i>S. Blockley</i> <i>S. Agona</i> <i>S. Indiana</i> <i>S. Anatum</i> |
| 4/0 | | | | <i>S. Mbandaka</i> | | <i>S. Hadar</i> | |
| 5/1 | | | | | | <i>S. Hadar</i> <i>S. Typhimurium</i> | <i>S. Blockley</i> <i>S. Agona</i> <i>S. Indiana</i> <i>S. Enteritidis</i> <i>S. 6,7:-:5</i> <i>S. Typhimurium</i> <i>S. Infantis</i> |
| 6/1 | | | <i>S. Hadar</i> <i>S. Mbandaka</i> | | <i>S. Hadar</i> <i>S. Mbandaka</i> <i>S. Anatum</i> | <i>S. Hadar</i> <i>S. Indiana</i> <i>S. Virchow</i> | <i>S. Hadar</i> <i>S. Infantis</i> <i>S. Montevideo</i> <i>S. Indiana</i> <i>S. Anatum</i> <i>S. Senftenberg</i> <i>S. Agona</i> |

Tabel 9: Vervolg

| Toom/ Slachthuis | Broeierij Transport | Hygiëne stal | Dieren | Voeder | Stal niet dieren Omgeving | Transport- containers | Slachthuis |
|---------------------|------------------------|--|---|--------------------|--|--|---|
| 7/1 | | <i>S. Hadar</i> | <i>S. Hadar</i> | | <i>S. Hadar</i> <i>S. niet typ.</i> <i>S. Mbandaka</i> | <i>S. Agona</i> <i>S. Montevideo</i> <i>S. Typhimurium</i> <i>S. Blockley</i> | <i>S. Hadar</i> <i>S. Blockley</i> <i>S. Typhimurium</i> <i>S. Indiana</i> <i>S. Brandenburg</i> <i>S. Infantis</i> <i>S. Agona</i> |
| 8/0 | <i>S. Enteritidis</i> | <i>S. Virchow</i> | <i>S. Enteritidis</i> | | <i>S. Enteritidis</i> <i>S. Mbandaka</i> | <i>S. Typhimurium</i> | <i>S. Enteritidis</i> <i>S. Mbandaka</i> |
| 9/0 | <i>S. Enteritidis</i> | <i>S. niet typ.</i> | <i>S. Enteritidis</i> <i>S. Braenderup</i> | | <i>S. Braenderup</i> <i>S. Mbandaka</i> | | <i>S. Enteritidis</i> <i>S. Typhimurium</i> |
| 10/2 | | <i>S. Blockley</i> <i>S. Hadar</i> <i>S. niet typ.</i> | <i>S. Blockley</i> <i>S. niet typ.</i> | <i>S. Blockley</i> | <i>S. Blockley</i> <i>S. niet typ.</i> | <i>S. Blockley</i> <i>S. Mbandaka</i> <i>S. niet typ.</i> | <i>S. Blockley</i> <i>S. Enteritidis</i> <i>S. Mbandaka</i> |
| 11/3 | | | | <i>S. Mbandaka</i> | | | <i>S. Infantis</i> <i>S. Virchow</i> <i>S. Senftenberg</i> <i>S. Enteritidis</i> |
| 12/4 | | | | | | <i>S. Blockley</i> | <i>S. Blockley</i> <i>S. Virchow</i> |
| 13/5 | | | | | <i>S. Blockley</i> <i>S. Hadar</i> | <i>S. niet typ.</i> <i>S. Hadar</i> | <i>S. Hadar</i> <i>S. Typhimurium</i> <i>S. Montevideo</i> <i>S. niet typ.</i> <i>S. Mbandaka</i> |

Tabel 9: Vervolg

| Toom/ Slachthuis | Broeierij Transport | Hygiëne stal | Dieren | Voeder | Stal niet dieren Omgeving | Transport- containers | Slachthuis |
|---------------------|------------------------|-----------------|--|---------------------|--|---|--|
| 14/6 | | | | | <i>S. Panama</i> | | <i>S. Agona</i> <i>S. Montevideo</i> |
| 15/6 | | | <i>S. Hadar</i> <i>S. Brandenburg</i> | | <i>S. Blockley</i> <i>S. Hadar</i> <i>S. Brandenburg</i> | <i>S. Montevideo</i> <i>S. Indiana</i> | <i>S. Enteritidis</i> <i>S. Montevideo</i> |
| 16/7 | | | <i>S. Anatum</i> | | | <i>S. Typhimurium</i> <i>S. Hadar</i> <i>S. niet typ.</i> | <i>S. Typhimurium</i> <i>S. Hadar</i> <i>S. Paratyphi B</i> <i>S. niet typ.</i> |
| 17/8 | | | <i>S. Kentucky</i> | | <i>S. Kentucky</i> | | <i>S. Infantis</i> <i>S. Typhimurium</i> |
| 18/3 | | | <i>S. niet typ.</i> | <i>S. niet typ.</i> | <i>S. niet typ.</i> | | <i>S. Mbandaka</i> <i>S. Enteritidis</i> |

* *S. niet typ.*: serologisch niet typeerbare *Salmonella* stam; De serotypes die in verschillende fases van de productieketen weerkomen zijn weergegeven in kleur: rood, verschillende plaatsen in levende fase en in het slachthuis; groen, alleen levende fase; blauw, omgeving hoeve en slachthuis

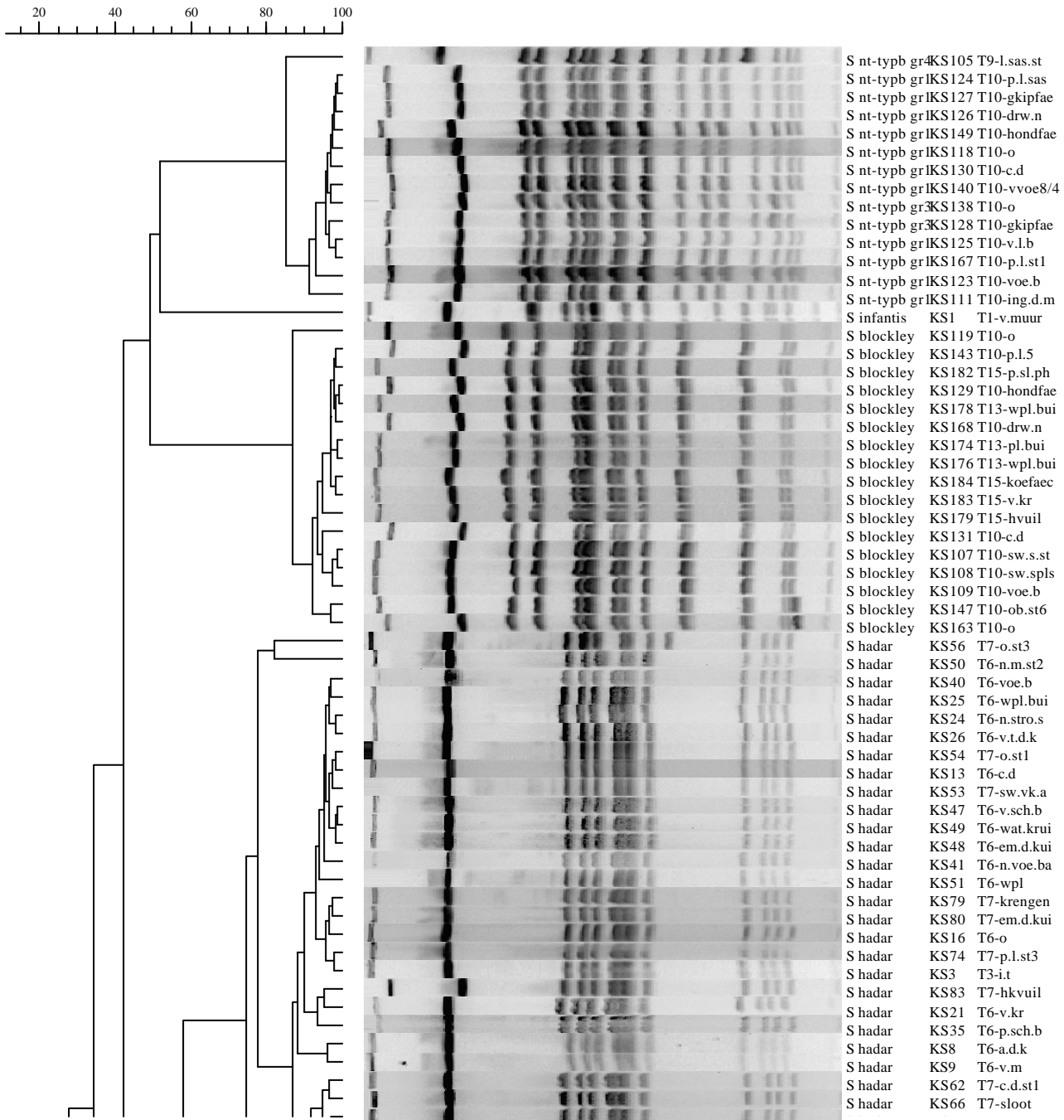
Moleculaire typering van *Salmonella* isolaten

Alle *Salmonella* isolaten uit de levende fase werden na serotypering (Tabel 9) (via REP-PCR en klassieke serotypering) verder getypeerd met pulsed field gel elektroforese (PFGE) om verschillende genotypes binnen de serotypes op te sporen. Indien er een verband was tussen serotypes in de levende fase en op de karkassen in het slachthuis, werden ook de slachthuisisolaten getypeerd met PFGE. Met deze moleculaire fijntypering kunnen epidemiologische verbanden gelegd worden die verder reiken dan wat met serotypering mogelijk is.

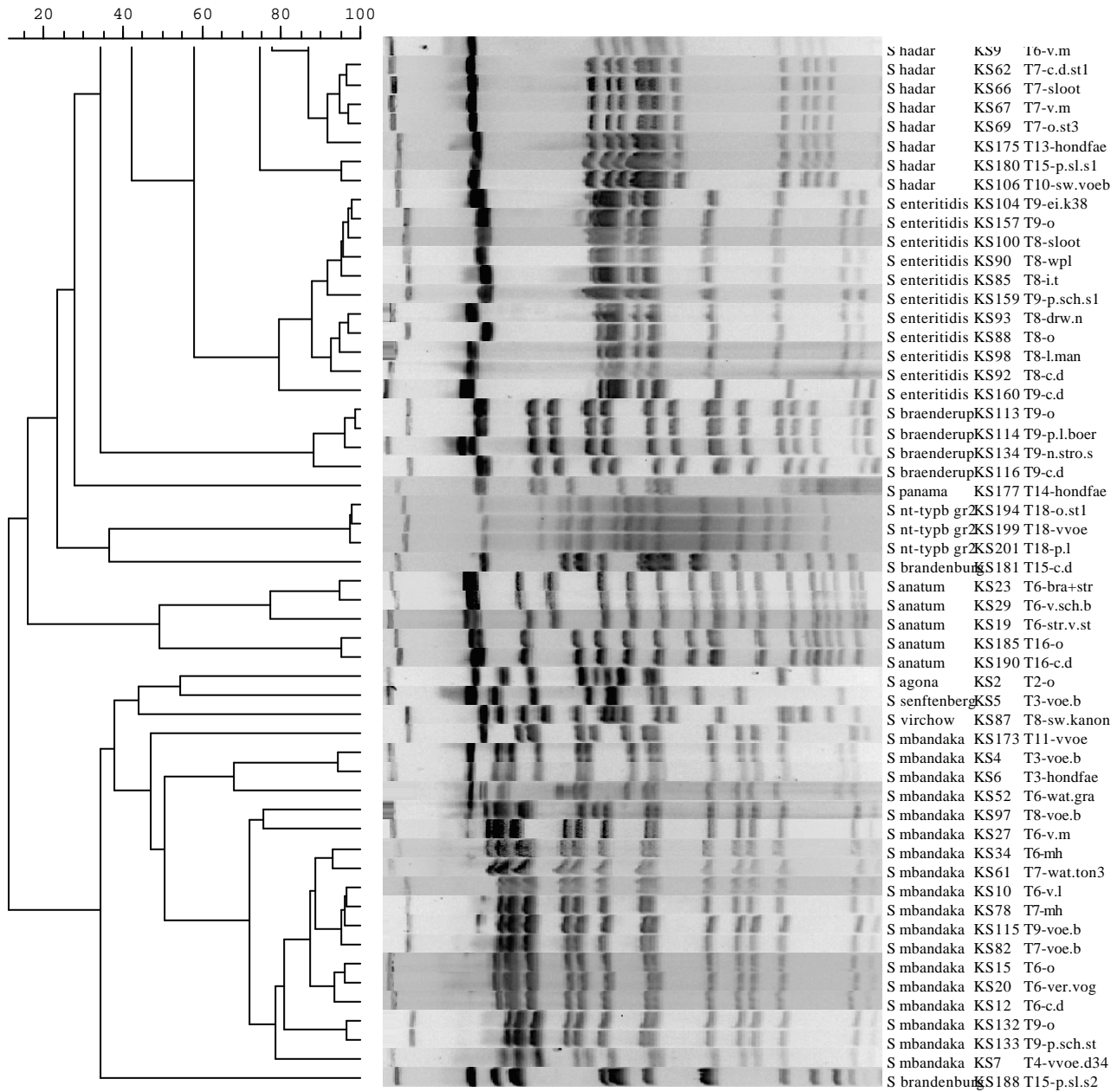
Alle isolaten werden in eerste instantie getypeerd met het restrictie-enzym *XbaI*. Voor een selectie van isolaten uit de levende fase waarbij alle tomen, isolatiebronnen en *XbaI*-genomische types zijn ingesloten, zijn de resultaten voorgesteld onder de vorm van een dendrogram (Figuur 6) waarin de isolaten zijn gegroepeerd volgens hun gelijkenis in *XbaI*-patroon. Een eerste belangrijke vaststelling is dat met *XbaI* de *Salmonella* isolaten visueel vrij gemakkelijk kunnen worden gegroepeerd op serotype niveau. Dit betekent dat naast REP-PCR ook PFGE met *XbaI* kan gebruikt worden om serotypes te identificeren. Voor bepaalde serotypes kon nog een verder onderscheid gemaakt worden tussen verschillende *XbaI*-types, bijvoorbeeld voor *S. Hadar* (isolaat KS56 t.o.v. de andere *S. Hadar* isolaten), *S. Anatum* (2 toomafhankelijke groepen), *S. Mbandaka* (verschillende types binnen en tussen tomen), en een niet-typeerbaar type (2 toomafhankelijke hoofdgroepen). Voor bepaalde serotypes zoals *S. Enteritidis* daarentegen werd geen enkele discriminatie bekomen met *XbaI*.

De meeste isolaten uit de levende fase werden ook getypeerd met het restrictie-enzym *NotI*, en een selectie van isolaten werd nog verder getypeerd met de restrictie-enzymen *SpeI* en *BlnI*. Voor een selectie van isolaten uit de levende fase waarbij alle tomen, isolatiebronnen en *NotI*-genomische types zijn ingesloten, zijn de resultaten voorgesteld onder de vorm van een dendrogram (Figuur 7) waarin de isolaten zijn gegroepeerd volgens hun gelijkenis in *NotI*-patroon. In vergelijking met *XbaI*, worden met *NotI* veel meer banden bekomen. Hierdoor gelijken de patronen van verschillende serotypes visueel veel meer op elkaar, maar kan er binnen bepaalde serotypes wel een verdere discriminatie bekomen worden, welke niet werd gedetecteerd met *XbaI*. Het restrictie-enzym *BlnI* gaf geen bijkomende discriminatie voor de geselecteerde isolaten, terwijl met *SpeI* enkel voor de serotypes *S. Mbandaka* en *S. Hadar* in een beperkt aantal gevallen een verdere discriminatie werd bekomen. De combinatie *XbaI* – *NotI* blijkt dus de beste discriminatie op te leveren voor *Salmonella* isolaten behorende tot de in deze studie voorkomende serotypes.

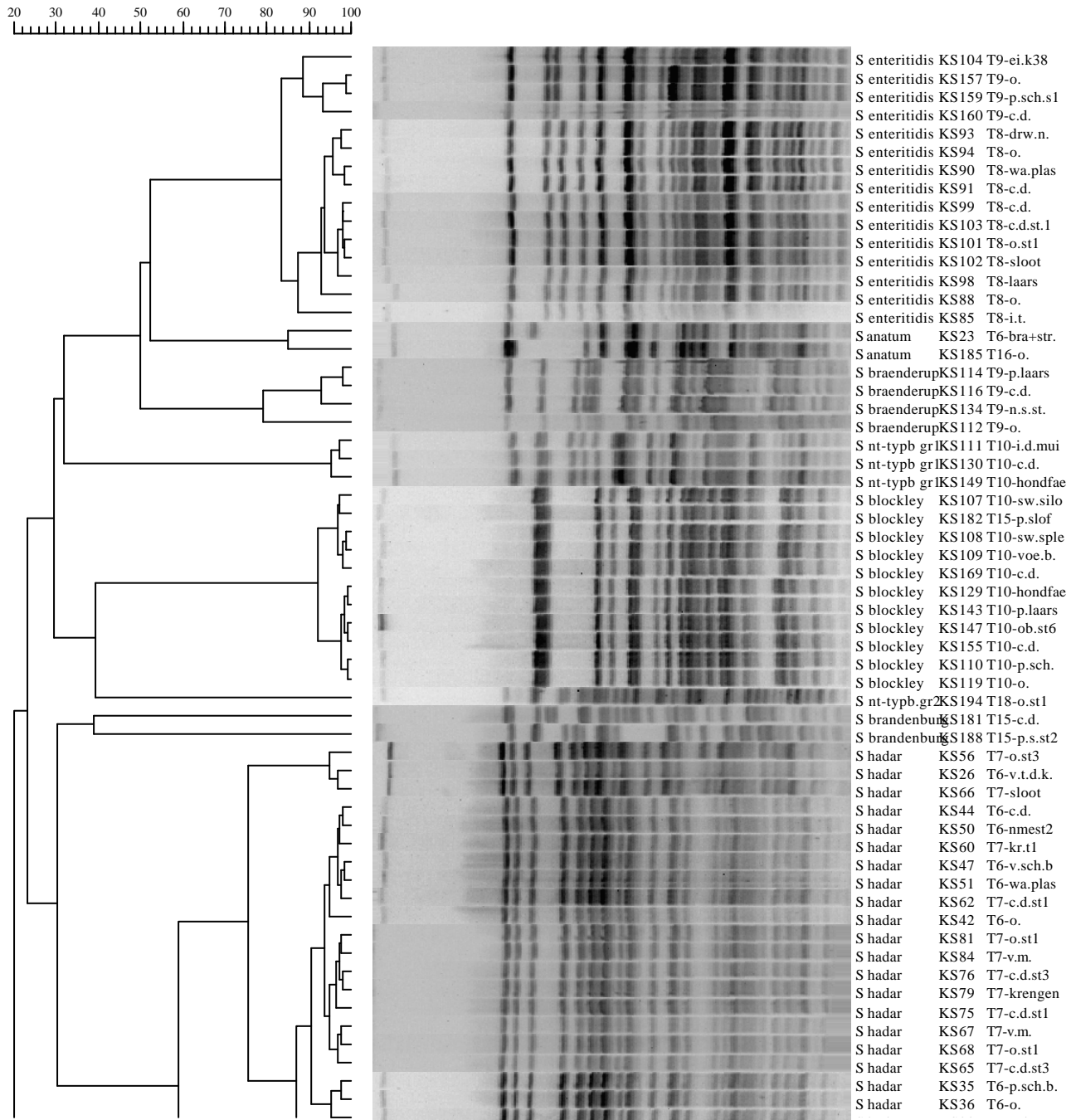
Figuur 6: Dendrogram van de PFGE-patronen met *XbaI* van een selectie van *Salmonella* isolaten uit alle positieve tomen in de levende fase. Zie lijst met afkortingen voor de isolatiebronnen



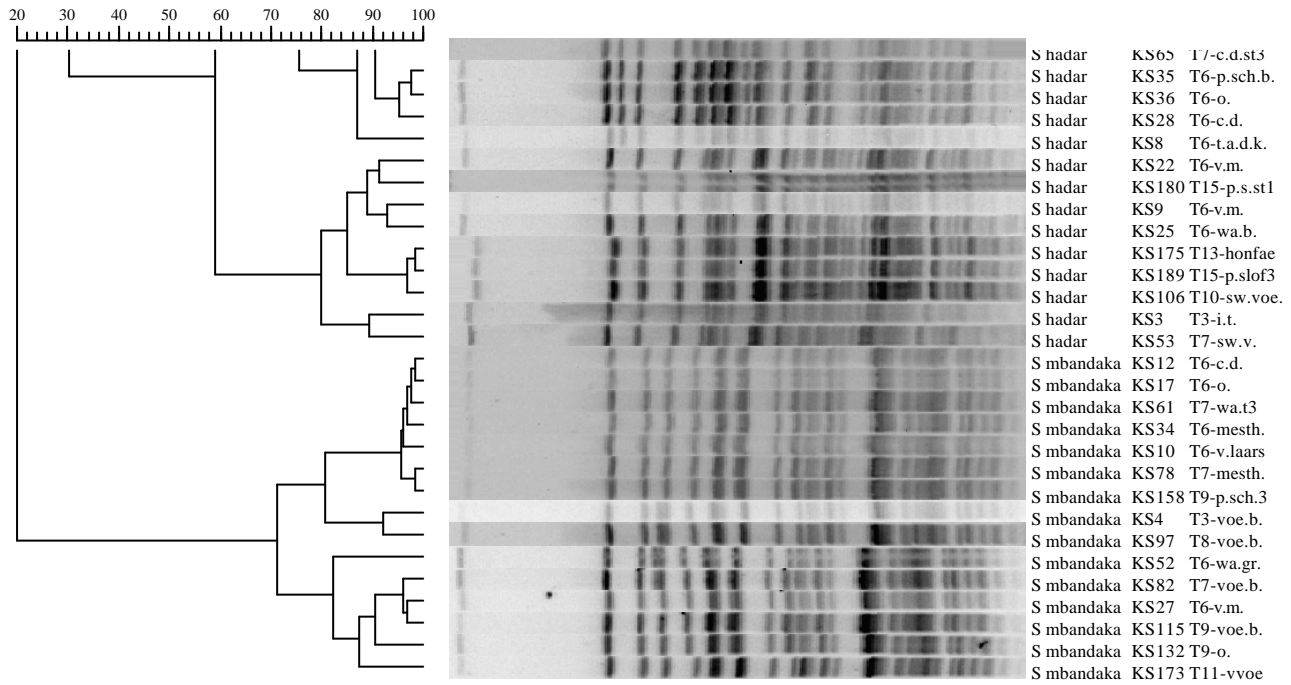
(Figuur 6: vervolg)



Figuur 7: Dendrogram van de PFGE-patronen met *NotI* van een selectie van *Salmonella* isolaten uit alle positieve tomen in de levende fase. Zie lijst met afkortingen voor de isolatiebronnen



(Figuur 7: vervolg)



Alle genomische types gevonden voor de 4 gebruikte restrictie-enzymen in elke toom en per staaltype in de levende fase zijn weergegeven in Tabel 10.

Tabel 10: PFGE-genomische types van *Salmonella* isolaten uit de levende fase. Het tijdstip van monstername is aangeduid als T: na transport van broeierij; M1: hygiënecontrole; M2: na 2 weken opfok; M3: na 4 weken opfok; M4: na 6 weken opfok.

Toom 1

| Tijd | Staal | Stam nr | Salmonella serotype | PFGE | | | |
|------|--------------------------|---------|---------------------|------|------|------|------|
| | | | | XbaI | SpeI | BlnI | NotI |
| M1 | grote ventilatie in muur | KS 1 | Infantis | I1 | | | |

Toom 2

| Tijd | Staal | Stam nr | Salmonella serotype | PFGE | | | |
|------|-----------|---------|---------------------|------|------|------|------|
| | | | | XbaI | SpeI | BlnI | NotI |
| M2 | overshoes | KS 2 | Agona | Ag1 | | | |

Toom 3

| Tijd | Staal | Stam nr | Salmonella serotype | PFGE | | | |
|------|------------------------------|---------|---------------------|------|------|------|------|
| | | | | XbaI | SpeI | BlnI | NotI |
| T | inlegvellen transport | KS 3 | Hadar | H1 | H1 | H1 | H3 |
| M3 | voeder uit bakjes | KS 4 | Mbandaka | M3 | M4 | M3 | M3 |
| M4 | hondendrol in water omgeving | KS 6 | Mbandaka | M3 | | | |
| M4 | voeder uit bakjes | KS 5 | Senftenberg | S1 | | | |

Toom 4

| Tijd | Staal | Stam nr | Salmonella serotype | PFGE | | | |
|------|--------------------|---------|---------------------|------|------|------|------|
| | | | | XbaI | SpeI | BlnI | NotI |
| M4 | vers voeder dag 34 | KS 7 | Mbandaka | M1 | M1 | M1 | M1 |

Toom 6

| Tijd | Staal | Stam nr | Salmonella serotype | PFGE | | | |
|------|----------------------------|---------------|---------------------|------|------|------|------|
| | | | | XbaI | SpeI | BlnI | NotI |
| M1 | ton afval dode kuikens | KS 8 | Hadar | H1 | H1 | | H1 |
| M1 | vocht mesthoop | KS 9 | Hadar | H1 | H1 | | H3 |
| M1 | vuile laarzen | KS 10 | Mbandaka | M1 | M1 | | M1 |
| M2 | strontjes voor stal | KS 19 | Anatum | A1 | | | |
| M2 | braakbal + strontje buiten | KS 23 | Anatum | A1 | A1 | A1 | A1 |
| M2 | vuile schoenen boer | KS 29 | Anatum | A1 | | | |
| M2 | pecale drop | KS 11 | Hadar | H1 | H1 | | |
| M2 | pecale drop | KS 13 | Hadar | H1 | H1 | H1 | H1 |
| M2 | overshoes | KS 14 | Hadar | H1 | H1 | | |
| M2 | overshoes | KS 16 | Hadar | H1 | H1 | | H1 |
| M2 | waterplas buiten | KS 25 | Hadar | H1 | H1 | | H3 |
| M2 | vocht ton dode kuikens | KS 26 | Hadar | H1 | H1 | H1 | H1 |
| M2 | vocht mesthoop | KS 27 | Mbandaka | M1 | M1 | M1 | M1 |
| M2 | pecale drop | KS 12 | Mbandaka | M1 | M1 | | M1 |
| M2 | overshoes | KS 15 | Mbandaka | M1 | M1 | M1 | M1 |
| M2 | overshoes | KS 17, KS 18 | Mbandaka | M1 | M1 | | M1 |
| M2 | veren vogel | KS 20 | Mbandaka | M1 | M1 | | M1 |
| M3 | vocht krenge | KS 21 | Hadar | H1 | H1 | | |
| M3 | vocht mesthoop | KS 22 | Hadar | H1 | H1 | | H3 |
| M3 | nat stro stal | KS 24 | Hadar | H1 | H1 | | |
| M3 | pecale drop | KS 28, KS 33 | Hadar | H1 | H1 | | H1 |
| M3 | pecale drop | KS 30 – KS 32 | Hadar | H1 | H1 | | |
| M3 | propere schoenen boer | KS 35 | Hadar | H1 | H1 | | H1 |
| M3 | overshoes | KS 36, KS 39 | Hadar | H1 | H1 | | H1 |
| M3 | overshoes | KS 37, KS 38 | Hadar | H1 | H1 | | |

| | | | | | | | |
|----|-----------------------|--------------|----------|----|----|----|----|
| M3 | voeder uit bakjes | KS 40 | Hadar | H1 | H1 | | |
| M3 | mesthoop | KS 34 | Mbandaka | M1 | M1 | | M1 |
| M4 | nat voeder uit bakjes | KS 41 | Hadar | H1 | H1 | | |
| M4 | overshoes | KS 42 | Hadar | H1 | H1 | | H1 |
| M4 | overshoes | KS 43 | Hadar | H1 | H1 | | |
| M4 | becale drop | KS 44, KS 46 | Hadar | H1 | H1 | | H1 |
| M4 | becale drop | KS 45 | Hadar | H1 | H1 | | |
| M4 | vuile schoenen boer | KS 47 | Hadar | H1 | H1 | | H1 |
| M4 | emmer dode kuikens | KS 48 | Hadar | H1 | | | |
| M4 | water kruiwagen | KS 49 | Hadar | H1 | | | |
| M4 | nieuw mest stal 2 | KS 50 | Hadar | H1 | H1 | | H1 |
| M4 | waterplas | KS 51 | Hadar | H1 | H1 | | H1 |
| M4 | water gracht | KS 52 | Mbandaka | M5 | M4 | M3 | M3 |

Toom 7

| Tijd | Staal | Stam nr | Salmonella serotype | PFGE | | | |
|------|----------------------------------|--------------|---------------------|------|------|------|------|
| | | | | XbaI | SpeI | BlnI | NotI |
| M1 | swabs ventilatiekanaal achteraan | KS 53 | Hadar | H1 | H1 | H1 | H3 |
| M2 | overshoes stal 1 | KS 54, KS 58 | Hadar | H1 | H1 | | H1 |
| M2 | overshoes stal 1 | KS 57 | Hadar | H1 | H1 | | |
| M2 | overshoes stal 3 | KS 55, KS 59 | Hadar | H1 | | | |
| M2 | overshoes stal 3 | KS 56 | Hadar | H2 | H2 | H2 | H2 |
| M2 | krengen ton 1 | KS 60 | Hadar | H1 | H1 | | H1 |
| M2 | becale drop stal 1 | KS 62 | Hadar | H1 | H1 | | H1 |
| M2 | becale drop stal 1 | KS 63 | Hadar | H1 | | | |
| M2 | becale drop stal 3 | KS 64 | Hadar | H1 | | | |
| M2 | becale drop stal 3 | KS 65 | Hadar | H1 | H1 | | H1 |
| M2 | sloot | KS 66 | Hadar | H1 | H1 | H1 | H1 |
| M2 | vocht mesthoop | KS 67 | Hadar | H1 | H1 | | H1 |
| M2 | water ton 3 | KS 61 | Mbandaka | M1 | M2 | | M1 |
| M3 | overshoes stal 1 | KS 68 | Hadar | H1 | H1 | | H1 |
| M3 | overshoes stal 1 | KS 70, KS 73 | Hadar | H1 | | | |
| M3 | overshoes stal 1 | KS 72 | Hadar | H1 | H1 | | |
| M3 | overshoes stal 3 | KS 69 | Hadar | H1 | H1 | | H1 |
| M3 | overshoes stal 3 | KS 71 | Hadar | H1 | | | |
| M3 | propere laarzen stal 3 | KS 74 | Hadar | H1 | | | |
| M3 | becale drop stal 1 | KS 75 | Hadar | H1 | H1 | | H1 |
| M3 | becale drop stal 3 | KS 76 | Hadar | H1 | H1 | | H1 |
| M3 | becale drop stal 3 | KS 77 | Hadar | H1 | H1 | | |
| M3 | krengen | KS 79 | Hadar | H1 | H1 | | H1 |
| M3 | emmer dode kuikens | KS 80 | Hadar | H1 | | | |
| M3 | mesthoop | KS 78 | Mbandaka | M1 | M1 | | M1 |
| M4 | overshoes stal 1 | KS 81 | Hadar | H1 | H1 | | H1 |
| M4 | houtkrulvuil | KS 83 | Hadar | H1 | | | |
| M4 | vocht mesthoop | KS 84 | Hadar | H1 | H1 | | H1 |
| M4 | voeder uit bakjes | KS 82 | Mbandaka | M1 | M1 | M1 | M3 |

Toom 8

| Tijd | Staal | Stam nr | Salmonella serotype | PFGE | | | |
|------|-----------------------|--------------|---------------------|------|------|------|------|
| | | | | XbaI | SpeI | BlnI | NotI |
| T | inlegvellen transport | KS 85, KS 86 | Enteritidis | E1 | E1 | E1 | E1 |
| M1 | swabs kanon | KS 87 | Virchow | V1 | | | |
| M2 | overshoes | KS 88 | Enteritidis | E1 | E1 | E1 | E1 |
| M2 | overshoes | KS 89 | Enteritidis | E1 | | | E1 |
| M2 | waterplas | KS 90 | Enteritidis | E1 | E1 | E1 | E1 |
| M2 | becale drop | KS 91 | Enteritidis | E1 | E1 | E1 | E1 |
| M2 | becale drop | KS 92 | Enteritidis | E1 | | | E1 |
| M2 | drinkwater nippels | KS 93 | Enteritidis | E1 | E1 | E1 | E1 |
| M3 | overshoes | KS 94 | Enteritidis | E1 | E1 | E1 | E1 |
| M3 | overshoes | KS 95, KS 96 | Enteritidis | E1 | | | E1 |
| M3 | laarzen man | KS 98 | Enteritidis | E1 | E1 | E1 | E1 |
| M3 | becale drop | KS 99 | Enteritidis | E1 | | | E1 |
| M3 | sloot | KS 100 | Enteritidis | E1 | E1 | E1 | E1 |
| M3 | voeder uit bakjes | KS 97 | Mbandaka | M4 | M5 | M1 | M3 |
| M4 | overshoes stal 1 | KS 101 | Enteritidis | E1 | | | E1 |
| M4 | sloot | KS 102 | Enteritidis | E1 | | | E1 |
| M4 | becale drop stal 1 | KS 103 | Enteritidis | E1 | E1 | E1 | E1 |

Toom 9

| Tijd | Staal | Stam nr | Salmonella serotype | PFGE | | | |
|------|-------------------------------------|----------------|---------------------|-------|------|------|------|
| | | | | XbaI | SpeI | BlnI | NotI |
| B | eierschalen kast 38 | KS 104 | Enteritidis | E1 | E1 | E1 | E3 |
| M1 | laarzen sas stal | KS 105 | nt typeerb.-groep4 | nt t4 | | | |
| M2 | overshoes | KS 112, KS 113 | Braenderup | Br1 | | | Br1 |
| M2 | propere laarzen boer | KS 114 | Braenderup | Br1 | | | Br1 |
| M2 | becale drop | KS 116, KS 117 | Braenderup | Br1 | | | Br1 |
| M2 | voeder uit bakjes | KS 115 | Mbandaka | M1 | M1 | M1 | M1 |
| M3 | nat stro stal | KS 134 | Braenderup | Br1 | | | Br1 |
| M3 | overshoes | KS 132 | Mbandaka | M1 | M1 | M1 | M1 |
| M3 | propere schoenen om in stal te gaan | KS 133 | Mbandaka | M1 | | | |
| M4 | overshoes | KS 157 | Enteritidis | E1 | E2 | E1 | E2 |
| M4 | propere schoenen stal 1 | KS 159 | Enteritidis | E1 | E2 | E1 | E2 |
| M4 | becale drop | KS 160 | Enteritidis | E1 | E2 | E1 | E2 |
| M4 | propere schoenen stal 3 | KS 158 | Mbandaka | M1 | M1 | | M1 |

Toom 10

| Tijd | Staal | Stam nr | Salmonella serotype | PFGE | | | |
|------|--------------------------|------------------------|---------------------|-------|-------|----------|-------|
| | | | | XbaI | SpeI | BlnI | NotI |
| M1 | ingewanden dode muis | KS 111 | nt typeerb.-groep1 | nt t1 | nt t1 | nt t1 | nt t1 |
| M1 | swabs silo's in stal | KS 107 | Blockley | B1 | B1 | | B1 |
| M1 | swabs spleten stal | KS 108 | Blockley | B1 | B1 | | B1 |
| M1 | voeder uit bakjes | KS 109 | Blockley | B1 | B1 | | B1 |
| M1 | propere schoenen stal | KS 110 | Blockley | B1 | B1 | | B1 |
| M1 | swabs voederbakjes | KS 106 | Hadar | H1 | H3 | H1 | H3 |
| M2 | overshoes | KS 118, KS 120, KS 121 | nt typeerb.-groep1 | nt t1 | | | |
| M2 | voeder uit bakjes | KS 123 | nt typeerb.-groep1 | nt t1 | | | |
| M2 | propere laarzen in sas | KS 124 | nt typeerb.-groep1 | nt t1 | | | |
| M2 | vuile laarzen buiten sas | KS 125 | nt typeerb.-groep1 | nt t1 | | | |
| M2 | drinkwater nippels | KS 126 | nt typeerb.-groep1 | nt t1 | | | |
| M2 | gewone kippestront | KS 127 | nt typeerb.-groep1 | nt t1 | | | |
| M2 | becale drop | KS 130 | nt typeerb.-groep1 | nt t1 | nt t1 | nt t1 | nt t1 |
| M2 | gewone kippestront | KS 128 | nt typeerb.-groep3 | nt t3 | | | |
| M2 | overshoes | KS 119 | Blockley | B1 | B1 | | B1 |
| M2 | overshoes | KS 122 | Blockley | B1 | | | |
| M2 | hondendrol | KS 129 | Blockley | B1 | B1 | | B1 |
| M2 | becale drop | KS 131 | Blockley | B1 | | | |
| M3 | overshoes | KS 135, KS 137 | nt typeerb.-groep1 | nt t1 | | | |
| M3 | vers voeder 8/4 | KS 140 | nt typeerb.-groep1 | nt t1 | | | |
| M3 | voeder uit bakjes | KS 141 | nt typeerb.-groep1 | nt t1 | | | |
| M3 | propere laarzen stal 4 | KS 145 | nt typeerb.-groep1 | nt t1 | | | |
| M3 | propere laarzen stal 6 | KS 144 | nt typeerb.-groep1 | nt t1 | | | |
| M3 | propere laarzen stal 7 | KS 146 | nt typeerb.-groep1 | nt t1 | | | |
| M3 | propere laarzen stal 8 | KS 142 | nt typeerb.-groep1 | nt t1 | | | |
| M3 | drinkwater nippels | KS 148 | nt typeerb.-groep1 | nt t1 | | | |
| M3 | hondendrol | KS 149 | nt typeerb.-groep1 | nt t1 | nt t1 | nt t1 | nt t1 |
| M3 | becale drop | KS 150 – KS 156 | nt typeerb.-groep1 | nt t1 | | | |
| M3 | overshoes | KS 138, KS 139 | nt typeerb.-groep3 | nt t3 | | | |
| M3 | overshoes | KS 136 | Blockley | B1 | | | |
| M3 | propere laarzen stal 5 | KS 143 | Blockley | B1 | B1 | | B1 |
| M3 | ontsmettingsbakje stal 6 | KS 147 | Blockley | B2 | B1 | | B1 |
| M3 | becale drop | KS 155 | Blockley | B1 | B1 | | B1 |
| M4 | propere laarzen stal 1 | KS 167 | nt typeerb.-groep1 | nt t1 | | | |
| M4 | propere laarzen stal 2 | KS 166 | nt typeerb.-groep1 | nt t1 | | | |
| M4 | propere laarzen stal 4 | KS 165 | nt typeerb.-groep1 | nt t1 | | | |
| M4 | overshoes | KS 161 | Blockley | B1 | B1 | gn patr. | B1 |
| M4 | overshoes | KS 162 | Blockley | B1 | | | |
| M4 | overshoes | KS 163 | Blockley | B2 | B2 | | B1 |
| M4 | voeder uit bakjes | KS 164 | Blockley | B1 | | | |
| M4 | drinkwater nippels | KS 168 | Blockley | B1 | | | |
| M4 | becale drop | KS 169 | Blockley | B1 | B1 | | B1 |
| M4 | becale drop | KS 170 – KS 172 | Blockley | B1 | | | |

Toom 11

| Tijd | Staal | Stam nr | Salmonella serotype | PFGE | | | |
|------|-------------|---------|---------------------|------|------|------|------|
| | | | | XbaI | SpeI | BlnI | NotI |
| M4 | vers voeder | KS 173 | Mbandaka | M2 | M3 | M2 | M2 |

Toom 13

| Tijd | Staal | Stam nr | Salmonella serotype | PFGE |
|------|-------|---------|---------------------|------|
|------|-------|---------|---------------------|------|

| | | | | XbaI | SpeI | BlnI | NotI |
|----|---------------------|--------|----------|------|------|----------|------|
| M1 | plassen buiten | KS 174 | Blockley | B1 | B1 | gn patr. | B1 |
| M1 | waterplas mesthoop | KS 176 | Blockley | B1 | | | |
| M1 | hondenfeces | KS 175 | Hadar | H1 | H3 | H1 | H3 |
| M4 | waterplassen buiten | KS 178 | Blockley | B1 | | | |

Toom 14

| Tijd | Staal | Stam nr | Salmonella serotype | PFGE | | | |
|------|-------------|---------|---------------------|------|------|------|------|
| | | | | XbaI | SpeI | BlnI | NotI |
| M2 | hondenfeces | KS 177 | Panama | P1 | | | |

Toom 15

| Tijd | Staal | Stam nr | Salmonella serotype | PFGE | | | |
|------|-------------------------------|---------|---------------------|------|------|----------|------|
| | | | | XbaI | SpeI | BlnI | NotI |
| M1 | huisvuil | KS 179 | Blockley | B1 | | | |
| M2 | pecale drop | KS 181 | Brandenburg | Bra1 | Bra1 | | Bra1 |
| M2 | propere sloffen stal 1 | KS 180 | Hadar | H1 | H3 | | H3 |
| M3 | propere sloffen parelhoenders | KS 182 | Blockley | B1 | B1 | | B1 |
| M3 | vocht krenge | KS 183 | Blockley | B1 | B1 | gn patr. | B1 |
| M3 | feces koe | KS 184 | Blockley | B1 | | | |
| M4 | propere sloffen stal 2 | KS 188 | Brandenburg | Bra2 | Bra2 | | Bra2 |
| M4 | propere sloffen stal 3 | KS 189 | Hadar | H1 | H3 | H1 | H3 |

Toom 16

| Tijd | Staal | Stam nr | Salmonella serotype | PFGE | | | |
|------|-------------|----------------|---------------------|------|------|------|------|
| | | | | XbaI | SpeI | BlnI | NotI |
| M3 | overshoes | KS 185 | Anatum | A2 | A1 | A2 | A2 |
| M3 | overshoes | KS 186, KS 187 | Anatum | A2 | | | |
| M4 | pecale drop | KS 190, KS 191 | Anatum | A2 | | | |

Toom 17

| Tijd | Staal | Stam nr | Salmonella serotype | PFGE | | | |
|------|------------------------|---------|---------------------|---------|------|------|------|
| | | | | XbaI | SpeI | BlnI | NotI |
| M2 | overshoes | KS 192 | Kentucky | gn patr | | | |
| M4 | propere laarzen stal 1 | KS 193 | Kentucky | gn patr | | | |

Toom 18

| Tijd | Staal | Stam nr | Salmonella serotype | PFGE | | | |
|------|------------------|-----------------|---------------------|-------|-------|-------|-------|
| | | | | XbaI | SpeI | BlnI | NotI |
| M2 | overshoes stal 1 | KS 194 | nt typeerb.-groep2 | nt t2 | nt t2 | nt t2 | nt t2 |
| M2 | overshoes stal 1 | KS 195 – KS 197 | nt typeerb.-groep2 | nt t2 | | | |
| M2 | overshoes stal 1 | KS 198 | nt typeerb.-groep2 | nt t2 | nt t2 | nt t2 | nt t2 |
| M2 | vers voeder | KS 199 | nt typeerb.-groep2 | nt t2 | | | |
| M3 | overshoes | KS 200 | nt typeerb.-groep2 | nt t2 | | | |
| M3 | propere laarzen | KS 201 | nt typeerb.-groep2 | nt t2 | | | |

In tomen 1, 2 en 4 werd telkens slechts 1 *Salmonella* stam geïsoleerd, respectievelijk *S. Infantis* na hygiënecontrole, *S. Agona* éénmalig uit de dieren na 2 weken opfok en *S. Mbandaka* uit vers voeder. Toom 5 was volledig negatief voor *Salmonella*.

In toom 3 werden 3 verschillende *Salmonella* serotypes geïsoleerd, namelijk *S. Hadar* uit de inlegvellen na transport van de één-dagskuikens uit de broeierij, *S. Mbandaka* uit voeder en hondenfeces en *S. Senftenberg* uit voeder. De *S. Hadar* stam van het genomisch type H1-H1-H1-H3 (resp. met *XbaI*, *SpeI*, *BlnI* en *NotI*) zette zich niet door in de dieren tijdens opfok.

In toom 6 werden 3 serotypes gedetecteerd, *S. Hadar*, *S. Mbandaka* en *S. Anatum*. Voor *S. Hadar* werden met *NotI* 2 genomische types (H1 en H3) gevonden. Het *S. Hadar* type H1 werd hoofdzakelijk teruggevonden in de levende dieren (cecale drops en overshoes), in de omgeving, in materiaal afkomstig van de dieren (afvalton dode kuikens, mest andere stal) en ook in andere omgevingsstalen (proper en vuil schoeisel, waterplas). Deze besmetting van toom 6 met het *S. Hadar* type H1 zette zich door tot in het slachthuis waar op de karkassen eveneens dezelfde stam werd teruggevonden. Het *S. Hadar* type H3 werd enkel teruggevonden in de mesthoop en niet in de levende dieren. Voor *S. Mbandaka* werden eveneens 2 genomische types gevonden met verschillende restrictie-enzymen: het type M1 (met alle restrictie-enzymen) werd het meest frequent teruggevonden, namelijk bij 1 staalname (week 2 tijdens opfok) in de levende dieren alsook in de omgeving (vuil schoeisel, mesthoop) gedurende week 1 en 4. Het type M5-M4-M3-M3 (resp. voor *XbaI*, *SpeI*, *BlnI* en *NotI*) werd slechts éénmaal gevonden in een gracht.

Op hetzelfde mestbedrijf en in dezelfde stal als toom 6 werd ook de daaropvolgende toom (toom 7) gevolgd. In toom 7 werden 2 serotypes gevonden, *S. Hadar* en *S. Mbandaka*. Bij hygiënecontrole bleek het *S. Hadar NotI*-type H3 aanwezig te zijn op het ventilatiekanaal in de stal; nochtans werd dit genomisch type vervolgens niet teruggevonden in de levende dieren. Dit is een duidelijk geval waarbij moleculaire typering meer epidemiologische informatie oplevert dan louter serotypering. Aangezien dit *S. Hadar* type in toom 6 ook enkel in de omgeving werd teruggevonden, zou dit mogelijks kunnen wijzen op een lagere virulentie van dit type voor braadkippen. Ook in toom 3 (zie hierboven) zette dit *S. Hadar* genomisch type H3 zich vanuit de broeierij (inlegvellen) niet door in de levende dieren.

In de levende dieren alsook in de omgeving (sloot, mesthoop) van toom 7 werd hetzelfde *S. Hadar* type (H1 met alle restrictie-enzymen) gevonden als in toom 6. Ook in een andere stal (stal 3) op deze boerderij werd hetzelfde type gevonden in de dieren. Hieruit volgt dat de overdracht van besmetting met dit *S. Hadar* type H1 van toom 6 naar toom 7 is gebeurd via de omgeving. Net zoals in toom 6, zette de besmetting van toom 7 met het *S. Hadar* type H1 zich ook door tot in het slachthuis waar op de karkassen eveneens dezelfde stam werd teruggevonden. In de levende dieren van stal 3 werd éénmalig (na 2 weken) nog een ander *S. Hadar* type gevonden (H2 met alle restrictie-enzymen). Uit deze gegevens kan geconcludeerd worden dat het *S. Hadar* type H1, dat gedurende de ganse opfok van tomen 6 en 7 werd gevonden in de dieren tot in het slachthuis op de karkassen, kan beschouwd worden als hoogvirulent voor kippen. Bij *S. Mbandaka* werden 3 verschillende genomische types gevonden: M2 met *SpeI* in een waterton, M1 (met alle restrictie-enzymen) in de mesthoop en M3 met *NotI* in voeder.

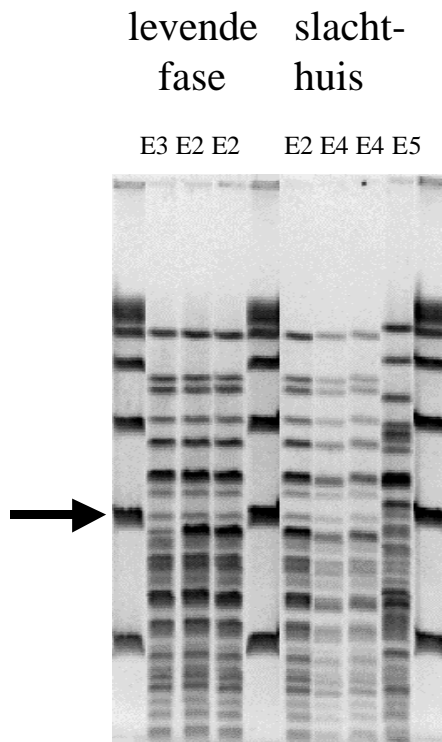
In toom 8 werden 3 serotypes teruggevonden, *S. Virchow*, *S. Enteritidis* en *S. Mbandaka*. *S. Virchow* werd enkel teruggevonden na hygiënecontrole op het verwarmingskanon, maar werd vervolgens niet gevonden in de levende dieren. *S. Enteritidis* genomisch type E1 (met alle restrictie-enzymen) werd reeds gevonden op de inlegvellen na transport van de één-dagskuikens uit de broeierij en werd vervolgens ook teruggevonden in de levende dieren gedurende de ganse

opfok. Deze overdracht vanuit de broeierij werd ook bevestigd door RAPD-typering. De besmetting van toom 7 met het *S. Enteritidis* type E1 zette zich door tot in het slachthuis waar op de karkassen dezelfde stam werd teruggevonden. Enkele geteste *S. Enteritidis* isolaten uit de broeierij (na transport) en uit de levende dieren tijdens de opfok bezaten allen het 55 kb virulentieplasmide en enkele kleinere plasmiden; één isolaat na 2 weken opfok bezat nog meer kleine plasmiden. Het *S. Mbandaka* genomisch type M4-M5-M1-M3 (resp. met *XbaI*, *SpeI*, *BlnI* en *NotI*) werd éénmalig gevonden in voeder. Op de karkassen in het slachthuis werd weliswaar ook éénmaal *S. Mbandaka* geïsoleerd maar van een ander genomisch type dan in het voeder.

In toom 9 werden 4 serotypes gevonden: *S. Enteritidis*, *S. Braenderup*, *S. Mbandaka* en een niet-typeerbaar type. Het niet-typeerbaar type werd enkel bij hygiënecontrole (laarzen) gevonden. *S. Enteritidis* werd reeds aangetroffen in de broeierij (eierschalen). Met *NotI* kon dit *S. Enteritidis* type (E3) onderscheiden worden van het type E1 dat in toom 8 was aangetroffen na transport uit de broeierij. Met moleculaire typering kan dus onderscheid gemaakt worden tussen besmettingen met *S. Enteritidis* op broeierijniveau en vervolgens op mestbedrijfniveau. In toom 9 zette deze *S. Enteritidis* besmetting van de dieren zich slechts door na 6 weken opfok. Uit de zeer gelijkende patronen met PFGE en RAPD bleek dat zowel uit de broeierij als uit de levende dieren na 6 weken hoogstwaarschijnlijk dezelfde *S. Enteritidis* stam werd geïsoleerd, maar dat toch een genetische wijziging was opgetreden in de kiem die werd geïsoleerd uit de dieren na 6 weken. Dit laatste werd vastgesteld door het optreden van een meer intense band in het *SpeI* en *NotI* patroon (aangeduid in Tabel 10 als E2; zie ook Figuur 7 voor *NotI*-patroon) en het optreden van 3 laagmoleculaire banden in het RAPD-patroon met één primer (23L). Uit plasmideprofilering bleek dat dit werd veroorzaakt door het bezit van een megaplasmide (grootte geschat op 100 kb) in de isolaten uit de levende dieren na 6 weken. In tegenstelling tot het broeierij-isolaat, waren deze isolaten ook ampicillineresistent zodat kan verondersteld worden dat deze resistentiemerker op het megaplasmide is gelegen. Na klonering en sequentiebepaling van één van de extra banden in het RAPD-patroon van deze isolaten werd een 370 bp sequentie bekomen die 99.5% similariteit vertoont met een gedeelte van de *traP* en *traO* genen. Deze genen liggen in het *tra*-operon dat optreedt bij conjugatieve plasmiden. Deze gegevens wijzen dus in de richting van een conjugatief megaplasmide dat is verworven door de *S. Enteritidis* stam in de dieren van toom 9, mogelijks onder selectiedruk van ampicillineresistentie, hoewel er in deze toom geen melding was van ampicilline gebruik. Naast antibioticumresistentiegenen kunnen op dit megaplasmide nog andere genen gelegen zijn die gecorreleerd zijn met (verhoogde) virulentie; dit zal in verder onderzoek nog nagegaan worden door partiële sequentiebepaling.

De dieren van toom 9 waren na 2 weken opfok besmet met *S. Braenderup*, terwijl na 4 weken opfok het *S. Mbandaka* genomisch type M1 werd aangetroffen zowel in de dieren, in het voeder uit de voederbakjes als op het proper schoeisel. Dit *Mbandaka* type werd ook aangetroffen op het proper schoeisel van een andere stal (stal 3). Schoeisel is hier dus waarschijnlijk verantwoordelijk voor een verder verspreiding van dit serotype op het mestbedrijf. Aangezien dit *S. Mbandaka* M1 type ook reeds (sporadisch) werd aangetroffen in de dieren van een andere toom (toom 6), in tegenstelling tot andere *S. Mbandaka* genomische types (voornamelijk uit voeder), kan hieruit geconcludeerd worden dat het M1 type een zekere virulentie vertoont in kippen. Zoals hierboven reeds vermeld waren de dieren na 6 weken opfok besmet met het *S. Enteritidis* *NotI*-genomisch type E2. De besmetting met *S. Enteritidis* type E2 zette zich door tot in het slachthuis waar op de karkassen dezelfde stam werd teruggevonden. Op de karkassen werden echter nog 2 andere *S. Enteritidis* *NotI*-types (E4 en E5, zie Figuur 8) gevonden die niet werden aangetroffen in de levende fase en dus waarschijnlijk afkomstig zijn van het slachthuis.

Figuur8: *NotI*-patronen en genomische types van *Salmonella* isolaten uit toom 9 (levende fase en slachthuis). De pijl geeft de meer intense band aan in type E2, veroorzaakt door het verwerven van een megaplasmide



In toom 10 (circulatiebedrijf met 8 stallen) werden 3 serotypes aangetroffen, *S. Blockley*, *S. Hadar* en een niet-typeerbaar type. Bij hygiënecontrole werden deze 3 serotypes reeds aangetroffen. Het *S. Hadar* isolaat uit de voederbakjes was van een nieuw type (H3 met *SpeI* en *NotI*) en werd niet verder aangetroffen in de levende dieren. Van het niet-typeerbaar type en van *S. Blockley* werden respectievelijk 2 en 3 genomische types aangetroffen. Hetzelfde genomisch type van het niet-typeerbaar type (nt t1 met alle restrictie-enzymen) werd aangetroffen in een dode muis bij hygiënecontrole, in vers voeder na 4 weken opfok, op het proper en vuil schoeisel van verschillende stallen, in hondenfeces en in de dieren tijdens de eerste 4 weken van de opfok. Na 2 en 4 weken opfok werd in de dieren ook sporadisch het ander genomisch type van het niet-typeerbaar type (nt t3 met *XbaI*) aangetroffen. Hetzelfde genomisch type van *S. Blockley* (B1 met alle restrictie-enzymen) werd aangetroffen bij hygiënecontrole op de silo's, in spleten, voeder en proper schoeisel, in hondenfeces, op schoeisel van een andere stal en in de dieren tijdens de ganse opfok. De besmetting van toom 10 met dit dominant *S. Blockley* B1 type zette zich door tot in het slachthuis waar op de karkassen dezelfde stam werd teruggevonden. De andere 2 genomische types van *S. Blockley* (resp. B2 met *XbaI* en B2 met *XbaI* en *SpeI*) werden éénmalig aangetroffen respectievelijk in de ontsmettingsbak van een andere stal en in de dieren na 6 weken opfok. Het is duidelijk dat minstens één genomisch type van zowel *S. Blockley* als van het niet-typeerbaar type zijn overgedragen door een ondoeltreffende hygiëne in de stal. Bovendien werden in dit circulatiebedrijf beide serotypes en hoofdzakelijk het niet-typeerbaar type nt t1 verder verspreid naar de andere stallen.

In toom 11 werd een *S. Mbandaka* geïsoleerd uit vers voeder; toom 12 was volledig negatief.

In toom 13 werd verschillende malen hetzelfde *S. Blockley* type (B1) geïsoleerd uit plassen in de omgeving. Uit hondenfeces werd een nieuw *S. Hadar* genomisch type H1-H3-H1-H3 (resp. met *XbaI*, *SpeI*, *BlnI* en *NotI*) geïsoleerd. Hoewel dit *S. Hadar* type zich niet doorzette in de levende

dieren tijdens opfok, kon hetzelfde type toch geïsoleerd worden op de karkassen in het slachthuis. Een mogelijke verklaring is dat de besmetting van de dieren tijdens opfok met dit *S. Hadar* type zodanig laag was dat het niet werd gedetecteerd ofwel werden de dieren met dit type pas besmet tijdens het ophalen van de toom voor slachten.

In toom 14 werd een *S. Panama* geïsoleerd uit hondenfeces.

In toom 15 werden 3 serotypes aangetroffen: *S. Blockley*, *S. Brandenburg* en *S. Hadar*. Hetzelfde *S. Blockley* genomisch type (B1) werd gevonden in de omgeving, namelijk in huisvuil na hygiënecontrole, op proper schoeisel van een andere stal (parelhoenders), in de kringen en in koeiefeces. Van *S. Brandenburg* werden 2 genomische types aangetroffen, namelijk éénmalig in de dieren na 2 weken opfok (Bra1 met alle restrictie-enzymen) en éénmalig op proper schoeisel van een andere stal (stal 2) (Bra2 met alle restrictie-enzymen). Hetzelfde *S. Hadar* genomisch type H1-H3-H3 (resp. met *XbaI*, *SpeI* en *NotI*) werd aangetroffen op het proper schoeisel van twee stallen (stal 1 en 3).

In toom 16 werd één type *S. Anatum* A2 aangetroffen in de dieren vanaf 4 weken opfok. Dit type was verschillend van het *S. Anatum* genomisch type in toom 6.

In toom 17 werd éénmalig in de dieren na 2 weken opfok en op proper schoeisel *S. Kentucky* aangetroffen. Er konden geen PFGE patronen bekomen worden van dit serotype, waarschijnlijk door DNase-activiteit.

In toom 18 werd in de dieren na 2 en 4 weken opfok en in het vers voeder hetzelfde genomisch type van een niet-typeerbaar serotype (nt t2) aangetroffen. Een besmetting via het voeder lijkt hier evident. Dit type was duidelijk verschillend van de genomische types nt t1 en t3 van het niet-typeerbaar serotype uit toom 10.

Op het slachthuisniveau werden een groot aantal serotypes teruggevonden die niet tijdens de boerderijfase werden aangetoond. Dit was reeds het geval voor de stammen geïsoleerd uit de feces verzameld uit de transportcontainers. Evenwel werden de meeste serotypes gevonden bij de levende dieren niet teruggevonden in deze fecesmonsters. Een aantal van de geïsoleerde serotypes uit feces van de transportcontainers werden ook teruggevonden op de gekoelde karkassen. Vooral gekoelde karkassen waren gecontamineerd met een groot aantal serotypes. Bij 17 tomen, waarvan de karkassen besmet waren na het slachten, konden tot 7 verschillende serotypes op de karkassen van éénzelfde toom aangetoond worden. Verdere typering van frequent voorkomende *Salmonella* serotypes op karkassen wees uit dat stammen afkomstig van karkassen van dezelfde toom en behorend van éénzelfde serotype genetisch verder te onderscheiden waren. Deze resultaten wijzen erop dat slechts in een beperkt aantal gevallen de aangevoerde kuikens als bron fungeerden voor de contaminatie van de karkassen. Het slachthuis zelf dient, zoals reeds statistisch aangetoond, als de contaminatiebron aanzien te worden. Hierbij is de contaminatiedruk uitgaande van het slachthuis bedrijfsafhankelijk.

Antibiotica resistentie van de *Salmonella* isolaten

Zoals samengevat wordt in Tabel 11 werden aan de tomen braadkuikens regelmatig antibioticumpreparaten toegediend.

Tabel 11: Gebruik van antibiotica tijdens de opfok van de 18 tomen braadkuikens

| Toom | Antibioticum preparaat | Tijdstip van toediening | Actieve component | Antibiotica groep |
|------|---|---|--|------------------------|
| 2 | Ampicilline | Dag 17-20 | Ampicilline | |
| 3 | Baytril Flumiquil | Dag 2-3 Dag 23-28 | Enrofloxacin Flumequine | Quinolone Quinolone |
| 4 | Baytril Trimazine | Dag 1-2 Dag 8-10 | Enrofloxacin Trimethoprim/Sulfa | Quinolone |
| 5 | Baytril | Week 1 | Enrofloxacin | Quinolone |
| 8 | Baytril Darvisil T Doxycycline | Week 1 Week 4 Dag 34-36 | Enrofloxacin Sulfaquinoxaline Tetracycline | Quinolone Sulfa |
| 10 | Lincospectin | Dag 25-27 | Lincospectine en Spectinomycine | |
| 11 | Flumiquil | Dag 10-14 | Flumequine | Quinolone |
| 14 | Flumiquil | Week 5 | Flumequine | Quinolone |
| 15 | Tylan Tylan Promycine Lincosin | Week 1 Week 2 Dag 26-28 Week 5 | Tylosine Tylosine Colistine Lincomycine | Macrolide |
| 16 | Lincospectin Flumiquil | Dag 5 Week 5 | Lincospectine en Spectinomycine Flumequine | Quinolone |
| 17 | Baytril | Week 1 | Enrofloxacin | Quinolone |
| 18 | Cosumix | Dag 11-14 | Sulfachloropyridazine | Sulfa |

Een representatieve groep van in totaal 210 *Salmonella* isolaten werd getest op resistentie voor de volgende antibiotica: ampicilline, amoxicilline, ceftriaxon, chloramphenicol, ciprofloxacine, kanamycine, nalidixinezuur, streptomycine, tetracycline en Trimethoprim/sulfamethoxazole 1/19. De bekomen resultaten worden samengevat in Tabel 12 en Tabel 13. Geen enkele *Salmonella* stam was resistent voor ceftriaxon, ciprofloxacine en kanamycine. Het grootste aantal stammen (64) was resistent voor streptomycine, gevolgd door ampicilline en amoxicilline (elk 59 resistente stammen), gevolgd door tetracycline (55 stammen), nalidixinezuur (31 stammen) en trimethoprim/sulfamethoxazole (23 stammen) en chloramphenicol (6 stammen). Er werd geen verband gevonden tussen de antibiotica resistentie van de stammen en de antibioticabehandelingen van de betrokken tomen.

Tabel 12: Aantal *Salmonella* stammen met een gevoeligheid (S) of resistentie (R) tegen een bepaald antibioticum

| | AM | AC | TX | CL | CI | KM | NA | SM | TC | TS |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| S | 151 | 151 | 210 | 204 | 210 | 210 | 179 | 146 | 155 | 187 |
| R | 59 | 59 | 0 | 6 | 0 | 0 | 31 | 64 | 55 | 23 |

AM: ampicilline; AC: amoxilline; TX: ceftriaxone; CL: chloramphenicol; CI: ciprofloxacine; KM: kanamycin; NA: nalidixinezuur; SM: streptomycine; TC: tetracycline; TS: trimethoprim/sulfamethoxazole 1/19

In totaal waren 122 isolaten gevoelig voor alle geteste antibiotica. Resistentie voor 1 antibiotica werd weergevonden voor nalidixinezuur (3 stammen), streptomycine (1 stam) en trimetoprim/sulfamethoxazole (2 stammen). Resistentie voor 2 antibiotica werd gevonden voor ampicilline en amoxilline (6 stammen), nalidixinezuur en streptomycine (1 stam) en streptomycine en tetracycline (1 stam). Resistentie voor 3 antibiotica werd gevonden voor nalidixinezuur, streptomycine en tetracycline (21 stammen) en voor ampicilline, amoxilline en trimethoprim/sulfamethoxazole (2 stammen). Resistentie voor 4 antibiotica werd gevonden voor ampicilline, amoxilline, nalidixinezuur en tetracycline (10 stammen) en voor ampicilline, amoxilline, streptomycine en trimethoprim/sulfamethoxazole (18 stammen). Resistentie voor 5 antibiotica werd weergevonden voor ampicilline, amoxilline, chloramphenicol, streptomycine en tetracycline (5 stammen), voor ampicilline, amoxilline, chloramphenicol, tetracycline en trimethoprim/sulfamethoxazole (1 stam) en voor ampicilline, amoxilline, nalidixinezuur, streptomycine en tetracycline (17 stammen).

Alle geteste *S. Hadar* 49 stammen waren resistent voor minimum 2 antibiotica en het overgrote deel van de stammen voor 3 tot 5. Van de *S. Enteritidis* stammen waren 13 stammen gevoelig voor alle geteste antibiotica, 4 stammen waren resistent. Vijf *S. Typhimurium* stammen waren resistent voor 5 antibiotica (ampicilline, amoxilline, chloramphenicol, streptomycine en tetracycline), 1 stam was resistent voor 4 antibiotica, 1 stam voor 1 antibiotica en 3 stammen vertoonden geen resistenties.

Tabel 13: Antibiotica resistentie van een representatieve groep *Salmonella* isolaten

| Code AR | Aantal st. | Serotype | Aantal/Toom nr. | Isolatie |
|------------|------------|-------------|---------------------------------|----------|
| RRSRSSRRS | 5 | Typhimurium | 1/6; 1/7; 1/8; 2/9 | S |
| RRSRSSRRR | 1 | Virchow | 1/6 | S |
| RRSSSRRRS | 3 | Hadar | 2/4; 1/5 | S |
| | 14 | Hadar | 9/6; 4/7; 1/15 | M |
| RRSSSRRSRS | 10 | Hadar | 10/13 | S |
| RRSSSRRSR | 1 | Blockley | 1/10 | S |
| | 16 | NT1; NT3 | 15/10 ; 1/10 | M |
| | 1 | Typhimurium | 1/2 | S |
| RRSSSSSSSR | 2 | NT1 | 2/10 | M |
| RRSSSSSSSS | 2 | Agona | 2/7 | S |
| | 2 | Enteritidis | 2/9 | M |
| | 1 | Enteritidis | 1/9 | S |
| | 1 | NT2 | 1/18 | M |
| SSSSSRRRS | 15 | Hadar | 4/6; 10/7; 1/10 | M |
| | 6 | Hadar | 4/6; 2/13 | S |
| SSSSSRRSS | 1 | Hadar | 1/6 | S |
| SSSSSRSSS | 1 | Enteritidis | 1/8 | M |
| | 2 | Virchow | 2/12 | S |
| SSSSSRRRS | 1 | Infantis | 1/6 | S |
| SSSSSRRSS | 1 | Typhimurium | 1/1 | S |
| SSSSSSSSSR | 2 | NTS | 2/13 | S |
| SSSSSSSSSS | 3 | Agona | 1/3; 1/5; 1/7 | S |
| | 4 | Anatum | 2/6; 2/16 | M |
| | 44 | Blockley | 1/1; 5/3; 1/5; 1/7 22/10; 14/12 | S |
| | 19 | Blockley | 14/10; 2/13; 3/15 | M |
| | 3 | Braenderup | 3/9 | M |
| | 1 | Brandenburg | 1/3 | S |
| | 11 | Enteritidis | 11/8 | M |
| | 2 | Enteritidis | 2/8 | S |
| | 4 | Indiana | 2/1; 1/5; 1/6 | S |
| | 4 | Infantis | 4/11 | S |
| | 9 | Mbandaka | 5/6; 4/9 | M |
| | 4 | Mbandaka | 1/8; 3/10 | S |
| | 2 | Montevideo | 1/3; 1/7 | S |
| | 1 | NT1 | 1/10 | M |
| | 2 | NT2 | 2/18 | M |
| | 3 | NTS | 3/10 | S |
| | 1 | Seftenberg | 1/6 | S |
| | 3 | Typhimurium | 1/5; 2/7 | S |
| | 2 | Virchow | 2/11 | S |

Code AR: code antibiotica resistentie; R: resistent; S: gevoelig in de volgende volgorde van antibiotica : ampicilline, amoxillin, ceftriaxone, chloramphenicol, ciprofloxacine, kanamycin, nalidixinezuur, streptomycine, tetracycline en Trimethoprim/sulfamethoxazole 1/19; Aantal st.: aantal stamen; M: mestbedrijf; S: slachthuis

4.1.4. Gedetailleerde resultaten betreffende de *Campylobacter* besmetting

Bepaling van de *Campylobacter* status van de tomen gedurende de opkweek

De *Campylobacter* status van een toom werd bepaald aan hand van de analyses die uitgevoerd werden op de cecale drops genomen in de stal op de leeftijd van 14, 28 en 42 dagen. Indien uit één van deze cecale drops een *Campylobacter* stam kon geïsoleerd worden, werd de toom als positief beschouwd.

De *Campylobacter* status gedurende de opkweek van de braadkuikens werd duidelijk met de grootste gevoeligheid bepaald door het testen van cecale drops (Tabel 14). Geen extra tomen werden positief bevonden bij het testen van proper schoeisel van de boer, drinkwater in de stal, dode kuikens, strooisel of overshoes.

Tabel 14: Efficiëntie van monstertypes voor de bepaling van de *Campylobacter* status van een toom

| Monster | Aantal onderzochte tomen | Gevoeligheid |
|------------------|--------------------------|--------------|
| Cecale drops | 18 | 1,000 |
| Proper schoeisel | 15 | 0,714 |
| Drinkwater stal | 18 | 0,667 |
| Dode kuikens | 8 | 0,250 |
| Strooisel stal | 6 | 0,200 |
| Overshoes | 2 | 0,000 |

Voorkomen van *Campylobacter* tijdens de productie van braadkuikens

Campylobacter werd niet aangetoond in de broeierij en bij ééndagskuikens (Tabel 15). Ook kon in de stal vóór de komst van de ééndagskuikens geen *Campylobacter* worden aangetoond (zie hygiëne stal Tabel 15). In de omgeving van de stal werd in 11 van de 16 tomen die hiervoor werden geanalyseerd *Campylobacter* geïsoleerd. In totaal bleken de kippen in 7 tomen positief voor *Campylobacter*. In de krattenmest werd *Campylobacter* geïsoleerd in 14 tomen. Na het slachten werd in 12 tomen *Campylobacter* geïsoleerd uit de cecuminhoud en in 13 tomen van de nekhuid.

De besmetting van tomen braadkuikens stijgt met een zekere regelmaat gedurende de gehele opfoktijd (Tabel 16). Dit is in tegenstelling met de *Salmonella* besmetting die zich vooral in de eerste 2 weken van de opfok manifesteert

Tabel 15: Voorkomen van *Campylobacter* in de productieketen van 18 tomen braadkuikens

| Toom/ Stallen* | Broeierij | Boerderijfase | | | | | Slachthuisfase | | | |
|-------------------|-----------|---------------|------------------|------------------|-----------------|----------------|-----------------|-------|----------|--------------------|
| | | Antibio | Stal- hygiëne | hoeve- omgev. | Stal- andere | Status toom | kratten mest | cecum | Nekhuid | Code slachthuis |
| 1/1 | NB | - | 0/5** | NB | 0/10** | 0/11** | 0/6** | 1+/6 | 11+/60** | 1*** |
| 2/1 | NB | 1x | 0/1 | 0/1** | 1+/3 | 15+/19 | 6+/6 | 6+/6 | 60+/60 | 0 |
| 3/3 | 0/1** | 2x | 0/2 | 0/8 | 2+/10 | 14+/17 | 6+/6 | 6+/6 | 30+/30 | 1*** |
| 4/1 | 0/1 | 2x | 0/2 | NB | 0/7 | 0/15 | 2+/6 | 0/6 | 0/30 | 0 |
| 5/1 | NB | 1x | 0/3 | 1+/29 | 0/5 | 0/16 | 0/6 | 0/6 | 0/60 | 1 |
| 6/3 | NB | - | 0/2 | 1+/34 | 0/9 | 0/14 | 4+/6 | 0/6 | 0/30 | 1 |
| 7/3 | NB | - | 0/4 | 6+/31 | 1+/5 | 9+/13 | 6+/6 | 6+/6 | 17+/30 | 1 |
| 8/3 | 0/4 | 3x | 0/2 | 0/20 | 0/2 | 0/11 | 0/6 | 0/6 | 0/60 | 0*** |
| 9/3 | 0/1 | - | 0/3 | 5+/19 | 1+/4 | 3+/16 | 6+/6 | 6+/6 | 60+/60 | 0*** |
| 10/8 | NB | 1x | 0/5 | 2+/23 | 0/9 | 0/19 | 6+/6 | 6+/6 | 47+/47 | 2 |
| 11/1 | 0/1 | 1x | 0/2 | 3+/29 | 3+/8 | 11+/15 | 6+/6 | 6+/6 | 59+/60 | 3 |
| 12/1 | 0/3 | - | 0/1 | 3+/31 | 1+/6 | 4+/9 | 6+/6 | 6+/6 | 30+/30 | 4 |
| 13/3 | 0/4 | - | 0/1 | 3+/19 | 0/3 | 0/19 | 6+/6 | 6+/6 | 20+/60 | 5 |
| 14/2 | 0/2 | 1x | 0/1 | 0/26 | 0/4 | 0/10 | NB | 0/6 | 28+60 | 6*** |
| 15/5 | 0/1 | 4x | 0/4 | 1+/28 | 0/4 | 0/12 | 6+/6 | 6+/6 | 60+/60 | 6 |
| 16/1 | 0/5 | 2x | 0/2 | 0/26 | 0/6 | 3+/27 | 6+/6 | 6+/6 | 30+/30 | 7*** |
| 17/4 | 0/8 | 1x | 0/3 | 1+/31 | 0/5 | 0/15 | 5+/6 | 2+/6 | 1+/30 | 8 |
| 18/1 | 0/2 | 1x | 0/2 | 3+/36 | 0/4 | 0/14 | 1+/6 | 0/6 | 0/30 | 3 |
| Totaal + | 0+ | 12 + | 0+ | 11+ | 6+ | 7+ | 14+; 3-; | 12+ | 13+ | |
| Totaal - | 6NB | 6 - | 18- | 5-; 2NB | 12- | 11- | 1NB | 6- | 5- | |

* : nummer van de toom/aantal stallen op de boerderij; ** : aantal *Campylobacter* positieve monsters op het totaal aantal onderzochte monster

*** : toom niet als eerste geslacht; NB: niet bepaald

Tabel 16: Detectie van *Campylobacter* tijdens de opkweek van braadkuikens

| Ouderdom dieren | Aantal tomen met positieve cecale drops |
|-----------------|---|
| 14 dagen | 3 |
| 24 dagen | 4 |
| 42 dagen | 7 |
| Alle leeftijden | 7 |

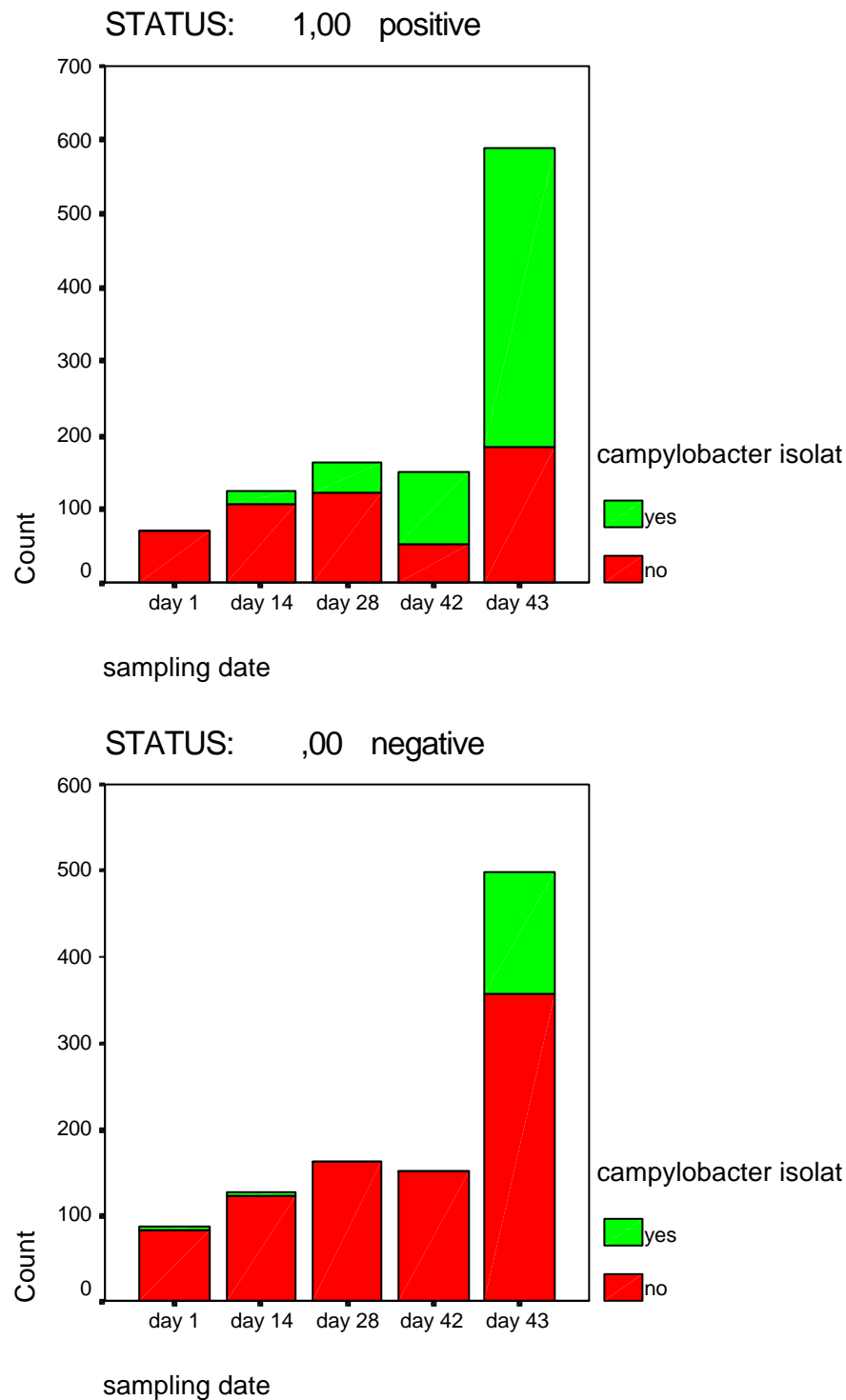
Verscheidene CCDA isolaten met een typisch microscopisch uitzicht bleken na PCR analyse toch geen *Campylobacter* stammen te zijn. Bij toom 13 werd het isolaat via 16S rDNA sequentie geïdentificeerd als *Helicobacter pullorum*. Uit de cecale drops van de braadkippen werd met uitzondering van toom 2 telkens *C. jejuni* geïsoleerd. Bij toom 2 werd bij de staalname op dag 14 *C. jejuni* geïsoleerd terwijl de staalname van dag 28 negatief was, waarschijnlijk ten gevolge van het toedienen van antibiotica in die periode. Bij de staalname van dag 42 werd *C. coli* uit de cecale drops geïsoleerd. Omdat het een gemengd bedrijf betrof met ook een varkensstal wordt een besmetting van *C. coli* vanuit deze hoek verondersteld. In toom 12 en toom 15 werd telkens uit een fecaal staal van koeien *C. hyointestinalis* geïsoleerd zoals werd aangetoond via 16S rDNA sequentie-analyse.

Bepaling van risicofactoren voor *Campylobacter* contaminatie van de dieren op de hoeve

In Figuur 9 wordt het verloop van de *Campylobacter* contaminatie voorgesteld. Op een hoeve met negatieve dieren worden zeer weinig *Campylobacter* stammen geïsoleerd uit de omgeving en dit enkel uit fecaal materiaal van andere dieren. Op een hoeve met positieve dieren worden isolaten bekomen uit fecaal materiaal van andere dieren, uit het verplaatsbaar materiaal en uit het niet-dierlijk materiaal van de hoeve-omgeving. Dit geeft aan dat hoeves met positieve dieren een verdere verspreiding kennen van *Campylobacter* in de omgeving dan hoeves met negatieve dieren. Het verplaatsbaar materiaal blijkt een significante risicofactor te zijn ($p=0,036$, bekomen met de 'bivariate Pearson' correlatie) voor de besmetting van de dieren met *Campylobacter* (Figuur 10, Figuur 11 en Tabel 17a). Het verplaatsbaar materiaal werd verder opgesplitst in Figuur 12 voor de hoeves met *Campylobacter* positieve dieren. Hieruit blijkt duidelijk dat het schoeisel van de boer als belangrijke vector fungeert voor *Campylobacter* besmetting van de dieren. Er werd ook een sterke correlatie gevonden tussen de besmetting bij de dieren en de aanwezigheid van *Campylobacter* in het voeder en het drinkwater in de stal bemonsterd tijdens de opfok van de dieren ($p=<0,001$ bekomen met de 'bivariate Pearson' correlatie) (Tabel 17a en Figuur 13). Dit besmet drinkwater en voeder zijn heel waarschijnlijk belangrijke factoren voor de vlugge verspreiding van *Campylobacter* naar alle dieren van de toom.

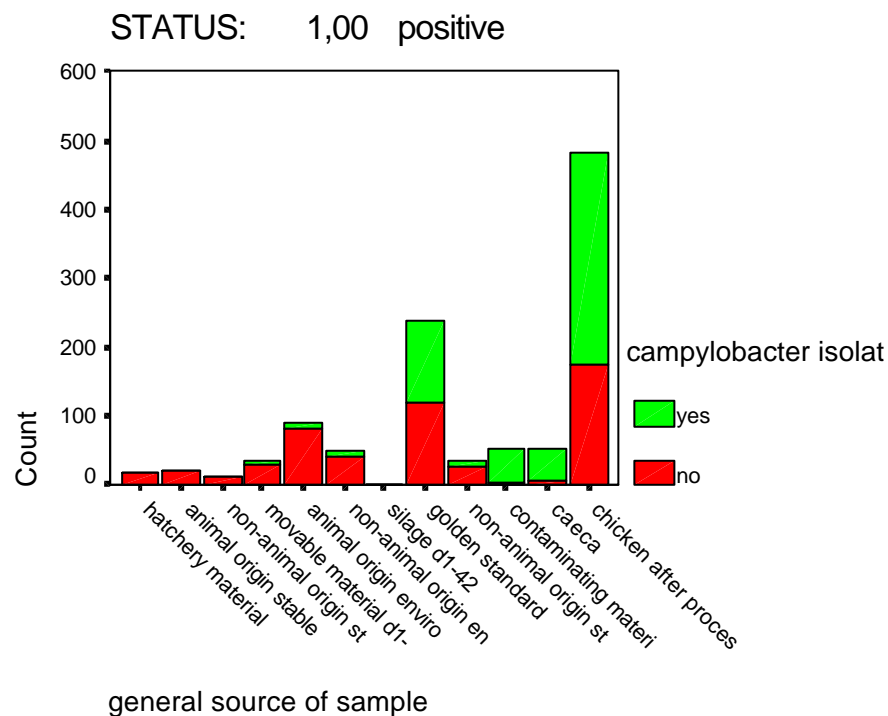
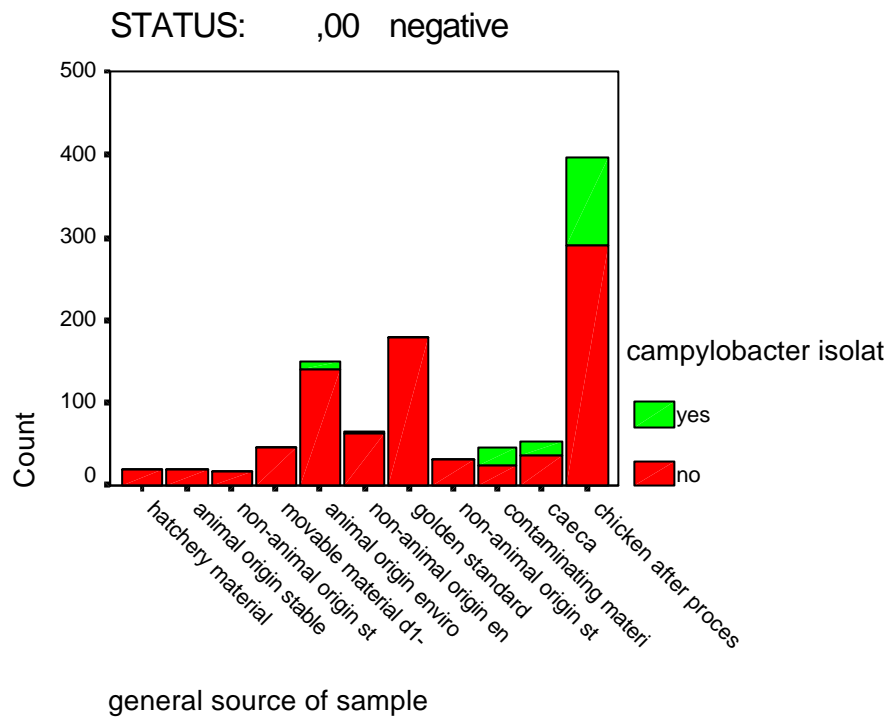
De invloed van de toediening van antibiotica aan de dieren werd nagegaan. De resultaten zijn voorgesteld in Figuur 14. Het toedienen van antibiotica blijkt een reducerend effect te hebben op het aantal *Campylobacter* kiemen dat bij positieve dieren werd geïsoleerd. Dit effect is echter niet zo uitgesproken als voor *Salmonella*. Met de one way ANOVA werd een invloed ($p=0,139$) van het gebruik van antibiotica op het aantal positieve *Campylobacter* cecale drops gedurende de opkweek van de kuikens vastgesteld (Tabel 17b). Een vergelijkbare analyse toonde voor *Salmonella* een invloed van $p=0,02$.

Figuur 9: Isolatie van *Campylobacter* bij de productie van braadkuikens in functie van de status van de tomen en van het tijdstip van staalname



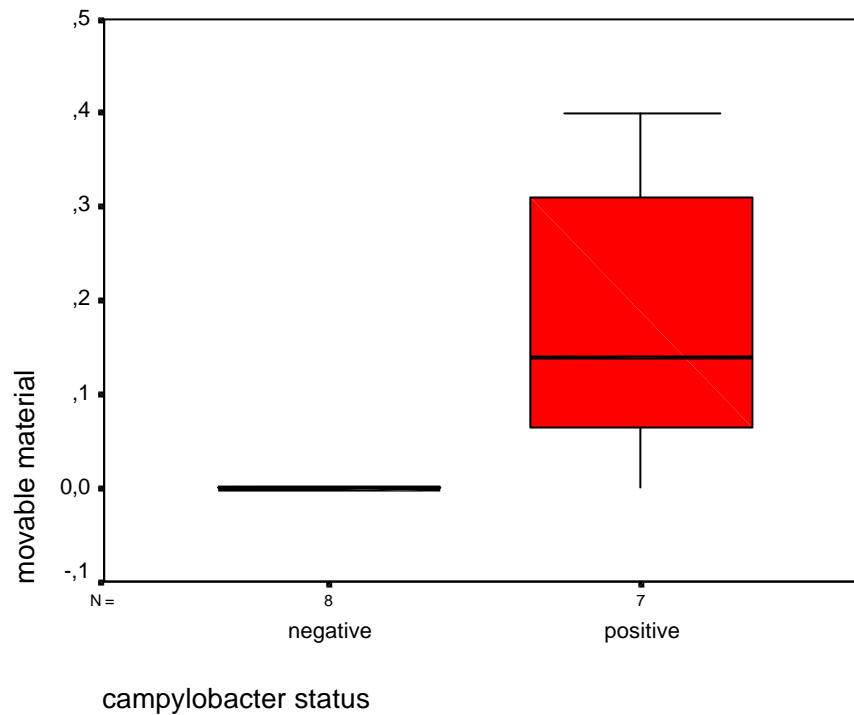
day 43: resultaten op slachthuisniveau

Figuur 10: Isolatie van *Campylobacter* per soort staalname, gesplitst volgens de status van de toom

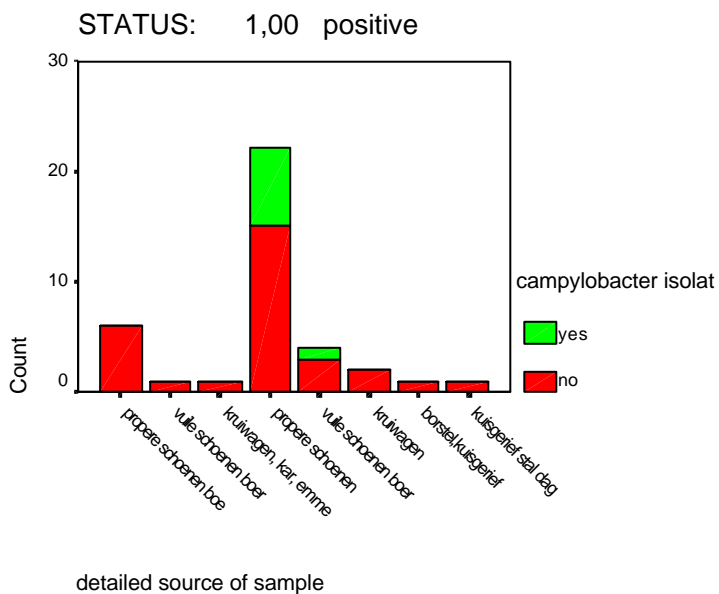


non-animal origin st: links: stalhygiëne vóór de aankomst van de ééndagskuikens, rechts: stal tijdens opkweek dieren

Figuur 11: Isolatie van *Campylobacter* uit verplaatsbaar materiaal naargelang de status van de toom



Figuur 12: Isolatie van *Campylobacter* in de verschillende soorten stalen van de categorie 'verplaatsbaar materiaal' op hoeves met positieve dieren



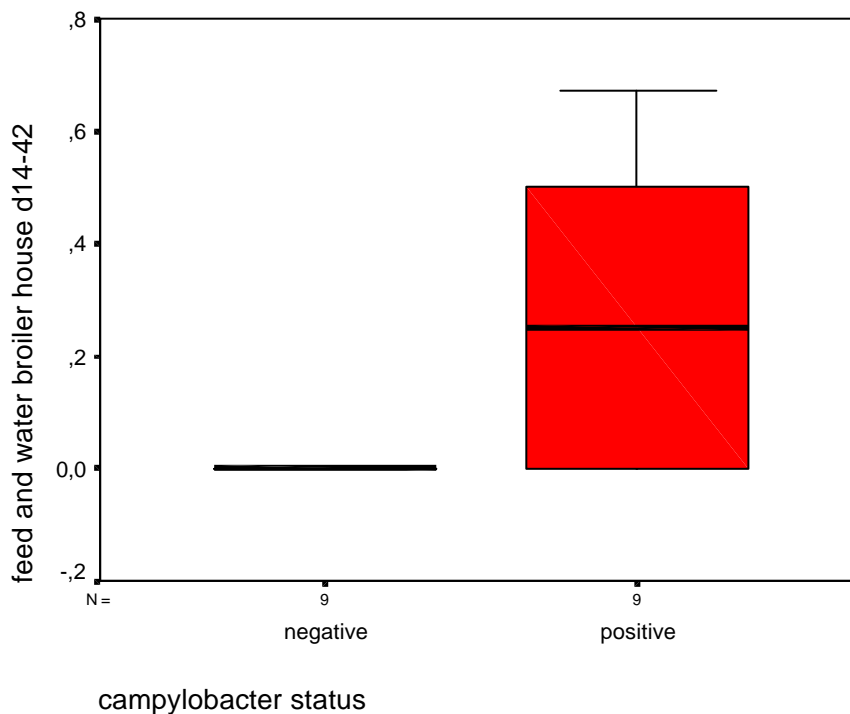
links: stalhygiëne vóór het toekomen van de ééndagskuikens: propere schoenen boer; vuile schoenen boer; kruiwagen, kar, emmer; tijdens de opkweek van de dieren: propere schoenen, vuile schoenen boer, kruiwagen

Tabel 17a: Overzicht van de resultaten bekomen met 'Bivariate Pearson' correlaties voor de besmetting van *Campylobacter* bij de dieren (cecale drops) en op de karkassen (nekhuid)

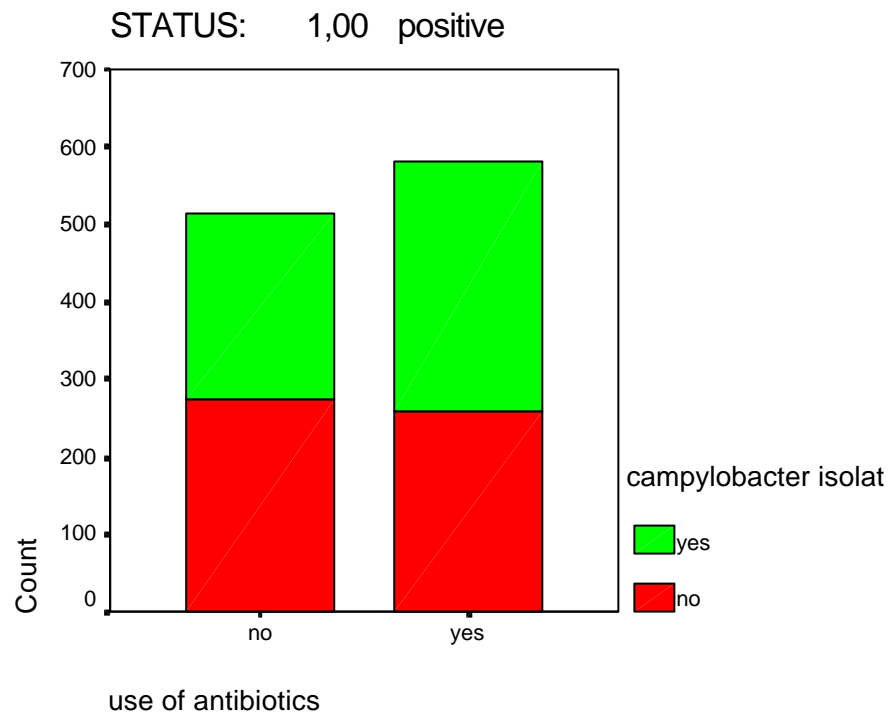
| Variabele 1 | Variabele 2 | r | p |
|-----------------------|--------------------------------------|-------|---------|
| % positieve dieren | verplaatsbaar materiaal | 0,545 | 0,036 |
| % positieve dieren | dierlijk materiaal uit de omgeving | 0,076 | 0,788 |
| % positieve dieren | niet-dierlijk materiaal uit omgeving | 0,325 | 0,237 |
| % positieve dieren | voeder en drinkwater dag 14-42 | 0,832 | < 0,001 |
| % positieve dieren | krattenmest | 0,422 | 0,081 |
| % positieve dieren | ceca na slachten | 0,534 | 0,027 |
| % positieve dieren | % positieve karkassen | 0,615 | 0,007 |
| % positieve karkassen | krattenmest | 0,75 | 0,001 |
| % positieve karkassen | ceca na slachten | 0,836 | < 0,001 |

De positieve correlaties zijn aangeduid in het blauw.

Figuur 13: Isolatie van *Campylobacter* in voeder en drinkwater tijdens de opfok van dieren (bemonsteringen dag 14, dag 28 en dag 42)



Figuur 14: Invloed van het toedienen van antibiotica tijdens de opfok van braadkuikens op het aantal *Campylobacter* isolaten uit de cecale drops van besmette dieren



Bepaling van risicofactoren voor *Campylobacter* contaminatie van de karkassen

Tabel 17b: Resultaten bekomen met ANOVA voor de besmetting van de dieren (cecale drops) en de karkassen (nekhuid) met *Campylobacter*

| Afhankelijke variabele | Onafhankelijke variabele | p |
|------------------------|------------------------------|-------|
| % positieve dieren | Gebruik antibiotica ja/nee | 0,139 |
| % positieve karkassen | Status dieren (cecale drops) | 0,058 |
| % positieve karkassen | Identiteit slachthuis | 0,714 |
| % positieve karkassen | Slacht management | 0,407 |
| % positieve karkassen | 1ste geslacht of niet | 0,826 |

Tijdens het transport van de braadkuikens naar het slachthuis treedt een bijkomende besmetting op. Deze is af te leiden uit de *Campylobacter* isolatie uit de mest van de transportcontainers zoals voorgesteld in Figuur 14. De besmetting van de mest is sterk gecorreleerd met de uiteindelijke besmetting van de kippenkarkassen ($p=0,001$, bekomen met de 'bivariate Pearson' correlatie; Tabel 17a). Dezelfde extra besmetting van de dieren tijdens het transport en slachtproces wordt weerspiegeld in de resultaten van de *Campylobacter* isolatie uit de ceca (Figuur 15). De besmetting van de ceca is gecorreleerd met de besmetting van de dieren tijdens de opfok met $p=0,027$ (bekomen met de 'bivariate Pearson' correlatie) en sterk gecorreleerd met de besmetting van de karkassen ($p=< 0,001$, bekomen met de 'bivariate Pearson' correlatie, Tabel 17a). Bij een aantal

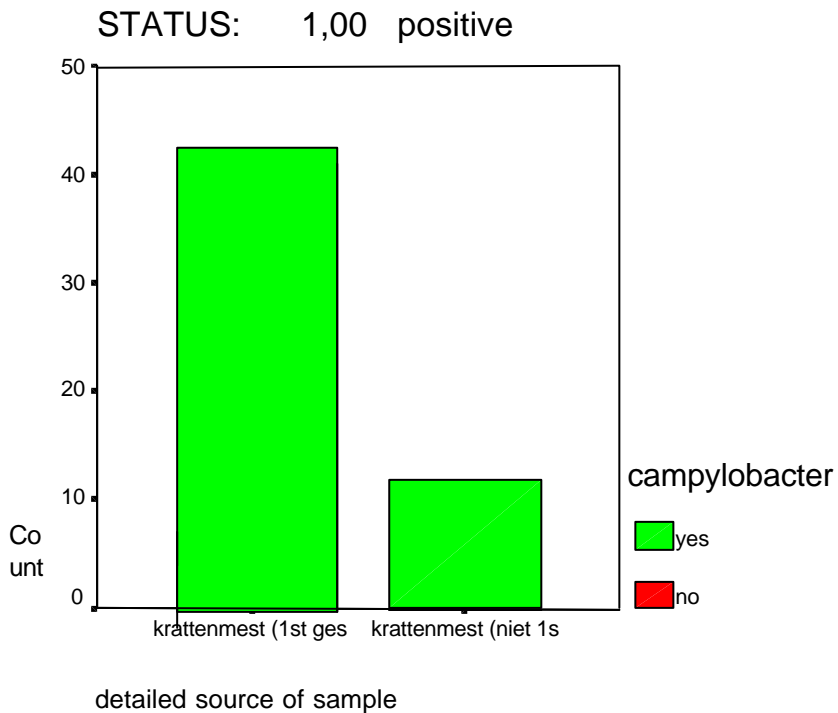
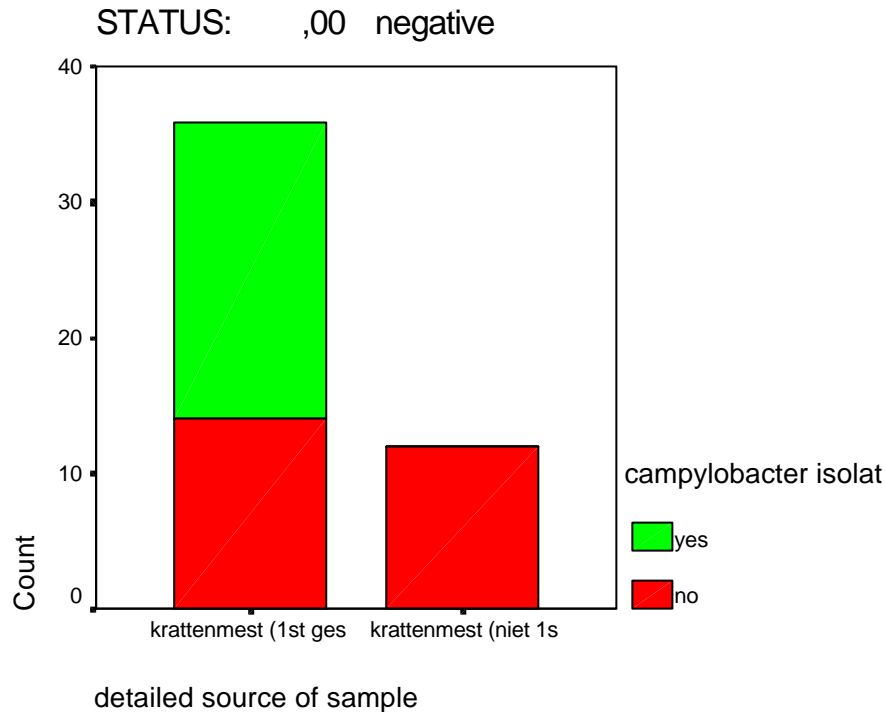
negatieve tomen werd evenwel de mest uit de transportcontainers *Campylobacter* positief bevonden. In de meeste van deze gevallen waren slechts een beperkt aantal monsters positief. In analogie met *Salmonella* is gebleken dat containers voor het transport van braadkippen gecontamineerd kunnen zijn met *Campylobacter*. (zie punt 4.3) Een dergelijke contaminatie zou dan ook de oorzaak kunnen zijn voor het positief vinden van mest uit transportcontainers. In hoeverre gecontamineerd transportcontainers kunnen leiden tot infectie van de dieren zelf werd niet bewezen. Sommige ceca van dieren uit negatieve tomen waarvan *Campylobacter* uit containermest werden geïsoleerd waren ook positief.

De besmetting van de karkassen met *Campylobacter* is significant gecorreleerd met de status van de dieren ($p=0,007$, bekomen met de 'bivariate Pearson' correlatie, Tabel 17a) en bijna significant met ANOVA ($p=0,058$, Tabel 17b). Dit wordt aanschouwelijk voorgesteld in Figuur 16.

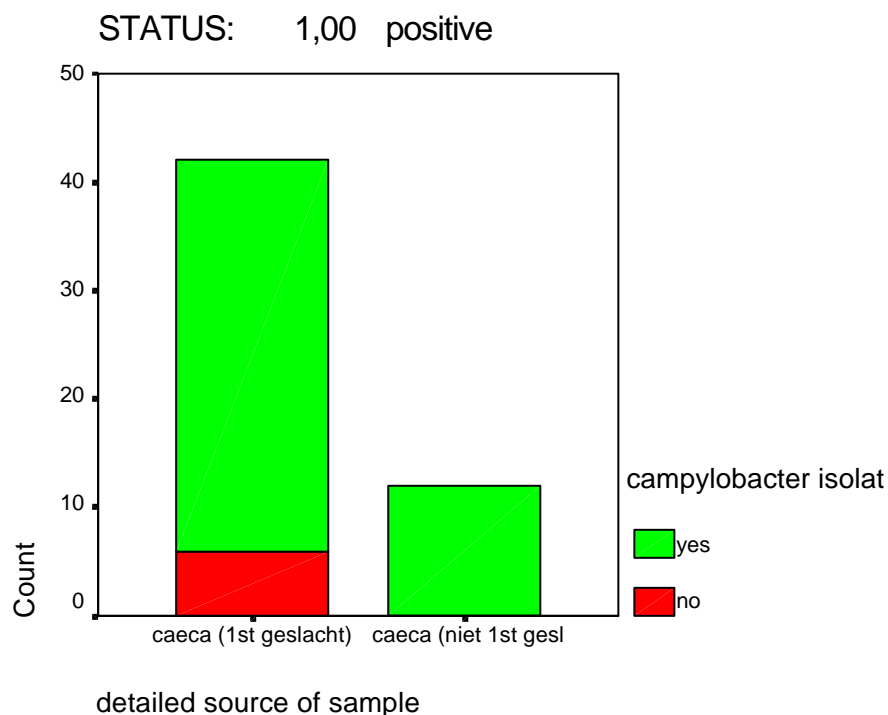
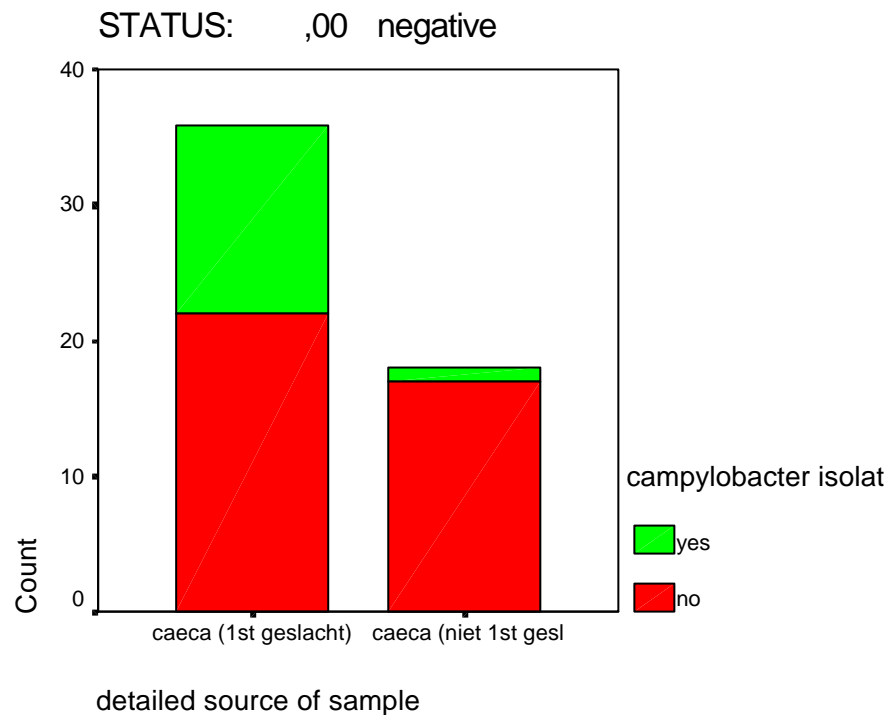
Zoals reeds vermeld treedt er tijdens het transport en het slachtproces een extra besmetting op met *Campylobacter*. Deze besmetting is, in tegenstelling tot de *Salmonella* besmetting, niet gecorreleerd met de identiteit van het slachthuis (Figuur 17). Via ANOVA wordt dit aangeduid met een $p=0,714$ (Tabel 17b).

De besmetting van de karkassen met *Campylobacter* bleek ook niet duidelijk gecorreleerd met de manier van het slachten (ingewanden afzonderlijk afgenomen, ingewanden op de rug of ingewanden op schaaltes). Dit wordt weergegeven in Figuur 18; via ANOVA werd een $p=0,407$ (Tabel 17b) gevonden. Of de toom al of niet als eerste werd geslacht had geen invloed op de uiteindelijke besmetting van de karkassen met *Campylobacter* (Figuur 19). ANOVA gaf voor dit verband $p=0,826$ (Tabel 17b).

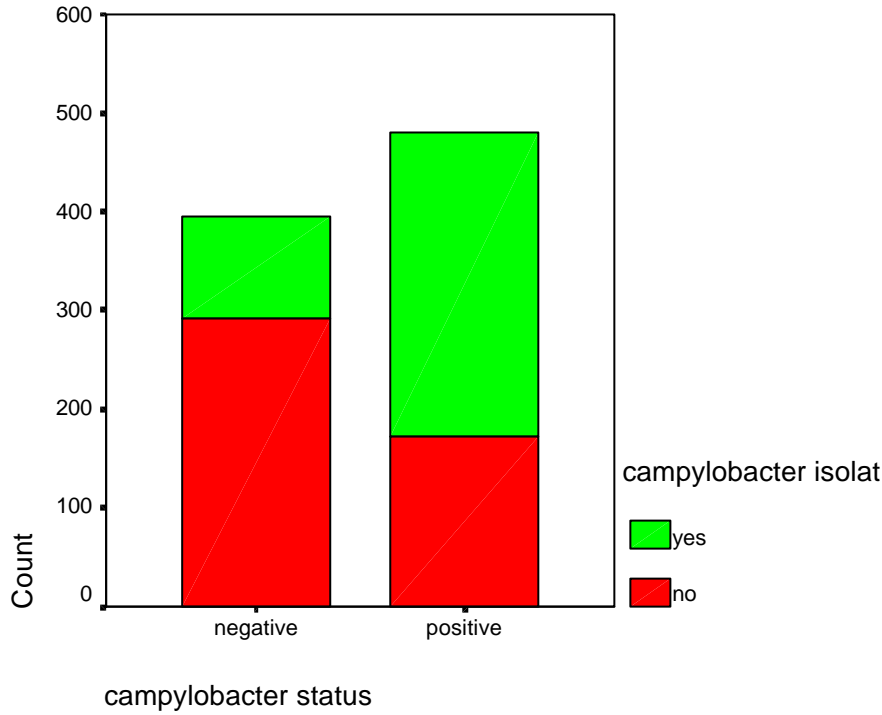
Figuur 14: Besmetting van de krattenmest met *Campylobacter* opgesplitst naargelang de status van de dieren tijdens de opfok en het al of niet als eerste geslacht zijn van de toom



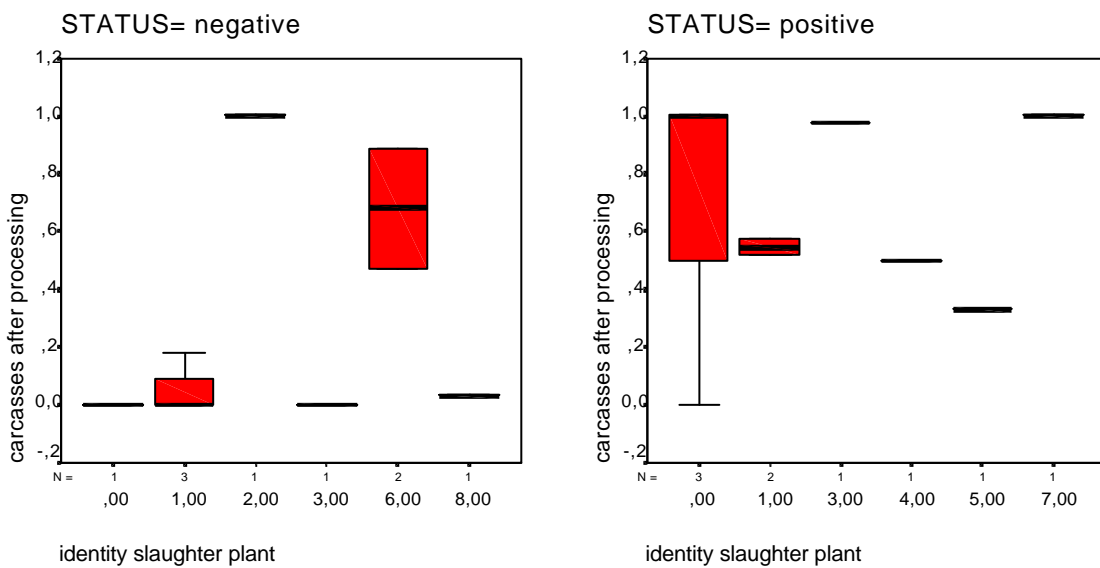
Figuur 15: *Campylobacter* besmetting van de caeca na slachten opgesplitst naargelang de status van de dieren tijdens de opfok en het al of niet als eerste geslacht zijn van de toom



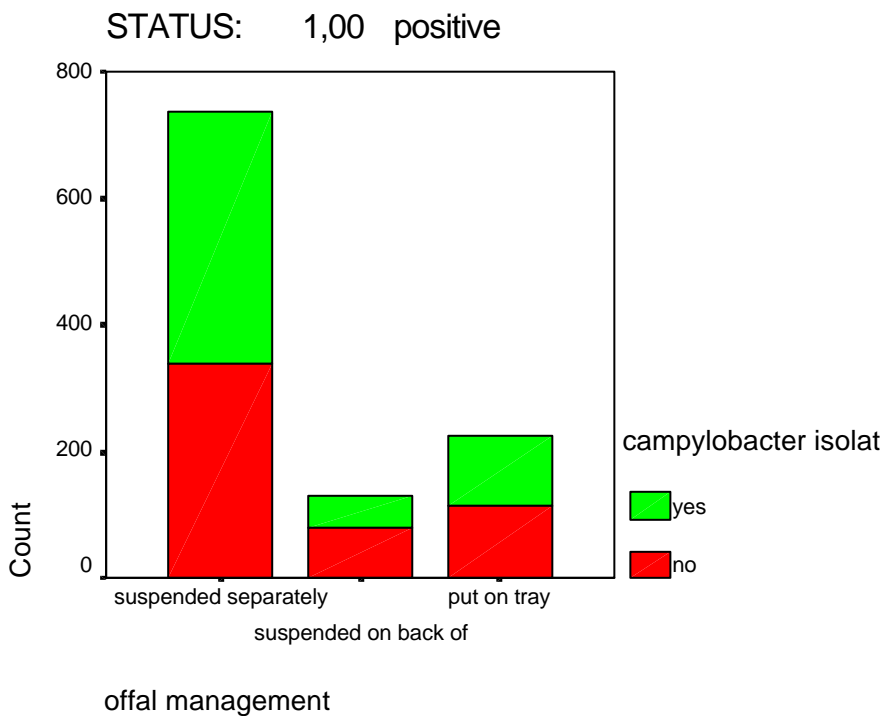
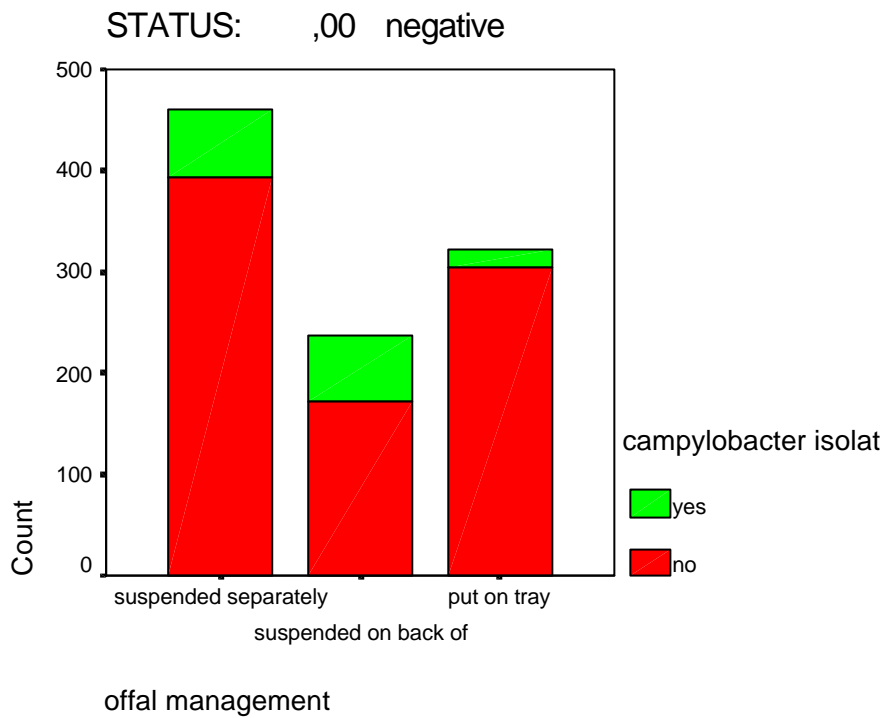
Figuur 16: *Campylobacter* besmetting van de karkassen opgesplitst naargelang de status van de dieren



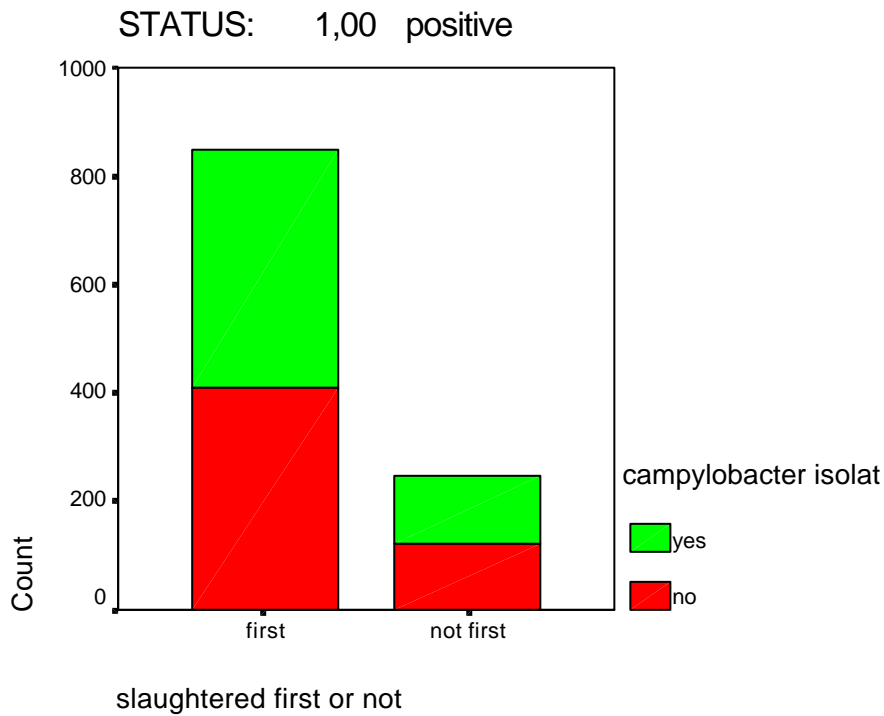
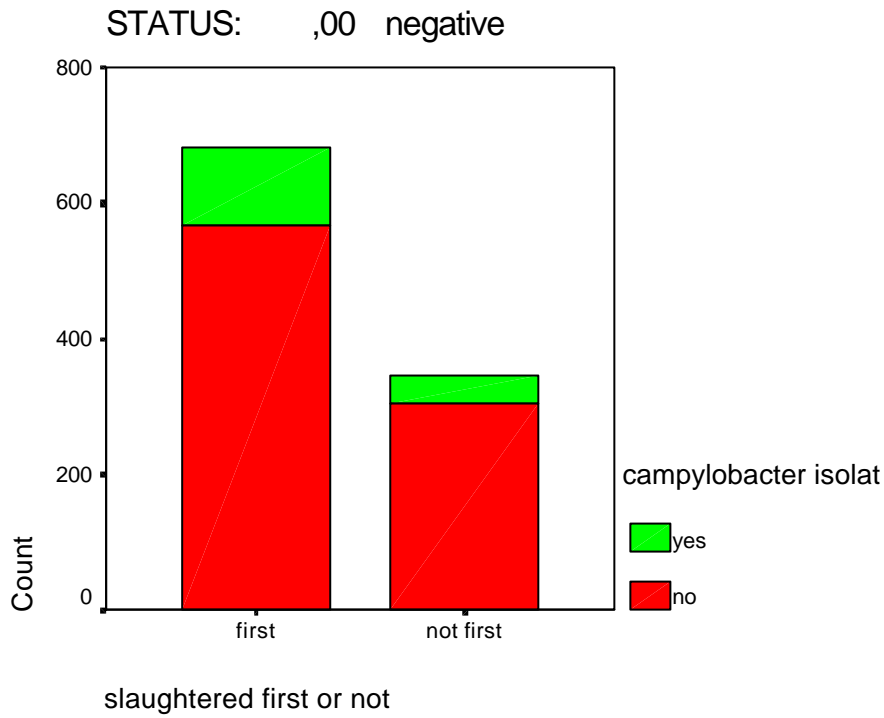
Figuur 17: *Campylobacter* besmetting van de karkassen in functie van de identiteit van het slachthuis bij zowel status positieve als status negatieve dieren



Figuur 18: *Campylobacter* besmetting van de karkassen in functie van de manier van slachten (ingewanden afzonderlijk afgenomen, ingewanden op de rug geplaatst, ingewanden op schaalte)



Figuur 19: *Campylobacter* besmetting van de karkassen in functie van het al of niet als eerste geslacht zijn van de toom

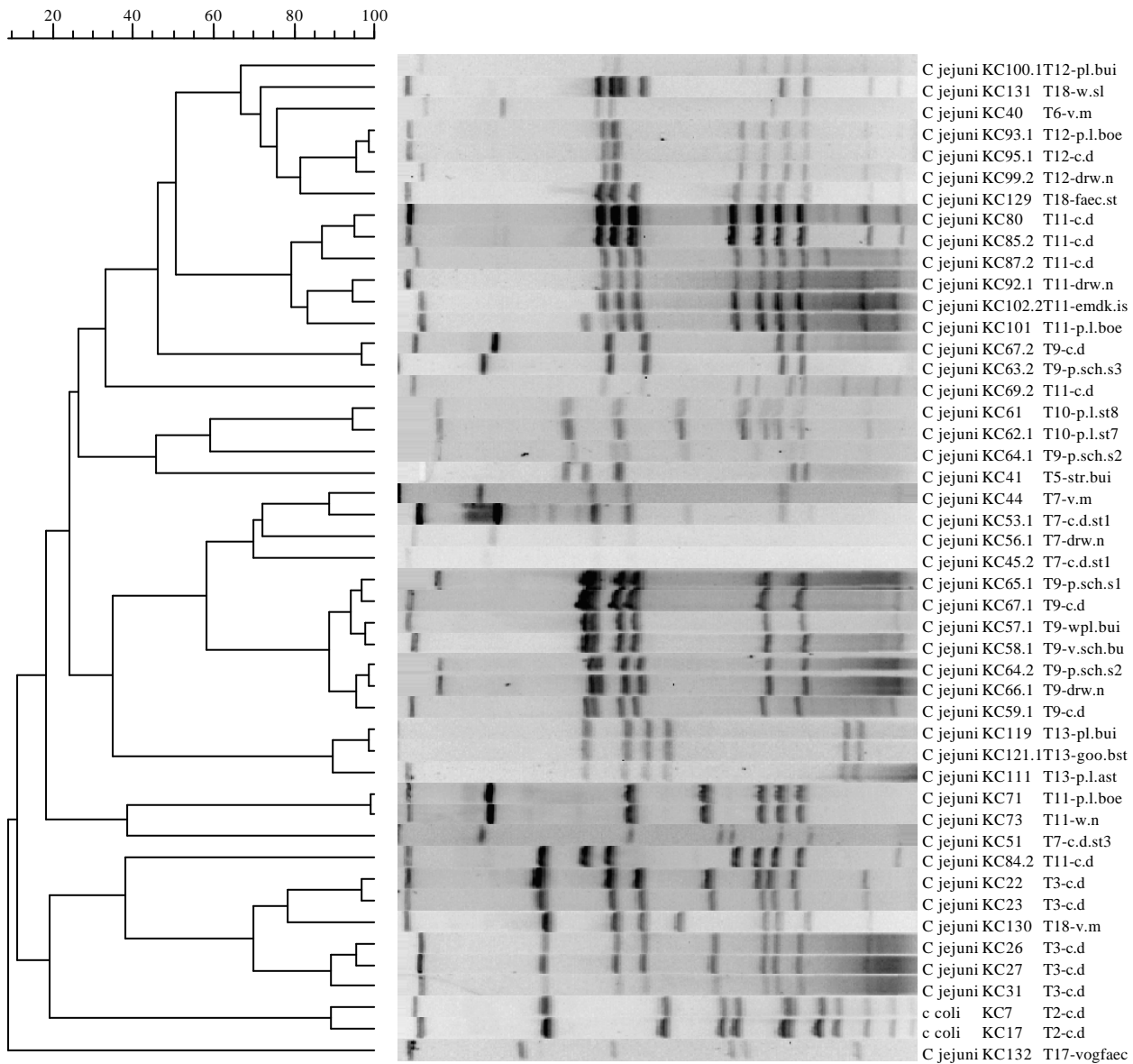


Moleculaire typering van de *Campylobacter* isolaten

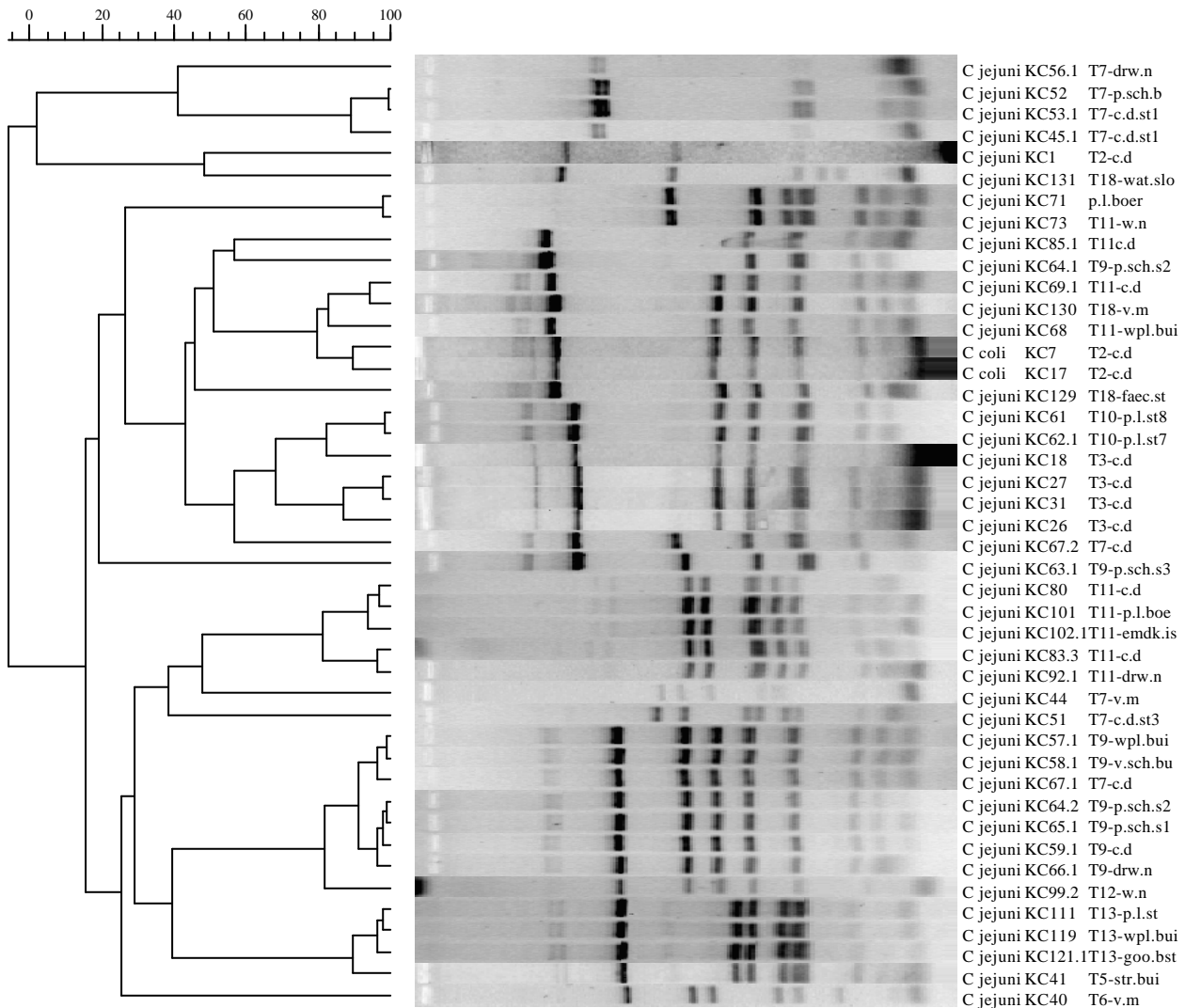
Alle *Campylobacter* isolaten uit de levende fase werden geïdentificeerd tot op species niveau en werden moleculair getypeerd d.m.v. PFGE met het restrictie-enzym *Sma*I en d.m.v. *flaA*-typering met de restrictie-enzymen *Dde*I en *Hinf*I. De meeste *Campylobacter* isolaten behoorden tot *C. jejuni*, in één toom (toom 2) werd ook *C. coli* aangetroffen en in 2 tomen *C. hyointestinalis*. In het algemeen kan gesteld worden dat er een vrij goede overeenkomst was tussen PFGE-*Sma*I types en *flaA* types bij deze *Campylobacter* isolaten. PFGE-*Sma*I vertoonde een iets grotere discriminatie (19 types) dan *flaA*-typering met het restrictie-enzym *Dde*I (14 types), terwijl *flaA*-typering met *Hinf*I duidelijk minder discriminatie opleverde (9 types). Voor een aantal isolaten kon geen patroon bekomen worden met PFGE of met *flaA*-typering of met beide technieken, waarschijnlijk door DNase-activiteit.

Voor een selectie van isolaten waarbij alle tomen, isolatiebronnen en genomische types met PFGE-*Sma*I en met *flaA-Dde*I zijn ingesloten, zijn de resultaten voorgesteld onder de vorm van dendrogrammen (Figuur 20 en 21) waarin de isolaten zijn gegroepeerd volgens hun gelijkenis in resp. PFGE-*Sma*I en *flaA-Dde*I patroon. Het is opmerkelijk dat er per positieve toom een ander genomisch type of voor een aantal tomen zelfs meerdere verschillende genomische types worden aangetroffen. *C. jejuni* blijkt dus op genetisch vlak een zeer variabel species te zijn.

Figuur 20: Dendrogram van de PFGE-patternen met *Sma*I van een selectie van *Campylobacter* isolaten uit alle positieve tomen in de levende fase. Zie lijst met afkortingen voor de isolatiebronnen



Figuur 21: Dendrogram van de *flaA*-patronen met *DdeI* van een selectie van *Campylobacter* isolaten uit alle positieve tomen in de levende fase. Zie lijst met afkortingen voor de isolatiebronnen



Alle genomische types gevonden voor PFGE-*SmaI* en *flaA*-typering met *DdeI* en *HinfI* in elke toom en per staaltype in de levende fase zijn weergegeven in Tabel 18.

Tabel 18: PFGE- en *flaA*-genomische types van *Campylobacter* isolaten uit de levende fase. Het tijdstip van monstername is aangeduid als T: na transport van broeierij; M1: hygiënecontrole; M2: na 2 weken opfok; M3: na 4 weken opfok; M4: na 6 weken opfok

Toom 2

| Tijd | Staal | Stam nr | Identificatie | PFGE- <i>SmaI</i> Types | <i>FlaA</i> | |
|------|-------------------|--------------|-----------------------------|-------------------------|-------------|--------------|
| | | | | | <i>DdeI</i> | <i>HinfI</i> |
| M2 | becale drop | KC 1 – KC 5 | <i>Campylobacter jejuni</i> | NB | 9 | 9 |
| M4 | becale drop | KC 7 – KC 16 | <i>Campylobacter coli</i> | 1 | 1 | 1 |
| M4 | water uit nippels | KC 17 | <i>C. coli</i> | 1 | 1 | 1 |

Toom 3

| Tijd | Staal | Stam nr | Identificatie | PFGE- <i>SmaI</i> Types | <i>FlaA</i> | |
|------|---------------------------------|-----------------------------------|------------------|-------------------------|-------------|--------------|
| | | | | | <i>DdeI</i> | <i>HinfI</i> |
| M2 | becale drop | KC 18 – KC 22 | <i>C. jejuni</i> | 2 | 2 | 2 |
| M3 | becale drop | KC 23 – KC 25 | <i>C. jejuni</i> | 2 | 2 | 2 |
| M3 | drinkwater uit nippels | KC 26 | <i>C. jejuni</i> | 2 | 2 | 2 |
| M4 | becale drop | KC 27, KC 28, KC 30, KC 32, KC 38 | <i>C. jejuni</i> | 2 | 2 | 2 |
| M4 | becale drop | KC 29 | <i>C. jejuni</i> | NB | 2 | 2 |
| M4 | hat stro onder lekkende nippels | KC 31 | <i>C. jejuni</i> | 2 | 2 | 2 |

Toom 5

| Tijd | Staal | Stam nr | Identificatie | PFGE- <i>SmaI</i> Types | <i>FlaA</i> | |
|------|------------------|---------|------------------|-------------------------|-------------|--------------|
| | | | | | <i>DdeI</i> | <i>HinfI</i> |
| M2 | strontjes buiten | KC 41 | <i>C. jejuni</i> | 9 | 3 | 3 |

Toom 6

| Tijd | Staal | Stam nr | Identificatie | PFGE- <i>SmaI</i> Types | <i>FlaA</i> | |
|------|----------------|---------|------------------|-------------------------|-------------|--------------|
| | | | | | <i>DdeI</i> | <i>HinfI</i> |
| M1 | vocht mesthoop | KC 40 | <i>C. jejuni</i> | 4 | 4 | 4 |

Toom 7

| Tijd | Staal | Stam nr | Identificatie | PFGE- <i>SmaI</i> Types | <i>FlaA</i> | |
|------|-----------------------|-------------------|------------------|-------------------------|-------------|--------------|
| | | | | | <i>DdeI</i> | <i>HinfI</i> |
| M2 | strontjes buiten | KC 42 | <i>C. jejuni</i> | NB | gn patroon | gn patroon |
| M2 | sloot | KC 43 | <i>C. jejuni</i> | NB | gn patroon | gn patroon |
| M2 | vocht mesthoop | KC 44 | <i>C. jejuni</i> | 5 | 14 | 5 |
| M3 | becale drop stal 1 | KC 45.1 | <i>C. jejuni</i> | NB | 5 | 5 |
| M3 | becale drop stal 1 | KC 45.2 – KC 47.3 | <i>C. jejuni</i> | 5 | 5 | 5 |
| M3 | becale drop stal 1 | KC 48.1 - KC49.1 | <i>C. jejuni</i> | 5 | gn patroon | gn patroon |
| M3 | becale drop stal 1 | KC 49.2 | <i>C. jejuni</i> | 5 | 5 | 5 |
| M3 | becale drop stal 1 | KC 49.3 | <i>C. jejuni</i> | 5 | gn patroon | gn patroon |
| M3 | becale drop stal 1 | KC 50.1, KC 50.2 | <i>C. jejuni</i> | 5 | 5 | 5 |
| M3 | becale drop stal 3 | KC 51 | <i>C. jejuni</i> | 6 | 6 | 6 |
| M4 | propere schoenen boer | KC 52 | <i>C. jejuni</i> | NB | 5 | 5 |
| M4 | becale drop stal 1 | KC 53.1 – KC 55.2 | <i>C. jejuni</i> | 5 | 5 | 5 |
| M4 | drinkwater nippels | KC 56.1 | <i>C. jejuni</i> | 5 | 5 | 5 |

Toom 9

| Tijd | Staal | Stam nr | Identificatie | PFGE- <i>SmaI</i> Types | <i>FlaA</i> | |
|------|-------|---------|---------------|-------------------------|-------------|--------------|
| | | | | | <i>DdeI</i> | <i>HinfI</i> |

| | | | | | | |
|----|-------------------------|-------------------|-----------|----|----|---|
| M3 | waterplas buiten | KC 57.1, KC 57.2 | C. jejuni | 7 | 7 | 7 |
| M3 | vuile schoenen buiten | KC 58.1, KC 58.2 | C. jejuni | 7 | 7 | 7 |
| M3 | becale drop | KC 59.1 – KC 60.2 | C. jejuni | 7 | 7 | 7 |
| M4 | propere schoenen stal 3 | KC 63.1, KC 63.2 | C. jejuni | 8 | 8 | 8 |
| M4 | propere schoenen stal 2 | KC 64.1 | C. jejuni | 13 | 12 | 7 |
| M4 | propere schoenen stal 2 | KC 64.2 | C. jejuni | 7 | 7 | 7 |
| M4 | propere schoenen stal 1 | KC 65.1 | C. jejuni | 7 | 7 | 7 |
| M4 | drinkwater nippels | KC 66.1, KC 66.2 | C. jejuni | 7 | 7 | 7 |
| M4 | becale drop | KC 67.1 | C. jejuni | 7 | 7 | 7 |
| M4 | becale drop | KC 67.2 | C. jejuni | 8 | 8 | 8 |

Toom 10

| Tijd | Staal | Stam nr | Identificatie | PFGE- Smal Types | FlaA | |
|------|------------------------|------------------|---------------|------------------|------|-------|
| | | | | | Ddel | HinfI |
| M3 | propere laarzen stal 8 | KC 61 | C. jejuni | 14 | 2 | 2 |
| M3 | propere laarzen stal 7 | KC 62.1, KC 62.2 | C. jejuni | 14 | 2 | 2 |

Toom 11

| Tijd | Staal | Stam nr | Identificatie | PFGE- Smal Types | FlaA | |
|------|-------------------------------------|----------------------------|---------------|------------------|------|-------|
| | | | | | Ddel | HinfI |
| M2 | waterplas buiten | KC 68 | ejuni | NB | 1 | 7 |
| M2 | becale drop | KC 69.1 – KC 70.2 | C. jejuni | 15 | 1 | 7 |
| M3 | propere laarzen boer | KC 71 | C. jejuni | 10 | 10 | 7 |
| M3 | waternippels | KC 73 | C. jejuni | 10 | 10 | 7 |
| M3 | becale drop | KC 80,82 | C. jejuni | 11 | 11 | 7 |
| M4 | becale drop | KC 85.1 | C. jejuni | 11 | 12 | 7 |
| M4 | becale drop | KC 83.2 – KC 88.3, KC 90.3 | C. jejuni | 11 | 11 | 7 |
| M4 | becale drop | KC 84.2, KC 86.1 | C. jejuni | 12 | 12 | 7 |
| M4 | becale drop | KC 87.2 | C. jejuni | 11' | 12 | 7 |
| M4 | becale drop | KC 87.1 | C. jejuni | NB | 12 | 7 |
| M4 | becale drop | KC 90.1 | C. jejuni | NB | NB | 7 |
| M4 | drinkwater nippels | KC 92.1, KC 92.2 | C. jejuni | 11 | 11 | 7 |
| M4 | propere laarzen boer | KC 101 | C. jejuni | 11" | 11 | 7 |
| M4 | emmer vr dode kuikens in inkom stal | KC 102.1, KC 102.2 | C. jejuni | 11 | 11 | 7 |

Toom 12

| Tijd | Staal | Stam nr | Identificatie | PFGE- Smal Types | FlaA | |
|------|----------------------|---------------------------|-------------------------------|------------------|------------|------------|
| | | | | | Ddel | HinfI |
| M4 | koeiefeces | KC 94 | Campylobacter hyointestinalis | NB | NB | NB |
| M4 | propere laarzen boer | KC 93.1 | C. jejuni | 16 | gn patroon | gn patroon |
| M4 | propere laarzen boer | KC 93.2, KC 95.1, KC 95.2 | C. jejuni | 16 | 7 | 7 |
| M4 | becale drop | KC 96.1 – KC 98.2 | C. jejuni | 16 | gn patroon | gn patroon |
| M4 | drinkwater nippels | KC 99.1 | C. jejuni | 16 | gn patroon | gn patroon |
| M4 | drinkwater nippels | KC 99.2 | C. jejuni | 16 | 7 | 7 |
| M4 | plassen buiten | KC 100.1, KC 100.2 | C. jejuni | 16 | gn patroon | gn patroon |

Toom 13

| Tijd | Staal | Stam nr | Identificatie | PFGE- Smal Types | FlaA | |
|------|-----------------------------|---------------------|-----------------------|------------------|------|-------|
| | | | | | Ddel | HinfI |
| M3 | becale drop | KC 104 – KC 110 | Helicobacter pullorum | NB | NB | NB |
| M3 | propere laarzen andere stal | KC 111 | C. jejuni | 3 | 3 | 3 |
| M4 | becale drop | KC 113.1 – KC 118.3 | H. pullorum | NB | NB | NB |
| M4 | propere laarzen stal1 | KC 122.1, KC 122.2 | H. pullorum | NB | NB | NB |
| M4 | becale drop | KC 112 | H. pullorum | NB | NB | NB |
| M4 | waterplassen buiten | KC 119 | C. jejuni | 3 | 3 | 3 |
| M4 | gootje aan buitenstal | KC 121.1, KC 121.2 | C. jejuni | 3 | 3 | 3 |

Toom 15

| Tijd | Staal | Stam nr | Identificatie | PFGE- Smal Types | FlaA | |
|------|------------|---------|--------------------|------------------|------|-------|
| | | | | | Ddel | HinfI |
| M1 | koeiefeces | KC 123 | C. hyointestinalis | NB | NB | NB |

Toom 16

| Tijd | Staal | Stam nr | Identificatie | PFGE- <i>SmaI</i> Types | <i>FlaA</i> | |
|------|-------------|---------|------------------|-------------------------|-------------|--------------|
| | | | | | <i>DdeI</i> | <i>HinfI</i> |
| M4 | fecale drop | KC 126 | <i>C. jejuni</i> | NB | gn patroon | gn patroon |

Toom 17

| Tijd | Staal | Stam nr | Identificatie | PFGE- <i>SmaI</i> Types | <i>FlaA</i> | |
|------|----------------|---------|------------------|-------------------------|-------------|--------------|
| | | | | | <i>DdeI</i> | <i>HinfI</i> |
| M4 | vogelstrontjes | KC 132 | <i>C. jejuni</i> | 17 | gn patroon | gn patroon |

Toom 18

| Tijd | Staal | Stam nr | Identificatie | PFGE- <i>SmaI</i> Types | <i>FlaA</i> | |
|------|----------------|---------|------------------|-------------------------|-------------|--------------|
| | | | | | <i>DdeI</i> | <i>HinfI</i> |
| M1 | feces aan stal | KC 129 | <i>C. jejuni</i> | 11 | 1 | 7 |
| M1 | vocht mesthoop | KC 130 | <i>C. jejuni</i> | 18 | 1 | 7 |
| M1 | water sloot | KC 131 | <i>C. jejuni</i> | 19 | 9 | 9 |

Toom 1 was volledig negatief voor *Campylobacter*.

In toom 2 werd *C. jejuni* aangetroffen in de levende dieren na 2 weken opfok en *C. coli* na 6 weken opfok. Hetzelfde genomisch *C. coli* type werd ook aangetroffen in het drinkwater uit de nippels.

In toom 3 werd hetzelfde *C. jejuni* genomisch type aangetroffen in de dieren gedurende de ganse opfok, alsook in het drinkwater uit de nippels en in de stal (nat stro).

Toom 4 was volledig negatief voor *Campylobacter*.

In tomen 5 en 6 werd éénmalig *C. jejuni* aangetroffen, respectievelijk in feces buiten de stal en in de mesthoop.

In toom 7 werd *C. jejuni* aangetroffen in de omgeving en in de dieren vanaf 4 weken opfok. In de levende dieren en het drinkwater uit de nippels werd hetzelfde genomisch type (PFGE-type 5) aangetroffen in stal 1 en éénmalig een ander genomisch type (PFGE- en *flaA*-type 6) in stal 3 na 4 weken opfok. Behalve een mesthoopisolaat, konden de omgevingsisolaten niet getypeerd worden (geen patroon). Het mesthoopisolaat vertoonde enkel bij *flaA*-typering met *DdeI* een ander patroon (type 14) dan de isolaten uit de dieren (type 5), maar dit isolaat was wel duidelijk verschillend met alle technieken van het mesthoopisolaat uit de voorgaande toom 6 op hetzelfde mestbedrijf (PFGE- en *flaA*-type 4). Rekening houdende met de grote gelijkheid met 2 technieken (PFGE-*SmaI* en *flaA*-*HinfI*) en de beschreven genomische instabiliteit van *C. jejuni* lijkt het toch aannemelijk dat de overdracht van de besmetting hier is gebeurd vanuit de omgeving (mesthoop).

Toom 8 was volledig negatief voor *Campylobacter*.

In toom 9 werden 3 *C. jejuni* genomische types aangetroffen. Het genomisch type PFGE-*flaA*-7 werd aangetroffen in de omgeving (plassen en vuil schoeisel) na 4 weken opfok, in de dieren na 4 en 6 weken opfok, in het drinkwater uit de nippels en op het proper schoeisel van stal 1 en van een andere stal (stal 2) na 6 weken opfok. Een tweede genomisch type PFGE-*flaA*-8 werd aangetroffen in de dieren na 6 weken opfok, alsook op het proper schoeisel van een andere stal (stal 3). Tenslotte werd een derde genomisch type PFGE-13/*flaA-DdeI*-12 enkel aangetroffen op propere schoenen van stal 2. Hieruit blijkt dat de dieren van toom 9 waren besmet met 2 verschillende *C. jejuni* genomische types en dat overdracht van besmetting met een bepaald type waarschijnlijk is opgetreden vanuit de omgeving (plassen) en tussen stallen via het schoeisel.

In toom 10 werd hetzelfde *C. jejuni* genomisch type gevonden op proper schoeisel van 2 verschillende stallen (stal 7 en 8) binnen een circulatiebedrijf.

In toom 11 werden 4 verschillende *C. jejuni* genomische types aangetroffen met PFGE-*SmaI* en met *flaA-DdeI*; een combinatie van deze 2 technieken geeft zelfs 5 verschillende types. Opmerkelijk is dat slechts één type werd gevonden met *flaA-HinfI*. In de levende dieren werden reeds 4 genomische types volgens een combinatie van PFGE-*SmaI* en *flaA-DdeI* aangetroffen. Het type PFGE-*SmaI*-15/*flaA-DdeI*-1 wordt enkel na 2 weken opfok aangetroffen en is mogelijks overgedragen vanuit de omgeving (plassen) waarin althans hetzelfde *flaA-DdeI* type werd gevonden (geen PFGE resultaat). Na 4 weken opfok wordt in de dieren het type PFGE-*SmaI*-11/*flaA-DdeI*-11 aangetroffen, maar in de stal (drinkwater, proper schoeisel) wordt nog een ander type PFGE-*SmaI*-10/*flaA-DdeI*-10 aangetroffen welke niet wordt teruggevonden in de dieren. Na 6 weken opfok wordt hetzelfde type als na 4 weken teruggevonden, alsook in het drinkwater uit de nippels en het proper schoeisel. Er treden echter nog 2 andere types op in de dieren, namelijk PFGE-*SmaI*-11/*flaA-DdeI*-12 en PFGE-*SmaI*-12/*flaA-DdeI*-12. In toom 11 treedt dus een opeenvolging op van *C. jejuni* genomische types in de dieren, met de grootste diversiteit na 6 weken opfok.

In toom 12 werden 2 *Campylobacter* species geïsoleerd; *C. hyointestinalis* uit koeiefeces en *C. jejuni* uit de dieren, omgeving (plassen), drinkwater en proper schoeisel. Alle isolaten werden bekomen na 6 weken opfok en behoorden tot hetzelfde genomisch type.

In toom 13 werd uit de dieren *Helicobacter pullorum* geïsoleerd vanaf 4 weken opfok, terwijl hetzelfde *C. jejuni* genomisch type werd aangetroffen in de omgeving en op proper schoeisel van een andere stal.

Toom 14 was volledig negatief voor *Campylobacter*. In toom 15 werd *C. hyointestinalis* geïsoleerd uit koeiefeces. In toom 16 werd éénmalig *C. jejuni* aangetroffen in de dieren na 6 weken opfok. In toom 17 werd *C. jejuni* geïsoleerd uit vogelstrontjes.

In toom 18 worden 3 verschillende *C. jejuni* genomische types aangetroffen in de omgeving na hygiënecontrole, maar niet in de dieren tijdens opfok.

Algemene vaststelling is dat in verschillende tomen het drinkwater uit de nippels besmet is met hetzelfde type als in de dieren en dus waarschijnlijk verantwoordelijk is voor een verdere verspreiding van de *C. jejuni* besmetting in de toom.

Antibiotica resistentie van de *Campylobacter* isolaten

In totaal werden 178 *Campylobacter* stammen onderzocht op antibiotica resistentie, 164 *C. jejuni*, 13 *C. coli* en 1 *C. hyointestinalis* (Tabel 19 en Tabel 20). Geen enkele *Campylobacter* stam was resistent voor amoxicilline/clavulaanzuur 2/1 en slechts 1 stam was resistent voor gentamycine. Resistentie voor ciprofloxacin, nalidixinezuur en tetracycline trad respectievelijk op bij 47, 57 en 44 stammen. Van de stammen waren er 15 resistent voor erythromycine en 14 voor ampicilline. De hoge resistentie voor ciprofloxacin (een quinolone) zou gerelateerd kunnen zijn aan het frequent gebruik van quinolones bij de opfok van braadkuikentomen.

Tabel 19: Aantal *Campylobacter* stammen met een gevoeligheid (S), een intermediaire resistentie (I) of een resistentie (R) tegen een bepaald antibioticum

| | EM | AM | CI | NA | TC | GM | XL |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| S | 25 | 153 | 130 | 121 | 132 | 1 | 178 |
| I | 137 | 11 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| R | 15 | 14 | 47 | 57 | 44 | 177 | 0 |

EM: erythromycine; AM: ampicilline; CI: ciprofloxacin; NA: nalidixinezuur; TC: tetracycline; GM: gentamycine; XL: amoxicilline / clavulaanzuur 2/1

Tabel 20: Antibiotica resistentie van een representatieve groep *Campylobacter* isolaten

| Code AR | Aantal stammen | Soort <i>Campylobacter</i> | Aantal/Toom nr. | Tijdstip isolatie |
|---------|----------------|----------------------------|-----------------|-------------------|
| IIRRSSS | 5 | <i>jejuni</i> | 2/13; 1/6; 2/17 | S |
| IISSSSS | 1 | <i>jejuni</i> | 1/4 | S |
| | 2 | <i>jejuni</i> | 2/11 | M |
| IRRRRSS | 1 | <i>jejuni</i> | 1/17 | S |
| IRRRSSS | 1 | <i>jejuni</i> | 1/3 | S |
| | 1 | <i>jejuni</i> | 1/11 | M |
| IRSSSSS | 2 | <i>jejuni</i> | 1/9; 1/11 | S |

| | | | | |
|---------|----|------------------------|--|---|
| ISRRRSS | 7 | <i>jejuni</i> | 2/1; 1/3; 3/13; 1/17 | S |
| | 4 | <i>jejuni</i> | 4/3 | M |
| ISRRSSS | 2 | <i>jejuni</i> | 2/11 | M |
| | 19 | <i>jejuni</i> | 1/12; 2/13; 15/15; 1/16 | S |
| ISSRRSS | 4 | <i>jejuni</i> | 4/10 | S |
| | 2 | <i>jejuni</i> | 2/10 | M |
| ISSRSSS | 1 | <i>hyointestinalis</i> | 1/15 | M |
| ISSSISS | 2 | <i>jejuni</i> | 2/11 | M |
| ISSSRSS | 9 | <i>jejuni</i> | 4/9; 1/10; 3/12; 1/18 | S |
| | 9 | <i>jejuni</i> | 7/9; 2/11 | M |
| ISSSSSS | 39 | <i>jejuni</i> | 2/2, 1/4; 1/6; 5/7; 1/10; 3/11; 2/12; 6/13; 14/16; 4/17 | S |
| | 23 | <i>jejuni</i> | 1/6; 7/7; 3/9; 5/11; 5/12; 2/13 | M |
| | 3 | <i>coli</i> | 3 | S |
| RISSRSS | 1 | <i>jejuni</i> | 1/9 | S |
| RRISSSS | 1 | <i>jejuni</i> | 1/11 | S |
| RRRRRSS | 1 | <i>jejuni</i> | 1/6 | S |
| RRSRSS | 1 | <i>jejuni</i> | 1/3 | S |
| RRSSSRS | 1 | <i>jejuni</i> | 1/3 | S |
| RRSSSSS | 3 | <i>jejuni</i> | 1/3; 2/11 | S |
| RSSSRSS | 5 | <i>coli</i> | 5/2 | S |
| | 2 | <i>coli</i> | 2/2 | M |
| SISSSSS | 2 | <i>coli</i> | 2/7 | S |
| SRRRSSS | 1 | <i>jejuni</i> | 1/12 | S |
| SRSSSSS | 1 | <i>jejuni</i> | 1/11 | S |
| SSRRRSS | 3 | <i>jejuni</i> | 2/1; 1/13 | S |
| SSRRSSS | 5 | <i>jejuni</i> | 5/15 | S |
| SSSSRSS | 1 | <i>jejuni</i> | 1/9 | S |
| | 1 | <i>jejuni</i> | 1/11 | M |
| SSSSSSS | 4 | <i>jejuni</i> | 1/7; 1/11; 2/13 | S |
| | 3 | <i>jejuni</i> | 3/7; 1/11; 1/12; 1/13 | M |
| | 1 | <i>coli</i> | 13 | S |

Code AR: code antibiotica resistentie; R: resistent; I: intermediair; S: gevoelig in de volgende volgorde van antibiotica: erythromycine, ampicilline, ciprofloxacine, nalidixinezuur, tetracycline, gentamycine en amoxicillin / clavulaanzuur 2/1; M: mestbedrijf; S: slachthuis

Slechts 11 stammen waren gevoelig voor alle geteste antibiotica (erythromycine ampicilline, ciprofloxacine, nalidixinezuur, tetracycline, gentamycine en amoxicilline/clavulaanzuur 2/1). In totaal waren 65 stammen intermediair resistent voor erythromycine en gevoelig voor de andere geteste antibiotica. Twee *C. coli* stammen waren enkel intermediair resistent voor ampicilline. In totaal vertoonden 5 stammen enkel een intermediaire resistentie voor 2 antibiotica (ampicilline en erythromycine of tetracycline). Resistentie voor 1 antibioticum werd weergevonden voor ampicilline (3 stammen), voor tetracycline (20 stammen) en voor nalidixinezuur (*C. hyointestinalis*). Resistentie voor 2 antibiotica werd gevonden voor ciprofloxacine en nalidixinezuur (31 stammen), voor nalidixinezuur en tetracycline (6 stammen), voor erythromycine en ampicilline (4 stammen) en voor erythromycine en tetracycline (8 stammen).

Resistentie voor 3 antibiotica werd gevonden voor ampicilline, ciprofloxacine en nalidixinezuur (3 stammen), ciprofloxacine, nalidixinezuur en tetracycline (14 stammen) en erythromycine, ampicilline en gentamycine (1 stam). Resistentie voor 4 antibiotica werd gevonden voor ampicilline, ciprofloxacine, nalidixinezuur en tetracycline (1 stam) en voor erythromycine, ampicilline, nalidixinezuur en tetracycline (1 stam). Eén stam bleek resistent voor 5 antibiotica: erythromycine, ampicilline, ciprofloxacine, nalidixinezuur en tetracycline. Resistentie voor amoxicilline/clavulaanzuur werd niet weergevonden bij de *Campylobacter* isolaten.

Het is duidelijk dat tijdens de opfok van toom 11 *Campylobacter* stammen circuleerden met een verschillend antibiotica resistentieprofiel (in totaal 8 types). Deze toom kreeg een quinolone preparaat toegediend. Resistentie voor ciprofoxacine (een quinolone) en nalidixinezuur werd weergevonden bij een isolaat uit de ceca. Bij dezelfde toom werd uit het water van de nippels een stam geïsoleerd die bijkomend nog resistent was aan ampicilline. Bij tomen 7, 11, 12 en 13 circuleerden 2 zeer gelijkaardige types met een erythromycine resistent en intermediair fenotype, bij toom 9 werden 2 types onderscheiden door een resistentie of gevoeligheid voor tetracycline. Bij tomen 3, 10 en 15 werd slechts 1 type weergevonden.

4.2. Onderzoek naar de contaminatie van gereinigde transportcontainers

4.2.1. Materiaal en methoden

In 3 slachthuizen werden op verschillende dagen en in 3 andere slachthuizen op één dag transportcontainers onderzocht. Daartoe werd telkens van een willekeurig aangevoerde toom braadkuikens mest verzameld uit 6 transportcontainers en in afzonderlijke recipiënten overgebracht. Iedere bemonsterde container werd vervolgens gemerkt. Na het reinigen van de

containers werden dezelfde containers afgeswabt. Alle monsters werden onmiddellijk naar het laboratorium overgebracht en getest op de aanwezigheid van *Salmonella* en *Campylobacter*. Dezelfde isolatiemethoden werden gebruikt als bij het onderzoek van braadkuikentomen van broeierij tot in het slachthuis (zie punt 4.1.1)

4.2.2. Resultaten

In totaal werden 168 containers onderzocht die gebruikt werden voor het transport van 28 tomen. De resultaten zijn weergegeven in Tabel 21. Uit dit onderzoek bleek, dat een groot aantal negatieve containers (gebaseerd op de resultaten van de mest uit de containers) positief werden na reiniging en desinfectie. Dit was vooral voor *Salmonella* en in mindere mate voor *Campylobacter* het geval. Ook hier werd een effect vastgesteld van het slachthuis. Alleen in slachthuizen met een grote reinigingsinstallatie en een aansluitende aparte desinfectie-installatie was de contaminatie van de gereinigde containers geringer. Ook bleek uit het onderzoek, dat de slachthuizen, die gebruik maken van transportcontainers met een geringere contaminatie, het aantal positieve mestmonsters geringer was.

Tabel 21: *Salmonella* en *Campylobacter* contaminatie van 168 transportcontainers voor braadkuikens

| | Containermest | Swabs na reiniging |
|----------------------|---------------|--------------------|
| <i>Salmonella</i> | 61 | 118 |
| <i>Campylobacter</i> | 119 | 139 |

Op basis van deze resultaten kan aangenomen worden, dat besmette transportcontainers als bron kunnen fungeren voor de contaminatie van de volgende te transporteren toom. Immers de verblijftijd van deze dieren in transportcontainers is in veel gevallen vrij lang (tot 8-9 uur) en de snelle darmtransit bij deze dieren is kort (4-6 uur).

4.3. Onderzoek naar de rol van transportcontainers en slachthuizen in de contaminatie van braadkuikenkarkassen

Uit voorgaande onderzoeken bleek dat er voor de *Salmonella* contaminatie geen goede correlatie bestaat tussen de status van de ter slachting aangeboden tomen en de contaminatie van de gekoelde karkassen. Anderzijds werd aangetoond dat gereinigde transportcontainers frequent besmet zijn met *Salmonella* en *Campylobacter*. Mogelijks fungeren dergelijke containers als bron voor besmetting van de dieren tijdens het transport van de boerderij naar het slachthuis. Om meer informatie hieromtrent te bekomen werd bijkomend onderzoek uitgevoerd. Daartoe werden braadkuikens van éénzelfde toom getransporteerd in normaal gereinigde en extra gereinigde transportcontainers die ook extra waren ontsmet. Een mogelijke besmetting van deze dieren werd onderzocht. Hierbij werd extra aandacht besteed aan het voorkomen van *Salmonella* in mest uit de gebruikte transportcontainers. In dit onderzoek werd ook aandacht besteed aan de contaminatie van karkassen tijdens het slachtproces en de slachtomgeving.

4.3.1. Materiaal en methoden

Twee extra tomen werden opgevolgd vanaf de aankomst op de boerderij tot en met het slachthuis. De tomen werden geslacht in 2 verschillende slachthuizen (de eerste toom in slachthuis 5 en de tweede toom in slachthuis 6). Iedere toom werd opgesplitst in 2 groepen: een eerste groep werd geladen in 2 extra gereinigde en ontsmette transportcontainers en een tweede groep (de rest van de toom) werd geladen in normaal gereinigde containers. Voor het laden werden 2 extra gereinigde en 4 normaal gereinigde containers bemonsterd met de swabmethode. Na aankomst van de dieren werden cloaca-, borst en pootswabs genomen van beide groepen dieren. Juist voor het slachten werd mest verzameld uit beide types van containers. De tomen werden als eerste van de dag geslacht, waarbij de dieren uit de extra gereinigde transportcontainers eerst werden opgehangen en vervolgens de dieren uit de normaal gereinigde containers. Tijdens het slachten van beide groepen dieren werden monsters genomen van het broeiwater, pluimen uit de plukmachine, nekhuid van karkassen onmiddellijk na de plukmachine, darmpakketten. Voor het onderzoek werd gebruik gemaakt van de reeds beschreven isolatiemethoden. De swabs genomen van de transportcontainers voor het laden van de dieren werden kwantitatief op *Salmonella* onderzocht m.b.v. de MPN methode.

Tijdens het onderzoek van braadkuikens van de broeierij tot en met het slachthuis werden vanaf toom 15 extra monsters genomen voor onderzoek op *Salmonella*. Tevens werd een extra toom (een willekeurig eerst geslachte toom in het slachthuis) in het onderzoek betrokken. De types monsters genomen tijdens het slachten van deze tomen werd in de loop van het onderzoek sterk opgedreven. Bij het slachten van de laatste toom werden volgende monsters genomen: swabs van de slachtlijn (slachtketting tot na de plukmachine, de binnenzijde van de broeibak en de plukmachine) voor het begin van de slachtactiviteiten, mest uit transportcontainers, borstswabs van opgehangen kuikens, broeiwater, pluimen, nekhuid van karkassen na de plukmachine, darmpakketten en nekhuid van karkassen na koeling.

4.3.2. Resultaten

De 2 extra gevolgde tomen werden tijdens de opkweek *Salmonella* negatief bevonden. Een deel van beide tomen werd in extra gereinigde en ontsmette transportcontainers geplaatst. De rest van de tomen werd in normaal gereinigde transportcontainers overgebracht. Na aankomst in het slachthuis verbleven de dieren nog ongeveer 10 uur in de transportcontainers. Alle containers, gebruikt voor het transport van de eerste toom, bleken *Salmonella* positief te zijn. Het gevonden aantal lag echter lager voor de extra gereinigde en ontsmette containers ($10^{-4}/\text{cm}^2$) dan de normaal gereinigde containers ($10^{-1}-10^{-2}/\text{cm}^2$). In de containers van toom 2 werd geen *Salmonella* aangetoond ($<10^{-3}/\text{cm}^2$). Het gebruik van besmette containers in toom 1 leidde echter niet tot een besmetting van de cloaca, cecum of dunne darm van de dieren met *Salmonella* (Tabel 22). Ook voor toom 18, waar gebruik gemaakt werd van *Salmonella* gecontamineerde containers, werd geen besmetting van de ceca en dunne darmen van de dieren vastgesteld. Feces afkomstig van dergelijke dieren zou dan ook negatief moeten zijn. Evenwel werden de mestmonsters genomen uit de sterkst besmette transportcontainers, positief bevonden. Deze resultaten wijzen erop, dat mestmonsters uit transportcontainers besmet werden door onvoldoende gereinigde transportcontainers. De besmetting van mestmonsters door onvoldoende gereinigde containers geeft ook een verklaring voor het groot aantal *Salmonella* serotypes aangetroffen in dergelijke monsters. Rekening houdend met de resultaten van het onderzoek naar de *Salmonella* contaminatie van transportcontainers kan dan ook gesteld worden, dat mestmonsters uit

transportcontainers geen betrouwbare resultaten opleveren met betrekking tot de detectie van een *Salmonella* besmetting van de aangevoerde braadkuikens in een slachthuis.

Hygiënisch onderzoek van de vuile slachtlijn (tot na het plukken) voor de aanvang van de slachtactiviteiten toonde aan dat in de 3 onderzochte slachthuizen dit gedeelte van de slachtlijn nog gecontamineerd is met *Salmonella* en dit zelfs met verschillende serotypes (Tabel 23). *Salmonella* werd niet alleen aangetroffen op de slachtapparatuur, maar ook op de slachtketting (haken en ketting), die door het gehele vuile slachtlijn draait. Uit het broeiwater werd bij het slachten van 4 van de 7 onderzochte tomen *Salmonella* geïsoleerd. In de gevallen, waarbij *Salmonella* positieve dieren werden geslacht (toom 15 en 16), werden andere serotypes geïsoleerd bij de levende dieren. Pluimen, verzameld tijdens het plukken van de betrokken tomen, waren in de meeste gevallen (6 van de 7 tomen) *Salmonella* positief. Zelfs alle monsters pluimen van *Salmonella* negatieve dieren, vervoerd in extra gereinigde transportcontainers (extra toom 1 en 2) waren positief. In de meeste gevallen werden diverse *Salmonella* serotypes (tot 6 serotypes) in de pluimmonsters aangetroffen. Meerdere van deze serotypes werden ook teruggevonden op de karkassen onmiddellijk na het plukken. Na het plukken zijn een groot aantal karkassen reeds besmet met *Salmonella*. Verder uitslachten en uitkoelen van de karkassen leidden tot een reductie van het aantal positieve karkassen. Veelal ging dit gepaard met een reductie van het aantal aanwezige serotypes.

Dit onderzoek toont aan, dat het slachthuis zelf en in het bijzonder de vuile slachtlijn als een belangrijke contaminatiebron voor de geslachte karkassen kan fungeren. Deze resultaten bevestigen ook de eerder gestelde beweringen dat de besmetting van braadkuikenkarkassen in grote mate bepaald wordt door het slachthuis waar de dieren geslacht worden. Hierbij speelt de hygiëne van de slachtinstallatie in het slachthuis een voorname rol.

Tabel 22: *Salmonella* contaminatie tijdens het slachten van braadkuikens

| Toom | Extra 1a* | Extra 1b* | Extra 2a* | Extra 2b* | Toom 15 | Toom 16 | Toom 17 | Toom 18 | Extra 3 |
|-----------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Plukmachine | - | | 0/8 | | - | - | - | 1/6 | 1/8 |
| Broeibak | - | | - | | - | - | - | - | 3/6 |
| Slachtketting | - | | 3/12 | | - | - | - | - | 4/26 |
| Swab Transportcontainers | 2/2** | 3/4*** | 0/4**** | 0/4**** | - | - | - | 2/4° | - |
| Cloaca | 0/36 | 0/36 | 0/8 | 0/8 | - | - | - | - | - |
| Borst + Poten | 0/12 | 0/12 | 0/16 | 0/16 | - | - | - | - | 2/6 |
| Mest Transportcontainers | 0/2 | 4/4 | 0/4 | 0/4 | 3/6 | 3/6 | 0/6 | 1/6 | 0/6 |
| Cecum | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 0/3 | - | - | - | 0/6 | 0/6 |
| Dunne darm | | | 0/3 | 0/3 | - | - | - | 0/6 | 0/6 |
| Broeiwater | 0/2 | 1/2 | 1/2 | 2/2 | 4/6 | 6/6 | - | 0/4 | 0/4 |
| Pluimen | 2/2 | 2/2 | 2/2 | 1/2 | 6/6 | 6/6 | 6/6 | 2/2 | 0/4 |
| Karkassen na plukken | 20/20 | 20/20 | 8/20 | 13/20 | 15/20 | 20/20 | 0/20 | 6/20 | 1/30 |
| Karkassen na koeling | - | - | 4/20 | 3/20 | 19/60 | 20/30 | 2/30 | 3/30 | 0/30 |

* a: braadkippen vervoerd in extra gereinigde en ontsmette transportcontainers, b* : braadkippen vervoerd in normaal gereinigde transportcontainers

** aantal: $2 \times 3,6 \cdot 10^{-4}/\text{cm}^2$; *** aantal: $1 \times < 3,0 \cdot 10^{-2}/\text{cm}^2$, $1 \times 3,6 \cdot 10^{-2}/\text{cm}^2$ en $2 \times 1,5 \cdot 10^{-1}/\text{cm}^2$, **** aantal: $4 \times < 1,0 \cdot 10^{-3}/\text{cm}^2$

° 400 cm²/container onderzocht

Tabel 23: *Salmonella* serotypes tijdens het slachten van braadkuikens

| Toom | Extra 1 | Extra 2 | Toom 15 | Toom 16 | Toom 17 | Toom 18 | Extra 3 |
|-----------------------------|--|---|---|---|--|---|---|
| Plukmachine | | | | | | <i>S. Enteritidis</i> | <i>S. Infantis</i> |
| Broeibak | | | | | | | <i>S. Infantis</i> |
| Slachtketting | | <i>S. Hadar</i> <i>S. niet typ.</i> | | | | | <i>S. Virchow</i> <i>S. Infantis</i> |
| Swab Transportcontainers | | | | | | <i>S. Enteritidis</i> <i>S. Mbandaka</i> | |
| Borst + Poten | | | | | | | <i>S. Infantis</i> <i>S. Enteritidis</i> |
| Mest Transportcontainers | <i>S. Typhimurium</i> <i>S. niet typ.</i> | | <i>S. Montevideo</i> <i>S. Indiana</i> | <i>S. Typhimurium</i> <i>S. Hadar</i> <i>S. niet typ.</i> | | | |
| Broeiwater | <i>S. niet typ.</i> | <i>S. Hadar</i> | <i>S. Bredeney</i> | <i>S. Hadar</i> <i>S. Paratyphi B</i> | | | |
| Pluimen | <i>S. Infantis</i> <i>S. Hadar</i> <i>S. Putten</i> <i>S. Mbandaka</i> <i>S. Montevideo</i> <i>S. niet typ.</i> | <i>S. Hadar</i> <i>S. Bredeney</i> | <i>S. Bredeney</i> <i>S. Indiana</i> <i>S. Enteritidis</i> | <i>S. Paratyphi B</i> | <i>S. 6,7:-:5</i> <i>S. Typhimurium</i> <i>S. Infantis</i> | <i>S. Enteritidis</i> | |
| Karkassen na plukken | <i>S. Infantis</i> <i>S. Hadar</i> <i>S. Typhimurium</i> <i>S. niet typ.</i> | <i>S. Hadar</i> <i>S. Typhimurium</i> <i>S. Bredeney</i> <i>S. niet typ.</i> | <i>S. Bredeney</i> <i>S. Indiana</i> <i>S. Enteritidis</i> <i>S. Hadar</i> | <i>S. Hadar</i> <i>S. Paratyphi B</i> <i>S. niet typ.</i> | | <i>S. Enteritidis</i> | <i>S. Infantis</i> |
| Karkassen na koeling | | <i>S. Hadar</i> <i>S. Typhimurium</i> <i>S. niet typ.</i> | <i>S. Enteritidis</i> <i>S. Montevideo</i> | <i>S. Hadar</i> <i>S. Paratyphi B</i> <i>S. niet typ.</i> | <i>S. Infantis</i> <i>S. Typhimurium</i> | <i>S. Enteritidis</i> <i>S. Mbandaka</i> | |

4.4. Bepaling van de gevoeligheid van de isolatiemethode voor het opsporen van *Campylobacter*

In het projectvoorstel was voorzien dat een kwantitatief onderzoek voor het voorkomen van *Campylobacter* bij braadkuikens zou uitgevoerd worden. Voor het tellen van lage aantallen (<100/g) moest gebruik gemaakt worden van de MPN techniek. Het uitvoeren van deze MPN techniek op een groot aantal monsters onder de gebruikelijke micro-aërofiële incubatie omstandigheden zou technische problemen (aanwezigheid van voldoende recipiënten voor incubatie) kunnen opleveren voor het laboratorium. Daarom werd een onderzoek uitgevoerd naar de mogelijkheid om de verrijking van *Campylobacter* uit te voeren in gewijzigde incubatie omstandigheden en werd de invloed ervan op de gevoeligheid bestudeerd.

4.4.1. Materiaal en methoden

Steriel kippenvlees, *Campylobacter* negatieve nekhuid van braadkuikens en gemengd gehakt werden beënt met *Campylobacter* stammen op 3 verschillende niveaus zodat het aantal *Campylobacter* in het verrijkingsmedium Preston varieerde van 10^4 tot 10^0 . Volgende *Campylobacter* stammen werden in dit onderzoek gebruikt: een LMG collectiestam, de referentie stam van Oxoid en een stam geïsoleerd uit nekhuid van braadkippen. Van ieder monster werd 2x10g onmiddellijk overgebracht in 2x10 ml Preston broth. Een andere 10g monster werd gehomogeniseerd in 90% peptone water. Vervolgens werd 2x10ml homogenaat (=1g monster) aan 2x90 ml Preston broth en 1ml (=0,1g monster) aan 9 ml Preston broth toegevoegd. Het verrijkingsmedium met 10g en één verrijkingsmedium met 1g monster werden overgebracht in een Stomacher zak. Deze zak werd op een zodanige wijze gesloten, dat praktisch alle lucht uit de zak was verwijderd (aërobe incubation). De andere media werden in micro-aërofiële omstandigheden geïncubeerd. De verder stappen in de isolatie werden op dezelfde wijze uitgevoerd zoals reeds hoger beschreven.

4.4.2. Resultaten

De gevoeligheid van de isolatiemethode voor het opsporen van *Campylobacter jejuni* werd door verschillende factoren beïnvloed (Tabel 24). In de eerste plaats lag het detectieniveau voor de Oxoid stam beduidend hoger dan voor de 2 andere stammen. Voor de LMG- en kippenstam werden vergelijkbare resultaten bekomen. Het type monster toegevoegd aan het verrijkingsmedium had geen invloed op het detectieniveau. De hoeveelheid monster, toegevoegd aan het medium, had een grote impact op het detectieniveau. Een beduidend betere detectie werd bekomen bij micro-aërofiële incubatie van 1g monster. Daarentegen leverde aërobe en micro-aërofiële incubatie van 10g monster vergelijkbare resultaten op.

Dit onderzoek toonde aan, dat alleen een aërobe incubatie van een groot monster mogelijk is. Kleinere hoeveelheden moeten micro-aërofiel geïncubeerd worden. Tevens toonde dit onderzoek aan dat bij gebruik van de MPN techniek rekening moet gehouden worden met een onderschatting van het werkelijk aanwezig aantal *Campylobacter* in het monster, daar in sommige gevallen een detectieniveau van 10^1 werd vastgesteld.

Tabel 24: Gevoeligheid van de *Campylobacter* isolatiemethode in functie van de hoeveelheid onderzocht monster en de incubatie-omstandigheden

| Hoeveelheid monster | 10 gram | | 1 gram | | 0,1 gram |
|--------------------------|--------------|------------------|-------------|------------------|------------------|
| Incubatie omstandigheden | aëroob* | micro aerophilic | aëroob | micro aerophilic | micro aerophilic |
| Steriel kippenvlees | | | | | |
| LMG stam | 10^0-10^1 | 10^0 | 10^4-10^5 | 10^0-10^1 | 10^0-10^1 |
| Oxoid stam | 10^1-10^2 | n.o.** | $>10^5$ | $10^4->10^5$ | 10^2-10^3 |
| Kuikenstam | 10^0-10^1 | 10^0-10^1 | $>10^4$ | 10^0-10^1 | 10^0-10^1 |
| Nekhuid braadkuikens | | | | | |
| LMG stam | 10^0-10^1 | 10^0-10^1 | 10^0-10^1 | 10^0-10^1 | 10^0-10^1 |
| Oxoid stam | 10^3-10^4 | 10^2-10^3 | $>10^5$ | 10^2-10^4 | 10^0-10^2 |
| Kuikenstam | 10^0-10^1 | 10^0-10^1 | $>10^4$ | 10^0-10^1 | 10^0-10^1 |
| Minced meat | | | | | |
| LMG stam | 10^0 | 10^0-10^1 | 10^1-10^3 | 10^0 | 10^0-10^1 |
| Oxoid stam | $10^1->10^3$ | 10^1-10^3 | $>10^3$ | $10^1->10^3$ | $>10^3$ |
| Kuikenstam | 10^0 | 10^0-10^1 | 10^2 | 10^0-10^1 | 10^0-10^1 |

* aëroob: incubatie in Preston broth in een gesloten Stomacherzak

** n.o.: niet onderzocht

5. Besluiten van het *Salmonella* en *Campylobacter* ketenonderzoek bij braadkippen

Tijdens dit project werden 18 braadkuikentomen gevolgd vanaf de broeierij tot in het slachthuis. Hierbij werden een groot aantal monsters genomen van de dieren, hun leefomgeving alsook tijdens het slachten en onderzocht op de aanwezigheid van *Salmonella* en *Campylobacter*. Om de contaminatiewegen beter in kaart te brengen werd naast de gebruikelijke typeringen zoals serotypering bij *Salmonella*, ook gebruik gemaakt van moleculaire typering van een geselecteerd aantal isolaten. Van een representatieve groep van *Salmonella* en *Campylobacter* stammen werd het antibiotica resistentieprofiel bepaald. Bovendien werd onderzoek verricht naar de rol van transportcontainers in de besmetting van de aangevoerde braadkuikens en het effect van de slachthuishygiëne op de contaminatie van de geslachte braadkuikens.

- Voor de isolatie van *Salmonella* uit pluimvee gerelateerde monsters leverden halfharde verrijkmingsmedia de beste gevoeligheid op. Door combinatie van zowel vloeibare als halfharde verrijkmingsmedia zoals Rappaport Vassiliadis en Diasalm werd een sensitiviteit van meer dan 99% bereikt.
- **De *Salmonella* contaminatie van braadkuikens treedt meestal op tijdens de 2 eerste levensweken van de dieren.** Tijdens de verdere opkweek neemt het aantal positieve tomen weer af. Bovendien **reduceert het antibioticagebruik de uitscheiding van *Salmonella* tijdens de opfok.**
- **De *Campylobacter* besmetting neemt constant toe gedurende de opkweek.** Hierbij geeft een antibioticabehandeling geen beduidend effect op de uitscheiding van *Campylobacter*. **Het opsporen van *Campylobacter* positieve tomen gebeurt dan ook het best juist voor het slachten.**
- De 'overshoe' methode is de gevoeligste bemonsteringsmethode voor het opsporen van een *Salmonella* infectie bij braadkuikens. Om de status van een toom te bepalen moeten, als gevolg van het effect van de leeftijd en antibioticumgebruik op de uitscheiding, **meerdere overshoe monsters** (meer dan 2 paar) onderzocht worden op verschillende tijdstippen tijdens de opkweek. Deze vaststellingen zouden in overweging moeten genomen worden bij de evaluatie van controleprogramma's gebaseerd op het bacteriologisch onderzoek van fecesmateriaal.
- **Cecale drops** zijn de meest aangewezen monsters voor het onderzoek van braadkuikens op *Campylobacter*.
- Het nagaan van de aan- of afwezigheid van *Salmonella* in bepaalde stalen en zelfs serotypering zijn soms niet voldoende om exact de contaminatiebronnen op te sporen. In vele gevallen geeft enkel moleculaire typering de noodzakelijke informatie om epidemiologische verbanden te leggen. Pulsed field gel elektroforese met het gebruik van de geschikte restrictie-enzymen (*XbaI* en *NotI*) is een techniek met een voldoende resolutie voor de in braadkippen voorkomende serotypes waaronder ook het klonale serotype *S. Enteritidis*.
- **Verticale overdracht van *Salmonella* komt nog steeds voor.** Dit benadrukt het belang van de voorgeschreven *Salmonella* onderzoeken bij moederdieren en in broeierijen. Dit onderzoek toonde aan dat het nuttig zou zijn inlegvellen uit de transportboxen van ééndagskuikens naar de boerderij in het onderzoek te betrekken. **De onmiddellijke toepassing van de nodige**

maatregelen bij de detectie van een infectie met verticaal overdraagbare *Salmonella* is nog steeds essentieel in de strijd tegen dergelijke infecties.

- De bijdrage van de verschillende risicofactoren voor besmetting toont een evolutie in vergelijking met de gegevens van de literatuur. De resultaten van deze studie tonen duidelijk dat er een **vermindering is van het relatieve belang van de eerste stadia in de productie** (broeierij, transport van de kuikens van een dag oud, reiniging en ontsmetting van het gevogelte huis) en een **toename van het relatieve belang van de laatste stadia** (transport van de kuikens en slachting).
- Nog steeds worden **een groot aantal tomen tijdens de opkweek** (horizontale transmissie) besmet zowel met *Salmonella* als *Campylobacter*. Een besmetting vanuit de **omgeving** wordt gemakkelijk overgedragen op de dieren in de stal. Het schoeisel van de boer speelt hierbij een belangrijke rol. Vandaar het grote belang om elk contact tussen de omgeving en de stal te vermijden. Hierbij speelt het correct gebruik van de **hygiënepoort een essentiële rol**. Hierdoor wordt niet alleen de **insleep van een contaminatie** vermeden, maar wordt ook de **verspreiding van een contaminatie bij de dieren naar de omgeving** voorkomen.
- Bovendien werd aangetoond dat ook de stalhygiëne kan bijdragen tot de besmetting van dieren met *Salmonella*. Vandaar de aanbeveling om meer aandacht te besteden aan de **reiniging en ontsmetting van de stallen**. Voor *Campylobacter* werd **geen effect** van de stalhygiëne vastgesteld.
- **Mest uit transportcontainers** kan niet gebruikt worden voor het opsporen van een *Salmonella* en *Campylobacter* contaminatie bij de aangevoerde braadkuikens in het slachthuis. Immers deze monsters kunnen **besmet worden door onvoldoende gereinigde en ontsmette transportcontainers**.
- **De *Salmonella* besmetting gedurende de opkweek is niet nauw verbonden met de besmetting van het eindproduct. De identiteit van het slachthuis is belangrijk voor de uiteindelijke karkasbesmetting met *Salmonella*.** De evisceratietechniek en het tijdstip van de slachting (eerste geslacht of niet) hebben geen belangrijke invloed op de besmetting van het eindproduct. Onderzoek in de slachtlijn toonde aan, dat de **contaminatie van de karkassen optreedt tijdens de eerste fase van het slachtproces** (tot en met het plukken). Tijdens het uitslachten en uitkoelen van de karkassen wordt een reductie van de contaminatiegraad bekomen. Een **betere beheersing van de hygiëne in sommige slachthuizen** kan een grote bijdrage leveren tot een **significante reductie van het aantal *Salmonella* besmette karkassen**. Verder onderzoek in deze slachthuizen is echter aangewezen om de juiste oorzaken van de *Salmonella* contaminatie tijdens het slachten van braadkuikens in kaart te brengen ten einde de gepaste maatregelen te kunnen nemen.
- **De *Campylobacter* besmetting gedurende de kweek is vrij nauw verbonden met de besmetting van het eindproduct.** Dit is in tegenstelling tot de bevindingen voor *Salmonella*. Er blijkt een significante correlatie te bestaan tussen de *Campylobacter* status van de dieren en de aanwezigheid van *Campylobacter* in de feces van de transportcontainers, de ceca na het slachten en de besmetting van de karkassen. **De identiteit van het slachthuis is geen significante factor voor de uiteindelijke karkasbesmetting met *Campylobacter*.** De evisceratietechniek en het tijdstip van de slachting (eerste geslacht of niet) hebben geen belangrijke invloed op de besmetting van het eindproduct.
- Slachting van *Campylobacter* positieve tomen resulteert in een hoge contaminatie van de geslachte karkassen.

- Zowel bij de *Salmonella* als bij de *Campylobacter* isolaten werd een aanzienlijke antibiotica resistentie vastgesteld. Van de *Salmonella* stammen waren 42% resistent voor ten minste 1 antibioticum, 11% van de stammen was resistent voor 5 antibiotica. Opvallend was de zeer hoge resistentie bij *S. Hadar*. Van de *Campylobacter* stammen waren 94% resistent voor ten minste 1 antibioticum, 2 stammen waren resistent voor 4 en 1 stam voor 5 antibiotica.

6. Valorisatie van het onderzoek

6.1. Verspreiding van de resultaten aan de betrokken sector

Van bij de opstart van het project werd een adviescomité opgericht. Volgende verenigingen, die bij de productie en commercialisatie van braadkuikens betrokken zijn, werden uitgenodigd op de vergaderingen van dit adviescomité:

- Ministerie van Middenstand en Landbouw, Bestuur voor de diergezondheid en de kwaliteit van de dierlijke producten (DG 5), Inspectie-generaal kwaliteit van de dierlijke producten
- Ministerie van Middenstand en Landbouw, Bestuur voor de diergezondheid en de kwaliteit van de dierlijke producten (DG 5), Inspectie-generaal Veterinaire diensten
- Ministerie van Middenstand en Landbouw, Bestuur voor onderzoek en ontwikkeling (DG6), Centrum voor Onderzoek in Diergeneeskunde en Agrochemie (CODA)
- Ministerie van Volksgezondheid, Instituut voor Veterinaire Keuring (IVK)
- Ministerie van Middenstand en Landbouw, Bestuur voor onderzoek en ontwikkeling (DG6), Centrum voor Landbouwkundig Onderzoek, Departement voor Dierlijke Voeding en Huisvesting (CLO-DVV)
- Ministerie van Volksgezondheid, Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid (WIV)
- Provinciale Laboratoria voor Dierziektenbestrijding van Torhout, Lier en Drongen
- Nationaal Verbond van Vermeerderaars en Broeierijen (NBFB)
- Beroepsorganisatie van Mengvoederfabrikanten (BEMEFA)
- Nationaal Verbond van Pluimveeslachthuizen (NVP)
- Vereniging van Industriële Pluimveeslachthuizen (VIP)
- Vereniging voor Pluimvee, Eieren en Konijnen (VEPEK)
- Federatie van Distributiebedrijven (FEDIS)
- Diensten van de eerste minister voor wetenschappelijke, technische en culturele aangelegenheden (DWTC)
- Universiteit Gent, Faculteit Diergeneeskunde, Departement voor Pathologie, Bacteriologie en Pluimveeziekten

Drie vergaderingen (op 19-06-1998, 26-03-1999 en 28-4-2000) werden georganiseerd met het adviescomité. Tijdens de vergaderingen werden de beschikbare resultaten bekend gemaakt en besproken. Na iedere vergadering werd aan alle leden van het comité een verslag van de vergadering (inclusief vermelding van de belangrijkste bevindingen) toegestuurd.

Voor het onderzoek werd beroep gedaan op de medewerking van zowel broeierijen, boerderijen als slachthuizen. Aan ieder bedrijf werden de resultaten van het onderzoek uitgevoerd op het betrokken bedrijf toegestuurd.

In de nabije toekomst is een studienamiddag gepland waarbij alle bedrijven die meewerkten aan het onderzoek, alsook de verenigingen vertegenwoordigd in het adviescomité en hun leden zullen uitgenodigd worden. Tijdens deze bijeenkomst zullen de resultaten besproken worden en zal tijd gegeven worden voor een open discussie.

6.2. Verspreiding van resultaten via symposia en tijdschriften

Resultaten van het onderzoek werden reeds verspreid op volgende symposia:

Lezingen

- Meeting of the COST ACTION 97 Pathogenic Microorganisms in Poultry and Eggs “Field experience on *Salmonella* control in Poultry: Pre- and Post harvest approaches in meat and egg production”, Berlin (Duitsland) 28 en 29 mei 1999. Titel van de lezing ‘Prevalence of *Salmonella* in Belgian broiler flocks and on poultry’.
Samenvatting lezing in proceedings, 13. Auteurs: I. ROLLIER, L. DE ZUTTER, L. HERMAN, M. HEYNDRICKX and J. VAN HOOF
- Meeting of the COST ACTION 97 Pathogenic Microorganisms in Poultry and Eggs “Safe Poultry Meat: Control of *Salmonella* and *Campylobacter* in Poultry Production and the Use of Population Genetics”, Lelystad (Nederland) 2 tot 4 december 1999. Titel van de lezing ‘Contaminated crates: a source of *Salmonella* and *Campylobacter* in broilers’.
Samenvatting lezing in proceeding. Auteurs: DE ZUTTER, L., L. HERMAN, M. HEYNDRICKX and I. ROLLIER
- BAMST studiedag ‘Pathogene kiemen in vlees en vleesproducten’, Brussel 22 november 2000. Titel van de lezing ‘Study of salmonella and *Campylobacter* cycles by the production of broilers’.
Tekst lezing in proceedings studiedag, 8-18. Auteurs: L.HERMAN, M. HEYNDRICKX, D. VANDEKERCKHOVE, K. GRIJSPEERDT and L. DE ZUTTER

Posters

- 17th International Conference of the International Committee on Food Microbiology and Hygiene ‘Food Micro’99’, Veldhoven (Nederland) 13 tot 17 september 1999. Titel van de poster ‘Effect of the incubation conditions and the presence of food in the enrichment broth on the detection limit of *Campylobacter jejuni* in food’.
Tekst poster in: Food Microbiology and Food Safety into the Next millennium. Eds.: A.C.J. Tuijtelaars, R.A. Samson, F.M. Rombouts and S. Notermans, Foundation Food Micro’99, Zeist (Nederland), 610-612. Auteurs: I. ARNAUT-ROLLIER, L. DE ZUTTER and J. VAN HOOF
- Studiedag VEE ‘Preventie van besmetting in de voedselketen’ Brussel 26 oktober 2000. Titel poster ‘Evolution of *Salmonella* and *Campylobacter* contamination in broiler flocks’. Tekst poster in proceedings van de studiedag. Auteurs: L. DE ZUTTER, L. HERMAN and M. HEYNDRICKX
- Studiedag BSM, Louvain-La-Neuve, 8 december 2000. Titel poster ‘Evolution of *Salmonella* and *Campylobacter* contamination in broiler flocks’. Tekst poster in proceedings van de studiedag. Auteurs: L. DE ZUTTER, L. HERMAN and M. HEYNDRICKX

Publicatie in vaktijdschrift

- DE ZUTTER, L. (2000): Crates inoculate broilers with *Salmonella* and *Campylobacter*. *World Poultry*, 16, No 4, 19.
- Op het ogenblik zijn verschillende wetenschappelijke manuscripten in voorbereiding. Deze zullen ter publicatie aangeboden worden in internationale tijdschriften.

6. Referenties

- Anon., 1994. Report on a WHO consultation on epidemiologie and control of campylobacteriosis. Bilthoven, The Netherlands, 25-27 April.
- Anon., 2000. Annual Report on Zoonoses in Denmark 1999, Ministry of Food, Agriculture and Fisheries, Denmark.
- Atanassova, V. and Ring, C., 1999. Prevalence of *Campylobacter* spp. in poultry and poultry meat in Germany. Int. J. Food Microbiol. 51: 187-190.
- Baggesen, D.L., Olsen, J.E. and Bisgaard, M., 1992. Plasmid profiles and phage types of *Salmonella* Typhimurium isolated from successive flocks of chickens on three parent stock farms. Avian Pathology, 21: 569-579.
- Brown, D.J., Olsen, J.E. and Bisgaard, M., 1992. *Salmonella* Enterica : infection, cross infection and persistence within the environment of a broiler parent stock unit in Denmark. Zeitblatt für Bakteriologie, 277: 129-138.
- Craven, S.E., Stern, N.J., Line, E., Bailey, J.S., Cox, N.A. and Fedorka-Cray, P., 2000. Determination of the incidence of *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni* and *Clostridium perfringens* in wild birds near broiler chicken houses by sampling intestinal droppings. Avian Dis. 44: 715-720.
- Daube and De Zutter, 2000. Surveillance de la contamination des denrées alimentaires d'origine animale par *Salmonella* spp. *Campylobacter* thermophiles et *Escherichia coli* O157 entérohémorragiques en Belgique. Rapport final 1999.
- De Zutter, L., De Smedt, J.M., Abrams, R., Beckers, H., Catteau, M., De Borchgrave, J., Debevere, J., Hoekstra, J., Jonkers, F., Lenges, J., Notermans, S., Van Damme, L., Vandermeersch, R., Verbraeken, R. and Waes, G., 1991. Collaborative study on the use of motility enrichment on modified semisolid Rappaport-Vassiliadis medium for the detection of *Salmonella* from foods. Int. J. Food Microbiol., 13: 11-20.
- Ducoffre, 2000. Surveillance van infectieuze aandoeningen door een netwerk van laboratoria voor microbiologie 1999 + epidemiologische trends 1983-1998. IPH/EPI Report.
- Evans, S.J. and Sayers, A.R., 2000. A longitudinal study of *Campylobacter* infection of broiler flocks in Great Britain. Prev. Vet. Med., 46: 209-223.
- Gregory, E., Barnhart, H., Dreesen, D.W., Stern, N.J. and Corn, J.L., 1997. Epidemiological study of *Campylobacter* spp. in broilers : source, time of colonization and prevalence. Avian Dis. 41: 890-898.
- Hanninen, M.L., Perko-Makela, P., Pitkala, A. and Rautelin, H., 2000. A three-year study of *Campylobacter jejuni* genotypes in humans with domestically acquired infections and in chicken samples from the Helsinki area. J. Clin. Microbiol., 38: 1998-2000.
- Hatha, A.A. and Lakshmanaperumalsamy, P., 1995. Antibiotic resistance of *Salmonella* strains isolated from fish and crustaceans. Letters in Applied Microbiology, 21(1): 47-49.
- Herman, L., Heyndrickx, M. and Waes, G., 1998. Typing of *Bacillus sporothermodurans* and other *Bacillus* species isolated from milk by repetitive element sequence based PCR. Lett. Appl. Microbiol., 26: 183-188.
- Holbrook, R., Anderson, J.M., Baird-Parker, A.C., Dodds, L.M., Sawhney, D., Stuchbury, S.H. and Swaine, D., 1989. Rapid detection of *Salmonella* in foods – a convenient two-day procedure. Lett. Appl. Microbiol., 8: 139-142.
- Humphrey, T., PHLS Exeter, personal communication.
- Humphrey, T.J., Henley, A. and Lanning, D.G., 1993. The colonization of broiler chickens with *Campylobacter jejuni* : some epidemiological investigations. Epidemiology and Infection 110(3): 601-607.
- Jacobs-Reitsma, W.F., Van De Giessen, A.W., Bolder, N.M. and Mulder, R.W., 1995. Epidemiology of *Campylobacter* spp. at two Dutch broiler farms. Epidemiology and Infection, 114(3): 413-421.
- Koenraad, P.M.F.J., Jacobs-Reitsma, W.F., Van Der Laan, T., Beumer, R.R. and Rombouts, F.M., 1995. Antibiotic susceptibility of *Campylobacter* isolates from sewage and poultry

- abattoir drain water. *Epidemiology and Infection*, 11(3): 475-483.
- Lin, A.W, Usera M.A., Barrett, T.J. and Goldsby, R.A., 1996. Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella* Enteritidis. *J. Clin. Microbiol.*, 34(4): 870-876.
 - Linton, D., Owen, R.J. and Stanley, J., 1996. Rapid identification by PCR of the genus *Campylobacter* and of five *Campylobacter* species enteropathogenic for man and animals. *Res. Microbiol.*, 147, 707-718.
 - Linton, D., Lawson, A.J., Owen, R.J. and Stanley, J., 1997. PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. *J. Clin. Microbiol.*, 35(10): 2568-2572.
 - Martel, J.L. and Coudert, M., 1993. Bacterial resistance monitoring in animals : the French national experiences of surveillance schemes. *Veterinary Microbiology*, 35(3-4): 321-338.
 - Nachamkin, I., Bohachick, K. and Patton, C.M., 1993. Flagellin gene typing of *Campylobacter jejuni* by restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.*, 31(6): 1531-1536.
 - Novick, R.P., 1981. The development and spread of antibiotic-resistant bacteria as a consequence of feeding antibiotics to livestock. *Annals New York Academy of Sciences*. ISBN : 0077-8923/81/0368-0023.
 - Pearson, A.D., Greenwood, M.H., Donaldson, J., Healing, T.D., Jones, D.M., Shahamat, M., Feltham, R.K. and Colwell, R.R., 2000. Continuous source outbreak of campylobacteriosis traced to chicken. *J. Food Prot.*, 63: 309-314.
 - Pitcher, D.G., Saunders, N.A. and Owen, R.J., 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidinium thiocyanate. *Lett. Appl. Microbiol.*, 8: 151-156.
 - Platt, D.J., Chesham, J.S., Brown, D.J., Kraft, C.A. and Taggart, J., 1986. Restriction enzyme fingerprinting of enterobacterial plasmids: a simple strategy with wide application. *J. Hygiene*, 97: 205-210.
 - Reitsma, W., 1994. *Epidemiology of Campylobacter in poultry*. Proefschrift – Universiteit Wageningen.
 - Schmieger, H., Schickmaier, P. and Zimmer, A., 1997. *Salmonella* phages : frequency, transduction, and use of their genome restriction patterns as markers for host typing. In : *Proc. Salmonella and Salmonellosis (1997)*. Ploufragan, Fr., pp. 23-27.
 - Shane, S.M., 2000. *Campylobacter* infection of commercial poultry. *Rev. Sci. Tech.*, 19: 376-395.
 - Van De Giessen, A.W., Frankena, K., Van Leeuwen, W.H. and Notermans, S.H.W., 1992. An approach for monitoring *Salmonella* and Salmonellosis. *Ploufragan, Fr.*, Sept., 15-17, pp. 375-385.
 - Westendorp, R., 1997. *Plan van Aanpak Salmonella en Campylobacter*. In : “*Studienamiddagen Pluimveehouderij: Salmonella problematiek bij vleeskuikens en moederdieren.*” Proefbedrijf voor de Veehouderij, Geel, België.
 - WHO verslag. 1994. Report on a WHO consultation on epidemiology and control of campylobacteriosis. Bilthoven, The Netherlands, 25-27
 - Wiberg, C. and Norberg, P., 1996. Comparison between a cultural procedure using Rappaport-Vassiliadis broth and motility enrichments on modified semisolid Rappaport-Vassiliadis medium for *Salmonella* detection in food and feed. *Int. J. Food Microbiol.*, 29: 353-360.