

‘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

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 afslachting 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 *fla*A-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.