

# Rapport

## Forekomst av *Clostridium botulinum* type C i norske slaktekyllingbesetninger

Resultater fra 111 slaktekyllingflokker høsten  
2007

Veterinærinstituttet  
Margareth Opheim



**Veterinærinstituttet**  
National Veterinary Institute

# Innledning og bakgrunn

I løpet av det siste året har det vært registrert flere tilfeller av botulisme i norske fjørfebesetninger. Det har vært utbrudd både på kylling og eldre dyr. Botulisme kan medføre store lidelser for dyrene og betydelige tap for produsenten. Man vet i dag lite om utbredelsen av *Clostridium botulinum* i norske fjørfebesetninger og det er av stor interesse å kartlegge risikofaktorer og patogenese for denne sykdommen.

Metodene for påvisning av *Clostridium botulinum* og disse bakterienes toksiner er per i dag tidkrevende, kostbare og krever ofte bruk av forsøksdyr. Dyrking av *Clostridium botulinum* og håndtering av dennes sporer og toksiner stiller strenge krav til lokaler og spesielle forhåndsregler. Selv om *Clostridium botulinum* type C ikke er beskrevet med sikkerhet hos menneske, er denne gruppen bakterier underlagt restriksjoner med tanke på blant annet kjøp og dyrking.

Ved utbrudd er det i dag musetoxisitetest som brukes for å stille sikker diagnose og for å typebestemme bakterien. Det er *Clostridium botulinum* type C som er hyppigst sett ved utbrudd i fjørfebesetninger. *Clostridium botulinum* type D er også beskrevet, blant annet fra Sverige. I Sverige har man også registrert at en mosaikk av type C og D er mer toksisk enn type C alene, hos slaktekylling.

*Clostridium botulinum* har evne til å vokse og produsere toxin i dødt vev (døde fugler.), fluelarver, strø, fôr og i fuglers blindtarm. På grunn av evnen til bakterieoppformering i blindtarmene kan klinisk friske fugler bidra til en betydelig oppformering, toxinproduksjon og spredning av bakterien i en utbruddssituasjon. Kliniske symptomer på fugler er avhengig både av inntatt toxinmengde og toxinaktivering.

Ved sykdomsutbrudd er det sjelden man klarer å påvise smitekilden og det er av interesse å forsøke å finne ut i hvor stor grad disse bakteriene er vanlige i norske fjørfepopulasjoner. Utviklingen av PCR gjør det mulig å teste mange prøver på en rask og rasjonell måte uten bruk av forsøksdyr.

## Mål

Enheten med denne studien har vært todelt. Det ene var å utvikle og etablere en PCR-metode for påvisning av *Clostridium botulinum* type C basert på prøvemateriale fra campylobacterovervåkingen. Det andre var å bruke metoden for å kartlegge forekomsten av *Clostridium botulinum* type C i 100 norske slaktekyllingbesetninger.

## Materiale og metode

I flere år har det pågått en overvåking av *Campylobacter* spp. i norske slaktekyllingbesetninger. Alle produsentene tar ut prøver tidligst fire dager før slakt og kyllingene er på det tidspunkt i underkant av en måned gamle. Prøvene består av ti svaberprøver av ferske blindtarmstømminger som ligger på golvet og blir sendt pr post til Veterinærinstituttet Trondheim for analyse. Analysen som blir benyttet i campylobacterovervåkingen er en real-time PCR metode.

Det finnes stoffer i feces som inhiberer selve PCR reaksjonen. I campylobacterovervåkingen blir det alltid benyttet internkontroll for å kunne avdekke disse inhibitorene. Alle prøvene i dette prosjektet har godkjente internkontroller fra campylobacterovervåkingen og det er samme opprensede DNA materiale som er benyttet under analysene for *Clostridium botulinum* type C.

Metoden brukt i denne studien var en modifisert utgave av en metode publisert i *Journal of Clinical Microbiology* (1). Primerne ble sjekket opp mot BLAST og funnet spesifikke for *Clostridium botulinum* type C toxingen, samt vurdert i Primer3 og Netprimer for egenskaper som blant annet smeltepunkt, primer-dimer dannelser etc.

Ekstrahert DNA fra en stamme sekvensert og identifisert som *Clostridium botulinum* type C ble brukt som positiv kontroll. Som negativ kontroll ble det benyttet DNA-fritt vann. Alle prøver ble kjørt i parallell.

Etter optimalisering ble metoden brukt til å analysere 111 prøver fra campylobacterovervåkingen.

Det ble også analysert blindtarmsprøver fra to besetninger med botulismeutbrudd.

## Resultater

Det ble undersøkt i alt 111 prøver, fra campylobacterovervåkingen, uten at *Clostridium botulinum* type C toxingen ble påvist. Fire av disse prøvene ble analysert på nytt på grunn av en positiv parallell. Ved ny analyse ble begge parallellene negative.

Under optimaliseringen fikk vi tilgang til prøver fra to botulismeutbrudd i Norge. Det ble fra disse to besetningene påvist *Clostridium botulinum* type C fra blindtarmsinnhold. Fra en av disse prøvene ble PCR-produktet sekvensert slik at man kunne sammenligne DNA sekvensen mellom resultat-DNA og mål-DNA. Sekvensene var svært like.

Besetningene med botulismeutbrudd leverte ikke prøver til campylobacterovervåkingen i prøveperioden og prøver fra etterfølgende innsett er derfor ikke analysert med tanke på *Clostridium botulinum* type C.

## Konklusjon og diskusjon

Metoden som er benyttet i analysene er basert på en metode som er validert av andre(1). På grunn av rask utvikling i PCR-metoder, er den brukte metoden i disse forsøkene en del avvikende fra den opprinnelige. For en grundig validering av metoder er man helt avhengig av å kunne styre konsentrasjonen av det agens man leter etter i forsøk. På grunn av restriksjonene som gjelder for *Clostridium botulinum* har det ikke vært mulig å gjøre slike forsøk i denne omgang. I en vurdering av resultatene må man derfor ta høyde for denne usikkerheten. Usikkerheten er i første rekke knyttet til metodens sensitivitet, d.v.s. hvor god metoden er for å påvise sanne positive prøver.

Våre undersøkelser har ikke påvist forekomst av *Clostridium botulinum* type C i 111 prøver fra campylobacterovervåkingen. Dette kan indikere at *Clostridium botulinum* type C ikke er veldig utbredt i norsk slaktekyllingproduksjon. Lignende studier fra Sverige, som ble utført på slakteriprøver, d.v.s. blindtarmsprøver, avdekket 6 positive funn fra 43 besetninger. Kun to av disse var "nye" besetninger uten forutgående utbrudd av botulisme. Analysemetoden som ble brukt i Sverige involverer et oppfomeringsstrinn og er avvikende i forhold til den som er benyttet i denne studien. Likevel illustrerer dette at forekomsten av *Clostridium botulinum* type C trolig er lav i kyllinghus og at det er svært viktig å eliminere denne smitten fra husdyrrom hvor smitte har vært påvist. Da bakterien er i stand til å danne sporer vil dette føre til store utfordringer med tanke på renhold i slaktekyllinghus etter innsett og ikke minst etter innsett hvor botulisme har vært påvist. Avfall-, gjødselhåndtering og grundig rengjøring/desinfeksjon av husdyrrom etter utbrudd vil være avgjørende for å hindre spredning av denne typen bakterier til andre rom eller senere innsett av kylling.

Det ble også analysert prøver fra to besetninger med botulismeutbrudd. Det ble fra disse besetningene påvist *Clostridium botulinum* type C. Dette støtter opp under patogenesen om at det kan skje en oppfomerings av *Clostridium botulinum* i blindtarmene under en utbruddssituasjon og underbygger nødvendigheten av å redusere/eliminere smitte under/etter utbrudd.

I denne studien ble det benyttet ekstrahert DNA fra campylobacterovervåkingen som utgangspunkt for å lete etter toxingenet til *Clostridium botulinum* type C. Prøvematerialet er eieruttatte prøver fra feceskladder på golv og selv om man forsøker å oppnå standardiserte uttak vil det være variasjoner både når det gjelder prøve kvalitet og mengde. Et optimalisert prøveuttak vil kunne bedre sensitiviteten og reproduserbarheten på metoden og blindtarmsprøver uttatt på slakteri kan være et eksempel på bedre prøveuttak. Blindtarmsprøver er mer ensartet og man kunne benytte en fast prøvemengde i analysene.

En annen mulighet for å bedre sensitiviteten på metoden er å benytte seg av forbehandling av prøvemateriale slik at *Clostridium botulinum* favoriseres. *Clostridium botulinum* kan danne sporer og man kunne tenke seg et oppvarmingstrinn for å redusere co-flora og ett oppformeringstrinn for å germinere sporene og øke konsentrasjonen av bakterien.

På generelt grunnlag er PCR metoder svært følsomme metoder og resultatene fra denne studien tyder på at forekomsten av *Clostridium botulinum* i norske slaktekyllingbesetninger er lav. Hadde bakterien vært utbredt og rikelig tilstede, som for eksempel ved utbrudd av botulisme, er det sannsynlig at dette ville blitt avdekket. Den etablerte PCR-metoden utgjør således et godt alternativ til tradisjonelle metoder for diagnostikk ved sjukdomsutbrudd.

## Referanse

1 Franciosa G, Fenicia L, Cالدiani C, Aureli P. PCR for detection of *Clostridium botulinum* Type C in avian and environmental samples. J Clin Microbiol 1996; 34(4) 882-885.