

Campylobacter från butik och klinik

– jämförelser under och efter utbrottet 2016–2017

av Rikard Dryselius och Cecilia Jernberg



Denna titel kan laddas ner från: www.livsmedelsverket.se/publicerat-material/.

Citera gärna Livsmedelsverkets texter, men glöm inte att uppge källan. Bilder, fotografier och illustrationer är skyddade av upphovsrätten. Det innebär att du måste ha upphovsmannens tillstånd att använda dem.

© Livsmedelsverket, 2018

ISSN 1104-7089

Foto/Illustration omslag: Johnér

Grafisk produktion: Livsmedelsverket

Förord

Under 2016-2017 erfor Sverige det enligt vår kännedom hittills största utbrottet av campylobacterinfektion hos människa. Utbrottet orsakades av färsk svensk kyckling. Denna rapport redovisar och avgränsar sig till resultaten från analyser av campylobacter i färskt kycklingkött från butik och från patientprover som Livsmedelsverket och Folkhälsomyndigheten genomförde under 2017. En utvärdering av hela utbrottet och inblandade organisationers insatser för att bryta utbrottet pågår och kommer att publiceras senare under 2018.

Rapporten baseras på detaljerade mikrobiologiska analyser med hjälp av helgenomsekvensering av prover tagna på kyckling från butik och prover från patienter. Via analyserna har vi kunnat identifiera en i tid och rum utbredd förekomst av en och samma campylobacterstam bland båda provtyper. Sammantaget tydliggör resultaten vilket kraftfullt verktyg helgenomsekvensering är för att förstå den mikrobiella epidemiologin och hur det i sin tur utgör en värdefull och avgörande pusselbit i förståelsen av spridningsvägarna. Rapporten kan utgöra underlag i kunskaps- och beslutsfattande situationer för myndigheter, livsmedelsindustrin, för arbetet inom smittskydd samt för en intresserad allmänhet.

Rapporten är sammanställd av Rikard Dryselius, Team Mikrobiologi, Biologiavdelningen, Livsmedelsverket och Cecilia Jernberg, Enheten för laborativ bakterieövervakning, Avdelningen för Mikrobiologi, Folkhälsomyndigheten. Vi vill rikta ett stort tack till de kliniska mikrobiologiska laboratorierna för att inom ramarna för det mikrobiella övervakningsprogrammet ha bistått med humanisolaten som ingått i rapporten.

Livsmedelsverket

Annika Rimland

Områdeschef, Område undersökning och vetenskapligt stöd

Folkhälsomyndigheten

Karin Tegmark-Wisell

Avdelningschef, Avdelningen för mikrobiologi

Innehåll

Förord	3
Ordlista och förkortningar	7
Sammanfattning	8
Summary	10
Campylobacter from retail and clinics – comparisons during and after the outbreak 2016-2017	10
Bakgrund	12
Metod	14
Resultat.....	15
Fynd av campylobacter i färskt kycklingkött	15
Klassificering utifrån sekvenstyp	19
Klusteranalyser	21
Diskussion.....	23

Ordlista och förkortningar

Campylobacterios	Infektion med campylobacter.
Campylobacterprogrammet	Övervakningsprogram för campylobacter i kyckling som organiseras av branschorganisationen Svensk Fågel och baseras på provtagning av kycklingflockar i samband med slakt
CFU	Kolonibildande enhet (colony forming unit), ett mått på antalet levande bakterier i ett prov.
F##	Enligt EUs regelverk godkända svenska anläggningar som slaktar och/eller styckar fjäderfän.
Helgenomsekvensering	Metod för att identifiera sekvensen för all arvsmassa hos en organism.
Isolat	Koloni härrörande från en enskild mikroorganism som isolerats ur en blandad population.
Klusteranalys	Metod för att dela in isolat i grupper med avseende på likheter i arvsmassan.
ST	Sekvenstyp, klassning utifrån DNA-sekvens hos ett begränsat antal gener med basala funktioner i cellen. Bestämning av sekvenstyp hos campylobacter baseras på DNA-sekvensen hos sju gener.
Sekvensering	Bestämning av ordningsföljden hos byggstenarna i arvsmassan.
SNP-analys	Analys av enbaspolymorfi (Single Nucleotide Polymorphism) där man utifrån jämförelser av arvsmassa identifierar skillnader i enskilda byggstenar mellan bakterieisolat.
Stam	Subtyp av en mikroorganism som är genetiskt uniform.
Typning	Identifiering av stam/subtyp.
WGS	Helgenomsekvensering (whole genome sequencing).

Sammanfattning

Det regelbundna säsongsmönstret för campylobacterinfektion, med högre nivåer under sensommar och lägre nivåer under vinter och vårmånader, bröts under vinterhalvåret 2014/15 och 2015/16 då två större utbrott med koppling till kyckling inträffade. Från sommaren 2016 rapporterades återigen ovanligt många fall av campylobacterinfektion och under hösten sjönk inte heller antalet fall till för årstiden normala nivåer utan fortsatte ligga högt ända till och med juni 2017. En samvariation mellan förekomst av campylobacter hos kycklingflockar provtagna inom ramen för branschens Campylobacterprogram och antalet sjukdomsfall syntes. Mot bakgrund av detta genomförde Folkhälsomyndigheten och Livsmedelsverket under 2017 jämförande analyser mellan campylobacterisolat i färskt kycklingkött från butik och från patienter. Syftet var att tydliggöra orsaken till utbrottet samt att påvisa en koppling mellan campylobacter i kycklingkött och humanfall av campylobacterios. Denna rapport redogör för resultaten från dessa analyser.

Sammanlagt analyserades 300 prover av färskt kycklingkött från butik som införskaffats under tre perioder, både medan utbrottet pågick (mars och maj) och efter det att utbrottet bedömts vara över (augusti). Även campylobacterisolat från patienter samlades in under (mars) och efter utbrottet (augusti). Isolat av campylobacter från kycklingkött och människa undersöktes genetiskt med sekvensering av arvsmassan och jämfördes sedan med varandra för att identifiera om samma stammar av campylobacter återfanns bland båda provtyper.

Analyserna av färskt kycklingkött från butik visade att förekomsten av campylobacter var hög både under våren och i augusti med 43 % respektive 50 % positiva prover. Den höga andelen campylobacterpositiva prover under våren var till stor del förknippad med produkter från Sveriges största slakteri (69 % positiva prover) som i februari aviserade problem med tvätten av sina transportburar. Den höga andelen campylobacterpositiva prover av kycklingkött vid provtagningen i augusti kan förklaras av naturliga säsongsvariationer och var främst förknippad med en hög förekomst bland ekologiskt uppfödd kyckling (88 % positiva prover). Detta var väntat eftersom dessa kycklingar vistas utomhus och lätt koloniserar av campylobacter från miljön.

Jämförelser av arvsmassan hos isolat från människa visade att en och samma stam av campylobacter stod för över 80 % av de 83 patientprover som analyserades i mars 2017. Eftersom patientproverna härrörde från ett stort antal landsting hade smittkällan stor spridning. Samma stam påträffades även bland produkter från ett stort antal geografiskt spridda gårdar, både i mars och i maj 2017. Gemensamt för dessa gårdar var dock att de levererade kyckling till det slakteri som tidigare aviserat problem med sin burtvätt. Sammantaget visar detta att färsk kyckling från ett enda slakteri var sammankopplad med de höga sjuktalen under våren. Att stammen hade fått fäste hos så många gårdar som levererar till slakteriet bekräftar dessutom misstanken om förorenade transportburar som den bakomliggande orsaken till de höga sjuktalen både under hösten 2016 och våren 2017.

Analyserna av isolaten från provinsamlingen i augusti visade att diversiteten av campylobacter från både patienter och kycklingkött då var betydligt större än under våren. Utbrottsstammen var alltså den stam som påträffades oftast och representerade 22 (24 %) av totalt 92 patientisolat insamlade från olika delar av landet. Därtill återfanns stammen i kycklingkött från minst sex gårdar kopplade till det ovan nämnda slakteriet varav två även hade haft den i mars. Stammen påträffades dessutom i ett prov från ett annat stort slakteri med produktion i nära anslutning till en av gårdarna kopplade till slakteriet med burtvättproblem. Detta visar att utbrottsstammen fortfarande fanns kvar ett halvår efter det att problemen med förorenade transportburar identifierats, att den var spridd bland ett flertal gårdar samt

att den alltså orsakade betydande sjuklighet i befolkningen. Resultaten antyder därför fortsatta brister avseende sanering och hygienbarriärer fram till augusti.

Utöver utbrottsstammen var det ytterligare tre stammar av campylobacter som påträffades både bland patientisolat och i kycklingkött. Två av dessa återfanns i produkter från slakteriet med burtvättproblem och kunde kopplas till sammanlagt sex patientisolat. Den tredje stammen återfanns i en produkt från ett annat stort slakteri och representerades av två patientisolat. Med utbrottsstammen inräknad hade därför nästan en tredjedel (30/92) av patientisolaten från augusti koppling till kyckling. Noterbart är att inget av de många isolaten från ekologisk uppfödd kyckling visade överlapp mot patientisolat och inte heller något isolat från utländsk kyckling, troligtvis på grund av relativt små marknadsandelar för dessa kategorier kyckling. Istället var det campylobacter från konventionellt uppfödd kyckling producerad vid Sveriges största slakterier som kunde kopplas till sjukdomsfall. Detta tydliggör hur betydelsefullt det är att i första hand minska förekomsten av campylobacter i kyckling från storproducenter för att nå en positiv inverkan på antalet insjuknade i campylobacterinfektion i Sverige. Sedan hösten 2017 då utbrottet officiellt deklarerades vara över har både andelen positiva kycklingflockar som undersöks inom ramen för Campylobacterprogrammet och antalet inhemskt smittade av campylobacter varit nära tidigare års nivåer.

Summary

Campylobacter from retail and clinics – comparisons during and after the outbreak 2016-2017

The regular seasonal pattern of campylobacter infection was disrupted during the winters of 2014/15 and 2015/16 when two major outbreaks related to chicken occurred. Over the course of summer 2016, unusually high numbers of campylobacter infection were reported again, and during the fall the number of cases did not return to normal levels. A clear link between the occurrence of campylobacter in poultry and the number of illnesses was observed. In early February, Sweden's largest chicken producer disclosed that they had identified problems with the cleaning of their transport cages. However, the situation with unusually high disease rates continued throughout the spring and only by July 2017 had it returned to normal levels for the season.

This report presents results from the analyses of campylobacter in chicken meat from retail and clinical samples performed by the Swedish National Food and Public Health Agencies during 2017. A total of 300 samples of fresh chicken meat purchased during three time periods were analysed, both during the outbreak (March and May) and after the outbreak was considered to be over (August). Campylobacter isolates from patients were collected during (March) and after the outbreak (August). Chicken and human campylobacter isolates were characterised by whole genome sequencing and sequences were compared to identify if the same strains of campylobacter were found among both types of samples.

Analysis of fresh meat from retail showed that the presence of campylobacter was high both during spring and in August with 43% and 50% positive samples, respectively. The high proportion of campylobacter positive samples in the spring was largely associated with products from slaughterhouse F38 (69% positive samples), which is the producer that had previously reported problems cleaning their transport cages. The high proportion of campylobacter positive chicken samples during the sampling in August was primarily associated with a high occurrence among organic chicken (88% positive samples). This was expected as these chickens are kept outdoors where they are easily colonized by campylobacter from the environment.

Genome comparisons of isolates from humans showed that one single strain of campylobacter accounted for over 80% of patient samples collected in March. As the patient samples were derived from a large number of different counties, the source of infection had a wide geographical spread. The same strain was also found among products from a large number of geographically dispersed farms linked to slaughterhouse F38, both in March and May 2017. This confirms that products from slaughterhouse F38 were associated with the high disease rate in the spring. The fact that the strain was linked to a multitude of farms delivering to the producer strengthens the case that contaminated transport cages was the underlying cause of the high morbidity both in autumn 2016 and spring 2017.

In August, the diversity of campylobacter strains from both patients and chicken meat was considerably larger than in spring. The outbreak strain was still most commonly found and represented 22 out of 92 patient isolates collected from different parts of the country. In addition, the strain was found in chicken meat from at least six farms connected to slaughterhouse F38, two of which also had it in March. The strain was also found in a sample from another slaughterhouse, F29, with production in close proximity to one of the farms connected to the F38. This demonstrates that the outbreak strain was widely dispersed half a year after the problems with polluted transport cages were identified, and

that it still caused significant morbidity in the population. The results indicate that both poor sanitation and inadequate hygiene barriers contributed to this increased morbidity.

In addition to the outbreak strain, there were three more campylobacter strains found both in patient isolate and in chicken meat. Two of these were found in products from slaughterhouse F38 and could be linked to a total of six patient isolates. The third strain was found in a product from another large slaughterhouse, F35, and was represented by two patient isolates. With the outbreak strain included, almost one third (30/92) of the patient isolate from August had a link to chicken. Notably, none of the many isolates from organic chicken showed any overlap with patient isolates, nor did isolates from imported chicken, probably due to relatively small market shares for these categories of chicken. Instead, it was campylobacter from conventionally bred chicken produced at Sweden's largest slaughterhouses (mainly F38 but also F35 and F29) that could be linked to disease cases. This emphasises how important it is to reduce the prevalence of campylobacter in chicken from large producers to achieve a positive impact on the number of cases of campylobacter infection in Sweden. Since autumn 2017 when the outbreak was officially declared to be over, both the number of campylobacter positive farms and the number of domestic infections with campylobacter have been close to levels of previous years without outbreaks.

N.B. The title of the publication is translated from Swedish, however no full version of the publication has been produced in English.

Bakgrund

Campylobacter är den vanligast inrapporterade bakteriella orsaken till magsjuka i Sverige¹ och kyckling, i synnerhet färskt kycklingkött, är en viktig smittkälla². Campylobactersmitta hos människa och andelen campylobacterpositiva kycklingflockar visar en tydlig samvariation med en ökning under sensommar och en minskning under vinter och vårmånader^{3,4}. Under vintersäsongerna 2014/15 och 2015/16 skedde dock tydliga trendbrott med kraftiga uppgångar i antalet sjukdomsfall även under vinterhalvåret. Genetiska jämförelser mellan campylobacter från patienter och kyckling indikerade att dessa båda vintertoppar hade koppling till svensk konventionellt uppfödd kyckling⁵.

I oktober 2016 gick Folkhälsomyndigheten ut med ett pressmeddelande om att antalet personer smittade med campylobacter i Sverige varit rekordhøgt under augusti och september⁶. Sjukdomstalen fortsatte vara mycket höga under hela hösten och totalt inrapporterades 6 900 inhemska fall, vilket är den högsta årsnotering som gjorts sedan campylobacterinfektion blev anmälningspliktig⁷. I en summering från de europeiska livsmedels- och smittskyddsmyndigheterna kom detta att rapporteras som det största livsmedelsburna sjukdomsutbrottet inom EU under 2016 med över 3000 sjukdomsfall⁸.

Även 2017 inleddes med mycket höga sjukdomstal av inhemsk campylobacterios. I februari aviserade Sveriges största kycklingslakteri (F38) att de i slutet av januari identifierat ett installationsfel som inneburit att deras transportburar tvättats med förorenat vatten⁹. Trots att problemet med tvättningen av transportburarna uppgavs vara åtgärdade kvarstod problemet med kraftigt förhöjda sjukdomstal och det började uttryckas tvivel från branschen om att detta verkligen varit orsaken till de höga sjuktalen^{10,11,12}. I mars (vecka 11) påbörjade Folkhälsomyndigheten insamling, typning och jämförelser av campylobacterisolat från landets kliniska mikrobiologiska laboratorier inom ramen för det mikrobiella övervakningsprogrammet. Parallellt utförde Livsmedelsverket en kartläggningsstudie av förekomst och halter av campylobacter i färskt kycklingkött från butik i mars och maj. Efterföljande genetiska jämförelser av campylobacter från patienter respektive kycklingkött gav tydliga indikationer på källan till de höga sjuktalen och Livsmedelsverkets och Folkhälsomyndighetens undersökningar finns sammanfattade i varsin rapport^{13,14}. Sjukdomstalen var fortsatt förhöjda under hela våren men hade sedan en tid återgått till för årstiden normala nivåer när samordnad insamling och typning av isolat upprepades i augusti (Figur 1).

¹ Sundström, K. 2007. Campylobacterios och salmonellos i Sverige – en beräkning av direkta och indirekta kostnader. Rapport 2007:1 Livsmedelsekonomiska institutet.

² EFSA. 2011. Scientific opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain. EFSA Journal 9(4):2105.

³ <https://www.folkhalsomyndigheten.se>, se statistik om Campylobacter.

⁴ <http://www.sva.se>, se information om Campylobacterprogrammet.

⁵ Skarin et al. 2017. Swedish winter peaks of *Campylobacter* in humans and chicken are connected. The 19th International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* and Related Organisms, Abstract book s 120.

⁶ <https://www.folkhalsomyndigheten.se/nyheter-och-press/nyhetsarkiv/2016/oktober/kraftig-okning-av-infektion-med-campylobacter/>

⁷ <https://www.folkhalsomyndigheten.se>, se statistik om Campylobacter.

⁸ Anonym. 2017. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. EFSA Journal 2017;15(12):5077. s 197.

⁹ <https://www.kronfagel.se/aktuellt/kronfagel-har-funnit-huvudorsaken-till-okningen-av-campylobacter>

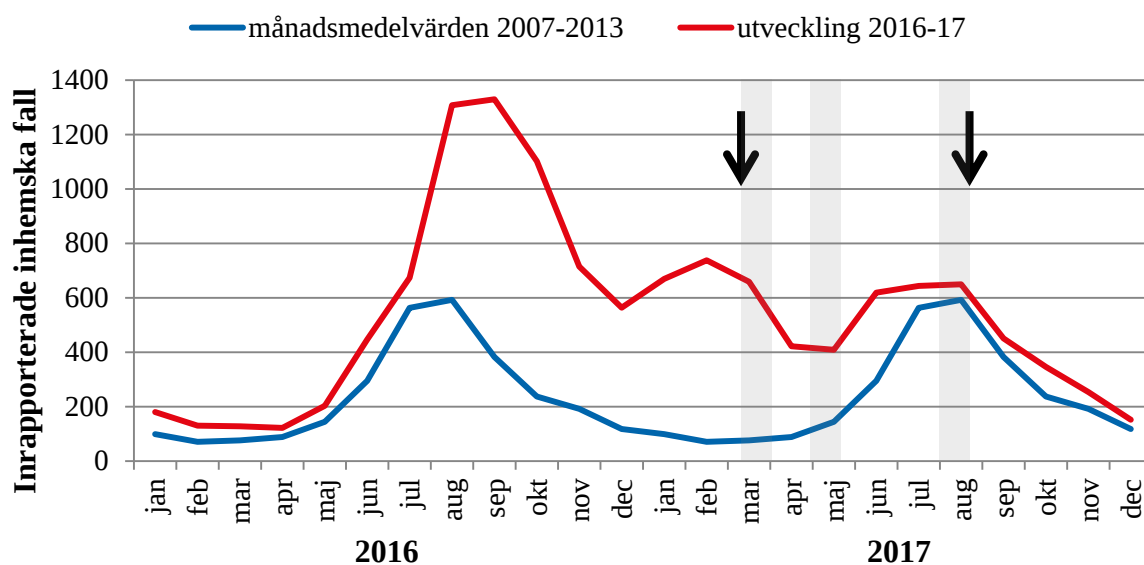
¹⁰ <http://sverigesradio.se/sida/artikel.aspx?programid=128&artikel=6641745>

¹¹ <https://www.svt.se/nyheter/lokalt/jonkoping/inte-sakert-att-svensk-kyckling-ligger-bakom>

¹² <https://www.svt.se/nyheter/lokalt/varmland/branschen-man-kan-ata-farsk-kyckling>

¹³ Livsmedelsverket. 2017. Förekomst och halter av *Campylobacter* i färsk kyckling från butik mars-maj 2017.

¹⁴ Folkhälsomyndigheten. 2017. Epidemiologisk typning av campylobacterisolat insamlade vecka 11 2017.



Figur 1. Månadsvis uppdelning av antalet inrapporterade inhemska sjukdomsfall januari 2016 till december 2017 (i rött) jämfört med månadsmedelvärden för perioden 2007-2013 (i blått). Pilarna anger tidpunkter för Folkhälsomyndighetens insamling av campylobacterisolat från landets kliniska mikrobiologiska laboratorier och skuggade partier visar tidsperioder för Livsmedelsverkets kartläggningar av campylobacter i färskt kycklingkött från butik.

Rapporten sammanfattar resultaten från Livsmedelsverkets och Folkhälsomyndighetens insamlingar under och efter utbrottet. Syftet är att tydliggöra orsaken till utbrottet samt att visa kopplingen mellan förekomst av campylobacter i färskt kycklingkött från butik och humanfall av campylobacterios. Ett tredje syfte är att bidra med insikt om möjliga spridningsvägar för campylobacter vid produktion av kyckling.

Metod

Under tre perioder, två medan utbrottet pågick (i mars och maj) och en när sjukdomstalen återgått till för årstiden normala nivåer (augusti), införskaffades vardera 100 prover av färskt kycklingkött från 40 olika butiker i Stockholm och Uppsala för analys av *Campylobacter*. Vid inköp eftersträvades en jämn fördelning av (i) kyckling från slakteri F38 som haft problem med rengöring av sina transportburar, (ii) övrig svensk konventionellt uppfödd kyckling, (iii) ekologiskt uppfödd svensk kyckling samt (iv) utländsk kyckling. I möjligaste mån undveks dubblettprover avseende uppfödare och produktionsdatum. Kvalitativa och kvantitativa analyser samt konfirmering och artbestämning av *campylobacter* gjordes som tidigare beskrivet¹⁵.

Kliniska isolat med Sverige som rapporterat smittland samlades in från en majoritet av landets landsting vid två tillfällen. Den första insamlingen genomfördes under vecka 11, medan utbrottet pågick och just som den första insamlingen av kycklingkött från butik påbörjats. Den andra insamlingen av kliniska isolat genomfördes vecka 34 vilket var i samband med att den tredje insamlingen av kycklingkött från butik avslutades och efter det att utbrottet bedömts vara över.

Campylobacter från kycklingkött respektive patienter undersöktes genetiskt med helgenomsekvensering (WGS). I ett första steg av analysen bestämdes art och därefter klassades isolaten in i så kallade sekvenstyper (ST) för att på traditionellt sätt synliggöra diversiteten bland *campylobacter* isolaten och dessutom bidra med en grov överblick avseende eventuella släktskap mellan isolat. Sekvenstypen bestäms utifrån en genetisk jämförelse av sju olika gener. För att belägga möjliga släktskap jämfördes isolat inom ST-grupper med varandra på nukleotidnivå genom analys av single nucleotide polymorphisms (SNP-analys). Distansmatriser räknades ut för att synliggöra likheter och skillnader mellan alla isolat inom de olika ST-grupperna. Resultaten illustreras som fylogenetiska träd (FigTree).

¹⁵ Livsmedelsverket. 2017. Förekomst och halter av *Campylobacter* i färsk kyckling från butik mars-maj 2017.

Resultat

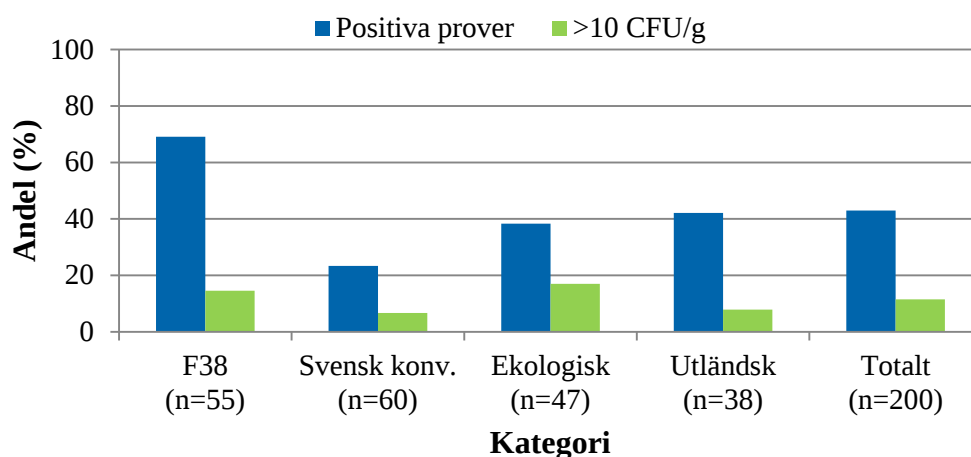
Fynd av campylobacter i färskt kycklingkött

Av de 300 kycklingköttprover som samlades in under och efter utbrottet var 136 (45 %) positiva för campylobacter (Tabell 1). Bakterien återfanns oftast hos produkter från det inhemska slakteriet med burproblem (F38) med 61 % positiva prover följt av ekologiskt uppfödd och utländsk kyckling med 56 respektive 41 % positiva prover. Lägst andel positiva prover återfanns i kategorin övrig svensk konventionellt uppfödd kyckling med 25 % positiva prover. Vid jämförelser där en specifik kategori ställdes mot övriga hade F38 och Ekologisk kyckling signifikant högre förekomst av campylobacter ($p < 0,001$ respektive $p < 0,05$, Fisher's exact test) medan den var signifikant lägre i kategorin övrig svensk konventionellt uppfödd kyckling ($p < 0,001$, Fisher's exact test).

Tabell 1. Förekomst av campylobacter i färskt kycklingkött från butik provtaget både under och efter utbrottet. I tabellen visas antalet analyserade prover, antal och andel positiva prover uppdelat efter kategori och totalt samt det 95-procentiga konfidensintervallet för respektive andel. Värdena avser fynd i motsvarande 25 g kycklingkött.

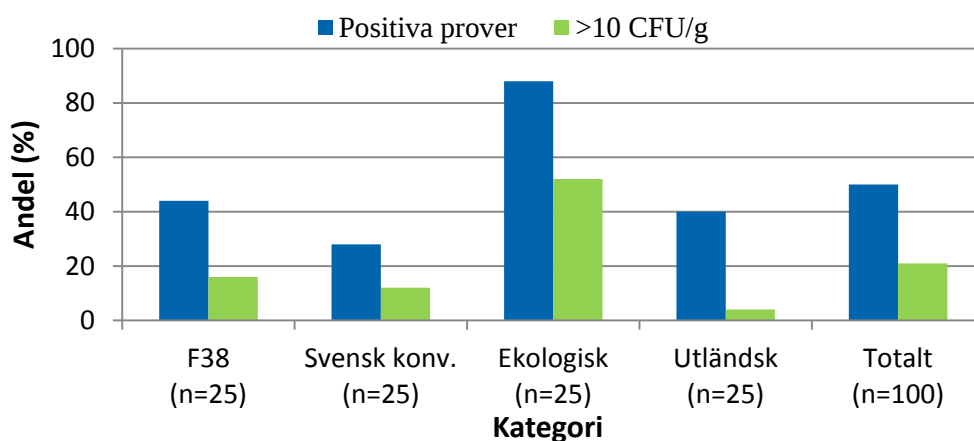
	F38	Svensk konventionell	Svensk ekologisk	Utländsk	Totalt
Antal prover	80	85	72	63	300
Antal/(%) positiva	49/(61,3)	21/(24,7)	40/(55,6)	26/(41,3)	136/(45,3)
Konfidensintervall	50,3-71,2	16,8-34,8	44,1-66,5	30,0-53,6	36,3-49,9

Vid vårens provtagningar gjordes fynd av campylobacter i totalt 43 % av kycklingköttproverna medan 12 % hade halter som överskred 10 kolonibildande enheter (CFU) per gram (Figur 2). Högst förekomst återfanns i kategorin F38 med 69 % positiva prover vilket var signifikant högre än övriga kategorier tillsammans och var för sig ($p < 0,01$, Fisher's exact test). Lägst förekomst hade kategorin övrig svensk konventionellt uppfödd kyckling med 23 % positiva prover vilket var signifikant lägre än övriga kategorier tillsammans ($p < 0,01$, Fisher's exact test). Avseende prover med halter över 10 CFU per gram återfanns störst andel i kategorin ekologisk kyckling (17 %) medan den var lägst bland övrig svensk konventionellt uppfödd kyckling (7 %). Det fanns dock inga signifikanta skillnader mellan kategorierna.



Figur 2. Andel campylobacterpositiva kycklingköttprover totalt (i blått) och med halter över 10 CFU per gram (i grönt) under våren medan utbrottet pågick. Positiva prover avser fynd i motsvarande 25 g kycklingkött.

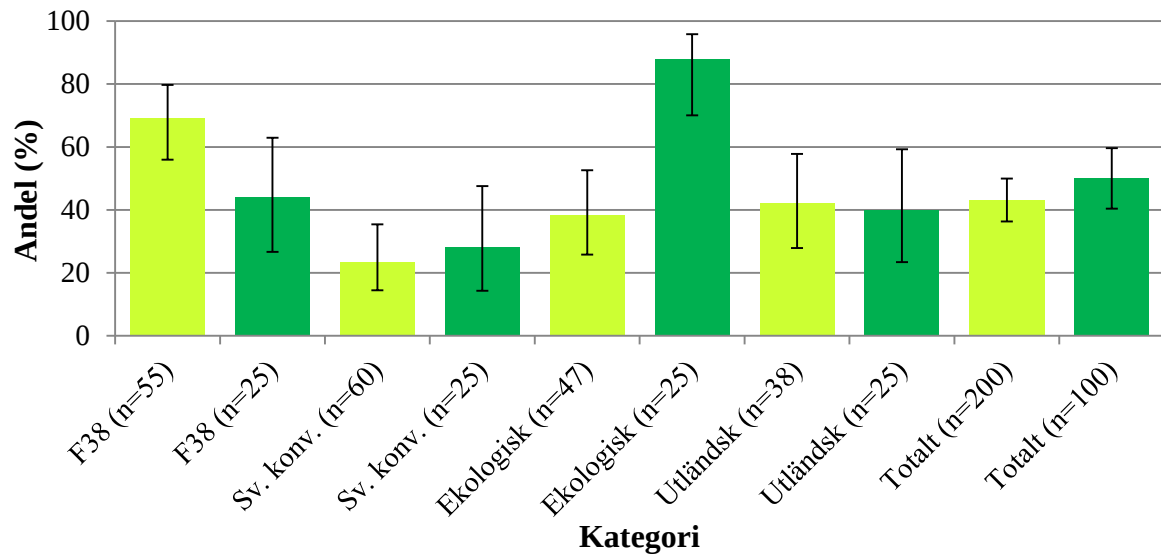
Vid provtagningen i augusti var totalt 50 % av kycklingköttproverna positiva för campylobacter och 21 % uppvisade halter som var högre än 10 CFU per gram (Figur 3). Kategorin ekologisk kyckling hade både högst förekomst (88 % positiva prover) och störst andel prover med mer än 10 CFU per gram (52 %). I båda fallen rörde det sig om signifikant högre andelar i jämförelse mot de övriga kategorierna tillsammans och var för sig ($p < 0,01$, Fisher's exact test). Lägst andel positiva prover hade kategorin övrig svensk konventionellt uppförd kyckling (28 %) medan den lägsta andelen kycklingprover med halter över 10 CFU per gram påvisades i den utländska kycklingen (4 %). Ingen av dessa två observationer stöds dock av statistisk signifikans.



Figur 3. Andel campylobacterpositiva kycklingköttprover totalt (i blått) och med halter över 10 CFU per gram (i grönt) i augusti efter det att sjukdomstalen återgått till för årstiden normala nivåer. Positiva prover avser fynd i motsvarande 25 g kycklingkött.

För att undersöka förändringar i andelen campylobacterpositiva prover över tid jämfördes proverna inköpta mars/maj medan utbrottet pågick med de som införskaffades i augusti då utbrottet bedömdes vara över (Figur 4). Som helhet var en något större andel prover positiva i augusti än under våren (50 respektive 43 %). Avseende enskilda kategorier syns en statistiskt säker minskning för F38 från 69 till 44 % positiva prover ($p < 0,05$, Fisher's exact test) medan det för kategorin ekologisk kyckling istället syns en kraftig ökning från 38 % positiva prover under våren till 88 % positiva i augusti ($p < 0,0001$,

Fisher's exact test). För de övriga kategorierna var förändringarna endast marginella med en svag ökning bland övrig svensk konventionellt uppfödd kyckling och en antydning till minskning för den utländska.



Figur 4. Andel campylobacterpositiva kycklingprover uppdelade efter inköpsperiod och kategori. Prover inköpta i mars/maj representeras i ljusgrönt och prover inköpta i augusti i mörkgrönt. Felstaplarna anger ett 95-procentigt konfidensintervall. Analyserna avser fynd i motsvarande 25 g kycklingkött.

De 300 kycklingproven härrörde från sammanlagt 13 olika slakterier/ursprungsländer (Tabell 2). Antalet prover per slakteri/land varierar stort från ett enda och upp till 80 stycken vilket förklaras dels av upplägget av undersökningen och dels av utbudet i butik. Sett till hela undersökningen var F38, F46, F21, F45 och den franska kycklingen (FRA) statistiskt överrepresenterade avseende andelen campylobacterpositiva prov. I samtliga fall observerades överrepresentationen bara vid den ena av de två undersökningsperioderna vilket i flera fall kan förklaras av ett begränsat antal prover, särskilt under augusti. På motsvarande sätt var F35 och den finska kycklingen (FI205) statistiskt underrepresenterade gällande andelen campylobacterpositiva prov och bägge slakterier var dessutom underrepresenterade vid båda provtagningsperioderna.

Tabell 2. Antal analyserade prover uppdelade per slakteri/ursprungsland samt hur många av dessa som var positiva för campylobacter. Enskilda slakteriers/ursprungsländers resultat redovisas dels för vårens provtagningar, provtagningen i augusti och sammanlagt för alla provtagningar. F## representerar svenska slakterier, DK733 är danskt och FI205 finskt. FRA är fransk kyckling utan definierat slakteri. Statistiskt signifikanta avvikelser avseende andelen positiva prov anges i fet stil vid överrepresentation och understruket vid underrepresentation ($p < 0,05$, Fisher's exact test).

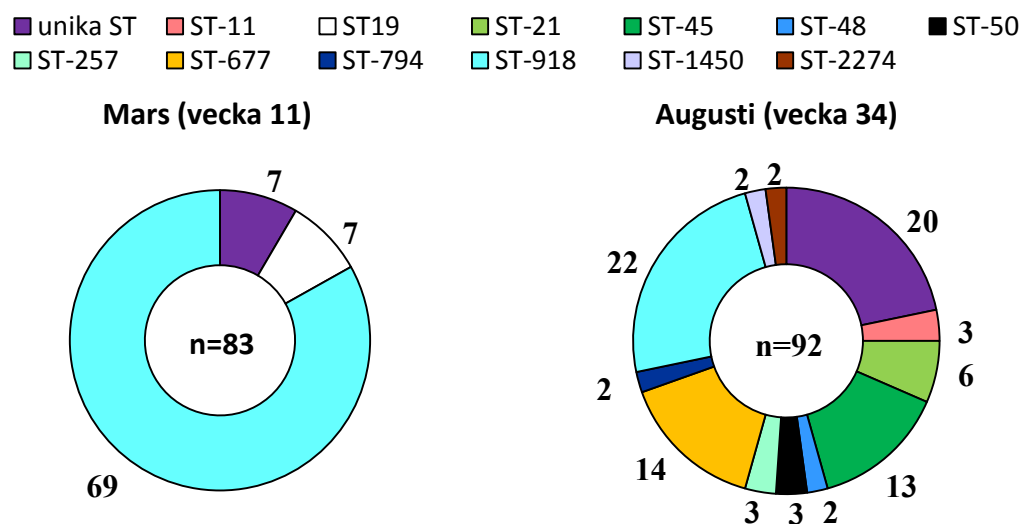
Slakteri	Kategori	Mars/Maj		Augusti		Totalt	
		Antal prover	Antal/(%) positiva	Antal prover	Antal/(%) positiva	Antal prover	Antal/(%) positiva
F38	F38	55	38/(69,1)	25	11/(44,0)	80	49/(61,3)
F22	Sv. konv.	7	<u>0/(0,0)</u>	1	1/(100,0)	8	1/(12,5)
F23	Sv. konv.	1	1/(100,0)	0	-/(-)	1	1/(100,0)
F25	Sv. konv.	8	6/(75,0)	4	1/(25,0)	12	7/(58,3)
F29	Sv. konv.	2	0/(0,0)	5	1/(20,0)	7	1/(14,3)
F35	Sv. konv.	33	<u>0/(0,0)</u>	13	<u>2/(15,4)</u>	46	<u>2/(4,3)</u>
F46	Sv. konv.	5	5/(100,0)	2	2/(100,0)	7	7/(100,0)
F21	Ekologisk	14	7/(50,0)	7	7/(100,0)	21	14/(66,7)
F33 [#]	Ekologisk [#]	32	<u>8/(25,0)</u>	17	14/(82,4)	49	22/(44,9)
F45	Ekologisk	5	5/(100,0)	1	1/(100,0)	6	6/(100,0)
DK733	Utländsk	11	3/(27,3)	12	7/(58,3)	23	10/(43,5)
FI205	Utländsk	11	<u>0/(0,0)</u>	9	<u>0/(0,0)</u>	20	<u>0/(0,0)</u>
FRA	Utländsk	16	13/(81,3)	4	3/(75,0)	20	16/(80,0)
Totalt		200	86/(43,0)	100	50/(50,0)	300	136/(45,3)

[#]Fyra av slakteriets 49 prover, varav två positiva och två negativa för campylobacter, kategoriserades som svensk konventionellt uppfödd kyckling.

Artbestämningen visade att 121 av de 136 positiva kycklingproverna innehöll *Campylobacter jejuni* medan 13 innehöll *Campylobacter coli*. I två av proverna detekterades både *C. jejuni* och *C. coli* och i tre prover återfanns två olika typer av *C. jejuni*.

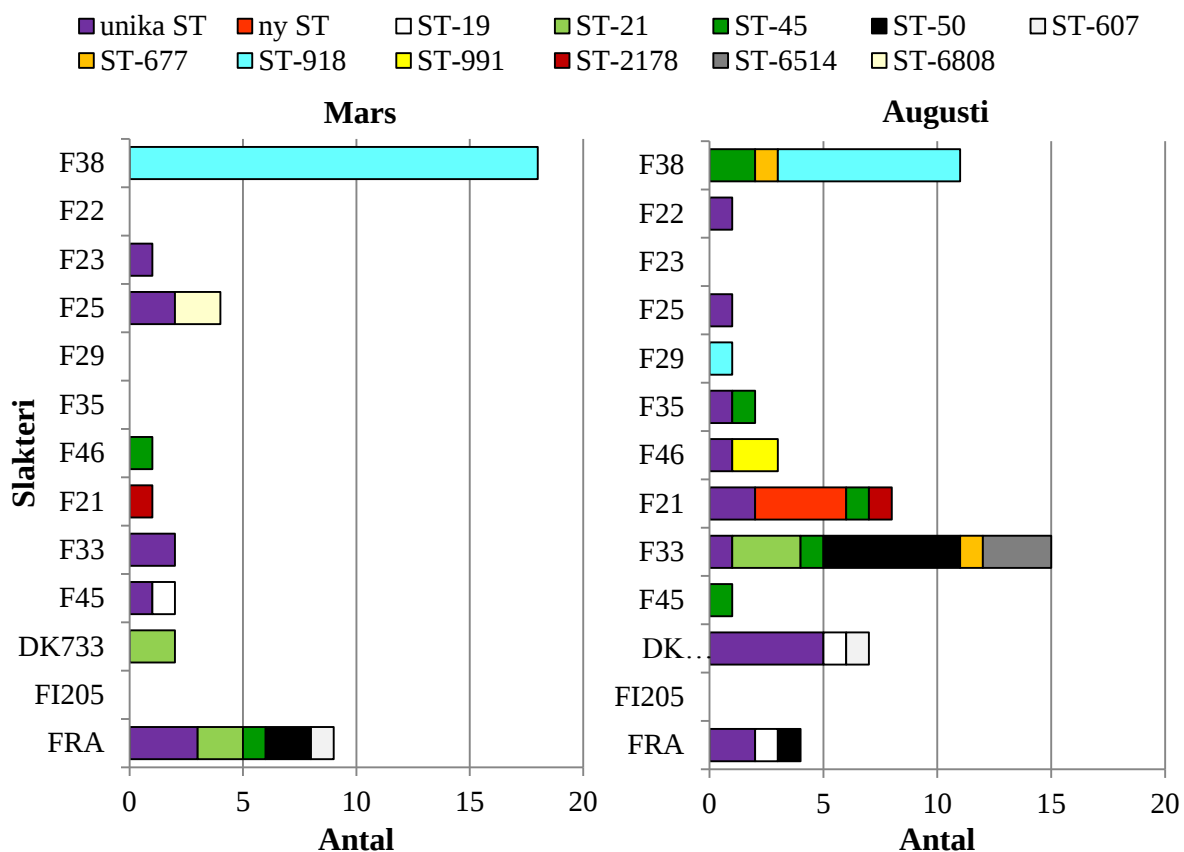
Klassificering utifrån sekvenstyp

Insamlingen av patientisolat genererade 83 prover från 15 av Sveriges 21 landsting i mars (vecka 11) och 92 prover från 15 landsting i augusti (vecka 34) som samtliga typades med helgenomsekvensering. Efter en initial artbestämning som visade att 168 isolat var *C. jejuni* och 7 isolat *C. coli* klassificerades sekvenserna utifrån sekvenstyp (ST) (Figur 5). Vid insamlingen i mars återfanns nio olika ST, varav sju var unika och representerade med varsitt isolat. Bara två sekvenstyper, ST-19 och ST-918, identifierades i fler än ett prov varav den senare var helt dominerande och stod för hela 83 % av proverna. Isolaten insamlade i augusti vittnade om en betydligt högre diversitet med sammanlagt 31 olika ST varav 20 identifierades i endast ett prov. Av de ST som återfanns i fler än ett prov var ST-918 vanligast (24 % av isolaten) följt av ST-677 (15 %) och ST-45 (14 %). Ytterligare åtta ST identifierades mer än en gång.



Figur 5. Sekvenstyper (ST) för de 175 kliniska isolat av campylobacter som samlats in från en majoritet av Sveriges landsting och helgenomsekvenserats under vecka 11 och vecka 34. Mitt i figurerna anges det totala antalet isolat som typats från respektive period och antalet identifierade isolat för enskilda ST anges vid sidan av respektive STs färgkod. Unika ST som endast representerar enskilda isolat representeras gemensamt i lila.

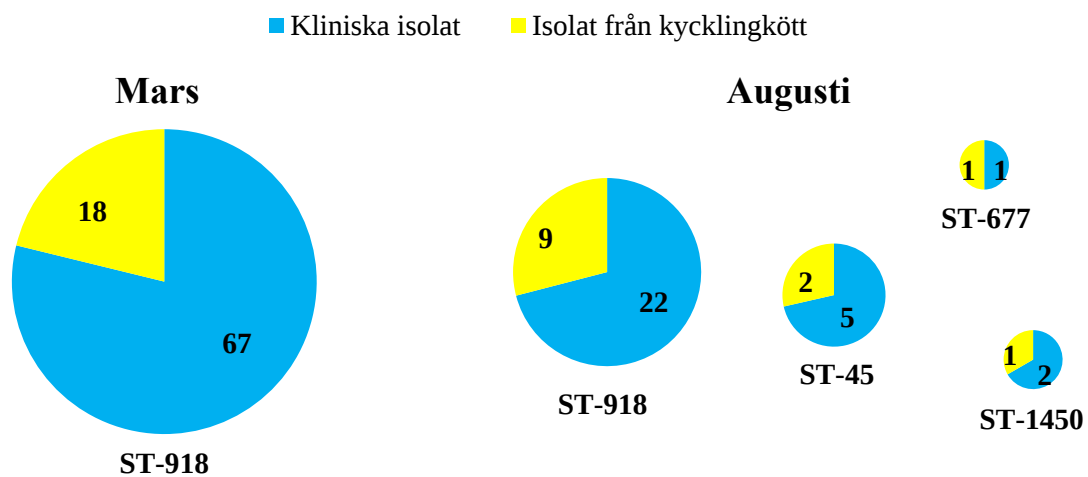
Fyrtio av sammanlagt 45 isolat från kycklingköttprover med produktionsdatum i mars och samtliga 54 isolat från augustiprovtagningen typades med helgenomsekvensering. Bland dessa identifierades 35 olika sekvenstyper (ST) varav fem tillhörde två nya ST. De flesta ST (23 st) påträffades bara vid enskilda tillfällen medan tolv återfanns i kycklingprover vid mer än ett tillfälle (Figur 6). Vanligast var ST-918 som utgjorde samtliga 18 analyserade prover från slakteri F38 under mars, och även var vanligast av detta slakteris isolat under augusti med åtta prover. Noterbart är att ST-918 också påträffades i ett prov från ett annat slakteri (F29) under augusti. Andra vanligt förekommande sekvenstyper var ST-50, ST-45 och ST-21 som samtliga påträffades hos olika slakterier både i mars och i augusti.



Figur 6. Sekvenstyper för de 94 isolat av campylobacter från kycklingkött som helgenomsekvenserats uppdelade utifrån inköpsperiod samt slakteri/ursprungsland. Beteckningen F## representerar olika svenska slakterier medan DK733 är danskt och FI205 finskt. FRA definierar inget specifikt slakteri utan innebär att kycklingen införts från Frankrike.

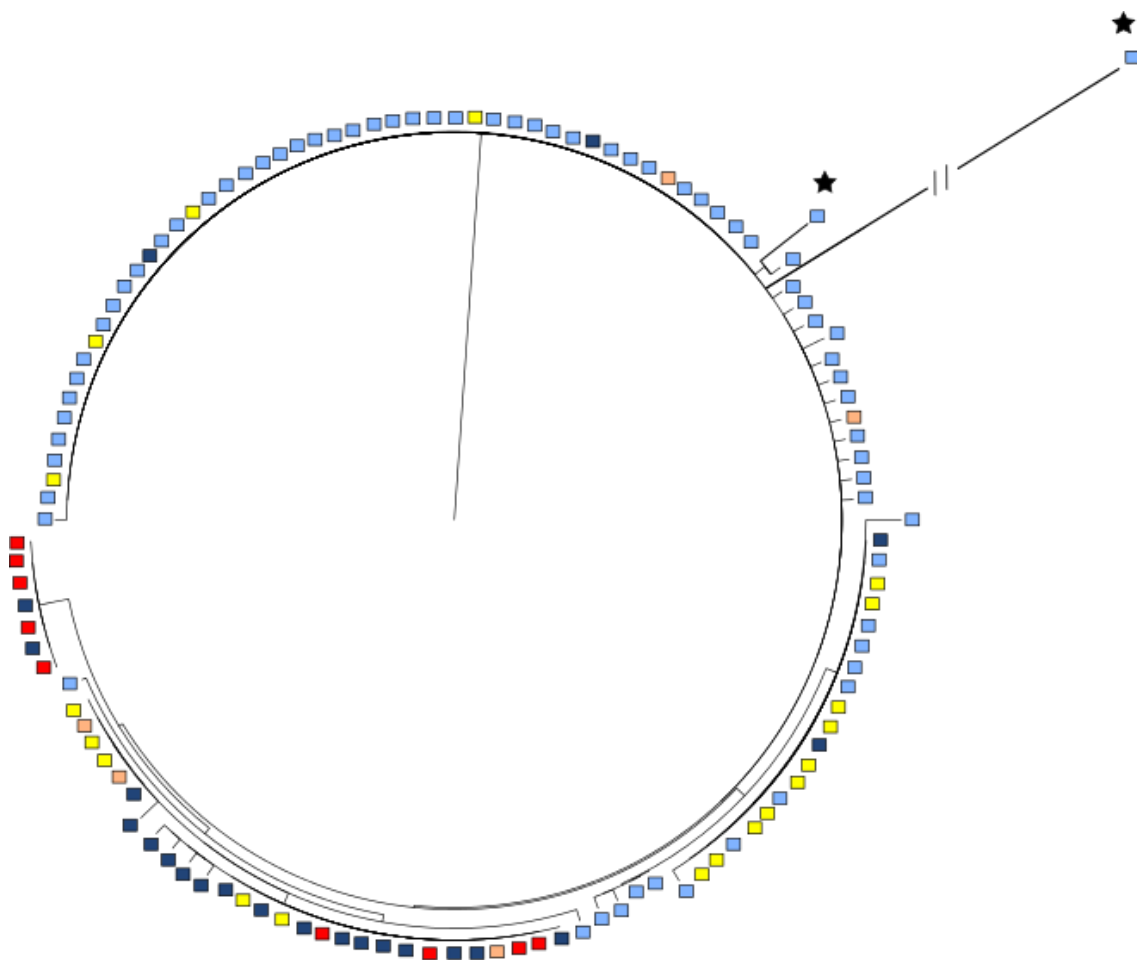
Klusteranalyser

Av de sammanlagt 35 sekvenstyper som detekterades i kycklingkött och de 34 som återfanns bland isolaten från patienter var tre gemensamma under utbrottet (mars) medan det under augusti var tio som var gemensamma. I de följande klusteranalyserna, där human- och kycklingisolat jämfördes på SNP-nivå, identifierades fem kluster där ST från båda provtyper ingick, ett från provtagningen i mars och fyra från provtagningen i augusti (Figur 7). Klustret identifierat i mars bestod av ST-918 och innefattade 67 kliniska isolat från 14 landsting samt 18 isolat från kycklingkött som alla härrörde från slakteri F38. Vid provtagningen i augusti tillhörde de flesta klustrande isolaten ST-918 med totalt 22 humanisolat och nio isolat från kycklingkött. Humanisolaten härrörde från 11 olika landsting medan kycklingisolaten återfanns hos två olika slakterier, F38 (åtta isolat) och F29 (ett isolat). Av de övriga klustren från augusti var ST-45 störst med fem human- och två kycklingisolat följt av ST-1450 med två humanisolat och ett isolat från kyckling och slutligen ST-677 som hade ett isolat av vardera sorten.



Figur 7. Sekvenstyper representerade av isolat från både människa och kycklingkött med nära identisk sekvens som samlats in i mars (vänster) och augusti (höger). Blå och gula andelar av cirkelarna representerar human- respektive kycklingköttisolat med antalet isolat angivet. Cirkelarnas storlekar är ungefärligt proportionerliga till det totala antalet isolat de representerar.

Bara ST-918 återfanns bland kliniska isolat och kycklingisolat både under mars och augusti. Därtill tillhörde samtliga fem isolat från kycklingkött som provtogs i maj denna sekvenstyp liksom även ett patient- och ett kycklingisolat från en lokal smittspårning i februari. En gemensam klusteranalys med alla dessa isolat presenteras i Figur 8 och visar en mycket liten genetisk variation där samtliga kycklingkött- och humanisolat utom två är i det närmaste identiska och detta oavsett tidpunkt för insamlingen.



Figur 8. Klusteranalys av samtliga isolat av ST-918 insamlade från kliniska laboratorier, kycklingkött i butik samt en lokal smittspårning 2017 (n=125). Ljusblått = kliniska isolat från vecka 11 samt ett patientisolat från lokal smittspårning i februari; Mörkblått = kliniska isolat från vecka 34; Gult = kycklingköttisolat från mars samt ett kycklingköttisolat från lokal smittspårning i februari; Orange = kycklingköttisolat från maj; Rött = kycklingköttisolat från augusti. Alla isolat utom två, som är markerade med en svart stjärna, har nästan identisk arvsmassa.

Diskussion

Kartläggningen av campylobacter i kycklingkött från butik uppvisade 43 % positiva prover under mars/maj medan utbrottet pågick och 50 % positiva i augusti. Detta är högt i jämförelse med en tidigare kartläggning i kött från svensk konventionellt uppfödd kyckling från 2003 där 25 % av prover tagna under förmodad högsäsong (juli-oktober) innehöll campylobacter¹⁶. Den höga andelen positiva prover under våren var starkt förknippad med slakteri F38, vars burtvätt tidigare varit felkopplad, som hade nära 70 % positiva prover (Figur 2). Under augusti var istället den ekologiska kycklingen (en kategori som inte ingick i undersökningen från 2003) starkast bidragande till den höga förekomsten eftersom hela 88 % av proverna i denna kategori innehöll campylobacter. En hög förekomst av campylobacter i ekologisk kyckling under sommaren är dock förväntad eftersom djuren rör sig ute och därför lätt koloniserar av bakterier från miljön¹⁷.

Den närmare analysen av förekomst på slakteri- och ursprungslandsnivå visade stora variationer (Tabell 2). Exempelvis påvisades campylobacter i samtliga prover från ett par mindre slakterier (F45 och F46) medan det i den finska kycklingen (FI205) inte detekterades några campylobacter alls. Bland landets allra största kycklingslakterier var F38, som står för ungefär hälften av den inhemska produktionen, tydligt överrepresenterad med 61 % positiva prover. Samtidigt var endast 4 % av proverna från slakteri F35, som står för runt en fjärdedel av den inhemska produktionen, positiva. Den låga andelen positiva prover hos F35 belyser att det går att kombinera stora produktionsvolymmer med en begränsad förekomst av campylobacter.

Som förväntat visade artbestämningen en tydlig dominans av *C. jejuni* samt en mer begränsad förekomst av *C. coli*, både bland kliniska isolat och bland isolat från kycklingkött. Detta stämmer väl överens med tidigare kartläggningar^{18,19} samt att *C. jejuni* anses ligga bakom drygt 90 % av fallen av campylobacterinfektion medan *C. coli* beräknas stå för merparten av de resterande fallen²⁰. Också förväntat var att den följande indelningen utifrån sekvenstyp visade en betydligt högre diversitet bland isolat från sommaren än isolat från våren för bägge provtyper (Figur 5 och 6). Detta förklaras av en generellt högre förekomst av campylobacter i miljön under sommarsäsong vilket i sin tur ökar risken för att bakterier når såväl konventionellt som ekologiskt uppfödda kycklingflockar och smittar människor.

Mindre väntat var istället att en relativt ovanlig sekvenstyp, ST-918, var spridd över hela landet och stod för hela 83 % av de kliniska isolaten insamlade under vecka 11 (Figur 5). Antalet inrapporterade inhemska sjukdomsfall var i mars fem-tio gånger högre än normalt (Figur 1) och resultatet från typningen pekar på att det var denna enda ST som låg bakom hela förhöjningen. Analysen av isolat från kycklingköttet provtaget i mars visade att ST-918 även återfanns i prover från slakteri F38 som tidigare rapporterat problem med tvätten av sina burar (Figur 6). Det var dessutom den enda sekvenstyp som identifierades bland slakteriets 18 sekvenserade isolat som i sin tur härrörde från minst tolv geografiskt spridda gårdar. Klusteranalyserna visade att nästan samtliga (67 av 69) kliniska isolat av ST-918 insamlade under mars var genetiskt mycket lika eller identiska med varandra vilket

¹⁶ Lindblad, M et al. 2006. Microbiological baseline study of broiler chickens at Swedish slaughterhouses. J. Food Prot. 69(12); 2875-2882.

¹⁷ Rosenquist, H et al. 2013. Campylobacter contamination and the relative risk of illness from organic broiler meat in comparison with conventional broiler meat. Int. J. Food Microbiol. 162(3):226-230.

¹⁸ Lindblad, M et al. 2006. Microbiological baseline study of broiler chickens at Swedish slaughterhouses. J. Food Prot. 69(12); 2875-2882.

¹⁹ Livsmedelsverket. 2005. Campy-SET Campylobacter: Smittspårning, epidemiologi och typning. Rapport 15-2005.

²⁰ Anonym. 2013. Campylobacterinfektion – ett nationellt strategidokument. ISBN 978-91-7555-019-0.

fastställer ett gemensamt ursprung för dessa sjukdomsfall (Figur 7 och 8). Analyserna visade även att samtliga ST-918 isolerade från kycklingkött under mars var genetiskt mycket lika eller identiska, även i jämförelse med de kliniska isolaten (Figur 7 och 8). Detta bekräftar en koppling mellan produkterna från slakteri F38 och de kraftigt förhöjda sjuktalen under mars. Att klonen dessutom återfanns i kycklingkött härrörande från ett stort antal olika gårdar styrker misstankarna att den dåligt fungerande burtvätten var grundorsak till den omfattande smittspridningen.

Vid provtagningstillfället av kycklingkött från butik i maj var sjuktalen hos människa fortfarande tydligt förhöjda (Figur 1). Eftersom andelen campylobacterpositiva prover från F38 fortsatt var mycket hög (62,5%) valdes isolat från fem prover ut för typning med helgenomsekvensering och jämförelse mot övriga sekvenserade isolat. Isolaten, som härstammade från kycklingkött med produktionsdatum mellan 30 april och 16 maj och med ursprung från minst fyra olika gårdar, var samtliga av typen ST-918 och hade sekvenser som var i det närmaste identiska med kycklingköttisolat och kliniska isolat från provtagningen i mars (data ej visad). Detta visar att klonen även var vida spridd under maj, att saneringen fortsatt varit bristfällig samt att de förhöjda sjuktalen i maj sannolikt hängde samman med detta. Som belägg för detta kan nämnas att tre av de sekvenserade isolaten från maj härrörde från gårdar vars kycklingkött också provtogs i mars och att köttet även då innehöll ST-918.

I augusti var ST-918 fortfarande den sekvenstyp som påträffades oftast, både bland isolat från kycklingkött och från människa (Figur 5 och 6). Bland de kliniska isolaten var dock ST-918 betydligt mindre dominant än tidigare och stod för en knapp fjärdedel av sjukdomsfallen. Det fanns nu även andra sekvenstyper, exempelvis ST-677 och ST-45, som utgjorde relativt stora andelar av humanisolaten vilket antydde att det under augusti fanns flera stammar med spridning i befolkningen. Bland isolaten från kycklingkött påträffades ST-918 i åtta av elva prover från slakteri F38 och dessa prover härrörde från minst sex olika gårdar varav två även hade ST-918 i mars. Därtill återfanns ST-918 nu även i ett prov från ett annat slakteri, F29, vilket skulle kunna innebära att det skett en direkt spridning mellan gårdar.

De följande klusteranalyserna bekräftade kopplingen mellan samtliga kycklingkött- och humanisolat av ST-918 i augusti (Figur 7) och synliggjorde även ett otvetydigt samband med isolaten från mars och maj (Figur 8). Detta visar att det även i augusti förekom en fortsatt stor spridning av utbrotsstammen ST-918 bland kycklingkött, att stammen fortsatt hade en betydande inverkan på sjuktalen samt att omfattande saneringsbehov kvarstod för att bli av med utbrotsstammen. Eftersom även isolatet från slakteri F29 ingick i klustret med ST-918 från F38 stärktes misstankarna om direkt spridning mellan gårdar. Efter närmare efterforskning visade det sig att två närliggande gårdar, båda positiva med ST-918, föder upp kyckling åt varsitt av slakterierna F38 och F29.

SNP- och klusteranalyserna för augusti visade att även andra kloner än ST-918 påträffades vid upprepade tillfällen på slakterier. Nära identiska isolat av ST-21, ST-45, ST50, ST-991 och ST-6514 återfanns bland kycklingkött från samma slakteri fast med olika i tiden närliggande produktionsdatum. Utöver möjligheten att det rör sig om spridning mellan olika gårdar skulle det exempelvis också kunna förklaras av (i) att en flock slaktats under flera efterföljande dagar, (ii) att det förekommit delad slakt eller (iii) att kycklingköttet korskontaminerats på slakteriet. I ett fall identifierades nära identiska isolat av ST-2178 hos ett slakteri både vid provtagningen i mars och i augusti. I likhet med flera exempel för ST-918 kan detta istället betyda att isolatet fått fäste hos uppfödaren.

Förutom ST-918 klustrade campylobacterisolat från kycklingkött med kliniska isolat för ytterligare tre sekvenstyper. Två av dessa, ST-45 och ST-677, återfanns hos slakteri F38 och nära identiska sekvenser identifierades bland fem respektive ett humanisolat. Den tredje sekvenstypen, ST-1450, återfanns hos slakteri F35 och klustrade med två av de kliniska isolaten. Med ST-918 inräknad var det

därför 33 % av humanfallen (30 av 92 isolat) som i augusti kunde kopplas till kycklingkött. Samtliga dessa sjukdomsfall var dessutom förknippade med svensk konventionellt uppfödd kyckling. Detta kan tyckas överraskande med tanke på fördelningen av de campylobacterpositiva proverna mellan de olika provtagna kategorierna kycklingkött under augusti och särskilt den tydliga överrepresentationen av positiva prover bland ekologisk kyckling (Figur 3). Provurvalet med en jämn uppdelning mellan fyra kategorier motsvarar dock inte alls de verkliga försäljningsvolymerna av färskt kycklingkött där ekologisk kyckling (och delvis även utländsk kyckling) står för en mycket begränsad del av marknaden för färskt kycklingkött i butik²¹. Istället är det svensk konventionell kyckling från ett fåtal slakterier som dominerar utbudet i butik vilket också framgick av jämförelsen med de kliniska isolaten. Om provtagningen av kycklingkött i butik vore anpassad efter vad som konsumeras skulle kategorierna med svensk konventionellt uppfödd kyckling vara betydligt större än kategorierna med ekologisk och utländsk kyckling. En sannolik följd hade då varit att fler än en tredjedel av de kliniska isolaten matchat med isolat från kycklingkött.

Sammanfattningsvis ger resultaten av kartläggningen och typning av campylobacterisolat från kliniska laboratorier och kycklingkött otvetydiga belegg för att en och samma stam (ST-918) legat bakom de kraftigt förhöjda sjuktalen under första halvåret 2017 och att denna stam härrör från Sveriges största kycklingslakteri (F38). Spridningen av stammen bland produkter från ett stort antal olika gårdar (minst 17 stycken) kopplade till detta slakteri styrker dessutom teorin att en dåligt fungerande tvättanläggning varit grundorsak till problemen. Det innebär dessutom att det sannolikt har varit samma stam som cirkulerat och orsakat de kraftigt förhöjda sjuktalen under hösten 2016.

Utöver tydliggörandet av orsaken till utbrottet bidrog typningen och jämförelser av isolat även till mer generella insikter om möjliga orsaker till förekomst och spridning av campylobacter. Bland annat gav analyserna indikationer om:

- Andra stammar som återfunnits i kycklingkött och som även orsakat sjukdomsfall
- Stammar som bitit sig fast på specifika gårdar över tid och därmed eventuella brister i rengöringen mellan flockar
- Korskontaminering på slakteri och därmed möjliga brister i slakterihygien
- Förekomst av olika stammar i kycklingkött från samma gård och därmed eventuella brister i hygienbarriärerna
- Korskontaminering mellan gårdar via gemensamt slakteri och därmed en antydning om förorenad transportutrustning
- Direkt korskontaminering mellan gårdar och därmed möjliga brister i hygienbarriärerna

Sammantaget visar detta att kartläggning och typning av campylobacterisolat från patienter och kycklingkött i butik ger utförlig information om förekomst, spridningsvägar samt kopplingar till sjukdomsfall och utbrott. Denna typ av kunskap kan användas för riktade åtgärder som gör kyckling till ett säkrare livsmedel och därmed minskar antalet campylobacterinfektioner i befolkningen.

Både antalet campylobacterpositiva gårdar²² och antalet inhemska fall av campylobacterinfection²³ har varit nära tidigare års nivåer sedan utbrottet officiellt deklarerades vara över²⁴. Folkhälsomyndigheten

²¹ Andersson, M. et al. 2015. Fungerar konkurrensen på marknaden för slaktdjur? Rapport 2015:08. Jordbruksverket.

²² <http://www.sva.se>, se information om Campylobacterprogrammet.

²³ <https://www.folkhalsomyndigheten.se>, se statistik om Campylobacter

kommer dock även fortsättningsvis genomföra regelbunden insamling av kliniska campylobacterisolat för typning och jämförelser inom ramen för sitt mikrobiella övervakningsprogram. Även Livsmedelsverket kommer att genomföra nya kartläggningar av förekomst av campylobacter i färskt kycklingkött från butik.

²⁴ Gemensamt pressmeddelande från Folkhälsomyndigheten, Livsmedelsverket, SVA och Jordbruksverket 2017-09-21.

Under andra halvåret 2016 och fram till sommaren 2017 pågick ett mycket stort utbrott av campylobacter med koppling till kyckling i Sverige. Denna rapport beskriver resultaten från de mikrobiologiska analyser av campylobacter i färskt kycklingkött från butik samt kliniska patientprover som genomfördes av Livsmedelsverket och Folkhälsomyndigheten under och efter utbrottet. Syftet med analyserna var att förtydliga orsakerna till utbrottet och även den starka koppling som finns mellan förekomst av campylobacter i kycklingkött och sjukdomsfall hos människor. Därtill synliggör resultaten på ett mer generellt plan hur man med hjälp av fördjupade mikrobiologiska analyser och jämförelser kan identifiera potentiella spridningsvägar samt brister i hygienrutiner på gårds- och slakterinivå. Målgrupper för rapporten är personer från bransch, centrala och lokala myndigheter som arbetar med mikrobiologisk hygien och säkerhet vid produktion och slakt av kyckling. Rapporten är även riktad till yrkeskategorier inriktade på smittskyddsarbete.

Livsmedelsverket är Sveriges expert- och centrala kontrollmyndighet på livsmedelsområdet.

Vårt uppdrag är att verka för säker mat och bra dricksvatten, att ingen blir lurad.

Vår vision är att bidra till att alla känner matglädje och mår bra av maten.