



Høgskolen i Telemark

Termotolerante *Campylobacter* i vann, fjørfe og gris.

- Forekomst
- Identifisering
- Genetisk diversitet

Aud Stølan & Elisabeth Moen Bråthen



Masteroppgave i natur-, helse- og miljøvern
innenfor fagområdet mikrobiologi
2008

Forord

Denne masteroppgaven er gjennomført ved Institutt for Natur- helse og miljøfag ved Høgskolen i Telemark, avdeling Bø. Innsamling av prøver og laboratoriearbeid ble påbegynt våren 2006. Alle analysene er gjennomført ved skolens laboratorium.

Det har vært en lærerik prosess og mange personer har vært viktige på veien til det endelige resultatet.

Takk til avd. ing. Karin Brekke Li som alltid var behjelpelig, Halvdan Klæboe for opplæring og veiledning på riboprinter og Camilla Haslekaas for gode råd og korrekturlesing.

En stor takk rettes til professor Olav Rosef som tålmodig har bidratt med faglig kunnskap, veiledning og engasjement. Og ikke minst for muligheten vi fikk til å presentere våre data ved 27th Food Microbiology Symposium, University of Wisconsin-River Falls, USA og ved International Scientific Conference, 6 juni 2008, Kaunas, Litauen.

Bø i Telemark, 2008

Elisabeth M. Bråten

Aud Stølan

Innholdsfortegnelse

Forord.....	1
Innholdsfortegnelse	2
Sammendrag.....	3
Summary	5
1. Innledning.....	7
1.1 Formålet med oppgaven	7
1.1 Historie	7
1.2 Taksonomi	9
1.3 Slektskarakteristikk	9
1.4 Forekomst og utbredelse	11
1.4.1 Viable-but-Nonculturable.....	12
1.4.2 Biofilm	12
1.4.3 Overlevelse av Campylobacter i jord.....	13
1.4.4 Klima.....	13
1.5 Vekst og overlevelse i næringsmidler	14
1.6 Virulsegenskaper	14
1.7 Campylobacteriose	15
1.8 Utbrudd.....	17
2. Materiale og metoder	18
2.1 Prøveinnsamling og isolering.....	18
2.1.1 Isolering fra vann.	18
2.1.2 Isolering fra kylling og and	18
2.1.3 Isolering fra gris.	19
2.2 Artsbestemmelse	19
2.2.1 Multiplex PCR.....	19
2.2.2 Riboprinter [®] Microbial Characterization System	20
2.3 Biotyping.....	21
2.3.1 Hippurathydrolyse	21
2.3.2 Nalidixin følsomhet.....	22
3. Resultater.....	23
3.1 Vann	23
3.2 Kylling og and.....	26
3.3 Gris	29
4. Diskusjon.....	32
4.1. Vann	32
4.2. Kylling og and.....	35
4.3. Gris	38
Litteraturliste	41
Vedlegg	51

Sammendrag

Termotolerante *Campylobacter* er en viktig næringsmiddelbåren patogen bakterie og regnes i dag blant de viktigste årsakene til bakterielt betinget diaré hos mennesker verden over.

Bakterien er vanlig i tarmen hos en lang rekke pattedyr og fugler, og kan overleve flere dager i vann og jord, men kan ikke formere seg der. Hensikten med denne oppgaven er å belyse forekomsten av *Campylobacter* som miljøbakterie i vann, fjørfe og gris, og å vurdere isolater/stammer fra ulike kilder, og se på genetisk diversitet innen miljø og mellom kildene. For identifisering og karakterisering av *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* og *Campylobacter lari* er fire metoder brukt. 1) Filtrering og utstryk på selektiv agar med kontroll av typiske kolonier ved hjelp av fase-kontrast mikroskop, 2) Biotyping ved hippurathydrolyse og nalidixinsyretest, 3) Multipleks PCR for arts identifisering, 4) Ribotyping med RiboPrinter[®] Microbial Characterization System for tester på genetisk likhet.

I 125 prøver fra vann, som er hentet fra to lokaliteter langs Bøelva; Oterholt og Storakaasa, er 45 stammer isolert. Av disse er 37,8 % identifisert som *C. jejuni*, 4,4 % som *C. coli*, 11,1 % som *C. lari* og 46,7 % som *Campylobacter* spp. Totalt er 10 bakterieisolater fra vann DuPont ID identifisert av riboprinteren. Bakteriene blir DuPont identifisert når båndmønsteret fra vår prøve og båndmønsteret i DuPont Identifikasjons bibliotek i RiboPrinter har en likhet >0,86. Dendrogrammet av de 45 isolatene fra vann inndeles i 2 hovedgrupper. Disse kan inndeles i 5 undergrupper. Fem av de 17 *C. jejuni* isolatene er identifisert med DuPont ID: DUP_PST1-1130, DUP_PST1-1122, DUP_PST1-2073, DUP_PST1-2000 og DUP_PST1-2058. Fire av de fem *C. lari* isolatene er DUP identifisert av riboprinteren som: DUP_PST1-1166 (n=2), DUP_PST1-1178 og DUP_PST1-1179. En av *C. spp.* er identifisert av riboprinteren som *C. hyointestinalis*: DUP_PST1-1170. Den store genetiske diversiteten kan skrive seg fra kontinuerlig tilførsel av *Campylobacter* til elven fra ville fugler og tilsig av forurenset avrenning fra områder rundt elven.

I 113 prøver fra kylling og and er 46 stammer isolert. Av disse er 73,9 % identifisert som *C. jejuni*, 17,4 % som *C. coli* og 8,7 % som *C. lari*. Av disse er 26 DuPont ID identifisert av riboprinteren. Dendrogrammet viser at isolatene inndeles i to hovedgrupper som igjen kan inndeles i fem undergrupper. De tre ulike artene grupperer seg i egne undergrupper. Dendrogrammet viser at isolatene i to undergrupper samler isolater fra kylling. En undergruppe samler isolater fra and, mens to undergrupper har isolater fra kylling og and. Av 35 *C. jejuni* isolater er 13 identifisert med DuPont ID; DUP_PST1-2050 (n=2), DUP_PST1-

1146, DUP_PST1-2061 (n=5), DUP_PST1-1131 (n=4) og DUP_PST1-2086. Alle *C. lari* isolater er identifisert med: DUP_PST1-1166 (n=4) og DUP_PST1-1181. Alle åtte *C. coli* er gitt en DUP-ID, seks av disse er samlet i en hovedgruppe i dendrogrammet. DUP_PST1-1211 (n=6) og DUP_PST1-1140 (n=2). Klusteranalysen viser stor genetisk variasjon blant isolatene fra kylling og and.

I 100 prøver fra slaktegris er *Campylobacter* isolert i 88, hvorav *C. coli* representerte 97,7 %, *C. jejuni* 1,1 % og 1,1 % *C. lari*. Av 81 isolater testet på riboprinter er 19 *C. coli* identifisert med DuPont ID. DUP_PST1-1182 (n=6), DUP_PST1-1208 (n=10), DUP_PST1-1175, DUP_PST1-1163 og DUP_PST1-1140. Dendrogrammet viser at isolatene inndeles i to hovedgrupper. Hovedgruppene deler seg igjen inn i 5 undergrupper. Dendrogrammet viser at isolatene i en av undergruppene samler 15 isolater fra en besetning. De andre undergruppene samler isolater fra flere besetninger. Klusteranalysen viser stor genetisk variasjon blant isolatene fra slaktegris, både innen besetningen og mellom besetninger.

Summary

Campylobacter is recognized as a leading human food-borne pathogen and the bacteria is normally found in cattle, swine and birds. The bacteria can survive in water and mud but not multiply here. The aim of this study was to examine the occurrence of *Campylobacter* as environmental bacteria, to evaluate isolates and groups or categories from various sources, and to study genetic diversity within the environment and amongst those sources. Four methods have been used to identify and characterize *C. jejuni*, *C. coli* and *C. lari*: 1) filtration and streak culture on selective agar, with the control of typical colonies by using phase contrast microscope; 2) biotyping by hippurate hydrolysis and nalidixic acid test; 3) multiplex PCR for species identification and 4) ribotyping using RiboPrinter[®] Microbial Characterization System for testing of genetic similarities.

Forty-five strains were isolated from 125 water samples collected from two localities along the Bø River of which 17 (37.8 %) were *C. jejuni*, 2 (4.4 %) *C. Coli*, 5 (11.1 %) *C. lari* and 21 (46.7 %) *C. spp.* A total of 10 DuPont ID were identified by the riboprinter. The bacteria is given a DupPont identification when the pattern from the sample and the pattern in DuPont Identificasjons library match with similarity > 0,86. The dendrogram of the 45 isolates was classified into two main categories, which in turn were divided into five subgroups. Five of the 17 *C. jejuni* isolates were identified with the following DuPont ID: DUP_PST1-1130 (n=1), DUP_PST1-1122 (n=1), DUP_PST1-2073 (n=1), DUP_PST1-2000 (n=1) and DUP_PST1-2058 (n=1). Four of the five *C. lari* isolated were DUP identified by the riboprinter as: DUP_PST1-1166 (n=2), DUP_PST1-1178 (n=1) and DUP_PST1-1179 (n=1). One of the *C. spp.* was identified by the riboprinter as *C. hyointestinalis*: DUP_PST1-1170. The large genetic diversity observed could be the result of a flow of *Campylobacter* from wild birds or local sources of pollution near the river.

A total of 46 strains were isolated from 113 fecal swabs of chicken and ducks. Thirty-four of these (73.9%) were identified as *C. jejuni*, 8 (17.4 %) as *C. coli*, and 4 (8.7 %) as *C. lari*. Twenty-six of these were DuPont ID identified by riboprinter. The dendrogram shows that the isolate divides into two main groups and five subgroups. The isolates of two of the subgroups originate from chicken, one from duck and two from both. Thirteen of the 35 *C. jejuni* isolates were identified with DuPont ID: DUP_PST1-2050 (n=2), DUP_PST1-1146 (n=1), DUP_PST1-2061 (n=5), DUP_PST1-1131 (n=4) and DUP_PST1-2086 (n=1). All of the *C. lari* isolates were identified as: DUP_PST1-1166 (n=4) and DUP_PST1-1181 (n=1).

All of the eight *C. coli* were given a DUP-ID, and six of these gathered in a main category in the dendrogram, DUP_PST1-1211 (n=6) and DUP_PST1-1140 (n=2). The cluster analysis showed large genetic variety among the isolates from chicken and duck.

Campylobacter were isolated in 88 of 100 pig fecal swabs of which *C. coli* was found in 86 (97.7 %), and *C. jejuni* and *C. lari* in 1 each (1.1 %). Of 81 isolates tested on the riboprinter, 19 *C. coli* were identified with DuPont ID. DUP_PST1-1182 (n=6), DUP_PST1-1208 (n=10), DUP_PST1-1175 (n=1), DUP_PST1-1163 (n=1) and DUP_PST1-1140 (n=1). The dendrogram shows that the isolates divide into two main categories which further divide into five subgroups. The dendrogram shows that the isolates of one of the subgroups are a collection of 15 isolates from one strain. The other subgroups were collections of isolates from several strains. The cluster analysis showed large genetic variety among the isolates from pigs, both within and between strains.

1. Innledning

1.1 Formålet med oppgaven

Zoonoser er definert som ”sykdommer som smitter mellom dyr og mennesker” Smitte kan skje gjennom maten vi spiser og da spesielt mat som kommer fra dyr. Vann som har blitt forurenset av gjødsel og kloakk og gjennom direkte kontakt med dyr er også en smittevei. *Campylobacter* er en viktig patogen med tanke på mikrobiell kontaminering av næringsmidler. Reservoaret for bakterien er viltlevende fugl, og husdyr kan være friske bærere av bakterien. Det er en viktig oppgave for helsevesenet å forebygge sykdommer som skyldes smitte fra vann og næringsmidler. Dette kan oppnås ved å kartlegge og overvåke problemet, identifisere smittekilder og smittemåter, og å bryte smitteveier eller redusere smittekilder.

Kunnskap om bakteriens forekomst, formering og hvilke arter som dominerer i de ulike miljøene har betydning for folkehelsen generelt, og økonomisk interesse for produsenter av næringsmidler. For å unngå smittespredning er det viktig å vite hvilke miljøer bakterien etablerer seg i, og hvordan den overlever og formerer seg. Hvilke arter som dominerer i ulike miljø er viktig å vite siden enkelte arter er mer patogene enn andre. Det antas at de fleste tilfeller av campylobacteriose hos mennesker stammer fra kontaminert ferskt fjørfe kjøtt og fra ubehandlet drikkevann.

Hensikten med denne oppgaven er å belyse forekomsten av *Campylobacter* som miljøbakterie og å isolere stammer fra ulike kilder, identifisere hvilke arter som dominerer i de ulike miljøene og å se på genetisk variasjon innen miljø og mellom kildene. Vi har valgt å undersøke hvilke arter som dominerer i ubehandlet vann fra Bøelva, i kylling og and, og hos slaktegris. Et annet mål har vært å presentere analysedataene på to internasjonale konferanser (Vedlegg 1, Vedlegg 2).

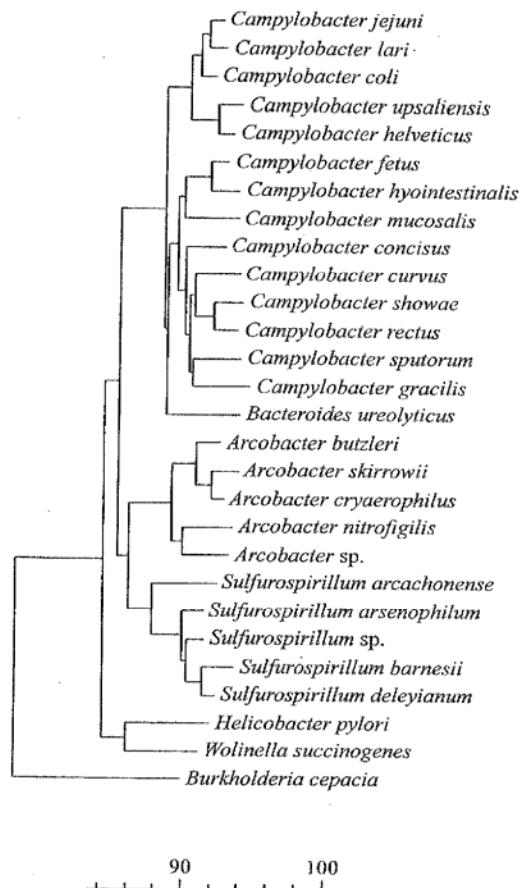
1.1 Historie

Campylobacter ble identifisert som årsak til akutt diaré hos mennesker første gang for ca. 30 år siden og siden da har kunnskapen om denne bakterien økt, men det er fremdeles mange

spørsmål som står ubesvart. *Campylobacter* var vel kjent i veterinær medisin lenge før den ble kjent som en human patogen og i 1919 beskrev Smith og Taylor en organisme som førte til abort hos kveg og gav bakterien navnet *Vibrio fetus* (Smith og Taylor 1919). Theodor Escherich beskriver i 1886 det som kan ha vært *Campylobacter*, i tarmen hos et spedbarn som døde av "cholera infantum" (Escherich 1886). Escherich forsøkte å dyrke disse bakteriene i laboratoriet uten suksess. Andre beskrivelser av spiral bakterier ble publisert i årene som fulgte. Noen av disse kan ha vært *Campylobacter*, men alle forsøk på å dyrke disse bakteriene i laboratorie gikk galt og interessen for bakteriene forsvant. Første indikasjon på at *Campylobacter* kunne forårsake infeksjon og diaré kom fra veterinære kilder. I 1931 isolerte Jones et al. "vibrio" fra kveg med dysenteri, her ble det dyrket noen få rene kulturer uten bruk av selektivt media ved å fortynne materiale, og ved å vaske og skrape fragmenter av jejunalmucosa. Navnet ble senere beholdt som *Campylobacter jejuni*. I 1940 ble en annen microaerofil vibrio isolert, denne forårsaket dysenteri hos svin. Bakterien fikk navnet *Vibrio coli* som vi i dag kjenner som *C. coli*. *Campylobacter* ble ikke kjent som en fecal patogen hos menneske før på slutten av 1970 tallet. En publikasjon fra 1938 beskriver den første dokumenterte hendelsen en antar er en human *Campylobacter* infeksjon. Det er i dag liten tvil om at denne organismen var *Campylobacter*. Genusnavnet *Campylobacter* ble foreslått i 1963 og i 1977 ble det utviklet rutinemetoder for dyrking av denne bakterien av Skirrow og Blaser (Skirrow 1977). Utviklingen av selektivt dyrkningsmedium gjorde isolasjon av *Campylobacter* til rutine i klinisk mikrobiologi og i 1979 kom den første publikasjonen om campylobacteriose hos mennesker (Butzler & Skirrow 1979). Det var foreløpig mangel på kunnskap og ikke mulig å skille mellom de ulike artene. På begynnelsen av 80-tallet etablerte metoder av John Penner i Toronto og Hermy Lior i Ottawa serotyping av *Campylobacter* (Penner & Hennessy 1980, Lior et al. 1982). Disse metodene sammen med biotyping og phagotyping, er fremdeles basis for å skille de ulike artene. Store fremskritt er gjort de siste årene ved genotyping for å skille ulike arter. Etter at isolasjon og dyrking av *C. jejuni* og *C. coli* ble rutine ble også andre arter av *Campylobacter* beskrevet/oppdaget, blant annet *C. lari* og *C. upsaliensis*. Disse har liten klinisk betydning i forhold til *C. jejuni* og *C. coli*, men det er kjent at *C. lari* og *C. upsaliensis* kan forårsake diaré hos barn i utviklingsland (Nachamkin & Blaser 2000). Forekomsten av campylobacteriose hos mennesker har økt i mange land siden begynnelsen av 1990-tallet. I Norge er nå sykdommen mer vanlig enn salmonellainfeksjoner (Folkehelseinstituttet 2005).

1.2 Taksonomi

Genus *Campylobacter* tilhører familien *Campylobacteriaceae*, hvor *Arcobacter*, *Sulfurospirillum* og *Bacteroides* er plassert i klassen *Epsilonbacteria* sammen med *Helicobacteraceae* og *Burkholderia*. Fylogenetisk tre av *Campylobacteriaceae* familien er vist i Figur 1 (Vandamme 2000).



Figur 1. Fylogenetisk tre av genus *Campylobacter* og dens nærmeste fylogenetiske naboer, *Helicobacter* og *Wolinella*, basert på 16S rRNA gen sekvens likhet. *Burkholderia cepacia* ble brukt som en utgruppe. Skalaen representerer sekvens ulikheten i (%) (Vandamme 2000).

1.3 Slektskarakteristikk

Campylobacter er en gram negativ, ikke sporedannende og oksidase positiv bøyd stavbakterie. Størrelsen er 0,2-0,5µm bredde og 0,5-8µm lengde. De fleste *Campylobacter* artene besitter en polar flagell på en eller begge sider. Dette gjør at de beveger seg med en

karakteristisk pilsnar, korketrekkerlignende bevegelse (Vandamme 2000). Eldre kulturer degenererer til en kokkoid form som har mistet bevegligheten (Rosef et al. 1986).

Campylobacter er strikt mikroaerofile og krever ca 5 % oksygen og ca 10 % CO₂ for å kunne vokse. Oksygen i atmosfæriske konsentrasjoner er toksiske for *Campylobacter* (Rosef & Kapperud 1982). Bakterieslekten *Campylobacter* deles inn i to grupper etter evnen til å produsere katalase. *C. jejuni*, *C. coli* og *C. lari* tilhører alle den katalase positive gruppen (Rosef et al. 1986). *Campylobacter* arter er klassifisert etter deres biokjemiske egenskaper, som er vist i tabell 1 (Lawson et al. 1997, Lerner et al. 1994).

Tabell 1.

Karakteristikk av *Campylobacter* arter (Lawson et al. 1997, Lerner et al. 1994).

Campylobacter arter	Alfa-haemolysis	Katalase	Hydrolyse		Reduserer		Vekst		1 % Glycin	Cefoperazone	Resistent mot	
		Katalase	Hippurate	Indoxyl acetate	Nitrate	Selenite	25 °C	42 °C			Nalidixic acid	Cephalothin
<i>C. jejuni</i> ssp. <i>Doylei</i>	+	V	+	+	-	-	-	-	V	-	-	-
<i>C. jejuni</i> ssp. <i>jejuni</i>	+	+	+	+	+	V	-	+	+	+	-	+
<i>C. coli</i>	V	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
<i>C. lari</i>	V	+	-	-	+	V	-	+	+	+	V	+
<i>C. upsaliensis</i>	+	-	-	+	+	+	-	V+	+	V	-	+
<i>C. hyointestinalis</i> ssp. <i>lawsonii</i>	V	+	-	-	+	+	-	+	V	V	+	-
<i>C. hyointest.</i> ssp. <i>hyointestinalis</i>	V	+	-	-	+	+	V	+	+	-	+	V

+ karaktertrekk finnes hos >90 % av stammene, - + karaktertrekk finnes hos >11 % av stammene, V stamme avhengig reaksjon, V+ karaktertrekk finnes hos >80 % av stammene

Termotolerante *Campylobacter* omfatter *C. jejuni* ssp. *jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. helveticus* og *C. upsaliensis*. Disse artene har evne til å vokse ved 42 °C, men ikke ved 25 °C, og er assosiert med sykdom hos mennesker (Vandamme 2000). *C. jejuni* (80-90 %), *C. coli* (ca 7 %) og *C. lari* (ca 1 %) representerer hovedårsaken til human gastroenteritt, men de fleste *Campylobacter* er kjente eller antatte patogener (Skirrow 1994, Lastovica, et al. 2000). Den virkelige prevalens av antallet som blir syke er ukjent, siden de isolasjon og påvisnings metoder som brukes ikke er tilpasset alle artene (Corry et al. 1995).

1.4 Forekomst og utbredelse

Termofile *Campylobacter*, *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* og *C. upsalienses*, har reservoar i tarmen hos en lang rekke ville og domestiserte pattedyr og fugler. Dyrene er friske bærere (Veterinærinstituttet 2008). I naturen er det ville fugler som utgjør det største reservoaret for *Campylobacter*, og fjørfe av alle slag er ofte bærere av bakterien. Fuglenes høye kroppstemperatur har vært antydning som en mulig sammenheng med bakteriens termofile egenskaper. Fra viltlevende fugler, og da særlig måker og kråker, er det isolert både *C. jejuni*, *C. coli* og *C. lari*. Bakterien kan spres over store avstander og fuglene fungerer som effektive sykdomsspredere til beiter, fôr og drikkevann. I mange land antar man at fjørfeprodukter og da særlig kylling er den vanligste smittekilden til mennesker. Fra tarminnholdet hos storfe isoleres *C. jejuni* oftere enn *C. coli*, og upasteurisert melk har vært smittekilde ved flere utbrudd i utlandet. Den mest sannsynlige årsaken er fekal forurensing fra melkekyr. Smitte fra storfekjøtt spiller en mindre rolle da graden av kontaminering under slakteprosessen er lavere enn ved den automatiserte slaktingen av fjørfe. Ved lagring av storfekjøtt vil bakterien dø relativt raskt, fordi overflaten på kjøttet tørker under kjølelagring. Gris er ofte frisk bærer av *C. coli*, også her vil uttørking av overflaten på slaktet føre til at bakterien overlever dårlig. *C. coli* er også mindre vanlig enn *C. jejuni* som årsak til sykdom hos mennesker. *C. jejuni* er ikke uvanlig blant sau, og sauer på utmarksbeite kan forårsake utbrudd ved at drikkevann blir forurenset. Bakterien er bare unntaksvis funnet hos viltlevende pattedyr. Kontakt mellom mennesker og kjæledyr kan være en mulig smittemåte, og hunder og katter er ikke sjelden friske bærere av *C. jejuni* og *C. upsaliensis*. Naturlige vannforekomster kan få tilført *Campylobacter* med kloakk, avløpsvann, avrenning fra gjødselkjellere, husdyrbeiter og fra ville fugler (Kapperud 2007a). Undersøkelser i Oslo-regionen har vist at *C. jejuni* og *C. coli* forekommer i overflatevannskilder til alle årstider (Rosef et al. 1986). De lave vanntemperaturene i Norge gir gode forhold for overlevelse av *Campylobacter* og øker muligheten for vannbårne utbrudd. Bakterien kan også leve intracellulært i akvatiske protozoer, noe som ytterligere kan øke overlevelsen. Kontaminert vann som brukes til irrigasjon og som drikkevann til husdyr kan spre bakterien (Kapperud 2007a). Kontaminerte grønnsaker og krysskontaminering med fluer kan også være en kilde til infeksjon (Rosef & Kapperud 1983, Alterkruse et al. 1994). *Campylobacter* er ofte isolert fra vann og har vært kilde til infeksjoner i flere land inkludert Norge (Mentzing 1981, Vogt et al. 1982, Rosef & Mork 1985, Dahl & Melby 1987, Melby et al. 1991, Varslot et al. 1996, Koenraad et al. 1997).

1.4.1 Viable-but-Nonculturable

Viable but nonculturable (VBNC) er en degenerert tilstand av bl.a. *Campylobacter*. Denne tilstanden har også blitt påvist i flere humanpatogene bakterier som *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Vibrio cholerae* og *Legionella pneumophila*. Standard dyrkings metoder kan ikke påvise VBNC celler effektivt, men cellene forblir potensielt patogene under gunstige forhold. Temperatur er en viktig faktor ved tap av den dyrkbare formen av *Campylobacter*. Det er vist at muligheten for å dyrke bakteriene forsvinner i løpet av tre dager når koloniene inkuberes ved 25 °C. Det er også vist at ulike stammer av *C. jejuni* i sterilt vann, som ble inkubert ved 4 °C, ble VBNC etter 18 til 28 dager. Den potensielt infektive VBNC formen av *C. jejuni* og overgangen mellom VBNC og aktive celler er et eksempel for overlevelsen til bakteriene under ulike forhold. Den kokkoide tilstanden av *C. jejuni* celler diskuteres fremdeles. Noen forskere ser på denne tilstanden som en degenerert form, mens andre påstår at VBNC er en dormant tilstand og at bakterien er i stand til å formere seg og vokse igjen når vekstforholdene blir optimale. *C. jejuni* gjennomgår en morfologisk forandring ved overgang fra dyrkbare celler til VBNC. De ”korketrekker formede stavene” med flagell, går over til en kokkoid form som er væskefylte og ubevegelige. Det kan være at den kokkoide formen spiller en rolle for overlevelse og spredning av bakterien (Hudock et al. 1998).

1.4.2 Biofilm

Biofilm er definert som et samfunn av bakterier som er festet til hverandre og/eller til overflater. Dette er antagelig en livsform som beskytter bakteriene mot stress fra miljøet. *Campylobacter* ser ut til å eksistere i tre ulike former av biofilm i flytende kulturer.

- En form som fester seg til overflater.
- En form som klumper seg sammen og danner aggregater i væske og ikke fester seg til overflater.
- En form som holder seg flytende i grenseflaten mellom væske og luft.

Ved undersøkelse i elektronmikroskop ligner de tre formene av biofilm hverandre i struktur. Det har vært foreslått at *C. jejuni* kan opprettholdes i miljøet over lengre tid ved å danne biofilm. Disse karakteristiske formene for vekst er viktige for å forbli i miljøet, og kan også til

dels forklare hyppigheten av *Campylobacter* assosierte matbårne utbrudd. Humane infeksjoner som danner biofilm er ofte mindre påvirkelig av antibiotika. Ved *C. jejuni* infeksjon er det viktig å forstå hvordan organismen overlever i miljøet og ”kommer inn i matkjeden”. Biofilm er relativt resistent mot forandringer i miljøet. Det er også en hypotese at *C. jejuni* danner biofilm for å overleve uheldige forhold hos vert (Joshua et al. 2005).

1.4.3 Overlevelse av *Campylobacter* i jord.

Overlevelse av tarmbakterier i jord avhenger av bakteriens art, dens fysiske tilstand og jordens beskaffenhet. Evnen til overlevelse øker i kald, våt, alkalisk, næringsrik leirjord som holder godt på fuktigheten. I et forskningsarbeid utført på New Zealand om overlevelse av *Campylobacter* i jordsmonn fant man at *Campylobacter* ikke ble isolert fra de 5 øverste cm av jorda, 10 dager etter irrigasjon. Vanninnholdet var mellom 30 og 40 % og snitt dag-temperaturen disse 10 dagene var 11,7- 12,4 °C. Teoretisk skulle man kunne forvente at dette var forhold *Campylobacter* kunne overleve under. Bevegelige mikroorganismer kan forflytte seg i jorda og finne områder som passer deres krav til omgivelser. Siden disse bakteriene er mobile er det mulig at de har forflyttet seg dypere i jordsmonnet. *Campylobacter* foretrekker mikroaerofile forhold og lav temperatur for overlevelse, noe som ikke oppfylles nær jordoverflaten. Ved forsøk i laboratoriet er det vist at både *C. jejuni* og *C. coli* overlever i jord lagret ved 10 °C i 14 dager (Ross & Donnison 2003).

1.4.4 Klima

Klimaendringer, flom og økt forurensing kan endre den mikrobiologiske balansen mellom mennesker og miljø. Insekter er viktige bærere av en lang rekke humanpatogene agens, deriblant *Campylobacter*. Klimaendringer kan medføre en økt flueplage og smitteoverføring til matvarer. Ved flomkatastrofer er særlig infisert vann assosiert med diareesykdommer som for eksempel campylobacteriose (Tauxe 1997, TemaNord 2008.)

1.5 Vekst og overlevelse i næringsmidler

C. jejuni, *C. coli* og *C. lari*'s muligheter til å forårsake næringsmiddelbårne infeksjoner avgjøres av tre ulike forhold:

1. Bakteriene er mikroaerofile, det vil si at de krever oksygenkonsentrasjoner som er mindre enn det som normalt finnes i luft.
2. Bakteriene er termotolerante og vekst skjer bare mellom 30,5 og 47°C (Smibert 1978).
3. Lav infektiv dose (Robinson 1981).

De mikroaerofile og termotolerante egenskapene medfører at bakteriene bare vokser i næringsmidler under helt spesielle forhold og den lave infektive dosen gjør at selv om bakterien ikke vokser i næringsmiddelet vil et lite antall bakterier likevel kunne føre til sykdom hos mennesker. Hvordan næringsmidlene oppbevares og tilberedes er avgjørende for bakterienes evne til å overleve. *Campylobacter* drepes ved oppvarming til 60°C og overlever ikke pasteurisering. Ved kjølelagring over lang tid (4°C) kan bakterien overleve, og de overlever bedre under kjølelagring enn ved romtemperatur (Doyle 1984). Resultater viser at det i vann kan finnes levedyktige, men ikke dyrkbare bakterier i flere måneder (Baffone et al. 2006). Luftfuktighet og temperatur i omgivelsene har mye å si for overlevelsessevnen. Ved romtemperatur er *Campylobacter* sensitive overfor tørke. Resultater tyder på at et stort antall bakterier kan overleve dehydrering i flere uker ved 4°C. Frysing gir en betydelig reduksjon av antall bakterier, men bakteriene kan overleve i frysede varer i flere uker. Bakteriens toleranse overfor pH og salt er også avhengig av temperatur og det er forskjell mellom de ulike stammene. *C. lari* er mer salttolerant enn *C. jejuni* og *C. coli*. Klorering fører til en effektiv desimering av *Campylobacter* i drikkevann. Studier med bruk av klorvann til desinfeksjon av fjørfeslakt har gitt motstridende resultater og en forklaring kan være at bakterier overlever i fordypninger og hulrom på slaktet (Doyle 1984, Blaser et al. 1984). Lavgradig gamma stråling oppnår effektiv eliminering av bakterien ved en dose på 1kGy (Tarkowski et al. 1984).

1.6 Virulensegenskaper

Det er mange uklarheter når det gjelder virulensmekanismene for *Campylobacter*, og virulensfaktorene hos *C. jejuni* og *C. coli* er gjenstand for intens forskning (Kapperud 2007a).

Det er mulig at *Campylobacter* omfatter flere undergrupper med ulike virulensfaktorer og kliniske ytringsformer. Det er postulert tre patogenitetsmekanismer som hver fører til ulike kliniske manifestasjoner.

- Adheranse til tarmepitelet og produksjon av enterotoksin som forårsaker vandig diaré.
- Invasjon av epitelcellene med påfølgende produksjon av et cytotoxin som fører til vevsødeleggelser og inflammasjon, som manifesterer seg i form av blodig diare.
- Penetrering av mucosa etterfulgt av vekst i lamina propria og mesenteriale lymfeknuter. Deretter eventuell spredning til andre organer hvor bakterien i svært sjeldne tilfeller kan forårsake lokale infeksjoner som cholecystitt, meningitt etc. (Kapperud 2007a).

1.7 Campylobacteriose

De fleste tilfellene av campylobacteriose er sporadisk (Friedman et al. 2000, Frost 2001). I Norge som i de fleste industrialiserte land, har utbrudd og kontrollerte studier vist at direkte eller indirekte kontakt med dyr, dårlig hygiene under grillmåltider, drikke av upasteurisert melk, konsum av kontaminert vann og fjørfe er risikofaktorer for campylobacteriose (Bryan & Doyle 1995, Evans et al. 2003). Infektiv dose som skal til for å forårsake sykdom er svært lav og det er påvist sykdom etter inntak av bare ca. 500 bakterier (Robinson 1981).

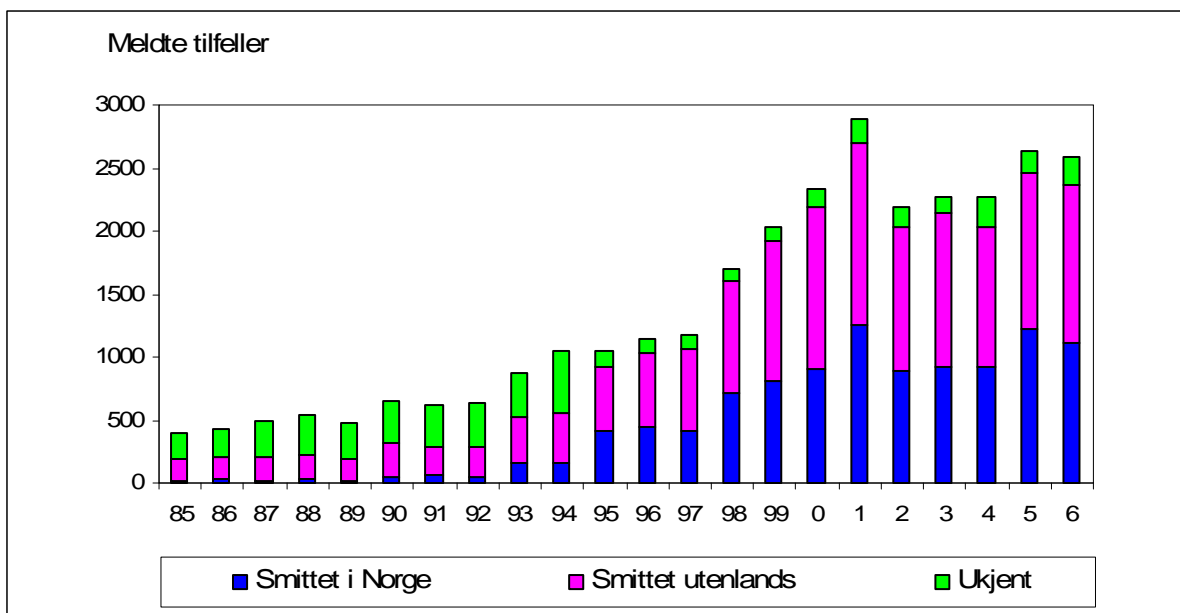
Sykdommen campylobacteriose varierer fra kortvarig gastroenteritt til mer alvorlig enterokolitt med magesmerter og blodig diaré. Vanlige symptomer er kraftig og vandig diaré, feber og magesmerter, som ikke krever antibiotikabehandling eller sykehusinnleggelse.

Andre hyppige rapporterte symptomer er svimmelhet, kvalme og oppkast, disse sykdomstegnene er sjelden dominerende (Blaser et al. 1983, Lastovica, & Skirrow 2000). *C. coli* gir mildere symptomer enn *C. jejuni* (Kapperud 2007a). Inkubasjonstid varierer fra en dag til over en uke, men to til fem dager er mest vanlig (Butzler & Oosterrom 1991). Den vanligvis selvbegrensende sykdommen varer fra en dag til en uke, men i de mer alvorlige tilfellene kan den vare i flere uker (Alterkruse et al. 1999). Pasienter kan skille ut bakteriene i feces i flere uker etter at sykdommen er overstått, men likevel er en langvarig bæretilstand uvanlig. Bakterien kan i sjeldne tilfeller forårsake reaktiv artritt og postinfeksiøs polynevropati, som fører til alvorlige lokale lammelser og hemolytisk-uremisk syndrom

(HUS). Slike senkomplikasjoner er sjeldne og campylobacteriose er sjelden dødelig.

Diagnosen stilles ved isolasjon av bakterien fra avføring (Kapperud 2007a).

I Norge registrerer Meldingssystemet for smittsomme sykdommer (MSIS) årlig ca 2500-3000 tilfeller av campylobacteriose. Det er begrensninger med meldesystemet, så det faktiske antallet personer som rammes er trolig 10-100 ganger større, blant annet oppsøker ikke alle syke lege (Kapperud 1994). *Campylobacter* rangerer som nummer en blant årsakene til de registrerte tilfellene av bakterielt betinget diaré etterfulgt av *Salmonella*. Dette er også situasjonen i de fleste andre europeiske land. Antall tilfeller steg kraftig i løpet av 1990 årene. MSIS registrerte i 1992 ca 600 pasienter med campylobacteriose. I 1997 var antallet fordoblet. En svært kraftig økning fant sted mot århundreskiftet og i 1998 passerte campylobacteriose i Norge for første gang salmonellose. I 2001 nådde sykdommen sitt hittil høyeste nivå med ca 3000 meldte tilfeller (Figur 2). Årsaken til økningen som i varierende grad også har funnet sted i andre europeiske land er ikke kjent (Kapperud et al. 2003).



Figur 2.
Antall registrerte tilfeller av campylobacteriose i Norge (MSIS 1985-2006).

Om lag 50-60% av de norske pasientene blir smittet i utlandet (Figur 2). Det er en kraftig økning i antall meldte tilfeller i tidsrommet juni til august (Heier et al. 2006). Tilsvarende sesongmessige variasjoner i campylobacteriose kan man også se i andre europeiske land (Friedman et al. 2000). I Norge er *C. jejuni* ansvarlig for ca. 90 % av de meldte tilfellene og

ca. 10 % skyldes *C. coli*. Et lignende mønster med dominans av *C. jejuni* er rapportert fra de fleste industrialiserte land. *C. coli* har en større dominans i utviklingsland med ca 40-50% av tilfellene. Campylobacteriose er vanligere i utviklingsland enn i industriland (Kapperud 2007a). Kjønn- og aldersfordeling av human campylobacteriose er de samme i Norge som i de fleste utviklingsland (Friedman et al. 2000). Man finner de fleste tilfellene blant de yngste barna, spesielt de under ett år, og de unge voksne (Bryan & Doyle 1995).

1.8. Utbrudd

Det er beskrevet en lang rekke utbrudd av campylobacteriose i Norge. Utbrudd er registrert i forbindelse med blant annet konsum av fjørfe, upasteurisert melk og drikkevann. Tradisjonelt har den norske drikkevannskvaliteten vært ansett for å være god, men likevel rapporteres det årlig utbrudd relatert til drikkevann. I enkelte av disse ble flere tusen personer syke (Kapperud 2007a). I løpet av perioden 1988 - 2002 ble det ved Statens næringsmiddeltilsyn og Folkehelseinstituttet registret 72 vannbårne utbrudd. Totalt ble det registrert 10 616 syke personer i disse utbruddene. Antall utbrudd varierte fra ett til 12 per år. Det var flere enn 200 syke registrert ved disse utbruddene alle årene, med unntak av i 1991, da kun ett utbrudd med fire syke ble registrert. *Campylobacter* var årsak til 26 % (19/72) av utbruddene og norovirus til 18 % (13/72). I 46 % (33/72) ble smittestoffet ikke identifisert (Nygård et al 2003). Ved alle *Campylobacter* utbruddene som involverte mer enn ti syke var vannkilden overflatevann. Årsaken til utbruddene er i hovedsak forurensning av vannkilden, med manglende eller mangelfull desinfeksjon av vannet. Oppgradering, spesielt av mindre og private vannforsyningssystemer, er nødvendig for å forebygge nye utbrudd (Nygård et al. 2003). I noen kjente utbrudd har smitekilden vært fjørfeprodukter. Ved to av utbruddene rammet det gjester på restauranter, årsaken var sannsynligvis krysskontaminasjon ved tilberedning av matvarer, men ikke konsum av fjørfeproduktene. Det har også blitt registrert utbrudd blant arbeidere i fjørfeslakteri og utbrudd forårsaket av upasteurisert melk (Kapperud 2007a). Vi kan ikke finne at det er registrert utbrudd i Norge i forbindelse med svineprodukter, selv om svin er bærer av *C. coli*.

2. Materiale og metoder

2.1 Prøveinnsamling og isolering

2.1.1 Isolering fra vann.

Vannprøvene ble samlet inn på sterile 0,5 l glassflasker fra to ulike lokaliteter i Bø elva i Telemark, Oterholt (O) og Storakaasa (S). De ble hentet fra januar til mai 2006. Vanntemperaturen var fra 1 °C til 5,2 °C. Vannet ble filtrert innen en time fra hentetidspunkt. 100 ml vann ble filtrert på 0,45-µm filtre (Millipore). Filtrene ble lagt med rutesiden opp på agarskåler med blodfri *Campylobacter* agar Oxiod CM 0739 med antibiotika supplement Oxoid SR 155E og vekst fremmer Oxoid SR 0232E. Skålene ble dyrket i lufttette kolber med CampyGen™ for å oppnå mikroaerofile forhold ved 42 °C. Etter 24 timer ble filtrene fjernet og skålene inkubert videre mikroaerofilt (42 °C) i 24 timer. For verifisering ble typiske kolonier, flate, transparente og vanddråpe lignende undersøkt i fasekontrast mikroskop. Karakteristiske bakterier ble sådd ut på blodagar og renkulturer fryst ned i Microbank™ og lagret ved -72 °C for senere analyser.

2.1.2 Isolering fra kylling og and

Prøvene ble tatt fra kylling og and fra kloakken med svaber (Invasive sterile eurotubo® Collection swab). Svaberne ble strøket ut samme dag som de ble tatt på blodfri *Campylobacter* agar Oxiod CM 0739 med antibiotika supplement Oxoid SR 155E og vekst fremmer Oxoid SR 0232E. Skålene ble dyrket ved 42 °C i 24 timer i lufttette kolber med CampyGen™ for å oppnå mikroaerofile forhold. For verifisering ble typiske flate, transparente, vanddråpe lignende kolonier undersøkt i fasekontrast mikroskop og videre sådd ut på blodagar for renkultur dyrking. Isolatene ble deretter fryst ned i Microbank™ og lagret ved -72 °C for senere analyser.

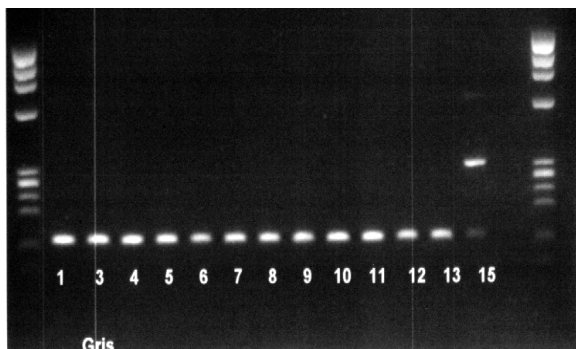
2.1.3 Isolering fra gris.

Svaber ble tatt fra kloakken/rektum fra slaktegris etter slakting (Invasive sterile eurotubo® Collection swab). Svaberne ble strøket ut samme dag som de ble tatt på blodfri *Campylobacter* agar Oxiod CM 0739 med antibiotika supplement Oxoid SR 155E og vekst fremmer Oxoid SR 0232E. Skålene ble dyrket i lufttette kolber med CampyGen™ for å oppnå mikroaerofile forhold, ved 42 °C i 24 timer. For verifisering ble typiske kolonier flate, transparente, vanddråpe lignende kolonier undersøkt i fasekontrast mikroskop og videre sådd ut på blodagar fra renkultur. Isolatene ble deretter fryst ned i Microbank™ og lagret ved -72 °C for senere analyser.

2.2 Artsbestemmelse

2.2.1 Multiplex PCR

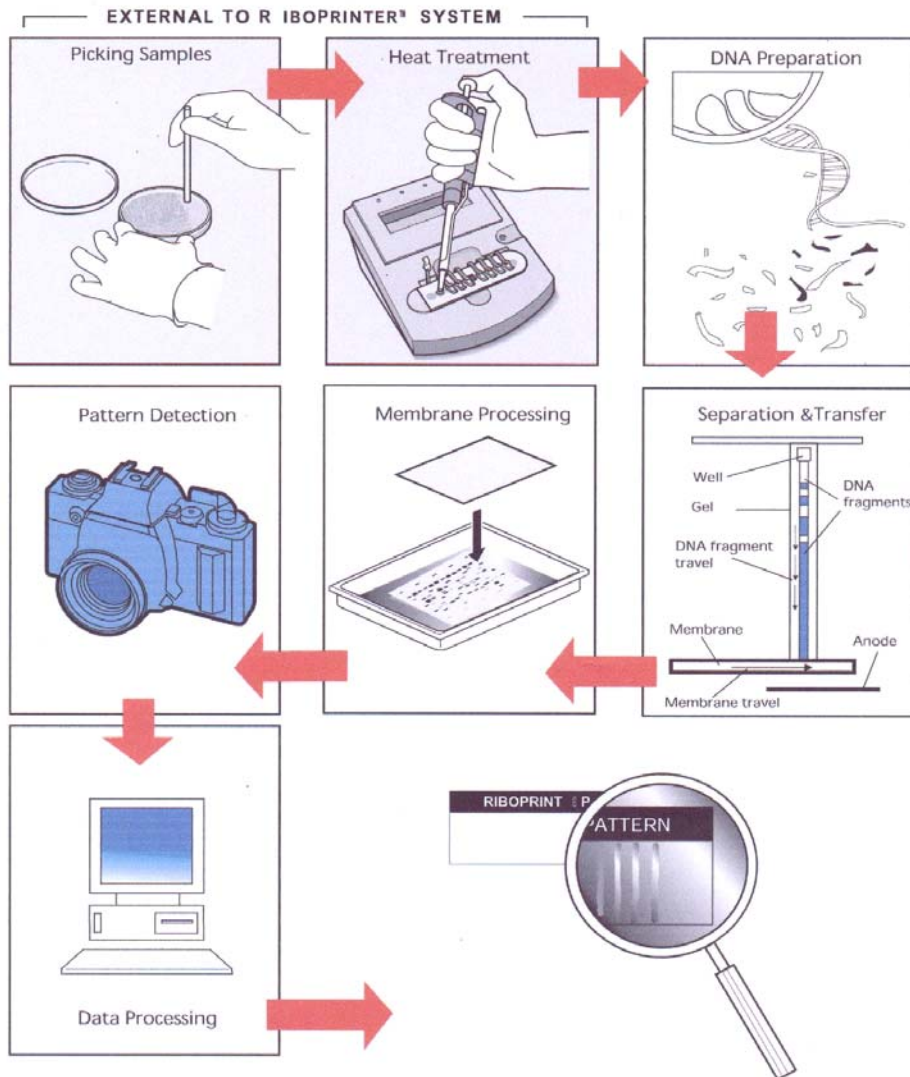
Multiplex-PCR primer sett beskrevet av Wang et al. (2002) ble brukt for arts bekreftelse av isolatene. Reaksjonene i en multiplex-PCR ble optimalisert for å identifisere 23S rRNA fra *C. spp.*, *hipO* gen fra *C. jejuni*, og *glyA* gen fra *C. coli*, *C. lari* og *C. upsaliensis*. Templatet ble preparert ved at en halv øse med materiale fra en enkelt koloni ble tilført en steril Eppendorf tube tilsatt 0,5 ml destillert vann og varmet til 100 °C i 10 minutter. 5 µl av løsningen ble brukt som templat i PCR reaksjonen. PCR-miksen (totalt volum 50µl) inneholdt arts-spesifikke primere og multipleks master mix (Quiagen GmbH, Hilden, Tyskland), vann og templat. Templat og reagenser ble satt inn i en PCR-maskin (Bio-Rad, iCycler) og DNA amplifikasjon foregikk etter følgende betingelser: 95 °C i 6 min, 35 repetisjoner ved 95 °C i 30 sek, 56 °C i 60sek, 72 °C i 60 sek; 72 °C i 7 min. Det hele ble avsluttet ved 4 °C. PCR produktet ble analysert på en 1.5 % agarose gel med TAE og ethidium bromid og visualisert under UV lys (Figur 2).



Figur 2.
Multiplex PCR reaksjon på prøver fra gris. Prøve 15 viser to bånd *C. jejuni* og *C. coli*, resten av prøvene viser bånd med *C. coli*.

2.2.2 Riboprinter[®] Microbial Characterization System

Riboprinter[®] Microbial Characterization System (Figur 3) ble brukt for å undersøke genetisk likhet mellom *Campylobacter* isolater. Totalt ble 172 isolater riboprintet. En bakteriekoloni plukkes fra en blodagarskål og dyrket i 24 timer. Bakteriene vispes ut i en buffer og varmes til 80 °C i 15 minutter. Etter avkjøling tilsettes prøvene et lyseringsenzym og overføres til Riboprinter[®]. Ved videre analyse brukes enzymet *Pst1* (20000µ/ML, New England Biolabs) til restriksjonskutting av DNA som blir utført automatisk. Riboprint profilene/båndene ble sammenlignet med båndene til en molekylær størrelsesmarkør og sammenlignet med tidligere observerte profiler/båndmønstre. Bakterien ble identifisert når båndmønsteret fra bakterien og båndmønsteret i DuPont Identifikasjons bibliotek i Riboprinter[®] hadde en likhet >0,86. Ribotypemønstrene blir automatisk tildelt et DuPont identifikasjonsnummer (DuPont ID), eks DUP_PST1-1166 som bekreftes visuelt. Ribotypemønstrene blir også sammenliknet med alle andre isolerte mønster generert med samme enzym. Denne sammenlikningen brukes til å definere RiboGroups som grupperer isolat med ≥95 % likhet. Dersom DuPont ID inkluderer mer enn et distinkt mønster blir prøvene automatisk plassert i ulike RiboGroups. DuPont ID blir da tildelt en bokstav i alfabetisk rekkefølge, f.eks DUP_PST1-1166A (Farber 1996). Grad av likhet ble kalkulert ved å bruke Riboprinter[®] "proprietary algorithm". Beregninger/kalkyler >0,93 gav resultatet genetisk slektskap mellom isolatene. Båndprofilene ble videre overført til og analysert med GelComparII software (Bio Numerics, Applied Maths inc.) ved å bruke båndmatching med Dice og UPGMA (unweighted pair group method with average clustering) for å lage dendrogram som illustrerer grad av genetisk likhet.



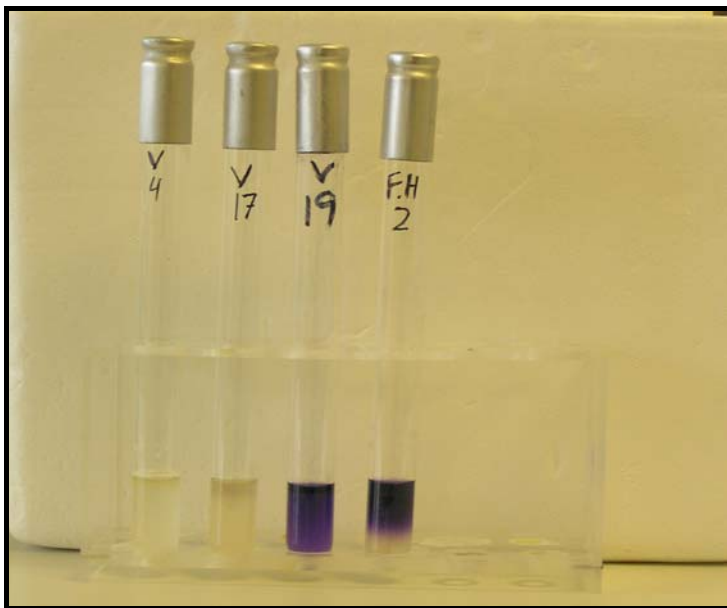
Figur 3.
Viser hvordan Riboprinter® System fungerer.

2.3 Biotyping

2.3.1 Hippurathydrolyse

Prinsippet med hippurathydrolyse består i å spalte N-benzoylglycin (hippuric syre) til glycin og benso syre katalysert av N-benzoylglycin amidohydrolase (hippuricase). Hippuricase genet (*hipO*) er spesifikt for *C. jejuni* og er ikke oppdaget i noen andre *Campylobacter* arter (Hani & Chan, 1995; Burnett et al., 2002). Hippurathydrolyse metoden er av stor viktighet i den biokjemiske differensieringen av *C. jejuni* fra de andre *Campylobacter* spp. (Nachamkin &

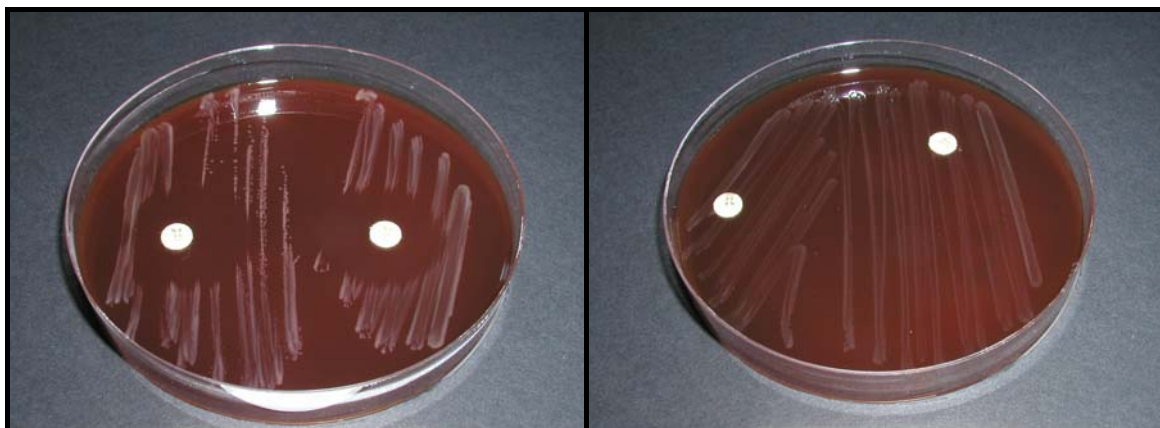
Blaser, 2000). Hippurathydrolyse ble beskrevet av Hwang og Ederer (1975) for å skille gruppe A og B streptokokker. Metoden er tilpasset *Campylobacter* og utføres ved at en rikelig mengde med bakteriemateriale slemmes opp i 2 ml sterilt fysiologisk saltvann og tilsettes 0,5 ml 5 % natriumhippuratløsning. Dette inkuberes to timer i vannbad ved 37 °C. Deretter tilsettes 1 ml ninhydrinløsning (3,5 g ninhydrin i 100 ml av en 1:1 blanding av aceton og butanol). Reaksjonen leses av etter to timer i romtemperatur. Blå farge (positiv test) indikerer nærvær av glycine som er produkt av hippurathydrolysen (Figur 4.).



Figur 4.
Hippurathydrolyse. Blå farge er positiv test.

2.3.2 Nalidixin følsomhet

Nalidixin følsomhet undersøkes ved at bakteriekolonier dyrkes på blodagarskåler og det legges på antibiotikalapper impregnert med Nalidixin. Antibiotikaen vil diffundere og danne en gradient. Etter inkubering blir skålene undersøkt for inhiberingsoner rundt lappene. Når disse sonestørrelser sammenlignes, ser man hvor følsom bakterien er for det pågjeldende antibiotika. Vekst helt inntil lappen viser resistens (Figur 5).



Figur 5.
Til venstre agarskål med *C.coli*, til høyre agarskål med *C.lari*. *C. lari* er resistent mot nalidixin, *C. coli* er sensitiv.

3. Resultater

3.1 Vann

I 125 vannprøver hentet fra Bø elva, ble det isolert 45 stammer termotolerante *Campylobacter* (36 %). Fra Oterholdt ble *Campylobacter* isolert i 19 av de 75 prøvene (25,3 %), og i 26 av 50 prøver (52 %) fra Storakaasa. Det ble isolert flest fra prøver hentet den 22.05.06.

Vanntemperaturen var da 5,2 °C, det var nedbør og mye avrenning til elva (Tabell 3). Av de 45 isolatene analysert med multiplex PCR (Tabell 2) var 17 *C. jejuni* (37,8 %), to *C. coli* (4,4 %), fem *C. lari* (11,1 %), mens 21 var *Campylobacter* spp. (46,7 %).

Ved biotyping var 17 av de 45 isolatene hippurat positive (Tabell 2), de var ikke resistente mot nalidixinsyre og identifiseres som *C. jejuni*. To *C. coli* isolater var hippurat negative og ikke nalidixinsyreresistente. Fem isolater var resistente mot nalidixinsyre, hippurat negative og er *C. lari*. De 21 *C. spp.* isolatene som ikke kunne grupperes i artene *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* eller *C. upsaliensis* ved PCR, var hippurat negative og var ikke nalidixinsyreresistente.

Ribotyping ble utført på alle 45 isolatene og et dendrogram er vist i Figur 6.

Dendrogrammet viser isolatene med båndstruktur, art, DuPont ID, hentedato for vannprøve og lokalitet hvor prøven er hentet. Totalt 10 DuPont ID ble identifisert (Figur 6). Fem av 17 *C. jejuni* isolater ble identifisert med DuPont ID: DUP_PST1-1130, DUP_PST1-1122, DUP_PST1-2073, DUP_PST1-2000 og DUP_PST1-2058. Fire av fem *C. lari* isolater ble identifisert med DuPont ID. DUP_PST1-1166 (n=2), DUP_PST1-1178 (n=1) og DUP_PST1-

1179 (n=1). En av *C. spp* ble identifisert av riboprinteren som *C. hyointestinalis*: DUP_PST1-1170. Dendrogrammet viser at isolatene fra vann deler seg i 2 hovedgrupper. Hovedgruppe 1 deler seg i to undergrupper a og b. Hovedgruppe 2 deler seg i tre undergrupper, c, d og e (Figur 6).

Tabell 2.

***Campylobacter* isolater fra Bøelva. Resultater fra multiplex PCR (disse vises også i prosent), biotyping (Hippurathydrolyse og Nalidixinsyre resistens) og gitt DuPont ID med Riboprinter® Microbial Characterization System.**

Art	<i>Campylobacter</i> multiplex PCR	Biotyping		%	DuPont ID
		Hippurat	Nalidixinsyre		
<i>C. jejuni</i>	17	17	0	37,8	5
<i>C. coli</i>	2	0	0	4,4	0
<i>C. lari</i>	5	0	5	11,1	4
<i>C. spp</i>	21	0	0	46,7	1
Total	45	17	5	100	10

Tabell 3.

Hvert isolat er vist med hentedato, lokalitet hvor prøven er hentet og vanntemperatur for vannprøve. O står for Oterholdt og S står for Storekaasa.

Dato	Sted	Vanntemp.	Påvist <i>Camp.</i>
18.01.06	O	-	1
26.01.06	O	1,1 °C	1
30.01.06	O	1,0 °C	1
03.04.06	O	1,9 °C	3
03.04.06	S	1,9 °C	2
19.04.06	S	3,3 °C	6
19.04.06	O	3,3 °C	4
25.04.06	O	-	1
04.05.06	S	-	3
22.05.06	O	5,2 °C	8
22.05.06	S	5,2 °C	15

3.2 Kylling og and

I 113 svaberprøver fra fjørfe (kylling og and) ble det isolert 46 stammer termotolerante *Campylobacter* (40,7 %) (Tabell 4). Fra kylling ble det av 60 svaberprøver, isolert 30 stammer *Campylobacter* (50 %) og av 53 svaberprøver fra and ble det isolert 16 stammer (30,2 %). Av 46 isolater ble 34 karakterisert som *C. jejuni* (73,9 %), åtte *C. coli* (17,4 %) og fire *C. lari* (8,7 %). Fra tre av prøvene ble det isolert både *C. jejuni* og *C. lari*. Svaberprøver fra kyllinger ble tatt hos to dager, en uke, tre uker og åtte uker gamle kyllinger, og svaberprøvene fra ender ble tatt etter slakting. Ingen kyllinger var smittet med *Campylobacter* i de to første levedagene (Tabell 5).

Ved biotyping var 29 hippurat positive, ikke nalidixinsyre resistente *C. jejuni* (Tabell 4). Fem av prøvene var hippurat negative. Disse isolatene ble genotypet som *C. jejuni* ved multiplex PCR (Tabell 4). De åtte *C. coli* isolatene var hippurat negative og ikke nalidixinsyresistente. Fire isolater var resistente mot nalidixinsyre, var hippurat negative og karakteriseres som *C. lari* (Tabell 4). Ribotyping ble utført på alle stammer isolert fra kylling og and (n=46), disse er presentert i et dendrogram (Figur 7). Hvert isolat er vist med båndstruktur, art, DuPont ID og om prøven er fra kylling eller and. Totalt ble 26 DuPont ID identifisert. Dendrogrammet viser at isolatene fra kylling og and er delt i to hovedgrupper. Hovedgruppe 1 består av 39 isolater og er delt inn i fire undergrupper; a, b, c og d. Undergruppe a består av 5 *C. lari* isolater. Alle i denne gruppen er gitt en DUP-ID; DUP_PST1-1166 (n=4) og DUP_PST1-1181 (n=1). Undergruppe b, består av 10 *C. jejuni* isolater, tre isolater i denne gruppen ble gitt DUP-ID; DUP_PST1-2050 (n=2) og DUP_PST1-1146 (n=1). Den tredje undergruppen c, består av 14 *C. jejuni* isolater ingen av disse er gitt en DUP-ID. I undergruppe d, er alle de 10 *C. jejuni* isolatene gitt en DUP-ID; DUP_PST1-2061 (n=5), DUP_PST1-1131 (n=4) og DUP_PST1-2086 (n=1). Hovedgruppe 2 viser åtte *C. coli* isolater som alle er gitt en DUP-ID; DUP_PST1-1211 (n=6) og DUP_PST1-1140 (n=2).

Tabell 4.

***Campylobacter* isolater fra kylling og and. Resultater fra multiplex PCR (disse vises også i prosent), biotyping (Hippurathydrolyse og Nalidixinsyreresistens) og DuPont ID utført ved Riboprinter® Microbial Characterization System.**

Art	<i>Campylobacter</i> multiplex PCR	Biotyping		%	DuPont ID
		Hippurate	Nalidixinsyre		
C. jejuni	34	29	0	73,9	13
C. coli	8	0	0	17,4	8
C. lari	4	0	4	8,7	5
Total	46	29	4	100	26

Tabell 5.

Påviste *Campylobacter* er vist med hentedato, om prøven er fra and eller kylling og alder ved prøvetaking.

Dato	And/Kylling	Alder	Påvist <i>Camp.</i>
28.02.06	K	2 dager	-
28.02.06	K	23 dager	9
28.02.06	K	58 dager	5
14.03.06	K	7 dager	7
14.03.06	K	21 dager	4
14.03.06	K	56 dager	5
15.05.06	A	53 dager	8
31.05.06	A	53 dager	8

3.3 Gris

I 100 svaberprøver fra slaktegris ble det isolert 88 stammer av termotolerante *Campylobacter* (88 %). Prøvene ble hentet fra 10 tilfeldige besetninger (Tabell 7). En stamme er identifisert som *C. jejuni* (1,1 %), 86 som *C. coli* (97,7 %) og en som *C. lari* (1,1 %) (Tabell 6). Fra en prøve ble det isolert både *C. jejuni* og *C. coli*, dette vises ved dobbelt bånd i den multiplexe PCR reaksjonen (Figur 2). Ved biotyping var en av de 88 hippurat positiv, ikke nalidixinsyre resistent og er *C. jejuni* (Tabell 6). De 86 *C. coli* isolatene testet negativt på hippurathydrolyse og viste ikke nalidixinsyre resistens. En av isolatene viste resistens mot nalidixinsyre, er hippurat negativ og identifiseres som *C. lari*.

Ribotyping ble utført på 81 av *C. coli* isolatene fra slaktegris, disse er presentert i et dendrogram (Figur 8). Hvert isolat er vist med båndstruktur, art, DuPont ID og besetnings identifikasjon. Totalt 19 DuPont ID ble identifisert. DUP_PST1-1182 (n=6), DUP_PST1-1208 (n=10), DUP_PST1-1175, DUP_PST1-1163 og DUP_PST1-1140. Dendrogrammet viser at *C. coli* isolatene fra slaktegris deler seg i to hovedgrupper. Hovedgruppe 1 inndeles i tre undergrupper a, b og c. Hovedgruppe 2 inndeles i undergruppe d og e (Figur 8).

Tabell 6.
***Campylobacter* isolater fra gris. Resultater fra multiplex PCR (disse vises også i prosent), biotyping (Hippurathydrolyse og Nalidixinsyre resistens) og DuPont ID utført ved Riboprinter® Microbial Characterization System.**

Art	<i>Campylobacter</i> multiplex PCR	Biotyping		%	DuPont ID
		Hippurate	Nalidixinsyre		
<i>C. jejuni</i>	1	1	0	1,1	
<i>C. coli</i>	86	0	0	97,7	19
<i>C. lari</i>	1	0	1	1,1	
Total	88	1	1	100	19

Tabell 7.
Viser grise besetninger og antall
prøver med påviste *campylobacter*.

Besetning	Påvist <i>Camp.</i>	Ant.prøver
A	8	9
B	1	1
C	1	1
D	31	39
E	1	1
F	1	1
G	5	5
H	1	1
I	13	15
J	26	27
Total	88	100

4. Diskusjon

4.1. Vann

Drikkevann er en kilde for næringsmiddelbårne infeksjoner og er et større problem i Norge enn de fleste andre industriland. Årsaken er utbredt bruk av overflatevann, kombinert med manglende eller ufullstendig vannbehandling. Epidemiologiske undersøkelser har vist at bruk av ikke desinfisert drikkevann er en betydelig risiko for å få campylobacteriose. Vannbårne utbrudd forekommer årlig i Norge (Kapperud 2007b). Vi isolerte en høy frekvens av termotolerante *Campylobacter*, 45 av 125 vannprøver (36 %). Selv om det ikke ble brukt optimale isolerings prosedyrer, det var ingen offisiell metode for å isolere *Campylobacter* fra vann da prøvene ble tatt våren 2006. Det har nå kommet en NMKL metode (nr 119, 3. utg. 2007) for termotolerante *Campylobacter*, denne metoden beskriver teknikker til kvalitativ, semikvantitativ og kvantitativ bestemmelse i næringsmidler og drikkevann. *Campylobacter* ble likevel regelmessig isolert fra overflate vann som må bli karakterisert som kontaminert, dette er i overensstemmelse med tidligere studier (Rosef et al. 2001). Hvor god overlevelse *Campylobacter* fra vann har avhenger av vannkvaliteten på vannet som blir testet. Blant faktorene som påvirker er antallet av *Campylobacter* som er tilstede, turbiditet, forurensingsgrad, konkurrerende mikroorganismer, og volum av vann som er undersøkt (Thomas et al. 1999, Rosef et al. 2001).

Fra Oterholdt er *Campylobacter* isolert i 19 av de 75 (25,3 %) prøvene, og i 26 av 50 (52 %) prøver fra Storakaasa. Storakaasa hadde som forventet en høyere isoleringsfrekvens på grunn av mer forurensing. Storakaasa ligger nedstrøms Oterholdt og her forurenses elva fra jordbruk og beiter, og i tider med mye nedbør vaskes forurensingen hurtig ut i elva. Dette studiet ble utført ved vann temperaturer mellom 1,0° og 5,2 °C. Brennhovd og Kapperud (1991) fant den høyeste deteksjons raten av *Campylobacter* i vann mellom 2° og 12°C. Det kan være færre konkurrerende faktorer tilstede ved lavere temperaturer, dette er bevist av Gondrosen (1986), som fant overlevelse i 15 dager ved 4 °C. De lave vanntemperaturene i Norge gir gode forhold for overlevelse av *Campylobacter* og øker muligheten for vannbårne utbrudd. Bakterien kan også leve intracellulært i akvatiske protozoer, dette har også innvirkning på overlevelsen (Kapperud 2007a).

Overflatevann blir regelmessig besøkt av vannfugler. På grunn av en høyere kroppstemperatur, så har fugler en annen fekal flora enn pattedyr og normalt et lavere innhold

av fekale koliforme bakterier, dette favoriserer *Campylobacter*. Det er også en sammenheng mellom fuglers høye kroppstemperatur og *Campylobacter* bakterienes termotolerante egenskaper. Kontaminering fra fugler spiller en stor rolle i kontaminasjon og overføring til vann, og de kan overføre bakterier over lange avstander. Fugler har vært årsaken til flere vannbårne epidemier her i landet (Rosef. O. & Rosef. L., 2005). Det er sannsynlig at vann utgjør et felles reservoar for utveksling av *Campylobacter* mellom mennesker, husdyr, ville dyr og fugler. Vi isolerte *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* og *C. hyointestinalis* fra Bøelva, det var også mange isolater som ikke ble identifisert. Dendrogrammet (Figur 6) deler isolatene i to hovedgrupper hvor hovedgruppe 1 består av flest *C. jejuni*, *C. coli* og *C. lari* isolater. Disse artene er normalt isolert fra en lang rekke levende viltfugler i vårt land. Blant måker og andre sjøfugl har en funnet et høyt antall *Campylobacter lari*. Det er blitt spekulert i om denne artens større salttoleranse kan være årsaken til disse fugleartene i større grad er bærere av denne arten. En høy grad av diversitet har også blitt dokumentert ved å bruke serologiske tester på isolater fra ville fugler (Rosef et al. 1985, Waldenstrøm 2005). *Campylobacter* er vanlig i tarmen hos en lang rekke pattedyr, både ville og domestiserte. Dyrene er som regel friske bærere (Rosef et al. 1983). Det blir derfor skilt ut et stort antall bakterier og dette sørger for en kontinuerlig strøm til miljøet. Mennesker med campylobacteriose og friske bærere sprer også *Campylobacter* til miljøet. Nesten alle *C. spp* isolatene noen *C. jejuni* isolater og bare en *C. hyointestinalis* isolat ble plassert i hovedgruppe 2 (Figur 6). Grunnen(e) til dette er ukjent. Alle *C. spp* isolatene (46,7 %) ble isolert fra Bøelva 29.5.2006. Det var mildt og nedbørmengden var stor i tiden før innhenting av disse vannprøvene og vannet hadde høy turbiditet og var tydelig grumsete. Selv om termotolerante *Campylobacter* ikke ser ut til å formere seg utenfor sitt naturlige habitat, overlever de nokså godt i ute miljøet, spesielt i vann (Blaser et al. 1980, Thomas et al. 1999). *C. spp* kan ved 4 °C maks overleve i tre uker fekal, fire uker i vann og fem uker i urin (Steltzer et al. 1991). På grunn av den manglende muligheten *Campylobacter* har til å formere seg i miljøet, så er det epidemiologiske spørsmålet hvor lenge de kan overleve i miljøet (inkludert vann) og forårsake utbrudd. Dette er foreløpig ukjent. Imidlertid, kan kontaminering av overflatevann føre til eksponering ved bading eller andre rekreasjons aktiviteter, dette kan øke muligheten til å bli smittet med campylobacteriose (Rosef et al. 2008 submitted).

Den infektive dosen til *Campylobacter* er lav, det trengs bare noen få hundre bakterier for å forårsake human infeksjon (Black et al. 1988). Spesielt barn kan være utsatt hvis de svelger kontaminert vann mens de bader. Våre resultater indikerer at man bør ta hygieniske forhåndsregler hvis man drikker urensset vann fra overflatekilder. Tidligere studier med

sereotyping på *C. spp.* isolater blant domestiserte og ville dyr (inkludert fugler) viste en diversitet på 42 ulike sereotyper blant isolatene (65,7 %) (Rosef et al. 1985). Broman et al. (2004) fant en høy diversitet blant isolater fra trekkfugler, Johnsen et al. (2006a) fant høy diversitet blant isolater fra miljø utendørs og isolater fra kveg (2006b). Det mangler kunnskap om virulens og diversitet fra miljøstammer fra vann. Ved hjelp av multipleks PCR påviste vi *C. jejuni* (37.8 %) *C. coli*, (4.4 %) *C. lari* (11.1 %), og en ikke typisk stamme (46.7 %) fra elvevann (Tabell 2). Biotyping av isolatene ga samsvar med disse resultatene. De 21 *Campylobacter* isolatene som ikke kunne grupperes i artene *C. jejuni*, *C. coli* og *C. lari* ved PCR, er hippurat negative og nalidixinsyre sensitive. Alle stammer isolert fra vann (n=45), ble ribotypet, disse er presentert i et dendogram (Figur 6). Totalt er 10 isolater identifisert med DuPont ID og blant disse er ni ulike DUP-PST1 ID nummer identifisert. Dette viser at vann har mange ulike stammer, fordi *Campylobacter* kan tilføres vann fra mange ulike kilder. Dette kan være kloakk, avløpsvann fra slakterier, ved avrenning fra gjødselkjellere og husdyrbeiter, dyr og fra ville fugler (Kapperud 2007a). Blant *C. spp.* isolatene (n=21), var det bare en som ble gitt en DUP-ID og den ble klassifisert som *C. hyointestinalis* DUP-PST1-1170. Ingen av *C. coli* (n=2) ble gitt en DUP-ID. Fem av *C. jejuni* isolatene (n=17) og fire av *C. lari* isolatene (n=4) ble gruppert i DUP PST1 ribotyper. *C. lari* fordelte seg i tre ribogrupper, DUP-PST1-1166, DUP-PST1-1178 og DUP-PST1-1179. De to første er funnet regelmessig blant mennesker og fjørfe isolater (Rosef et al. 2008 submitted). Populasjons strukturen til *C. jejuni* har lenge vært lite forstått, men resultater basert på MultiLokus Sekvens Typing (MLST) har indikert at *C. jejuni* er en veldig divers organisme (Dingle et al. 2002, Meinersmann et al. 2002). Vi identifiserte 15 *C. jejuni* profiler (Figur 6), og fem ble identifisert; DUP-PST1-1122, DUP-PST1-1130, DUP-PST1-2000, DUP-PST1-2058 og DUP-PST1-2078. Klusteranalysen viser stor genetisk variasjon blant isolatene fra vann.

Det har blitt antatt at epidemiologisk slektskap mellom *Campylobacter* isolert fra dyr er proporsjonal med likheten mellom arts sereotype fordelingen. Den største likheten til human kliniske isolater har blitt observert i fjørfe isolater, mens andre fugler og domestiske dyr har vist mindre likhet (Munroe et al. 1983, Rosef et al. 1985). Imidlertid, så er denne uuttalte antagelsen ikke nødvendigvis korrekt. Siden de faktorene som er ansvarlige for virulens er ukjente, så er det mulig at mange miljø isolater ikke er patogene, selv om de tilhører samme art, er serologisk identiske og har tilhørighet til samme ribogruppe som kliniske isolat. På grunn av mangel på kunnskap om virulens faktorer og et stort antall av isolater fra overflatevann, må man ta spesielle forhåndsregler for å unngå risikoen for overføre campylobacteriose til vann (Rosef et al. 2001).

4.2. Kylling og and

Campylobacter finnes i tarmen hos fugler. Smittet kylling har bakterien i tarmen uten symptomer på sykdom, de kan skille ut mer enn ti millioner *Campylobacter* per gram avføring. Andelen slaktekyllingflokker smittet med *Campylobacter* varierer fra land til land. Norge har en spesielt lav forekomst med færre enn 5 % infiserte flokker, mens Danmark og Sverige har *Campylobacter* tilstede i mellom 20 og 40 % av flokkene. *Campylobacter* spres til hele flokken i løpet av noen dager. Gjennom slakting smittes kjøttet, også kjøttet fra ikke-infiserte flokker. Norge har blant verdens laveste forekomster av *Campylobacter* på kyllingkjøtt (Johnsen et al. 2006a). Vi isolerte en høy frekvens av termotolerante *Campylobacter*, 46 av 113 (40,7 %) svaberprøver fra kylling og and. Av de 113 prøvene ble 60 tatt fra kylling og 53 fra and. Det ble påvist færre positive svaberprøvene fra ender (24,5 %) enn fra kyllinger (50 %). Svaberprøver fra kyllinger ble tatt hos to dager, en uke, tre uker og åtte uker gamle kyllinger, og svaberprøvene fra ender ble tatt etter slakting. Ingen kyllinger var smittet med *Campylobacter* i de to første levedagene. Dette er i samsvar med hva andre har funnet (Berndtson et al. 1996, Corry & Atabay 2001), og kommer trolig av beskyttelsen som morens antistoffer (overført via eggeplommen) har mot spesielle *Campylobacter* (Sahin et al. 2003). Det kan også skyldes at liv-kyllingene blir kjøpt fra en gård som ikke er kontaminert med *Campylobacter*. Fra en til åtte uker gamle var en stor andel av kyllingene smittet. Norges lave andel av *Campylobacter* positive broiler flokker, kan delvis skyldes norsk praksis av å slakte ved ung alder som 4-5 uker, hvilket gir en kortere eksponeringstid enn flokker med lenger oppdrett (Johnsen 2006). På gården hvor vi isolerte prøvene har kyllingene og endene en lengre eksponeringstid, kyllingene ble slaktet ved en alder av 8-8,5 uker og endene ved 7,5 uker.

Vertikal overføring av *Campylobacter* fra høner til kyllinger er sjeldent (Newell & Fearnley 2003), dette innebærer at infeksjon er introdusert horisontalt via omgivelsene. Studier har vist at mangel på hygieniske barrierer, bruk av ikke desinfisert drikkevann og utilstrekkelige hygieniske barrierer er signifikante risiko faktorer for å innføre *Campylobacter* til broiler kyllinger (Adkin et al. 2006). Vi tok prøver av drikkevannet fra ulike steder på gården. Produsenten får vann fra offentlig vannverk og borebrønn som i utgangspunktet skal være fri for *Campylobacter*. Våre prøver underbygger dette da vi ikke kunne påvise *Campylobacter*, men siden vi bare tok prøver av drikkevannet den 15.5.2006 kan vi ikke se bort i fra at drikkevannet kan ha vært kontaminert. Det er kjent at drikkevann har betydning

for smitte til fjørfebesetninger. Her har en observert VBNC som trolig kan ha betydning for kontamineringen. *Campylobacter* konsentrasjonen i vann kan også ha vært betydelig forsterket i den forventede sommer toppen, på grunn av en økt *Campylobacter* konsentrasjon i avrenning under beite og vekst sesong enn resten av året. *Campylobacter* konsentrasjonen i overflatevann har vist seg å øke etter episoder med mye regn på grunn av økt avrenning (Signor et al. 2005). Andre risiko faktorer som er viktige er ventilasjon (Hald et al. 2004), tilstedeværelse av fluer for fluer kan opptre som en vektor for å transportere *Campylobacter* fra infisert møkk i miljøet (Rosef & Kapperud 1983, Hald et al. 2004). Nærvær av andre gårds dyr vil øke konsentrasjonen av *Campylobacter* i miljøet og utgjøre en risiko for smitte. Dette gjelder spesielt husdyr, men også kjæledyr og ville dyr (Padungton & Kaneene 2003). *Campylobacter* kan overleve flere uker i kloakk og gjødsel. Dette betyr at gjødsel fra en positiv flokk deponert ute vil utgjøre en betydelig *Campylobacter* kilde. Villfugl kan i neste omgang bidra til at bakterien spres til miljøet rundt kyllinghusene og til nabogårder (Corry & Atabay 2001). Svaberprøvene fra kylling og and viste at foruten de to dager gamle kyllingene så var flokkene infisert. En høy forurensing av fjørfehus-interiør kan muligens bli forklart med en konstant tilførsel fra infiserte fugler. Tidligere undersøkelser viser at det er en lav deteksjons rate av *Campylobacter* fra overflater og tørre materialer, dette gjelder både i omgivelsene ute og i slakteriet. Dette kan forklares med bakteriens sensitivitet til oksygen, lav vann aktivitet og tørke (Jacobs-Reitsma 2000). *Campylobacter* blir ofte isolert fra fuktige steder som vanddammer, skoldings bad, gulv eller avløp (Johnsen 2006c), og er i henhold til det faktum at *Campylobacter* trives best i våte omgivelser (Corry & Atabay 2001). Videre er det rapportert at *Campylobacter* har blitt værende igjen inne i vannsystemet til kyllingene og kan være en smittekilde til etterfølgende flokker (Corry & Atabay 2001). Dette viser viktigheten av rengjørings rutiner og desinfeksjon. Johnsen (2006) fant en høy genetisk diversitet blant *C. spp* isolater fra slakteri og fra miljøet utenfor kyllinghus og slaktekyllinghus. *Campylobacter* ble funnet i avføringsprøvene fra hund og fugl, i vannprøver, på gårdsplassen, på støvler og på traktorhjul. Vi isolerte *C. jejuni* (73,9 %), *C. coli* (17,4 %) og *C. lari* (8,7 %) ved hjelp av multipleks PCR. Fra tre av prøvene er det isolert både *C. jejuni* og *C. lari* (Tabell 4), hvilket medførte 46 stammer fra kylling og and. Ved biotyping har disse tre prøvene blitt verifisert som *C. lari*. Frekvensen av *C. jejuni* er høy, det kan bekreftes av tidligere studier at de fleste stammene som isoleres fra fjørfe tilhører *C. jejuni*. Fra rått fjørfe kjøtt er det isolert 73 % *C. jejuni* og 27 % *C. coli* (Harmon et al. 1997). *C. jejuni* er ansvarlig for ca 90 % av tilfellene ved human campylobacteriose, dette kan bety at *C. jejuni* er mer effektiv i å kolonisere og forårsake sykdom hos mennesker enn de andre

Campylobacter artene. Det er derfor viktig å begrense smitteoverføring mest mulig. *C. jejuni* har også evne til å danne biofilm og kan derfor opprettholdes i miljøet over lengre tid (Joshua et al. 2005). Resultatene fra biotyping er ikke helt entydige med de fra multiplex PCR. Det er blant annet fem prøver som ved multiplex PCR er identifisert som *C. jejuni*, disse er hippurat negative. Hippurat negative *C. jejuni* stammer er uvanelig (Slater & Owen 1997). En studie har vist at 1,6 % av menneske og fjørfe *C. jejuni* stammer har blitt rapportert som hippurat negative dette er i henhold til resultatene fra kvantitative DNA hybridisering og hippurat hydrolyse tester (Totten et al. 1987).

Alle stammer isolert fra kylling og and (n=46), ble ribotypet, disse er presentert i et dendrogram (Figur 7). Totalt er 26 isolater identifisert med DuPont ID og ni ulike DUP-PST1 ID nummer er identifisert. Dendrogrammet viser at isolatene fra kylling og and kunne deles i to hovedgrupper, de 39 isolatene i hovedgruppe 1 fordeler seg i fire undergrupper (a-d), undergruppe a består av fem *C. lari* isolater alle i denne gruppen har alle blitt gitt en DUP-ID; DUP_PST1-1166 (n=4) og DUP_PST1-1181 (n=1). Undergruppe b består av 10 *C. jejuni* isolater, tre isolater i denne gruppen har blitt gitt DUP-ID; DUP_PST1-2050 (n=2) og DUP_PST1-1146 (n=1). Undergruppe c består av 14 *C. jejuni* isolater, men ingen av disse har fått en DUP-ID. I undergruppe d har alle de 10 *C. jejuni* isolatene fått en DUP-ID; DUP_PST1-2061 (n=5), DUP_PST1-1131 (n=4) og DUP_PST1-2086 (n=1). Hovedgruppe 2 består av 8 *C. coli* isolater som alle har fått en DUP-ID; DUP_PST1-1211 (n=6) og DUP_PST1-1140 (n=2). Av de 30 isolatene fra kylling ble 22 isolater identifisert som *C. jejuni* og 8 isolater *C. coli* og 23,3 % fikk DUP-ID. Av de 13 isolatene fra and ble det identifisert 12 *C. jejuni* og fire *C. lari* og 69,2 % fikk DUP-ID. At isolatene kan gis en DUP-ID indikerer at denne varianten av f.eks *C. jejuni* tidligere er isolert og identifisert. Dette kan bety at det er isolert mer fra and enn kylling. Resultatene våre viser at kylling og and har stort sett ulik DUP-ID, men DUP_PST1-1131 er isolert fra begge grupper. Klusteranalysen viser stor genetisk variasjon blant isolatene fra kylling og and.

Handlingsplan mot *Campylobacter* i norsk slaktekylling ble etablert i april 2001. Planen er tredelt og består av et overvåkingsprogram, oppfølging av positive besetninger og produktundersøkelser. Både tilsynsetater, forvaltningsstøtteinstitusjoner og fjørfebransjen deltar. Resultatet av dette er at vi nå har relativt god kjennskap til forekomsten av infeksjonen hos slaktekylling og har mulighet til å iverksette tiltak for å unngå at positive slakt blir sendt ubehandlet ut på markedet. Det er sannsynlig at utbrudd av campylobacteriose blir oversett fordi det mangler enkle, sensitive metoder til å foreta løpende overvåking. Store utbrudd vil være lettere å oppdage enn små for eksempel slike der fjørfekjøtt er smitekilden. Denne

skjevheten kan føre til at blant annet fjørfekjøtt blir undervurdert som smittekilde i utbrudd i forhold til drikkevann, som har hatt mange omfattende utbrudd av campylobacteriose (Kapperud 2007b).

4.3. Gris

Slaktegris kan være en mulig kilde til *Campylobacter* infeksjon hos mennesker. Dette kan skje ved at kjøtt blir kontaminert under slakteprosessen. Matsikkerheten kan forbedres ved å forsøke å redusere/ fjerne *Campylobacter* på produksjons nivå eller ved å begrense kontamineringen under slakteprosessen. *C. coli* står for om lag 10 % av de registrerte campylobacteriose tilfellene hos mennesker. Det ble isolert en høy frekvens av termotolerante *C. coli* i våre prøver fra slaktegris. Av totalt 100 svaberprøver ble det isolert 88 stammer *Campylobacter* (88 %) og det er tidligere påvist en bærerfrekvens på over 90 % i Norge (Rosef et al.1986). En høy isoleringsrate av *C. coli* i feces hos gris er også rapportert fra store deler av verden, fra 66 til 100 % (Guevremont et al. 2004). Det er grunn til å tro at dette gjelder for de fleste besetninger av slaktegris også i Norge. En lavere isolerings frekvens kan gjenspeile dårligere laboratorie metoder og analyseteknikker, enn at det er en forskjell i forekomst (Varela et al. 2007). Isoleringseffektiviteten av *Campylobacter* fra gris avhenger av kvaliteten på de prøvene som blir tatt og frekvensen kan være høyere enn våre tall viser. Av det tilfeldige utvalget fra 10 besetninger vi testet, viste prøvene at alle besetningene var bærere av *Campylobacter*. De 12 prøvene vi ikke har isolater fra representerer 4 besetninger, A, D, I og J.

Av de totalt 88 isolerte stammene av *Campylobacter* ble 86 karakterisert som *C. coli* (97,7 %) 1 som *C. jejuni* (1,1 %) og 1 som *C. lari* (1,1 %) Det er i samsvar med tidligere studier at *C. coli* isoleres langt oftere hos gris enn andre *C. spp.* Fra en av prøvene har vi isolert både *C. jejuni* og *C. coli*.

Ved bruk av naturgjødsel fra gris kan smitten opprettholdes en tid i jordsmonnet. Varmere klima og flom kan øke antallet av fluer og insekter som kan spre organismen, og ved mye nedbør og flom vil utvasking fra jorder gjødslet med husdyrgjødsel kunne spre bakterien til elver og bekker. Det er derfor viktig at vann som brukes til irrigasjon ikke er kontaminert om en skal vanne vekster som skal brukes til dyrefôr. Mange gårder har private drikkevanns kilder fra borebrønner eller fra overflatevann. Vann som brukes som drikkevannkilde til

husdyr bør kontrolleres for *Campylobacter*. Husdyr røkteren kan også bidra til smittespredning ved å bevege seg mellom områder som er kontaminerte med bakterien og områder som ikke er det. Hygiene for å unngå smittespredning i fjøs, ved dyretransport, på slakteri og for personer som arbeider med dyra er viktig. Bakterien kan spres ved direkte kontakt mellom mennesker eller mellom mennesker og dyr. Slaktegris føres opp i store besetninger og smitte spres raskt mellom dyra. Det er tidligere vist at *C. jejuni* har evne til å danne biofilm, og det er naturlig å tro at dette også gjelder for *C. coli* (Joshua et al. 2005) *Campylobacter* kan ved stress omdannes til en viable but not culturable (VBNC) tilstand (Hudock et al. 1998). Bakteriene forblir potensielt patogene og smitte kan spres videre. De nevnte forholdene viser at *Campylobacter* stadig tilføres og sørger for en kontinuerlig flyt av bakterien i miljøet hvor slaktegris ales opp. Gris er frisk bærer av *C. coli*, men svinekjøtt blir likevel ikke regnet blant de viktigste smitekilder til mennesker (Folkehelseinstituttet 2005). Faktorene som er ansvarlig for virulens hos *Campylobacter* er ikke kjent. Det kan være mulig at mange av isolatene ikke er patogene selv om de tilhører samme art, er serologisk like og tilhører samme ribogruppe. På grunn av det høye antall isolater fra slaktegris bør spesielle hygieniske hensyn tas.

Ribotyping ble brukt for å kunne sammenligne våre ribotyper med ribotypemønstre som tidligere er lagret i RiboPrinter® biblioteket med DUP_PST1 ID. Dette gir oss muligheten til å sammenligne ribotypemønstre med andre brukere av RiboPrinter. Flere ulike ribotyper ble funnet i våre prøver fra slaktegris. Nitten isolater ble identifisert med DuPont ID og totalt er fem ulike DUP_PST1 ID nummer identifisert. Fem av stammene grupperte seg ikke inn i klustere. Figur 8 viser dendrogrammet for slaktegris. Av de 81 isolatene er 19 *C. coli* identifisert med DuPont ID, DUP_PST1-1182 (n=6), DUP_PST1-1208 (n=10), DUP_PST1-1175 (n=1), DUP_PST1-1163 (n=1) og DUP_PST1-1140 (n=1). Dendrogrammet viser at isolatene kan inndeles i 2 hovedgrupper. Hovedgruppene deler seg igjen inn i 5 undergrupper (a-e). Undergruppe a og c identifiserer ingen av isolatene med DUP_PST1 ID. Undergruppe b identifiserer flest DUP-ID, DUP_PST1-1208, DUP_PST1-1182 og DUP_PST1-1175 og representerer 16 isolater, disse er fra besetningene A, D, I og J. Undergruppe d identifiserer en stamme, DUP_PST1-1163, fra besetning J. Isolatene i undergruppe e samler 15 isolater fra besetning D, og en av isolatene er gitt DUP_PST1-1140. DUP_PST1-1140 er også identifisert i kylling (Figur 7). Undergruppene a, b, c og d samler isolater fra flere besetninger. DUP_PST1-1208 dominerer og er identifisert 10 ganger fra besetning I og J. DUP_PST1-1182 er identifisert 6 ganger fra besetning D og I.

Klusteranalysen viser stor genetisk variasjon blant isolatene fra slaktegris, både innen besetningen og mellom besetninger. Denne studien viser at *C. coli* er den dominerende *Campylobacter* art hos slaktegris, i samsvar med andre studier kan gris betraktes som et øreservoar for *C. coli*. Forsøk på å utrydde *Campylobacter* fra besetning og produksjonslokaler kan være vanskelig da griser er friske bærere. Spredning av bakterien kan kontrolleres ved hygienisk slakting.

Litteraturliste

- Adkin, A., Hartnett, E., Jordan, L., Newell, D. & Davison, H.** 2006. Use of a systematic review to assist the development of *Campylobacter* control strategies in broilers. *J. Appl. Microbiol.* 100: 306-315.
- Alterkruse, S.F., Hunt, J.M., Tollefson, L.K. & Madden, J.M.** 1994. Food and animal sources of human *Campylobacter jejuni* infection. *J. Am. Vet. Med. Asso.* 204: 57-61.
- Alterkruse, S.F., Stern, N.J., Fields, P.I. & Swerdlow, D.L.** 1999. *Campylobacter jejuni* - an emerging foodborne pathogen. *Emerg. Infect. Dis.* 5: 28-35.
- Baffone, W., Casaroli, A., Citterio, B., Pierfelici, L., Campana, R., Vittoria, E., Guaglianone, E. & Donelli, G.** 2006. *Campylobacter jejuni* loss of culturability in aqueous microcosms and ability to resuscitate in a mouse model. *Int. J. Food Microbiol.* 107: 83-91.
- Berndtson, E., Danielsson-Tham, M.L. & Engvall A.** 1996. *Campylobacter* incidence on a chicken farm and the spread of *Campylobacter* during the slaughter process. *Int. J. Food Microbiol.* 32: 35-47.
- Black, R.E., Levine, M.M., Clements, M.L., Hughes, T.P. & Blaser, M.J.** 1988. Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *J. Infect. Dis.* 157: 472-479.
- Blaser, M.J., Hardesty, H.L., Powers, B. & Wang, W.L.** 1980. Survival of *Campylobacter fetus subsp. jejuni* in Biological Milieus. *J. Clin. Microbiol.* 11: 309-313.
- Blaser, M.J., Taylor, D.N. & Feldman, R.A.** 1983. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections. *Epidemiol. Rev.* 5: 157-176.
- Blaser M.J., Taylor, D.N. & Feldman, R.A.** 1984. Epidemiology of *Campylobacter* infections. In: J. P. Butzler (ed): *Campylobacter* infection in man and animals. CRC Press, Inc., Boca Ration, Florida: 143-162.

- Brennhovd, O. & Kapperud, G.** 1991. Forekomst av *Campylobacter* spp. og *Yersinia* spp. i et vassdrag påvirket av forurensning fra jordbruk og avløpsvann (The prevalence of thermotolerant *Campylobacter* spp. and *Yersinia* spp. in water polluted by agricultural activity and from waste water) In: Brennhovd O. (ed) Termotolerante *Campylobacter* spp. og *Yersinia* spp. i noen norske vannforekomster. Ph.D. Thesis, Norwegian College of Veterinary Medicine, Oslo.
- Broman, T., Waldenström, J., Dahlgren, I., Carlsson, I. & Olsen, B.** 2004. Diversities and similarities in PFGE profiles of *Campylobacter jejuni* isolated from migrating birds and humans. *J. Appl. Microbiol.* 96: 834-843.
- Bryan, F.L. & Doyle, M.P.** 1995. Health risks and consequences of *Salmonella* and *Campylobacter jejuni* in raw poultry. *J. Food Prot.* 58: 326-344.
- Burnett, T.A., Hornitzky, M.A., Kuhnert, P. & Djordjevic, S.P.** 2002. Speciating *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from poultry and humans using six PCR-based assays. *FEMS Microbiol. Lett.* 216: 201–209.
- Butzler, J.P., Dekeyser, P., Detrain, M. & Dehaen, F.** 1973. Related vibrio in stools. *J. Pediatr.* 82: 493-495.
- Butzler, J.P. & Oosterrom, J.** 1991. *Campylobacter*: Pathogenicity and significance in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 12: 1-8.
- Butzler, J.P., & Skirrow, M.B.** 1979. *Campylobacter* enteritis. *Clin. Gastroenterol.* 8: 737-765.
- Corry, J.E.L. & Atabay, H.I.** 2001. Poultry as a source of *Campylobacter* and related organism. *Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.* 90: 96-114.
- Corry, J.E.L., Post, D.E., Colin, P. & Laisney, M.J.** 1995. Culture media for the isolation of *Campylobacters*. *Int. J. Food Microbiol.* 26: 43-76.

- Dahl, O.P. & Melby, K.** 1987. En vannbåren epidemic forårsaket av *Campylobacter jejuni*. Tidsskr. Nor. Lægeforen. 107: 349-351.
- Dekeyser, P., Gossuin-Detrain, M., Butzler, J.P. & Sternon, J.** 1972. Acute enteritis due to related *vibrio*: first positive stool cultures. J. Infect. Dis. 125: 390-392.
- Dingle, K.E., Colles, F.M., Ure, J.R., Wagenaar, A., Duim, B., Bolton, F.J., Fox, A.J., Wareing, D.R. & Maiden, M.C.** 2002. Molecular characterization of *Campylobacter jejuni* clones: a basic for epidemiological investigation. Emerg. Infect. Dis. 8: 949-955.
- Doyle, M.P.** 1984. *Campylobacter* in foods. In: J. P Butzler (ed.): *Campylobacter* infection in man and animals. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida: 163-180.
- Escherich, T.** 1886. Articles adding to the knowledge of intestinalbacteria, III. On the existence of *vibrios* in the intestines and feces of babies. Munch. Med. Wochenschr. 33: 815-817.
- Evans, M.R., Ribairo, C.D. & Salmon, R.L.** 2003. Hazards of healthy living: bottled water and salad vegetables as risk factors for *Campylobacter* infection. Emerg. Infect. Dis. 9: 1219-1225.
- Farber, J.M.** 1996. An introduction to the hows and whys of molecular typing. "J. Food Prot. 59: 1091-1101.
- Folkehelseinstituttet** 2005: <http://www.fhi.no>: Campylobacteriose. Publisert 11.11.2005, oppdatert: 6.3.2008.
- Friedman, C.R., Neimann, J., Wegener, H.C. & Tauxe, R.V.** 2000. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. In: Nachamkin, and M.J. Blaser (ed.) *Campylobacter*. Am. Soc. Microbiol. Washington, USA: 121-138.

- Frost, J.A.** 2001. Current epidemiological issues in human campylobacteriosis. Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol. 90: 85-95.
- Gondrosen, B.** 1986. Survival of thermotolerant *campylobacters* in water. Acta. Vet. Scand. 27: 1-10.
- Guevremont E, Higgins R, Quessy S.** 2004. Characterization of *Campylobacter* isolates recovered from clinical healthy pigs and from sporadic cases of campylobacteriosis in humans. J. Food Prot. 67: 228-234.
- Hald, B., Skovgård, H., Bang, D.D., Pedersen, K., Dybdahl, J., Jespersen, J.B. & Madsen, M.** 2004. Flies and *Campylobacter* infection of broiler flocks. Emerg. Infect. Dis. 10: 1490-1492.
- Hani, E.K. & Chan, V.L.** 1995. Expression and characterization of *Campylobacter jejuni* benzoylglycine amidohydrolase (hippuricase) gene in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 177: 2396–2402.
- Harmon, K.M., Ransom, G.M. & Wesley, I.V.** 1997. Differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by polymerase chain reaction. Mol. Cell. Probes 11: 195-200.
- Heier, B.T., Nygård, K. & Kapperud, G.** 2006. Campylobacteriose i Norway 2005. Common. Dis. Rep. 34, Norwegian Institute of public Health, Norway.
- Hudock, J.F., Borger, A.C. & Kaspar, C.W.** 1999. Physiological Characterization of Viable-but-Nonculturable *Campylobacter jejuni* Cells. Appl. Environ. Microbiol. 65: 1110– 1116.
- Hwang, M & Ederer, M.G.** 1975. Rapid Hippurate Hydrolysis Method for Presumptive Identification of Group B *Streptococci*. J. Clinic. Microbiol. 114-115.
- Jacobs-Reitsma, W.F.** 2000. *Campylobacter* in the food supply. In: I. Nachamkin, and M.J. Blaser(eds.) *Campylobacter*. Am. Soc. Microbiol. Washington, USA: 467-481.

- Johnsen, G.** 2006. *Campylobacter* in Norwegian poultry production. Norwegian School of Veterinary Science. Oslo.
- Johnsen, G., Hofshagen, M. & Kruse, H.** 2006c, Genotyping of *Campylobacter jejuni* from broiler carcasses and slaughterhouse environment by amplified-fragment length polymorphism. Poultry Sci. 85: 2278-84.
- Johnsen, G., Kruse, H. & Hofshagen, M.** 2006a. Genetic diversity and description of transmission routes for *Campylobacter* on broiler farms by amplified-fragment length polymorphism. J. Appl. Microbiol. 101: 1130-1139.
- Johnsen, G., Zimmerman, K., Lindstedt, B-A., Vardund, T., Herikstad, H. & Kapperud, G.** 2006b. Intestinal carriage of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* among cattle from South-western Norway and comparative genotyping of bovine and human isolates by amplified-fragment length polymorphism. Acta Vet. Scand. www.actavetscand.com/content/1/1/4.
- Joshua, G.W.P., Guthrie-Irons, C., Karlyshev, A.V. & Wren, B.W.** 2005. Biofilm formation in *Campylobacter jejuni*. Microbiology 152 (2006), 387-396; DOI 10.1099/mic.0.28358-0. © 2006 [Society for General Microbiology](#)
- Kapperud, G.** 1994. Campylobacterinfeksjon, epidemiologi, risikofaktorer og forebyggende tiltak. Tidsskr. Nor. Lægefor. 114: 745-799.
- Kapperud, G.** 2007a. *Campylobacter* i: Granum, P. E. (ed.). Matforgiftning; næringsmiddelbårne infeksjoner og intoksikasjoner. Høyskoleforlaget, Kristiansand: 84-97.
- Kapperud, G.** 2007b. *Campylobacter* i: Granum, P. E. (ed.). Matforgiftning; næringsmiddelbårne infeksjoner og intoksikasjoner. Høyskoleforlaget, Kristiansand: 24-47.

- Kapperud, G., Espeland, G., Wahl, E., Walde, A., Herikstad, H., Gustavsen, S., Tveit, I., Natås, O., Bevanger, L. & Digranes, A.** 2003. Factors Associated with Increased and Decreased Risk of *Campylobacter* Infection: A Prospective Case-Control Study in Norway. *Am. J. Epidemiol.* 158: 234-242.
- Koenraad, P.M.F.J., Rombouts, F.M. & Notermans, S.H.W.** 1997. Epidemiological aspects of thermophilic *Campylobacter* in water-related environments: a review. *Water Environ. Res.* 69: 52-63.
- Lastovica, A.J. & Skirrow M.B.** 2000. Clinical significance of *Campylobacter* and related species other than *Campylobacter jejuni* and *C.coli*. In: I. Nachamkin, and M.J. Blaser (eds.) *Campylobacter*. Am. Soc. Microbiol. Washington, USA: 89-120.
- Lawson, A.J., Linton, D., Stanley, J. & Owen, R.J.** 1997. Polymerase chain reaction and speciation of *Campylobacter upsalensis* and *C.helveticus* in human faeces and comparison with culture techniques. *J. Appl. Microbiol.* 83: 375-380.
- Lerner, J., Brumberger, V. & Preac, M.** 1994. Severe diarrhea associated with *Arcobacter butzleri*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 13: 660-662.
- Lior, H., Woodward, D.L., Edgar, J.A., Roche, L.J. & Gill, P.** 1982. Serotyping of *Campylobacter jejuni* by slide agglutination based on heat-labile antigenic factors. *J. Clin. Microbiol.* 15: 761-768.
- Melby, K., Gondrosen, B., Gregusson, S., Ribe, H. & Dahl, O.P.** 1991. Waterborne campylobacteriosis in Northern Norway. *Int. J. Food Microbiol.* 12: 151-156.
- Meinersmann, R.J., Patton, C.M., Evins, G.M., Wachsmuth, I.K. & Fields, P.I.** 2002. Genetic diversity and relationships of *Campylobacter* species and subspecies. *Int. J. Evol. Microbiol.* 52: 1789-1797.
- Mentzing, L.O.** 1981. Water borne outbreak of *Campylobacter* enteritis in Central Sweden. *Lancet* ii: 352-354.

- Munroe, G.L., Prescott, J.F. & Penner, J.L.** 1983. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* serotypes isolated from chickens, cattle, and pigs. *J. Clin. Microbiol.* 18: 877-881.
- Nachamkin, I. & Blaser M.J.** 2000. *Campylobacter*. Am. Soc. Microbiol. Washington; USA.
- Nachamkin, I., Engeberg, J. & Aarestrup, F.M.** 2000. Diagnosis and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* species. In: I. Nachamkin, and M. J. Blaser (eds.) *Campylobacter*. Am. Soc. Microbiol. Washington, USA: 45-66.
- Newell, D.G. & Fearnley, C.** 2003. Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4343-4351.
- Nygård, K., Gondrosen, B. & Lund, V.** 2003. Sykdomsutbrudd forårsaket av drikkevann i Norge. *Tidsskr. Lægeforen.* 123: 3410-3.
- Padungton, P. & Kaneene, J.B.** 2003. *Campylobacter* spp. in human, chickens, pigs, and their antimicrobial resistance. *J. Vet. Med. Sci.* 65: 161-170.
- Penner, J.L. & Hennessy, J.N.** 1980. Passive hemagglutination technique for serotyping *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* on the basis of heat-stable antigens. *J. Clin. Microbiol.* 12: 732-737.
- Robinson, D.A.** 1981. Infective dose of *Campylobacter jejuni* in milk. *Br. Med. J.* 282: (6276) 1584.
- Rosef, O., Kapperud, G., Gondrosen, B., & Nesbakken, T.** 1986. *Campylobacter jejuni* og *Campylobacter coli* i næringsmiddelhygienisk og epidemiologisk sammenheng. *Nor. Vet. Tidsskr.* 98: 103-110.
- Rosef, O. & Kapperud, G.** 1983. House flies (*Musca domestica*) as possible vectors of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 381-383.

- Rosef, O., & Kapperud, G.** 1982. Isolering og identifikasjon av *Campylobacter fetus* subspecies *jejuni*. Nor. Vet. Tidsskr. 94: 1.
- Rosef, O., Kapperud, G., Lauwers, S. & Gondrosen, B.** 1985. Serotyping of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Campylobacter laridis* from domestic and wild animals. Appl. Environ. Microbiol. 49: 1507-1510.
- Rosef, O. & Mork, A.V.** 1985. Kontaminert brønnvann som årsak til *Campylobacter*-diarè. Nor. Vet. Tidsskr. 97: 831-832.
- Rosef, O., Rettedal, G. & Lågeide, L.** 2001. Thermophilic *campylobacters* in surface water: a potential risk of campylobacteriosis. Int. J. Environ. Health Res. 11: 321-327.
- Rosef, O., & Rosef, L.** 2005. Helse og miljø-mikrobiologi. Fenris forlag. s.189-195. ISBN. 82-91768064
- Rosef, O., Stølan, A., Bråthen, E.M., & Paulauskas, A.** 2008. Diversity of thermophilic *Campylobacter* isolated from Bø river water in Norway. Vit. Med. Zootech. Submitted.
- Ross, C. & Donnison, C.A.** 2003. *Campylobacter* and farm dairy effluent irrigation. N.Z. J. Agric. Res. Vol. 46: 255-262.
- Sahin, O., Luo, N., Huang, S. & Zhang, Q.** 2003. Effect of *Campylobacter*-specific maternal antibodies on *Campylobacter jejuni* colonization in young chickens. Appl. Environ. Microbiol. 69: 5372-5379.
- Signor, R.S., Roser, D.J., Ashbolt, N.J. & Ball, J.E.** 2005. Quantifying the impact of runoff events on microbiological contaminant concentrations entering surface drinking source waters. J. Water Health. 3: 453-468.
- Skirrow, M.B.** 1977. *Campylobacter* enteritis: a "new" disease. Br. Med. J. 2: 9-11.

- Skirrow, M.B.** 1994. Diseases due to *Campylobacter*, *Helicobacter* and related bacteria. J. Comp. Pathol. 111: 113-149.
- Slater, E.R. & R.J. Owen.** 1997. Restriction fragment length polymorphism analysis shows that the hippuricase gene of *Campylobacter jejuni* is highly conserved. Lett. Appl. Microbiol. 25: 274-278.
- Smibert, R.M.** 1978. The genus *Campylobacter*. Ann.Rev. Microbiol. 32: 673-709.
- Smith, T. & Taylor, M.** 1919. Some morphological and biological characters of the spirilla (*Vibrio fetus*, n. sp) associated with disease of the fetal membranes in cattle. J. Exp. Med. 30: 299-311.
- Steltzer, W., Jacob, J. & Schulze, E.** 1991. Review: Environmental aspects of *Campylobacter* infections. Zentralbl. Mikrobiol. 146: 3-15.
- Tarkowski, J.A., Stotter, S.C., Beumer, R.R. & Kampelmacher, E.H.** 1984. Low dose gamma irradiation of raw meat. I. Bacteriological and sensory quality effects in artificially contaminated samples. Int. J. Food Microbiol. 1: 13-23.
- Tauxe, R.V.** 1997. Emerging foodborne diseases: an evolving public health challenge. Emerg. Infect. Dis. 3: 425-34.
- TemaNord** 2008. 507. Betydningen for Norden av 2 grader global oppvarming. Vurdering av sårbarhet og effekter av klimaendringer. © Nordisk Ministerråd, København.
- Thomas, C., Hill, D.J. & Mabey, M.** 1999. Evaluation of temperature and nutrients on the survival of *Campylobacter* spp. In water microcosms. J. Appl. Microbiol. 86: 1024-1032.
- Totten, P.A., Patton, C.M., Tenover, F.C., Barret, T.J., Stamm, W.E., Steigerwalt, A.G., Lin, J.Y., Holmes, K.K. & Brenner, D.J.** 1987. Prevalence and characterization of hippurate-negative *Campylobacter jejuni* in King County, Washington. J. Clin. Microbiol. 25: 1747-1752.

- Vandamme, P.** 2000. Taxonomy of the family Campylobacteraceae In: I. Nachamkin, and M.J. Blaser (eds.) *Campylobacter*. Am. Soc. Microbiol. Washington, USA: 3-26.
- Varela, N.P., Friendship, R.M. & Dewey, C.E.** 2007. Prevalence of *Campylobacter* spp. isolated from grower-finisher pigs in Ontario. *Can. Vet. J.* 48: 515–517.
- Varslot, M., Ressel, J. & Fostad, I.G.** 1996. Vannbåren campylobacterinfeksjon- trolig forårsaket av kortnebbgjess. *Tidsskr. Nor. Lægeforen.* 3366-3369.
- Veterinærinstituttet.** 2008. <http://www.vetinst.no>. Campylobacteriose og *Campylobacter*. Andersen. S. Oppdatert 13.03.2008.
- Vogt, R.L., Sours, H.E., Feldmann, R.A., Dickinson, R.J. & Witherell, L.** 1982. *Campylobacter* enteritis associated with contaminated water. *Ann. Intern. Med.* 96: 292-296.
- Waldenström, J.** 2005. Epidemiology and population structure of *Campylobacter jejuni* and related organisms in wild birds. PhD thesis, Department of Ecology, Lund University, Sweden.
- Wang, G., Clark, C. G., Taylor, T. M., Pucknell, C., Barton, C., Price, L., Woodward, D.L & Rodgers, F.G.** 2002. Colony Multiplex PCR Assay for Identification and Differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *Fetus*. *J. Clin. Microbiol.* 40: 4744-4747

Vedlegg

Vedlegg 1: Poster presentert ved “27th Food Microbiology Symposium”, University of Wisconsin-River Falls, USA.

Vedlegg 2: Poster presenteres ved International Scientific Conference, 6 juni 2008, Kaunas, Litauen.