

# Opzetten van ringonderzoeken voor *Campylobacter* toepasbaar binnen het monitoringsonderzoek in de vleeskuikenhouderij

Ria van der Hulst-van Arkel, Wilma Jacobs-Reitsma, Marcel van Bergen en Miriam Koene

Rapport nummer ASG07-100360  
Project nummer 2032551000

Lelystad, april 2007

Animal Sciences Group van Wageningen UR  
Divisie Infectieziekten  
Postbus 65  
8200 AB Lelystad  
Tel: +31 320 238238/445

E-mail: [ria.vanderhulst@wur.nl](mailto:ria.vanderhulst@wur.nl)

Dit onderzoek werd uitgevoerd in opdracht van het Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit

Titel: Opzetten van ringonderzoeken voor Campylobacter, toepasbaar binnen het monitoringsonderzoek in de vleeskuikenhouderij

## Inhoudsopgave

Inhoudsopgave	2
1. Titel	3
2. Samenvatting	3
3. Inleiding	3
4. Materiaal en Methoden	4
4.1 Vooronderzoek	4
4.2 Ontwerp protocol	6
4.3 Pilot ringonderzoek	8
5. Resultaten/Discussie	11
5.1 Vooronderzoek	11
5.2 Pilot-ringonderzoek	14
5.3 Controlemonsters	14
6. Conclusie	19
6.1 Vooronderzoek	19
6.2 Pilot ringonderzoek	20
6.3 Borstvellen	20
6.4 Protocol	20
6.5 Praktijk-Pilot ringonderzoek	20
7. Aanbevelingen	21
8. Referenties	21
Bijlage 1 Brief aan deelnemers	23
Bijlage 2 Procedurebeschrijving	24
Bijlage 3 Testrapport deel I (informatie over de gebruikte methoden)	26
Bijlage 4 Testrapport deel II (informatie over de gebruikte materialen)	28
Bijlage 5 Testrapport deel III (Resultaten)	29
Bijlage 6 Gebruikte media bij controle analyses door de aanbieder	31
Bijlage 7 Eindrapportage Pilot-Ringonderzoek Campylobacter, Augustus 2006.	33
Titel	35
Samenvatting	35
Inleiding	35
Materiaal en Methoden	35
Resultaten	37
Conclusie	38
Bijlage 1	39
Bijlage 2	40
Bijlage 3	41

Titel: Opzetten van ringonderzoeken voor Campylobacter, toepasbaar binnen het monitoringsonderzoek in de vleeskuikenhouderij

## 1. Titel

Opzetten van ringonderzoeken voor Campylobacter, toepasbaar binnen het monitoringsonderzoek in de vleeskuikenhouderij.

## 2. Samenvatting

Voor het Actieplan 2000+ van de Productschappen Vee, Vlees en Eieren (PVE) zijn ruim 20 laboratoria door PVE erkend om monsters afkomstig van pluimvee (mest en borstvel) te onderzoeken op Campylobacter. Voor het verkrijgen en behouden van deze erkenning moeten de laboratoria o.a. deelnemen aan relevante ringonderzoeken. Voor Campylobacter bestond tot op heden geen ringonderzoek waarbij de matrices mest en borstvel werden aangeboden. In dit onderzoek is een ringonderzoek ontwikkeld, waarbij naast reïnculturen ook mest en borstvel met en zonder Campylobacter worden aangeboden. Hiervoor is onderzoek verricht naar de beste manier om de monstermaterialen te besmetten in relatie tot het noodzakelijke bewaren en in verband met transport. Ook de wijze van transport, ontwerpen van formulieren en verwerking van resultaten is in het onderzoek meegenomen.

In een pilot ringonderzoek met 5 geselecteerde deelnemers is het ontwerp getest. De reïnculturen en de al dan niet besmette blindedarmmest gaven geen problemen, alle monsters (op 1 na) werden door de deelnemers juist beoordeeld. De borstvelmonsters zijn maar door 3 deelnemers geanalyseerd, waarbij niet altijd de juiste (door PVE voorgeschreven) methode is gebruikt en mogelijk daarom ook niet de juiste resultaten zijn gegenereerd.

De hier ontwikkelde procedure zal in 2007 in de praktijk bij de PVE erkende laboratoria worden getest.

## 3. Inleiding

De overheid heeft de verplichting om jaarlijks aan de EU te rapporteren aangaande het voorkomen en de bestrijding van zoönosen in Nederland. Hieronder vallen bijvoorbeeld ook monitoringsgegevens betreffende Campylobacter in pluimvee.

In het kader van het PVE Actieplan 2000+ (voorheen Plan van Aanpak) in de vleeskuikenhouderij worden door ruim 20 verschillende laboratoria analyses uitgevoerd op aanwezigheid van Campylobacter (en Salmonella) in diverse soorten monstermateriaal. Logischerwijs en efficiënt kan van deze gegevens ook gebruik worden gemaakt in de zoönosen rapportages naar de EU.

De laboratoria, die deze analyses uitvoeren, zijn door PVE erkend en zijn verplicht met regelmaat deel te nemen aan een ringonderzoek. Zo kan gecontroleerd worden of ze onderling vergelijkbare en juiste resultaten leveren.

In de periode 2000-2005 was 5-52 % van het Nederlandse levende pluimvee en 9-47 % van het eindproduct besmet met Campylobacter. Deze cijfers zijn gegenereerd uit de resultaten van het Actieplan Salmonella en Campylobacter pluimveevlees 2000+ van de PVE. De grote verschillen in besmettingspercentages worden veroorzaakt door o.a. de seizoenen en verbeterde analysemethode. In de zomer zijn veel meer monsters Campylobacter positief dan in de winter. In januari 2004 is overgeschakeld naar een verbeterde methode voor de detectie van Campylobacter in borstvel. Ophoping in CCDB is vervangen door Preston medium zonder bloed. Hierna steeg het percentage Campylobacter positieve borstvelen aanzienlijk in vergelijking met voorgaande jaren.

Titel: Opzetten van ringonderzoeken voor *Campylobacter*, toepasbaar binnen het monitoringsonderzoek in de vleeskuikenhouderij

Momenteel is een vleeskuikenbedrijf verplicht twee keer per jaar mestmonsters op te sturen voor onderzoek op aanwezigheid van *Campylobacter*. Van de koppels, die bij het vleeskuikenbedrijf worden bemonsterd worden in de slachterij vervolgens 30 blindedarmen voor onderzoek verzameld. Deze moeten bij 4°C worden bewaard en binnen 48 uur onderzocht zijn bij een door PVE erkend laboratorium.

Daarnaast vindt standaard, 1 x per dag eindproductencontrole in de slachterij en/of uitsnijderij, plaats waarbij 25 gram borstvel van 1 kuiken wordt geanalyseerd.

*Campylobacter* is een gecompliceerd micro-organisme, dat groeit onder speciale condities. Begeleidende flora kan de detectie van *Campylobacter* aanzienlijk bemoeilijken. In mest en op borstvelmonsters is deze begeleidende flora in grote mate aanwezig. Het gebruik van deze matrices (mest en borstvel) zijn daarom onontbeerlijk voor een goed vergelijkend ringonderzoek.

Het is voor een door PVE erkend laboratorium belangrijk om te bewijzen dat het in staat is *Campylobacter* aan te tonen in de gevraagde matrices.

Echter, er worden op dit moment geen ringonderzoeken met de gevraagde matrices aangeboden. Er zijn sterke aanwijzingen dat vooral op het gebied van *Campylobacter* de kwaliteit van de analyses niet optimaal is, waardoor een verkeerd beeld kan ontstaan aangaande de werkelijke *Campylobacter* besmetting in pluimvee.

Bij een bestaand ringonderzoek voor *Campylobacter* via Chek (1) is het mogelijk om de aan- of afwezigheid van *Campylobacter* spp. aan te tonen in blood-based medium. In Groot Brittannië wordt *Campylobacter* in gevriesdroogd rauw kippenvlees (Food Analysis Performance Assessment Scheme, FAPAS) (2) aangeboden.

Het in dit rapport ontwikkelde en beschreven ringonderzoek heeft tot doel de resultaten van erkende laboratoria te meten bij het analyseren van verschillende, al dan niet met *Campylobacter* besmette, matrices mest en borstvel. De ontwikkeling van het ringonderzoek is uitgevoerd volgens ILAC 2000 (4) en ISO/IEC Guide 43-1:1997 (5).

Het doel van het onderzoek is het ontwikkelen van een ringtest voor *Campylobacter*, waarbij ook de matrices mest en borstvel zijn betrokken. In een pilot met een beperkt aantal deelnemers wordt het ontworpen ringonderzoek inclusief informatie, formuleren, verzending, beoordeling en eindrapportage, getest.

## 4. Materiaal en Methoden

### 4.1 Vooronderzoek

Om de resultaten van de analyses naar aanwezigheid van *Campylobacter* goed te kunnen beoordelen is gekozen voor het gebruik van reïnculturen van zowel *Campylobacter*, als ook van een look-alike. Al dan niet met *Campylobacter* aangeënte blindedarminhoud (via swabs) en borstvelmonsters zijn rondgestuurd.

In vooronderzoek is de optimale besmettingswijze van de swabs met de betreffende micro-organismen onderzocht. Voor de reïnculturen is gebruik gemaakt van de bij ASG aanwezige stammen:

*Campylobacter jejuni* (C 356)

*Campylobacter coli* (BA 1311)

*Escherichia coli* (1610)

Naast *Campylobacter jejuni* en *Campylobacter coli* is ook gekozen voor een "look-alike" voor *Campylobacter*, een mestgerelateerde stam die groeit op CCDA medium, maar geen *Campylobacter* is. Dit is een tijdrovend gedeelte van het onderzoek geweest. De meeste geschikte stammen groeiden na verloop van tijd niet meer op CCDA onder microaërobe omstandigheden. Uiteindelijk is

Titel: Opzetten van ringonderzoeken voor *Campylobacter*, toepasbaar binnen het monitoringsonderzoek in de vleeskuikenhouderij

gekozen voor een stam, geïsoleerd uit kuikenmest en getypeerd als *Escherichia coli*. De *E.coli* stam is opgestuurd naar het RIVM voor verdere typering.

Om een indruk te krijgen van de beste methode voor het met *Campylobacter* besmetten van swabs is het uiteindelijke aantal kolonie vormende eenheden (kve) aanwezig op 5 swabs gemeten na:

- Met swab opnemen van de groei van *Campylobacter* van een hele plaat (HIS 48 uur 41,5°C, microaëroob)
- Met swab opnemen van de groei van *Campylobacter* van een halve plaat (HIS 48 uur 41,5°C, microaëroob)
- Met swab opnemen van de groei van *Campylobacter* van een kwart plaat (HIS 48 uur 41,5°C, microaëroob)
- Weken van de swab (soak methode) in met *Campylobacter* besmette vloeistof. Hiertoe wordt de groei van *Campylobacter* van een kwart plaat (HIS 48 uur 41,5°C, microaëroob) opgenomen in 1 ml fysiologische zoutoplossing (FZ) en gedurende 1 uur bij kamertemperatuur bewaard.

Vervolgens zijn de swabs in transportmedium geplaatst en nog 1 uur bij kamertemperatuur bewaard. Daarna is de swab in 9 ml FZ geplaatst en vanuit deze buis (beschouwd als  $10^{-1}$  verdunning) is een verdunningsreeks gemaakt en telkens 0,1 ml op CCDA medium uitgespateld voor een kwantitatieve bepaling van *Campylobacter*.

#### Bewaarprouf

Naar aanleiding van de resultaten is gekozen de bewaarprouf van de met *Campylobacter* besmette swabs uit te voeren door

- met de swab de groei van een halve plaat op te nemen en
- de soak methode  $\Rightarrow$  swabs te weken in een suspensie van *Campylobacter* in FZ

Na besmetten van de swab is deze in transportmedium gestoken (Amies met houtskool, Copan Venturi Transystem), 1 uur bij kamertemperatuur geplaatst en daarna gekoeld bewaard bij 4°C gedurende 7 dagen. Van 7 setjes monsters werden dagelijks 10 swabs bemonsterd.

5 swabs werden gebruikt voor de kwantitatieve *Campylobacter* bepaling (swab in 9 ml FZ =  $10^{-1}$  verdunning) en de 5 andere swabs werden rechtstreeks op CCDA uitgestreken (kwalitatief).

#### Swabs van blindedarminhoud

##### Proefdieren

Voor het verkrijgen van *Campylobacter* positieve en negatieve blinde darmen van vleeskuikens werden vijftien vleeskuikens (Ross 308) op 27 dagen leeftijd besmet met *Campylobacter jejuni* en tien kuikens werden gescheiden gehuisvest en niet besmet, voor het verkrijgen van *Campylobacter* negatieve blinde darmen.

*Campylobacter jejuni* (C 356) is opgekweekt op HIS Agar en gedurende 48 uur bij 41,5°C microaëroob geïncubeerd. Groei van een hele plaat werd afgeschraapt met een entoog en gesuspendeerd in 4 ml FZ oplossing. Hieruit werden tellingen ingezet en van de rest van de suspensie werd aan 15 kuikens 0,2 ml per kuiken oraal toegediend. Vervolgens is na 2 en 4 dagen gecontroleerd of de kuikens *Campylobacter* uitscheidde. De niet besmette kuikens werden gecontroleerd op afwezigheid van *Campylobacter*. Zeven dagen na infectie werden de kuikens geëuthanaseerd en de blindedarmen verwijderd. Vijf blindedarmen werden direct bemonsterd en 10 blindedarmen werden ingevroren bij -80°C, om te onderzoeken of de blindedarminhoud ook na invriezen nog te gebruiken was. De inhoud van de 5 blinde darmen, die direct werden bemonsterd, werd verzameld op aluminiumfolie. De inhoud werd rechtstreeks bemonsterd voor de bepaling van het aantal *Campylobacter* kve (kolonie vormende eenheden)/gram door 1 gram blindedarminhoud te suspenderen in 9 ml FZ ( $10^{-1}$  verdunning) en vervolgens te verdunnen en uit te platen op CCDA Agar. De inhoud werd ook bemonsterd door swabs goed in het materiaal rond te draaien. De swabs werden daarna in het transport medium gestoken en gedurende 1 uur bij kamertemperatuur

Titel: Opzetten van ringonderzoeken voor Campylobacter, toepasbaar binnen het monitoringsonderzoek in de vleeskuikenhouderij

bewaard, gevolgd door bewaren bij 4°C gedurende 7 dagen. De eerste 2 dagen werden de swabs kwantitatief onderzocht op de aanwezigheid van Campylobacter, daarna werd uitsluitend kwalitatief onderzoek gedaan. Van elk kuiken werd ook een swab ingevroren bij -80°C en na 21 dagen kwalitatief onderzocht op aanwezigheid van Campylobacter.

Van de 10 blindedarmen, die werden ingevroren bij -80°C, zijn na 23 dagen 5 blindedarmen ontdooid en vervolgens werd de procedure, zoals gevolgd bij directe bemonstering, uitgevoerd. Nu werd echter vanaf dag 0 tot en met dag 8 één swab per kuiken gebruikt voor een kwantitatieve bepaling en één swab per kuiken voor een kwalitatieve bepaling.

Door de laboratoria die deelnemen aan het ringonderzoek wordt alleen een kwalitatieve bepaling uitgevoerd. De kwantitatieve bepaling werd uitgevoerd door de aanbieder om meer inzicht te krijgen in de aantallen Campylobacter bij bewaren gedurende 8 dagen.

#### Monsters borstvel

In een voorgaande fase is onderzoek verricht naar de mogelijkheid om de matrix “borstvel” mee te nemen in het ringonderzoek (6). De resultaten van dit onderzoek zijn eveneens gebruikt bij het ontwikkelen van de ringtest.

#### Temperatuur registratie tijdens vervoer

Om te controleren of de temperatuur tijdens het vervoer van de monsters, van de ringtest aanbieder naar de betrokken laboratoria, binnen de toegestane grenzen (5-10°C) blijft, is een aantal mogelijkheden onderzocht.

- WarmMark Tag 10°C (Introtech)  
Irreversibele roodverkleuring treedt op meteen na blootstelling aan temperaturen boven 10°C, aflezen van drie tijdsfasen: Brief – 2 uur, Moderate – 12 uur en Prolonged – 48 uur. Tag's kunnen eenmalig worden gebruikt.
- Verder is er nog een tag die de heersende temperatuur weergeeft, waarbij de ontvanger bij openmaken van de verpakking de temperatuur kan noteren. Dit zegt dus niets over de temperatuur gedurende het vervoer.
- Data logger Escort Mini  
Direct afleesbaar van het scherm, minimum, maximum en gemiddelde temperatuur. Via PC te programmeren en temperatuurverloop tijdens de reis op een later tijdstip uit te lezen. Meetinterval zelf in te stellen. Software licentie vrij te gebruiken. Steeds weer te gebruiken, dus eenmalig aan te schaffen.
- i-Button  
Lijkt op datalogger Escort Mini. In overleg met Frans-Peter Scheer en Eelke Westra van Agro Technology & Food Innovation Wageningen UR is gezocht naar de beste optie voor het registreren van de temperatuur gedurende transport. A&F heeft veel ervaring met Tracking en Tracing van o.a. vleesproducten, fruit en bloemen, waarbij temperatuur en luchtvochtigheid gedurende het gehele traject kunnen worden gemeten. Voor dit ringonderzoek is in overleg gekozen voor i-Buttons, waarin het tijdsinterval, temperatuurrange en tijdsperiode van meting geprogrammeerd kunnen worden. De datalogger ter grootte van een knoopcelbatterij kan worden gelezen via een uitleesadapter, die aan de USB poort van de PC wordt aangesloten.

#### *4.2 Ontwerp protocol*

Ontwerp van een protocol voor het gehele ringonderzoek, inclusief een tijdschema.

Ontwerpen van formulieren waaronder:

Ontwerp van een brief aan de deelnemers met een procedure beschrijving.

Titel: Opzetten van ringonderzoeken voor Campylobacter, toepasbaar binnen het monitoringsonderzoek in de vleeskuikenhouderij

Er is een brief ontworpen, waarin de deelnemers op de hoogte worden gebracht van het tijdstip van versturen van de monsters voor de ringtest. In de tevens bijgevoegde procedurebeschrijving worden nadere instructies gegeven over uitvoeren van het onderzoek en invullen van de testrapporten.

#### Ontwerp Testrapport deel I (Informatie).

In het Testrapport deel I verstrekt de deelnemer informatie over de gebruikte voedingsmedia en omstandigheden zoals temperatuur en incubatietijd.

#### Ontwerp Testrapport deel II (Informatie).

In Testrapport II verstrekt de deelnemer informatie over de samenstelling en herkomst van de gebruikte voedingsmedia, gebruikte materialen om een microaëroob milieu te verkrijgen, gebruikte materialen voor biochemische testen en over de herkomst (leveranciers) van deze materialen.

#### Ontwerp van Testrapport deel III (Resultaten).

In Testrapport III worden de resultaten weergegeven van de monsters die opgestuurd zijn in het kader van het ringonderzoek Campylobacter.

#### Ontwerp van een database in Microsoft Office Access.

In deze database zijn opgenomen: de bedrijfsnaam, voornaam en achternaam (van de contactpersoon), adres 1 en adres 2, woonplaats, labcode, telefoonnummer en e-mail adres. De labcode is een voor ieder laboratorium unieke code. De gegevens van de database kunnen worden gekoppeld aan de te versturen brieven.

#### Ontwerp van een Excel file.

Hierin worden alle resultaten verzameld en verwerkt, waarna tabellen en figuren in het eindrapport kunnen worden geïmporteerd.

#### Ontwerp van een eindrapport.

In het eindrapport worden de resultaten van het gehele ringonderzoek weergegeven, waarbij de identiteit van de deelnemende laboratoria door anderen niet is waar te nemen.

#### Tijdschema

- Twee maanden vóór verzenden van het ringonderzoek  
De deelnemers worden per e-mail op de hoogte gebracht wanneer het ringonderzoek plaatsvindt om ze de gelegenheid te geven het onderzoek in te plannen.
  
- Twee à 3 weken vóór verzenden van het ringonderzoek  
Per e-mail wordt aangekondigd op welke dag de ringtest precies wordt verstuurd via de brief, inclusief procedurebeschrijving en formulieren om de deelnemer te informeren over het te volgen protocol. Daarin o.a.:
  - instructies over bewaren na ontvangst van onderzoeksmaterialen
  - instructies retourneren dataloggers
  - het verzoek de monsters als routinemonsters behandelen
  - het verzoek de gebruikte methode te beschrijven
  - instructie over aanleveren van resultaten
  - het leveren van feed back

Kuikens worden geïnfecteerd met Campylobacter jejuni voor verkrijging van Campylobacter positieve blindedarminhoud.

- Eén week vóór verzenden van het ringonderzoek  
Controleren of kuikens die geïnfecteerd zijn ook Campylobacter uitscheiden en kuikens die negatief moeten zijn, Campylobacter negatief zijn. Wanneer de resultaten bekend zijn kan een

Titel: Opzetten van ringonderzoeken voor *Campylobacter*, toepasbaar binnen het monitoringsonderzoek in de vleeskuikenhouderij

afpraak worden gemaakt voor het exacte tijdstip van euthanaseren van de kuikens en het verwijderen van de blindedarmen.

Benodigde stammen voor de reïnculturen opkweken uit de -80°C.

Pluimvee slachterij/uitsnijderij vragen om borstvellen.

- Drie dagen vóór verzenden van het ringonderzoek  
Stammen op plaat overenten ter voorbereiding van de soak suspensie.  
Etiketten printen voor het labelen van de monsters.
- Eén dag vóór verzenden van het ringonderzoek  
Soak suspensie bereiden en swabs besmetten met reïnculturen.  
Blindedarminhoud uitdrukken en mengen, vervolgens swabs besmetten met dit mengsel.  
Swabs labelen, verpakken en gekoeld opslaan.
- Dag van verzenden  
Borstvellen ophalen bij slachterij/uitsnijderij, naar het laboratorium van de aanbieder transporten en besmetten met *Campylobacter*. Borstvellen individueel in plastic zakken verpakken, labelen en gekoeld opslaan. Monsters per deelnemer verpakken en distribueren.  
Deelnemers per e-mail op de hoogte brengen van verzending.
- Dag na verzenden  
Ontvangstbevestiging van de monsters registreren. Terugsturen van de dataloggers.
- Eén week na uitvoering van het ringonderzoek  
Ontvangst deelnemers checken en bij het ontbreken van de ontvangstbevestiging eventueel telefonisch navragen.
- Twee weken na uitvoering van het ringonderzoek  
Ontvangst resultaten van de deelnemende laboratoria.
- Vier weken na uitvoering van het ringonderzoek  
Schema van de resultaten toesturen aan de deelnemers (met lab code), zodat deze de door hen ingestuurde resultaten kunnen controleren.
- Zes weken na uitvoering van het ringonderzoek  
Resultaten in definitief eindrapport en versturen naar alle deelnemers en opdrachtgever.

#### 4.3 Pilot ringonderzoek

Om de opzet van het ringonderzoek en het gebruik van de testrapporten in de praktijk te onderzoeken, is een pilot-ringonderzoek uitgevoerd met de volgende deelnemers:

- Gezondheidsdienst voor Dieren (GD) Deventer
- Veterinair Microbiologisch Diagnostisch Centrum (VMDC) Utrecht
- Instituut voor Voedselveiligheid (RIKILT) Wageningen
- Veterinair Centrum Someren (VCS) Someren
- Animal Sciences Group (ASG) Lelystad

Bovengenoemde laboratoria hebben veel ervaring met aantonen van *Campylobacter* in mest en andere matrices en zijn daarom gevraagd te participeren.

Achttien dagen voor verzenden van de monsters werden de brief en de testrapporten per e-mail verstuurd aan de opgegeven contactpersonen. Deze personen werden gevraagd de brief en de formulieren kritisch te bekijken en commentaar en eventueel aanvullingen door te geven. Op de dag



Titel: Opzetten van ringonderzoeken voor *Campylobacter*, toepasbaar binnen het monitoringsonderzoek in de vleeskuikenhouderij

van verzenden werd per e-mail aangekondigd dat de monsters waren verzonden en verzocht op het moment van afleveren een ontvangstbevestiging te sturen.

#### Swabs

Uit de resultaten van het vooronderzoek werd de juiste methode gezocht om de monsters klaar te maken voor verzenden. Voor de reïncultures werd de soakmethode gekozen. Groei van HIS platen werd gesuspendeerd in FZ oplossing en alle swabs met hetzelfde monsternummer werden gedurende 1 uur bij kamertemperatuur bij elkaar in dezelfde suspensie geplaatst. Zo werd de besmetting gestandaardiseerd en kreeg elk lab een vergelijkbaar monster. Voor verkrijgen van de blanco swabs werden swabs in FZ geplaatst, ook gedurende 1 uur bij kamertemperatuur. De swabs met blindedarmmest werden besmet zoals in het vooronderzoek. De inhoud van 10 blinde darmen werd in een potje door roeren goed gemengd en vanuit dit mengsel werd monstermateriaal op de swab aangebracht.

#### Borstvellen

Verse borstvellen werden opgehaald bij pluimvee uitsnijderij Storteboom te Nijkerk. De borstvellen werden verdeeld in stukken van ongeveer 25 gram. De niet kunstmatig besmette vellen dienden als blanco vellen. De *Campylobacter* status was op dat moment echter niet bekend. De *Campylobacter*-positieve vellen werden besmet met 100 µl van een *Campylobacter jejuni* (C 356) cultuur, waarin ongeveer  $10^4$  kve *Campylobacter* per ml aanwezig waren, zodat ca.  $10^3$  kve *Campylobacter* per vel aangebracht werd.

#### Monsters Pilot-ringtest

Voor deze pilot-ringtest werden de volgende monsters opgestuurd naar de verschillende laboratoria:

- 2 swabs reïncultuur *Campylobacter jejuni*
- 2 swabs reïncultuur *Campylobacter coli*
- 2 swabs blanco
- 2 swabs reïncultuur *Escherichia coli* (als look-alike voor *Campylobacter*)
- 2 swabs met *Campylobacter jejuni* geïnfecteerde blindedarminhoud van vleeskuikens
- 1 swab van *Campylobacter* negatieve blindedarminhoud van vleeskuikens
- 2 kunstmatig besmette borstvellen
- 1 niet kunstmatig besmet borstvel (*Campylobacter* status onbekend)

De monsters werden random genummerd en voor alle laboratoria werd dezelfde nummering gebruikt.

Voor de identificatie van de laboratoria is een vertrouwelijk nummer gebruikt, bestaande uit 4 cijfers. In de begeleidende brief bij de eindrapportage is aan elk laboratorium het bijbehorende nummer bekend gemaakt.

De monsters werden verpakt in plastic en met diepvrieselementen omgeven in een piepschuim doos geplaatst. De piepschuim doos werd in een kartonnen doos met koeriersbedrijf UPS verzonden. In de verpakking werd een antwoordenvolpde met twee dataloggers ingesloten. In de brief werd gevraagd de dataloggers in deze antwoordenvolpde te verpakken en te retourneren.

Bij ontvangst van de dataloggers werden deze uitgelezen en de gegevens verwerkt.

Eén doos werd op het eigen lab bij kamertemperatuur bewaard tot de volgende dag de eerste twee meldingen van ontvangst binnen waren. Daarna werden de monsters uitgepakt en de dataloggers teruggestuurd naar de aanbieder.

Het was de bedoeling dat *Campylobacter* werd aangetoond met: “de PVE branchemethode voor het aantonen van thermotolerante *Campylobacter*-bacteriën in (blindedarm) mest en eindproducten afkomstig van pluimvee”. Volgens de procedurebeschrijving moest men de monsters analyseren volgens de (in het eigen laboratorium) gebruikelijke methode. In Testrapport I diende de gebruikte methode te worden beschreven.

Titel: Opzetten van ringonderzoeken voor *Campylobacter*, toepasbaar binnen het monitoringsonderzoek in de vleeskuikenhouderij

Parallel aan het pilot ringonderzoek zijn door de organisator gedurende 8 dagen controlemonsters uit dezelfde batch geanalyseerd en bewaard bij 4°C.

De monsters die worden opgestuurd voor het ringonderzoek moeten binnen 24 uur bij het betreffende laboratorium zijn afgeleverd. Omdat niet op alle laboratoria dagelijks *Campylobacter* onderzoek plaats vindt, is het mogelijk dat monsters vervolgens nog maximaal 2 dagen bij 4°C worden bewaard. Tijdens het onderzoek is deze situatie zo goed mogelijk nagebootst. Zeven identieke sets swabs zijn gedurende 1-8 dagen bij 4°C bewaard en dagelijks is 1 set door de aanbieder bemonsterd. In deze monsters is kwantitatief en kwalitatief *Campylobacter* bepaald.

Analysemethoden van de controlemonsters

Informatie over de gebruikte media wordt gegeven in bijlage 6.

Swab monsters kwalitatief

De swab werd rechtstreeks afgestreeken op een CCDA plaat, deze werd gedurende 48 uur onder microaërobe omstandigheden geïncubeerd bij 41,5°C en na 24 en 48 uur beoordeeld en bevestigd als *Campylobacter*.

Swab monsters kwantitatief

Aan de swab werd 9 ml FZ toegevoegd en gedurende 1 minuut gevortexed (werd beschouwd als 10<sup>-1</sup> verdunning). Vervolgens werd een verdunningsreeks gemaakt en telkens 0,1 ml op een CCDA plaat uitgespateld. CCDA werd gedurende 48 uur onder microaërobe omstandigheden geïncubeerd bij 41,5°C en na 24 en 48 uur werden verdachte kolonies geteld en bevestigd als *Campylobacter*.

Borstvelmonsters kwalitatief

In een stomacherzak met binnenzak werd aan 25 gram borstvelmonster 100 ml Preston medium toegevoegd, vervolgens werd 30 seconden gestomacherd en daarna werd de binnenzak met borstvel verwijderd. De buitenzak met het Preston medium werd gedurende 24 uur bij 41,5°C microaëroob geïncubeerd, waarna werd afgestreeken op CCDA. CCDA werd gedurende 48 uur onder microaërobe omstandigheden geïncubeerd bij 41,5°C en na 24 en 48 uur geteld en bevestigd als *Campylobacter*.

Borstvelmonsters kwantitatief

Vanuit de nog onbebroedde Preston (zie bij borstvelmonsters kwalitatief) werd 1 ml verdeeld over 3 CCDA platen uitgespateld en de drie platen werden gezamenlijk geteld en beoordeeld als de 10<sup>-1</sup> verdunning. Met nog 1 ml werd een verdunningsreeks gemaakt in FZ en in porties van 0,1 ml uitgeplaat op CCDA. CCDA werd gedurende 48 uur onder microaërobe omstandigheden geïncubeerd bij 41,5°C. De platen werden vervolgens na 24 en 48 uur geteld en verdachte kolonies reïngekweekt en bevestigd als *Campylobacter*.

Bevestigen van isolaten

Voor het reïnkweken van verdachte kolonies werd geënt op HIS Agar. De HIS Agar werd 48 uur onder microaërobe omstandigheden geïncubeerd bij 41,5°C en na 24 en 48 uur werden verdachte kolonies geteld en bevestigd als *Campylobacter*. De reïnculturen werden eerst microscopisch beoordeeld, vervolgens werd een oxidase test gedaan en met een Multiplex PCR werd bepaald welk *Campylobacter* species werd geïsoleerd, een *Campylobacter jejuni* of *Campylobacter coli*. Bij de gebruikte Multiplex PCR (3) worden 4 primers gebruikt, 2 specifiek voor *Campylobacter jejuni* en 2 voor *Campylobacter coli*. Door de vorming van specifieke banden van verschillende grootte (resp. 773 en 363 bp) is het mogelijk te discrimineren tussen *C. jejuni* en *C. coli*.

Titel: Opzetten van ringonderzoeken voor *Campylobacter*, toepasbaar binnen het monitoringsonderzoek in de vleeskuikenhouderij

## 5. Resultaten/Discussie

### 5.1 Vooronderzoek

Voor selectie van een look-alike stam werden *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Proteus* (7700), *Proteus* (A6 geïsoleerd uit kuikenmest), *Proteus* (H9, geïsoleerd uit kuikenmest) en *Proteus vulgaris* (A5, geïsoleerd uit kuikenmest) gebruikt. Stammen werden geënt op CCDA en onder microaërobe omstandigheden bij 41,5 °C geïncubeerd. Alleen *Proteus vulgaris* was in staat te groeien op CCDA. Toen later werd voorgekweekt op HIS Agar en daarna uitgeplaat op CCDA bleek deze kiem niet meer in staat om te groeien onder microaërobe omstandigheden. Daarom werd gezocht naar een andere look-alike stam. Uit de begeleidende flora van de blindedarmswabs werden 4 stammen gekweekt (1610, 1611, 1614 en 1615). Na herhaald overenten werd 1610 het meest geschikt geacht. Deze stam werd gedetermineerd en door het RIVM getypeerd als *Escherichia coli* O1 positief/K1 PCR negatief.

In het vooronderzoek werd de wijze van besmetting van de swabs onderzocht. De resultaten worden gegeven in Tabel 5.1

**Tabel 5.1** Samenvatting resultaten vooronderzoek wijze van besmetten swabs met reïncultuur (gemiddelde van 5 waarnemingen)

Stam	methode	kiemgetal log 10 kve/swab	stdev
<i>C. jejuni</i> (C 356)	hele plaat	9,0	0,4
<i>C. jejuni</i> (C 356)	halve plaat	8,3	0,5
<i>C. jejuni</i> (C 356)	kwart plaat	8,1	0,2
<i>C. jejuni</i> (C 356)	soak suspensie zelf	8,9	0,3
<i>C. jejuni</i> (C 356)	swab na soak 1 uur kamertemperatuur	7,1	0,2
<i>C. coli</i> (BA 1311)	hele plaat	8,6	0,2
<i>C. coli</i> (BA 1311)	halve plaat	8,7	0,2
<i>C. coli</i> (BA 1311)	kwart plaat	8,6	0,2
<i>C. coli</i> (BA 1311)	soak suspensie zelf	8,5	0,2
<i>C. coli</i> (BA 1311)	swab na soak 1 uur kamertemperatuur	6,5	0,1

In een bewaarproef werd dit onderzoek met meer monsters en zowel kwalitatief als ook kwantitatief herhaald. De swabs werden besmet door de groei van een halve plaat op te nemen of door de swabs te laten weken in een suspensie met *Campylobacter*. Resultaten bij bewaren van swabs met *Campylobacter jejuni* zijn weergegeven in Tabel 5.2.

Resultaten van bewaren swabs met *Campylobacter coli* zijn weergegeven in Tabel 5.3, resultaten van bewaren swabs met look-alike zijn weergegeven in Tabel 5.4.

De resultaten van het bewaren van de swabs van met *Campylobacter* besmette verse blindedarminhoud zijn weergegeven in Tabel 5.5 en de resultaten van de swabs met blindedarminhoud, die gedurende 23 dagen bewaard werd bij -80°C, zijn weergegeven in Tabel 5.6.

De ontwerpen van de brief, procedurebeschrijving en formulieren zijn weergegeven in de bijlagen 1 t/m 6

Titel: Opzetten van ringonderzoeken voor *Campylobacter*, toepasbaar binnen het monitoringsonderzoek in de vleeskuikenhouderij

**Tabel 5.2** Samenvatting resultaten bij bewaren swabs met *Campylobacter jejuni* gedurende 7 dagen bij 4°C (gemiddelde van 5 waarnemingen)

Stam	methode	dag	kwantitatief log10 kve/swab	stdev	kwantitatief positief/totaal
<i>C. jejuni</i> (C 356)	halve plaat	dag 0	7,9	0,2	5/5
<i>C. jejuni</i> (C 356)	halve plaat	dag 1	7,5	0,2	5/5
<i>C. jejuni</i> (C 356)	halve plaat	dag 2	7,5	0,2	5/5
<i>C. jejuni</i> (C 356)	halve plaat	dag 3	7,6	0,1	5/5
<i>C. jejuni</i> (C 356)	halve plaat	dag 4	7,6	0,2	5/5
<i>C. jejuni</i> (C 356)	halve plaat	dag 5	7,6	0,5	5/5
<i>C. jejuni</i> (C 356)	halve plaat	dag 6	7,3	0,3	5/5
<i>C. jejuni</i> (C 356)	halve plaat	dag 7	7,8	0,5	5/5
<i>C. jejuni</i> (C 356)	soak	dag 0	7,2	0,1	5/5
<i>C. jejuni</i> (C 356)	soak	dag 1	7,3	0,1	5/5
<i>C. jejuni</i> (C 356)	soak	dag 2	6,8	0,2	5/5
<i>C. jejuni</i> (C 356)	soak	dag 3	7,1	0,2	5/5
<i>C. jejuni</i> (C 356)	soak	dag 4	6,9	0,2	5/5
<i>C. jejuni</i> (C 356)	soak	dag 5	7,0	0,2	5/5
<i>C. jejuni</i> (C 356)	soak	dag 6	6,0	0,4	5/5
<i>C. jejuni</i> (C 356)	soak	dag 7	6,6	0,2	5/5

**Tabel 5.3** Samenvatting resultaten bewaren van swabs met *Campylobacter coli* gedurende 7 dagen bij 4°C (gemiddelde van 5 waarnemingen)

Stam	methode	dag	kwantitatief log10 kve/swab	stdev	kwantitatief positief/totaal
<i>C. coli</i> (BA 1311)	halve plaat	dag 0	8,1	0,1	5/5
<i>C. coli</i> (BA 1311)	halve plaat	dag 1	8,0	0,1	5/5
<i>C. coli</i> (BA 1311)	halve plaat	dag 2	7,6	0,1	5/5
<i>C. coli</i> (BA 1311)	halve plaat	dag 3	7,7	0,2	5/5
<i>C. coli</i> (BA 1311)	halve plaat	dag 4	7,5	0,1	5/5
<i>C. coli</i> (BA 1311)	halve plaat	dag 5	7,3	0,1	5/5
<i>C. coli</i> (BA 1311)	halve plaat	dag 6	7,4	0,2	5/5
<i>C. coli</i> (BA 1311)	halve plaat	dag 7	7,5	0,1	5/5
<i>C. coli</i> (BA 1311)	soak	dag 0	6,6	0,3	5/5
<i>C. coli</i> (BA 1311)	soak	dag 1	6,4	0,2	5/5
<i>C. coli</i> (BA 1311)	soak	dag 2	6,2	0,1	5/5
<i>C. coli</i> (BA 1311)	soak	dag 3	6,4	0,4	5/5
<i>C. coli</i> (BA 1311)	soak	dag 4	5,9	0,1	5/5
<i>C. coli</i> (BA 1311)	soak	dag 5	7,5	0,2	5/5
<i>C. coli</i> (BA 1311)	soak	dag 6	5,1	0,2	5/5
<i>C. coli</i> (BA 1311)	soak	dag 7	5,2	0,1	5/5

Titel: Opzetten van ringonderzoeken voor Campylobacter, toepasbaar binnen het monitoringsonderzoek in de vleeskuikenhouderij

**Tabel 5.4** Samenvatting resultaten bij bewaren swabs met look-alike gedurende 7 dagen bij 4°C (gemiddelde van 5 waarnemingen)

Stam	methode	dag	kwantitatief log10 kve/swab	stdev	kwantitatief positief/totaal
Look-alike 1610	halve plaat	dag 0	5,7	0,3	5/5*
Look-alike 1610	halve plaat	dag 1	6,2	0,1	5/5*
Look-alike 1610	halve plaat	dag 2	5,6	0,2	5/5*
Look-alike 1610	halve plaat	dag 3	6,0	0,3	5/5*
Look-alike 1610	halve plaat	dag 4	6,4	0,1	5/5*
Look-alike 1610	halve plaat	dag 5	6,7	0,1	5/5*
Look-alike 1610	halve plaat	dag 6	6,6	0,3	5/5*
Look-alike 1610	halve plaat	dag 7	5,9	0,1	5/5*
Look-alike 1610	soak	dag 0	4,0	0,4	5/5*
Look-alike 1610	soak	dag 1	4,9	0,3	5/5*
Look-alike 1610	soak	dag 2	4,9	0,2	5/5*
Look-alike 1610	soak	dag 3	5,3	0,1	5/5*
Look-alike 1610	soak	dag 4	5,7	0,3	5/5*
Look-alike 1610	soak	dag 5	5,7	0,1	5/5*
Look-alike 1610	soak	dag 6	5,7	0,2	5/5*
Look-alike 1610	soak	dag 7	4,9	0,1	5/5*

\*wel groei, maar Campylobacter negatief

**Tabel 5.5** Samenvatting resultaten bij bewaren swabs met verse blindedarminhoud gedurende 7 dagen bij 4°C (gemiddelde van 5 waarnemingen)

Monstersoort	drager	dag	kwantitatief log10 kve/swab	stdev	kwantitatief positief/totaal
Blindedarminhoud	swab	dag 0	6,3	0,9	n.v.t.
Blindedarminhoud	swab	dag 1	6,3	0,7	n.v.t.
Blindedarminhoud	swab	dag 2	n.v.t.	n.v.t.	5/5
Blindedarminhoud	swab	dag 3	n.v.t.	n.v.t.	5/5
Blindedarminhoud	swab	dag 4	n.v.t.	n.v.t.	5/5
Blindedarminhoud	swab	dag 5	n.v.t.	n.v.t.	5/5
Blindedarminhoud	swab	dag 6	n.v.t.	n.v.t.	5/5
Blindedarminhoud	swab	dag 7	n.v.t.	n.v.t.	5/5
Blindedarminhoud	swab	dag 8	n.v.t.	n.v.t.	5/5
Blindedarminhoud	swab	na 21 dagen -80°C	n.v.t.	n.v.t.	5/5

Titel: Opzetten van ringonderzoeken voor *Campylobacter*, toepasbaar binnen het monitoringsonderzoek in de vleeskuikenhouderij

**Tabel 5.6** Samenvatting resultaten bewaren swabs met blindedarminhoud, die gedurende 23 dagen bij -80°C is bewaard. De swabs zijn vervolgens 8 dagen bij 4°C bewaard. (gemiddelde van 5 waarnemingen)

Monstersoort	drager	dag	kwantitatief log 10 kve/swab	stdev	kwantitatief positief/totaal
Blindedarminhoud	direct	dag 0	4,7	0,8	
Blindedarminhoud	swab	dag 1	3,2	0,7	4/5
Blindedarminhoud	swab	dag 2	3,1	0,5	4/5
Blindedarminhoud	swab	dag 3	2,8	0,6	5/5
Blindedarminhoud	swab	dag 4	2,6	0,6	5/5
Blindedarminhoud	swab	dag 5	2,7	0,9	4/5
Blindedarminhoud	swab	dag 6	2,5	0,4	2/5
Blindedarminhoud	swab	dag 7	2,5	0,5	4/5
Blindedarminhoud	swab	dag 8	2,3	0,4	4/5

De blindedarmen voor bovenstaande monsters zijn gedurende 23 dagen bewaard bij -80°C. Bij bewaren van de met deze blinde darminhoud besmette swabs, werden veel meer schimmels aangetroffen als stoorflora dan in de verse blindedarmmonsters.

### 5.2 Pilot-ringonderzoek

De procedure is gestart en het pilot ringonderzoek is uitgevoerd in augustus 2006.

De resultaten van de participerende laboratoria zijn weergegeven in Bijlage 7: Eindrapportage Pilot-Ringonderzoek *Campylobacter*, augustus 2006.

Voor de geselecteerde laboratoria is het aantonen van *Campylobacter* in de matrix borstvel geen routineonderzoek. Slechts drie laboratoria hebben ook de borstvelmonsters geanalyseerd. Eén lab heeft een andere methode gebruikt. Het tweede lab heeft wel de juiste methode gebruikt, maar is vergeten het borstvel met de binnenzak uit de stomacherzak te verwijderen. Hierdoor is veel stoorflora gegroeid, die het rein kweken van *Campylobacter* ernstig bemoeilijkt heeft.

### 5.3 Controlemonsters

Behalve door de laboratoria zijn de verschillende monsters ook onderzocht door de aanbieder zelf (controlemonsters). De resultaten van de analyse van de controle monsters gedurende 8 dagen door de aanbieder zijn weergegeven in tabel 5.7.

#### Bevestiging verdachte kolonies

Van een aantal monsters is één of meerdere kolonies reingekweekt. Met de reinkulturen is vervolgens een oxidase test gedaan en er is een Multiplex PCR voor identificatie van *Campylobacter jejuni* en *Campylobacter coli* uitgevoerd. In tabel 5.8 zijn de resultaten van de oxidase test en de PCR weergegeven.

Titel: Opzetten van ringonderzoeken voor *Campylobacter*, toepasbaar binnen het monitoringsonderzoek in de vleeskuikenhouderij

**Tabel 5.7** Samenvatting resultaten controle monsters parallel aan pilot ringonderzoek augustus 2006 in log 10 kve/swab en steeds 1 swab per keer.

Monsternummer	Monstersoort	dag 1	dag 2	dag 3	dag 4	dag 5	dag 7	dag 8	Na direct afstrijken op CCDA (8 dagen) pos/totaal
C06 08 21 <b>01</b>	blindedarminhoud <i>Campylobacter jejuni</i> positief	7,7	7,2	7,5	7,1	7,5	7,0	7,7	7/7
C06 08 21 <b>02</b>	blanco	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	0/7
C06 08 21 <b>03</b>	reincultuur <i>Campylobacter jejuni</i>	5,3	5,4	5,4	5,3	5,1	4,7	4,8	7/7
C06 08 21 <b>04</b>	blindedarminhoud <i>Campylobacter jejuni</i> positief	7,5	6,1	7,2	7,1	7,0	7,2	7,3	7/7
C06 08 21 <b>05</b>	reincultuur <i>Campylobacter coli</i>	7,2	6,2	7,1	7,2	7,3	7,1	7,0	7/7
C06 08 21 <b>06</b>	reincultuur <i>Campylobacter jejuni</i>	5,3	5,3	5,4	5,2	5,3	4,7	4,8	7/7
C06 08 21 <b>07</b>	blanco	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	0/7
C06 08 21 <b>08</b>	reincultuur <i>Escherichia coli</i>	4,5*	4,9*	5,3*	4,2*	4,2*	4,4*	4,1*	0/7*
C06 08 21 <b>09</b>	blindedarminhoud negatief	3,0*	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	>6,0*	>6,0*	0/7*
C06 08 21 <b>10</b>	reincultuur <i>Campylobacter coli</i>	7,6	7,1	7,0	6,9	6,9	6,7	6,9	7/7
C06 08 21 <b>11</b>	reincultuur <i>Escherichia coli</i>	4,6*	5,2*	5,0*	4,6*	4,2*	4,2*	4,7*	0/7*
		dag 0	dag 1	dag 2	dag 3	dag 4	dag 6	dag.7	Na ophoping in Preston
C06 08 21 <b>12</b>	huid <i>Campylobacter jejuni</i> positief	1,4	2,0	2,2	2,1	2,0	2,1	2,6	7/7
C06 08 21 <b>13</b>	huid <i>Campylobacter jejuni</i> positief	1,7	2,0	2,0	2,1	2,5	1,8	<1,0	7/7
C06 08 21 <b>14</b>	onbeënte huid (bleek positief)	1,5	2,3	2,2	2,8	1,7	1,8	2,5	7/7

\* Na rechtstreeks afstrijken op CCDA wel groei waargenomen, maar geen *Campylobacter* aangetoond

Titel: Opzetten van ringonderzoeken voor *Campylobacter*, toepasbaar binnen het monitoringsonderzoek in de vleeskuikenhouderij

**Tabel 5.8** Resultaten oxidase test en PCR van reïnculturen

Monster nummer	aantal dagen bewaren	oxidase	PCR	aangeënt met	Conclusie
C 06 08 21 <b>01</b>	3	+	<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>	klopt
C 06 08 21 <b>03</b>	3	+	<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>	klopt
C 06 08 21 <b>04</b>	3	+	<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>	klopt
C 06 08 21 <b>04</b>	8	+	<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>	klopt
C 06 08 21 <b>05</b>	3	+	<i>Campylobacter coli</i>	<i>Campylobacter coli</i>	klopt
C 06 08 21 <b>06</b>	3	+	<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>	klopt
C 06 08 21 <b>10</b>	3	+	<i>Campylobacter coli</i>	<i>Campylobacter coli</i>	klopt
C 06 08 21 <b>12</b>	2	+	<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>	klopt
C 06 08 21 <b>12</b>	5	+	<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>	klopt
C 06 08 21 <b>13</b>	2	+	<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>	klopt
C 06 08 21 <b>13</b>	5	+	<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>	klopt
C 06 08 21 <b>13*</b>	5*	+	<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>	klopt
C 06 08 21 <b>14</b>	2	+	<i>Campylobacter jejuni</i>	onbekend*	waren bij aanvang al besmet <i>C. jejuni</i> en <i>C. coli</i>
C 06 08 21 <b>14</b>	5	+	<i>Campylobacter coli</i>	onbekend*	
C 06 08 21 <b>14</b>	5	+	<i>Campylobacter jejuni</i>	onbekend*	
C 06 08 21 <b>14*</b>	5*	+	<i>Campylobacter jejuni</i>	onbekend*	

\* = na ophoping in Preston medium

Opvallend is dat op het blanco borstvel (waarvan de *Campylobacter* status niet bekend was), zowel *Campylobacter jejuni* als ook *Campylobacter coli* werd aangetoond.

#### Resultaten dataloggers

Voor het registreren van de temperatuur tijdens het transport van de monsters is in overleg met A&F gekozen voor de i-Buttons. Deze dataloggers werden van A&F geleend en medewerkers van A&F werden geraadpleegd voor gebruik, instellingen en verwerking van data.

Voor de temperatuurmetingen werd een tijdsinterval van 4 minuten ingesteld. Daardoor was het mogelijk in totaal gedurende ruim 6 dagen de temperatuur te registreren.

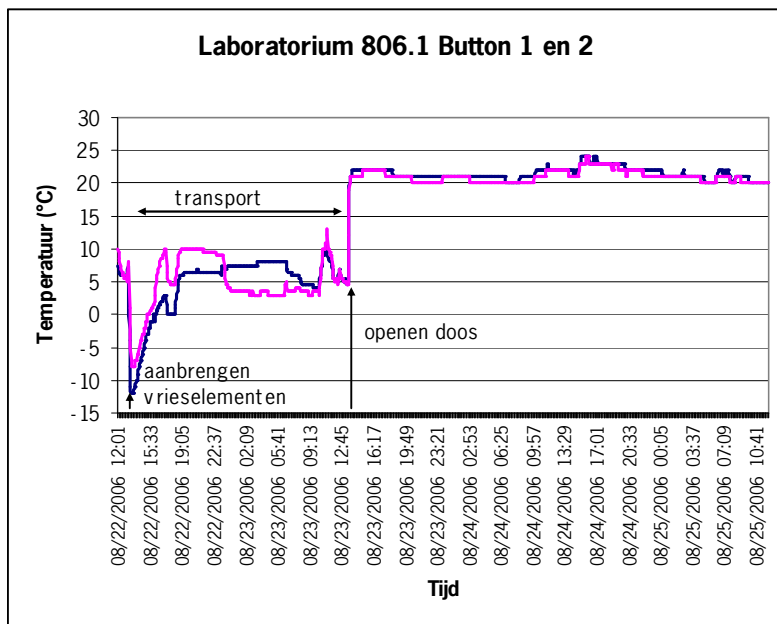
Er werden 2 dataloggers gebruikt, die op een bepaalde afstand van elkaar werden geseald in een plastic zak, zodat op twee verschillende plaatsen in de doos temperatuur kon worden gemeten.

Na retourneren van de dataloggers werden deze afgelezen en de data werden opgeslagen als tekstfile en om te bewerken geïmporteerd in Excel. Fig. (5.1–5.5) geven de resultaten van temperatuur registratie tijdens vervoer naar de vijf deelnemende locaties.

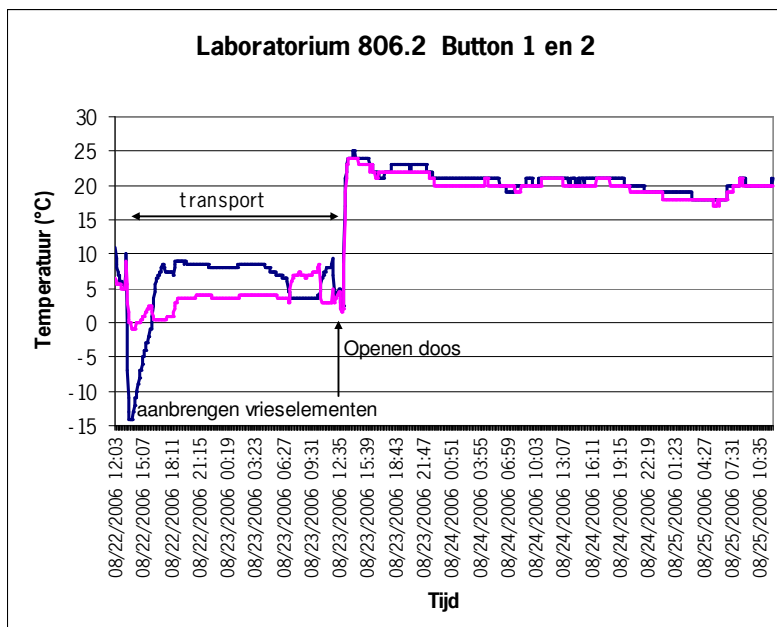


Titel: Opzetten van ringonderzoeken voor Campylobacter, toepasbaar binnen het monitoringsonderzoek in de vleeskuikenhouderij

**Figuur 5.1** Temperatuur tijdens transport naar laboratorium 806.1

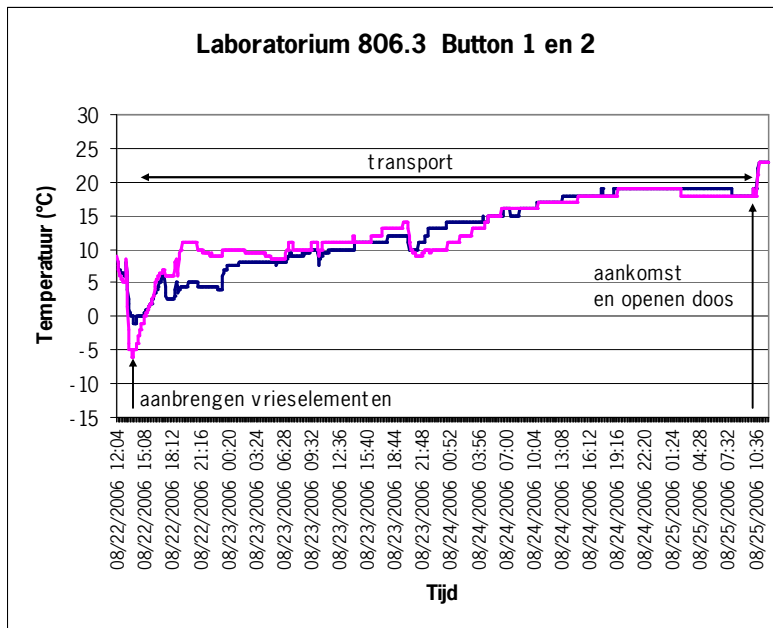


**Figuur 5.2** Temperatuur tijdens transport naar laboratorium 806.2



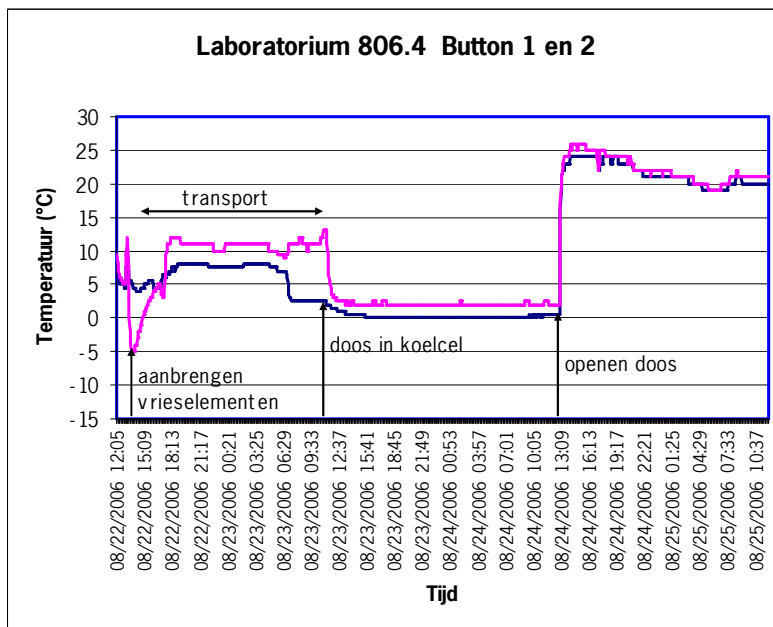
Titel: Opzetten van ringonderzoeken voor Campylobacter, toepasbaar binnen het monitoringsonderzoek in de vleeskuikenhouderij

**Figuur 5.3** Temperatuur tijdens transport naar laboratorium 806.3



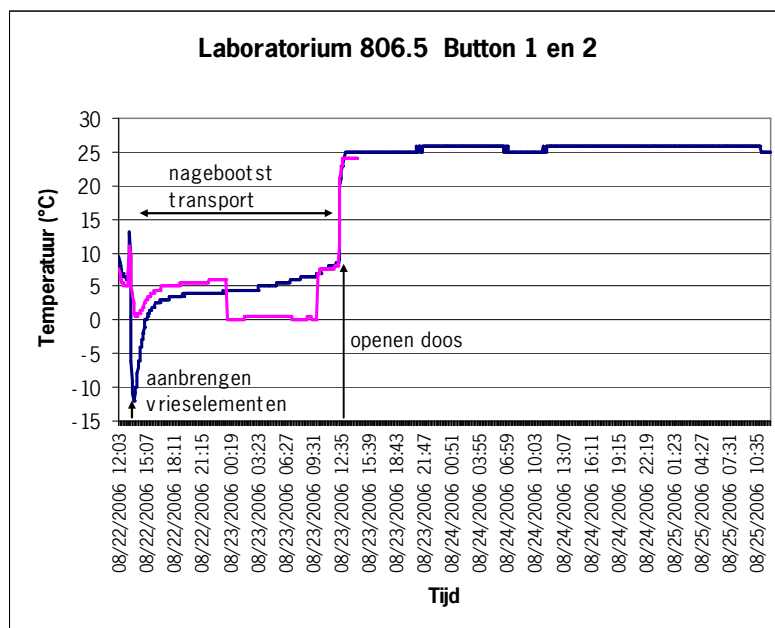
Naar dit laboratorium zijn de monsters langer onderweg geweest.

**Figuur 5.4** Temperatuur tijdens transport naar laboratorium 806.4



Titel: Opzetten van ringonderzoeken voor Campylobacter, toepasbaar binnen het monitoringsonderzoek in de vleeskuikenhouderij

**Figuur 5.5** Temperatuur tijdens transport naar laboratorium 806.5



De gegevens van de dataloggers laten zien dat bij verpakken en het plaatsen van de koelelementen de omgevingstemperatuur van de monsters ver onder 0°C komt. Onduidelijk is of alleen de dataloggers tegen de vrieselementen hebben aangelegd of ook de monsters. Na enkele uren is de gewenste temperatuur (tussen 5 en 10°C) bereikt en dat blijft ongeveer zo tot het moment waarop de monsters worden ontvangen, uitgepakt en/of verwerkt.

In figuur 3 is het temperatuurverloop van de monsters, bedoeld voor laboratorium 806.3 weergegeven. Dit pakket is 3 dagen onderweg geweest en in de figuur is goed te zien hoe de temperatuur in die tijd gestaag oploopt. Dit heeft mogelijk de resultaten negatief beïnvloed. Door de ervaringen tijdens transport van de monsters voor het pilot ringonderzoek, zal voor de praktijk proef gekozen worden voor een andere manier van transporteren. Er wordt nader onderzoek verricht naar de optimale methode van verpakken. Ook daar zullen echter weer dataloggers worden meegestuurd ter controle van de temperatuur tijdens transport.

## 6. Conclusie

### 6.1 Vooronderzoek

In de aanloop naar het pilot ringonderzoek is veel voorwerk uitgevoerd om vast te stellen wat de beste manier was om de verschillende soorten monstermaterialen te besmetten met *Campylobacter*. De volgende manieren bleken te werken: reïncultuur *Campylobacter* en look-alike op swabs, mest met en zonder *Campylobacter* op swabs en borstvelmonsters met en zonder *Campylobacter*. Voor de reïnculturen werd gekozen voor de soak methode. Dit is de beste methode van aanenten om het monster te standaardiseren, omdat alle swabs met dezelfde code in dezelfde suspensie worden geplaatst. Ook komt er op deze manier genoeg materiaal op de swab om na een aantal dagen nog *Campylobacter* te kunnen aantonen.

Om *Campylobacter*-positieve blindedarmmest te verkrijgen werden kuikens geïnfecteerd met *Campylobacter jejuni* en geëthanaseerd nadat geconstateerd was dat de kuikens *Campylobacter* uitscheidde. De blindedarmen werden verwijderd en de inhoud gebruikt om de swabs te besmetten.

Titel: Opzetten van ringonderzoeken voor Campylobacter, toepasbaar binnen het monitoringsonderzoek in de vleeskuikenhouderij

Invriezen van blindedarminhoud van Campylobacter-positieve kuikens vertoonde een ongunstig effect op het overleven van Campylobacter, daarnaast werd ook een toename van schimmels als stoorflora waargenomen. Er is daarom gekozen om voor de ringtest verse blindedarminhoud te gebruiken.

### *6.2 Pilot ringonderzoek*

In bijlage 7 zijn de resultaten van de pilot opgenomen. In de pilot waren de resultaten van de swabmonsters, op één na, allemaal goed. In geval van borstvel zijn de 3 betreffende deelnemers geen van allen in staat geweest de Campylobacters uit borstvel juist te analyseren of rein te kweken en te bevestigen. In de parallel test was dit wel het geval. De borstvelmonsters zullen moeten worden getest in een onderzoek waarin alle PVE erkende laboratoria deelnemen.

Bij deze laboratoria is het doorgaans routine om borstvelmonsters met de PVE branche methode te analyseren, dit in tegenstelling tot de laboratoria, die hebben deelgenomen in de pilot.

### *6.3 Borstvelen*

In deze proef zijn borstvelen gebruikt die afkomstig waren van een uitsnijderij. Nadeel hiervan is dat de status niet bekend is bij de start van het ringonderzoek. Inderdaad bleken de onbeënte borstvelen in deze proef toch besmet met Campylobacter (zowel *C. jejuni* als *C. coli* zijn via de kwantitatieve methode geïsoleerd). Als alternatief zouden borstvelen kunnen worden behandeld om ze Campylobacter vrij te maken alvorens ze al dan niet te besmetten met Campylobacter. Nadeel is dat dit afwijkende monsters oplevert t.o.v. de praktijk (zoals aanwezigheid van stoorflora).

Om niet besmette borstvelen te verkrijgen zouden proefdieren kunnen worden gebruikt die Campylobactervrij zijn gehouden (op dezelfde wijze als Campylobactervrije blindedarm monsters zijn verkregen in deze proef). Nadeel hiervan is dat de borstvelen niet het gebruikelijke slachtproces hebben ondergaan. Tenslotte kan ook gekozen worden voor het in dit onderzoek gebruikte model, waarbij echter pas achteraf informatie over de Campylobacter status beschikbaar is.

### *6.4 Protocol*

Het pilot-ringonderzoek was bedoeld om het ontwerp te toetsen en op de gebruikers af te stellen. Tevens heeft het de mogelijkheid geboden eventuele gebreken vast te stellen en te wijzigen. Op het ontwerp van de brief, procedurebeschrijving, formulieren en eindrapportage is door de deelnemers geen commentaar geleverd. Deze zullen ongewijzigd worden overgenomen. Bij een volgend ringonderzoek zullen alle monsters voor de parallel controle van de aanbieder eveneens verzonden worden, zodat ook deze omstandigheden overeenkomen met die van de deelnemende laboratoria. Tevens zal voor een andere wijze van verpakken (zonder vrieselementen) worden gekozen. De monsters zullen dan gekoeld worden getransporteerd.

### *6.5 Praktijk-Pilot ringonderzoek*

In 2007 zal het ringonderzoek in de praktijk door PVE erkende laboratoria worden uitgevoerd, zoals ontworpen en getest, met wijziging van verpakken en wijze van transport.

Tevens zullen in het praktijkonderzoek 2 negatieve blindedarmmonsters en 1 blanco monster worden aangeboden. Eén look-alike monster zal worden vervangen door een reïncultuur Arcobacter. Er zal nog vooronderzoek plaatsvinden om een Arcobacter te selecteren die onder microaërobe omstandigheden bij 41,5°C en/of 37°C groeit.

Titel: Opzetten van ringonderzoeken voor *Campylobacter*, toepasbaar binnen het monitoringsonderzoek in de vleeskuikenhouderij

## 7. Aanbevelingen

- Vooronderzoek is nodig, om een *Arcobacter* te selecteren, die in staat is om te groeien op CCDA onder microaërobe omstandigheden bij 41,5°C en/of 37°C. Van deze *Arcobacter* zal ook het gedrag bij bewaren bij 4°C gedurende 8 dagen worden onderzocht.
- Voor het ringonderzoek wordt verse blindedarminhoud gebruikt.
- Er wordt gebruik gemaakt van borstvelen, rechtstreeks afkomstig van een uitsnijderij, waarvan de *Campylobacter* status niet bekend is bij de start van het ringonderzoek. Daarbij is achteraf informatie over de *Campylobacter* status beschikbaar. Voordeel hiervan is dat de borstvelen niet bewaard of behandeld zijn, waardoor uiterlijk en aanwezigheid van stoorflora niet worden beïnvloed.
- Er wordt aanvullend onderzoek gedaan naar de beste manier van verpakken van de monsters, zodat gekoeld transport gewaarborgd kan worden.
- In de praktijk-pilot 2007 worden de volgende monsters rondgestuurd, in een andere volgorde, dan in de pilot van 2006:
  - 2 x reïncultuur *C. jejuni*
  - 2 x reïncultuur *C. coli*
  - 2 x blindedarmmest + *C. jejuni*
  - 2 x blindedarmmest blanco
  - 1 x blanco
  - 1 x *E. coli*
  - 1 x *Arcobacter butzleri*
- Na de uitvoering van de praktijk-pilot wordt een begroting gemaakt van de totale kosten voor de opdrachtgever per deelnemer.
- In overleg met de opdrachtgever worden criteria opgesteld voor het beoordelen van de resultaten van de deelnemers. Hoe zwaar weegt een bepaalde afwijking van de verwachte resultaten? Wegen vals positieve resultaten even zwaar als vals negatieve? Welke consequenties hebben de scores voor de laboratoria? Kan een laboratorium bij onvoldoende score bijvoorbeeld verplicht worden om deel te nemen aan een cursus "Aantonen van *Campylobacter* in de matrices mest en borstvel".
- Als in 2007 het ringonderzoek in de praktijk goed verloopt, kan het in deze opzet 2 x per jaar worden aangeboden om de kwaliteit van de PVE erkende laboratoria goed te kunnen monitoren.

## 8. Referenties

1. Chek Proficiency Testing Programme van de Voedsel en Warenautoriteit.  
[http://www2.vwa.nl/CDL/files/10629/1004/12586%20CHEK\\_Annual\\_Programme\\_2007.pdf](http://www2.vwa.nl/CDL/files/10629/1004/12586%20CHEK_Annual_Programme_2007.pdf)

Titel: Opzetten van ringonderzoeken voor Campylobacter, toepasbaar binnen het monitoringsonderzoek in de vleeskuikenhouderij

2. FAPAS (Food Analysis Performance Assessment Scheme).  
<http://www.fapas.com/prog.cfm?currsch=fepas>
3. Giessen, AW van de, Tilburg JJ, Ritmeester WS en van der Plas J. Reduction of campylobacter infections in broiler flocks by application of hygiene measures. Epidemiol. Infect. 1998 Aug;121(1):57-66.
4. ILAC-G13:2000  
Guidelines for the Requirements for the Competence of Providers of Proficiency Testing Schemes.
5. ISO/IEC Guide 43-1:1997 (E)  
Proficiency testing by interlaboratory comparisons-  
Part 1: Development and operation of proficiency testing schemes.
6. Jacobs-Reitsma, W.F. en Putirulan, F.F. Onderzoek naar de mogelijkheid om de matrix "borstvel" mee te nemen in ringonderzoek voor Campylobacter. Animal Sciences Group rapport ASG 04/101028 (2004)

Titel: Opzetten van ringonderzoeken voor Campylobacter, toepasbaar binnen het monitoringsonderzoek in de vleeskuikenhouderij

## **Bijlage 1 Brief aan deelnemers**

Geachte deelnemer,

22 augustus 2006 wordt gestart met het ringonderzoek voor Campylobacter detectie in pluimveemest en borstvel. Via e-mail wordt u op de hoogte gebracht van het feit dat de monsters verzonden zijn. U dient de monsters gekoeld (bij 4°C) te bewaren tot het moment van inzetten. De monsters dienen binnen 3 dagen na aankomst te worden ingezet, maar bij voorkeur op de dag van ontvangst. Verwerk de monsters zoals in uw laboratorium gebruikelijk is. De resultaten moeten uiterlijk 14 dagen na ontvangst van de monsters aangeleverd zijn via e-mail (gebruik hiervoor het bijgaande digitale testrapport). Resultaten die te laat worden ingestuurd kunnen niet meer worden verwerkt in de rapportage. Het concept rapport wordt u digitaal toegestuurd, waarbij u de gelegenheid wordt geboden om binnen twee weken eventuele correcties door te geven. Daarna ontvangt u een papieren versie van het definitieve rapport. Als bijlage vindt u de procedure voor dit ringonderzoek. Wij verzoeken u deze procedure nauwkeurig te volgen, de bijgevoegde formulieren zo volledig mogelijk in te vullen en zo snel mogelijk, na afhandeling van de monsters, per e-mail terug te sturen. Mochten er nog vragen rijzen, dan kunt u contact opnemen met ondergetekende.

Met vriendelijke groet,

Ing. M.C. (Ria) van der Hulst-van Arkel  
Animal Sciences Group, Wageningen UR  
Infectieziekten (Ketenkwaliteit en Zoonosen)  
Postbus 65  
8200 AB Lelystad  
Tel: 0320 238 445  
Fax: 0320 238 961  
e-mail: [ria.vanderhulst@wur.nl](mailto:ria.vanderhulst@wur.nl)  
internet ASG : [www.asg.wur.nl](http://www.asg.wur.nl)

Titel: Opzetten van ringonderzoeken voor *Campylobacter*, toepasbaar binnen het monitoringsonderzoek in de vleeskuikenhouderij

## Bijlage 2 Procedurebeschrijving

### *Procedure voor het ringonderzoek voor detectie van *Campylobacter* in pluimveemest en borstvel*

Dit ringonderzoek dient te worden uitgevoerd volgens de op uw laboratorium gebruikelijke methode voor de bepaling van de aan- of afwezigheid van thermotolerante *Campylobacter spp.* in monsters pluimveemest en borstvel. Vermeld in het digitaal aangeleverde testrapport alle gevraagde gegevens over media, producten en eventuele apparatuur, die gebruikt worden tijdens het onderzoek.

#### **1. Terugsturen dataloggers**

In de verpakking bevinden zich 2 dataloggers met een diameter van 16 mm en in de vorm van een knoopcel batterij. Laat deze dataloggers tussen de monsters zitten totdat de monsters worden ingezet. Doe de dataloggers in de bijgesloten geadresseerde enveloppe en stuur deze naar ons terug.

#### **2. Aankomst**

Vul in het digitaal toegezonden testrapport uw gegevens in bij de voetnoot (door in Word bij beeld koptekst en voettekst te kiezen en bij voettekst uw gegevens in te vullen, na invullen koptekst en voettekst sluiten)

Noteer bij aflevering van de monsters op pagina 4 van het testrapport de datum en de tijd van aankomst.

#### **3. Methode**

Voer het onderzoek uit zoals op uw laboratorium gebruikelijk is. Swabs dienen als mestmonsters te worden behandeld en borstvellen als borstvellen. Vermeld gebruikte media en de daarbij behorende vragen op pagina 3 van het testrapport.

#### **Isolatie**

- **Swabs**

Swabs moeten beschouwd worden als mestmonsters en als zodanig worden ingezet volgens de door u gebruikte methode. Vermeld in het testrapport (pagina 2) de temperatuur van de stoom, en begin- en eindtijd van de incubatieperiode.



Titel: Opzetten van ringonderzoeken voor Campylobacter, toepasbaar binnen het monitoringsonderzoek in de vleeskuikenhouderij

- **Borstvellen**

U ontvangt ± 25 g borstvel per monster. Borstvellen dienen als zodanig te worden behandeld en te worden verwerkt volgens eigen voorschrift. Vermeld procedure, temperatuur van de stoof en begin- en eindtijd van de incubatieperiode op pagina 2 van het testrapport.

#### **4. Bevestiging**

Bevestig verdachte kolonies volgens de door u gebruikte methode Vermeld in het testrapport (pagina 3) de gevraagde gegevens over de bevestigingsmedia.

Vermeld de resultaten van het onderzoek in de tabel met analyse resultaten op pagina 4 van het testrapport.

#### **5. Feed back**

Wanneer u van mening bent dat er zaken ontbreken of beter anders kunnen, heeft u op pagina 5 gelegenheid dat aan te geven.

#### **6. Terugsturen van het ingevulde testrapport**

Het volledig ingevulde, digitaal aangeleverde, testrapport dient binnen 14 dagen te worden verzonden naar: [ria.vanderhulst@wur.nl](mailto:ria.vanderhulst@wur.nl)

Coordinator:

Ing. M.C. (Ria) van der Hulst-van Arkel  
Animal Sciences Group, Wageningen UR  
Infectieziekten  
Postbus 65  
8200 AB Lelystad  
Tel: 0320 238 445  
Fax: 0320 238 961  
bezoekadres: Edelhertweg 15  
e-mail: [ria.vanderhulst@wur.nl](mailto:ria.vanderhulst@wur.nl)  
internet ASG : [www.asg.wur.nl](http://www.asg.wur.nl)



Titel: Opzetten van ringonderzoeken voor Campylobacter, toepasbaar binnen het monitoringsonderzoek in de vleeskuikenhouderij

### **Bijlage 3 Testrapport deel I (informatie over de gebruikte methoden)**

## **TESTRAPPORT RINGONDERZOEK CAMPYLOBACTER 2006**

Pilot ringonderzoek

**BACTERIOLOGISCHE DETECTIE VAN *CAMPYLOBACTER* IN PLUIMVEE MEST EN BORSTVEL**

*Georganiseerd door cluster Ketenkwaliteit en Zoonosen van de Animal Sciences Group van Wageningen Universiteit en Research Centrum, Postbus 65, 8200 AB Lelystad*

*Coordinator: Ing. M.C. (Ria) van der Hulst-van Arkel*

*Postbus 65, 8200 AB Lelystad*

*Tel: 0320 238 445, Fax: 0320 238 961*

*e-mail: [RIA.VANDERHULST@WUR.NL](mailto:RIA.VANDERHULST@WUR.NL)*



Titel: Opzetten van ringonderzoeken voor Campylobacter, toepasbaar binnen het monitoringsonderzoek in de vleeskuikenhouderij

## TESTRAPPORT DEEL I (INFORMATIE)

Type monster swab/borstvel	Gebruikt medium	Micro- aëroob ja/nee	Incubatie tijd en temperatuur					
			Begin			Eind		
			Datum	Tijd u/min	Temp stoof °C	Datum	Tijd u/min	Temp stoof °C

## Bijlage 4 Testrapport deel II (informatie over de gebruikte materialen)

### TESTRAPPORT DEEL II (INFORMATIE)

<b>Media</b>		
Gebruikt medium	Leverancier	Artikelnummer

<b>Bereiken micro-aëroob milieu</b>	
	Merk
Gaszakjes	
Eigen systeem	
Anders	

<b>Bevestigen</b>		
Microscopisch		
nat/gekleurd	kleuring	
Biochemisch		
Gebruikt medium/reagentia	Firmanaam	Artikelnummer
1		
2		
3		
Immunologisch		
1		
2		
Anders (geef omschrijving)		
1		
2		

Titel: Opzetten van ringonderzoeken voor Campylobacter, toepasbaar binnen het monitoringsonderzoek in de vleeskuikenhouderij

## Bijlage 5 Testrapport deel III (Resultaten)

### TESTRAPPORT DEEL III (RESULTATEN)

Transport gegevens	
Datum en tijd van aankomst	

Analyse resultaten						
Monster nr.	Lab nr: (evt.)	Soort monster Swab/borstvel	Groei ja/nee	Verdacht ja/nee	Bevestigd ja/nee	Conclusie
C06 08 21 01						
C06 08 21 02						
C06 08 21 03						
C06 08 21 04						
C06 08 21 05						
C06 08 21 06						
C06 08 21 07						
C06 08 21 08						
C06 08 21 09						
C06 08 21 10						
C06 08 21 11						

Titel: Opzetten van ringonderzoeken voor Campylobacter, toepasbaar binnen het monitoringsonderzoek in de vleeskuikenhouderij

C06 08 21 12						
C06 08 21 13						
C06 08 21 14						

**Feed back**

Wanneer er zaken ontbreken of anders/beter kunnen, kunt u dat hier aangeven

Titel: Opzetten van ringonderzoeken voor Campylobacter, toepasbaar binnen het monitoringsonderzoek in de vleeskuikenhouderij

## Bijlage 6 Gebruikte media bij controle analyses door de aanbieder

### CCDA- Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar

Campylobacter Blood-free Selective Medium (Modified CCDA- Preston Agar, OXOID CM 0739)

Samenstelling:	g/L
Nutrient Broth No.2	25.0
Bacteriological charcoal	4.0
Casein hydrolysate	3.0
Sodium desoxycholate	1.0
Ferrous sulphate	0.25
Sodium pyruvate	0.25
Agar	12.0
pH	7.4 ± 0.2

Aan 1 L medium wordt toegevoegd 2 vials SR0155 (OXOID)

Samenstelling:	per vial	per liter
Cefoperazone	16 mg	32 mg
Amphotericin B	5 mg	10 mg

### FZ Fysiologische Zoutoplossing

0,87% NaCl (Baker 0278) in 1000 ml water

### HIS Heart Infusion Agar met schapenbloed

Heart Infusion Agar (ACU media 7269C)

Samenstelling:		
Enzymatic Digest of casein	10	
Enzymatic digest of Animal Tissue		5.0
Sodium chloride	5.0	
Pork Heart Infusion Solids	2.0	
Yeast Extracts	2.0	
Agar	15.0	
pH	7.4 ± 0.2	

Toevoegen	per L
Select Agar (Invitrogen)	3,75 g
Schapenbloed (BioTrading)	50 ml

Titel: Opzetten van ringonderzoeken voor Campylobacter, toepasbaar binnen het monitoringsonderzoek in de vleeskuikenhouderij

### **Preston medium**

Nutrient Broth Nr 2: (OXOID CM 0067)

Samenstelling:	g/L
'Lab-Lemco' powder	10.0
Peptone	10.0
Sodium chloride	5.0
pH	7.5 ± 0.2

Aan 1 L medium wordt toegevoegd:

2 vials Modified Preston Campylobacter Selective Supplement SR 0204E (OXOID)

Samenstelling:	per vial
Polymyxin B	2500 IU
Rifampicin	5.0 mg
Trimethoprim	5.0 mg
Amphotericin B	5.0 mg

2 vials Campylobacter Growth Supplement SR 0232E (OXOID)

Samenstelling:	per vial
Sodium pyruvate	0.125 g
Ferrous sulphate	0.125 g
Sodium metabisulphite	0.125 g

Gebruikte apparatuur

Anoxomat, Mart Microbiology B.V.

Om een microaëroob milieu te verkrijgen wordt het medium in een luchtdicht vat geplaatst, waarin de lucht wordt vervangen door een mengsel van 6% zuurstof en 7,1% kooldioxide, 3,6% watersof en 83,3 % stikstof.



Titel: Opzetten van ringonderzoeken voor Campylobacter, toepasbaar binnen het monitoringsonderzoek in de vleeskuikenhouderij

**Bijlage 7 Eindrapportage Pilot-Ringonderzoek Campylobacter, Augustus 2006.**

## Eindrapportage

# Pilot-Ringonderzoek Campylobacter Augustus 2006

Ria van der Hulst-van Arkel  
Project nummer 2032551000  
Lelystad, januari 2007

Report number: ASG07-100115/R00/Bke

Titel: Opzetten van ringonderzoeken voor Campylobacter, toepasbaar binnen het monitoringsonderzoek in de vleeskuikenhouderij

# Eindrapportage Pilot-Ringonderzoek Campylobacter Augustus 2006

Ria van der Hulst-van Arkel

Rapport nummer ASG  
Project nummer 2032551000

Lelystad, januari 2007

Animal Sciences Group van Wageningen UR  
Divisie Infectieziekten  
Postbus 65  
8200 AB Lelystad  
Tel: +31 320 238238/445

E-mail: [ria.vanderhulst@wur.nl](mailto:ria.vanderhulst@wur.nl)

Met dank aan de pluimveeuitsnijderij voor het beschikbaar stellen van monstermateriaal.  
Met dank aan Wilma Jacobs, Marcel van Bergen en Albert ter Laak voor hun gewaardeerde medewerking.

Dit onderzoek werd uitgevoerd in opdracht van het Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit

Titel: Opzetten van ringonderzoeken voor Campylobacter, toepasbaar binnen het monitoringsonderzoek in de vleeskuikenhouderij

## Titel

Eindrapportage Pilot-Ringonderzoek Campylobacter, augustus 2006

## Samenvatting

In een pilot ringonderzoek, uitgevoerd in augustus 2006, zijn swabs en borstvelmonsters door ASG (Animal Sciences Group) opgestuurd aan 5 laboratoria, voor analyse op aanwezigheid van Campylobacter. In totaal zijn per laboratorium 14 monsters aangeboden, bestaande uit swabs met reïnculturen, besmette en niet besmette blindedarmmonsters en borstvelmonsters al dan niet aangeënt met Campylobacter. Door 1 laboratorium is 1 positief swabmonster van blinde darm mest negatief beoordeeld. De andere 4 laboratoria hebben alle 11 swabs juist beoordeeld. Slechts 3 van de 5 laboratoria hebben borstvelmonsters geanalyseerd, voor 2 daarvan was het geen routine om borstvelmonsters voor aantonen van Campylobacter in te zetten. In alle borstvelmonsters is wel groei van Campylobacter geconstateerd en een enkele maal microscopisch bevestigd, maar door de aanwezigheid van veel stoorflora is reïnculeren niet mogelijk geweest. Het was de bedoeling dat er 2 positieve en 1 negatief borstvelmonster werden aangeboden. De borstvelmonsters waren echter al voor aantonen besmet met Campylobacter, waardoor het zogenaamde blanco monster ook Campylobacter positief was. De pilot is goed gelukt.

## Inleiding

Op dit moment worden niet routinematig ringonderzoeken voor Campylobacter in de pluimveehouderij aangeboden en uitgevoerd. Daarom is dit ringonderzoek ontwikkeld en uitgevoerd. Het is voor de laboratoria, die door de PVE (Productschappen Vee, Vlees en Eieren) erkend zijn als laboratorium voor analyses op Campylobacter in de pluimvee matrices mest en borstvel, verplicht om 2x per jaar te participeren in een relevant ringonderzoek. Dit is niet alleen noodzakelijk om de certificering te verkrijgen, maar ook om deze te behouden.

De gegevens die gegenereerd worden door de door PVE erkende laboratoria worden o.a. door LNV (Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit) gebruikt in de zoönosen rapportage naar de EU (Europese Unie) en moeten dus een juiste weergave zijn van de situatie. Relevant ringonderzoek moet aantonen of de participerende laboratoria in staat zijn Campylobacter te analyseren, ook bij de aanwezigheid van stoorflora, zoals in de matrices mest en borstvel. Het is de bedoeling dit ringonderzoek 2 x per jaar uit te voeren.

Het in dit rapport beschreven onderzoek was een pilotstudy, uitgevoerd met 5 participanten, met als doel het testen van de gehele procedure, inclusief methode van verzenden en eindrapportage.

Dit ringonderzoek werkt met de relevante matrices in tegenstelling tot andere ringonderzoeken voor Campylobacter. In Groot-Brittannië wordt Campylobacter in gevriesdroogd rauw kippenvlees (Food Analysis Performance Assessment Scheme, FAPAS) aangeboden en in Nederland (Voedsel en Warenautoriteit, VWA) in blood-based medium.

## Materiaal en Methoden

Het testmateriaal is samengesteld door de Animal Sciences Group van Wageningen UR, Divisie Infectieziekten, Cluster Ketenkwaliteit en Zoönosen te Lelystad.

Van reïnculturen werd een suspensie gemaakt in FZ (Fysiologische Zoutoplossing) en hierin werden de swabs geplaatst gedurende 1 uur bij kamertemperatuur. Voor het verkrijgen van Campylobacter positieve

Titel: Opzetten van ringonderzoeken voor *Campylobacter*, toepasbaar binnen het monitoringsonderzoek in de vleeskuikenhouderij

blindedarminhoud werden kuikens een week voor het ringonderzoek oraal besmet met een reïncultuur *Campylobacter jejuni* (C 356) en na enkele dagen gecontroleerd op uitscheiding van *Campylobacter*. Voor de *Campylobacter* negatieve blindedarminhoud werden kuikens apart aangehouden en gecontroleerd op afwezigheid van *Campylobacter*. Één dag voor verzenden werd de blindedarminhoud van 10 kuikens gemengd en monstermateriaal werd opgenomen met behulp van transport swabs.

Verse borstvelmonsters werden verkregen door bij een uitsnijderij voor vleeskuikens borstvel op te halen en de buitenzijde van het borstvel kunstmatig te besmetten. Op de ene helft van het borstvelmonster werd 0,1 ml van een *Campylobacter* suspensie aangebracht (waarin  $10^4$  kve per ml), het borstvel werd vervolgens dubbelgevouwen en 1 uur bij kamertemperatuur bewaard. De blanco borstvels werden onbehandeld aangeboden.

Reïnculturen en mestmonsters werden op swabs in transportmedium aangeboden. Borstvelmonsters werden verpakt in plastic zakken. Voor gedetailleerde informatie monsters zie tabel 1.

Het geheel werd met vrieselementen in een piepschuim doos verpakt, die weer in een kartonnen doos geplaatst werd. In de dozen werden dataloggers verpakt om het verloop van de temperatuur tijdens transport te registreren. Dozen werden met de koeriersdienst UPS vervoerd en moesten binnen 24 uren op de bestemming zijn afgeleverd.

**Tabel 1. Monsters pilot-ringonderzoek *Campylobacter***

Monster nr.		Type monster/stam	Verwachte resultaten
C06 08 21 01	swab	blindedarmmest <i>Campylobacter jejuni</i> positief	Thermotolerante <i>Campylobacter</i> aangetoond
C06 08 21 02	swab	blanco	Geen thermotolerante <i>Campylobacter</i> aangetoond
C06 08 21 03	swab	reïncultuur <i>Campylobacter jejuni</i>	Thermotolerante <i>Campylobacter</i> aangetoond
C06 08 21 04	swab	blindedarmmest <i>Campylobacter jejuni</i> positief	Thermotolerante <i>Campylobacter</i> aangetoond
C06 08 21 05	swab	reïncultuur <i>Campylobacter coli</i>	Thermotolerante <i>Campylobacter</i> aangetoond
C06 08 21 06	swab	reïncultuur <i>Campylobacter jejuni</i>	Thermotolerante <i>Campylobacter</i> aangetoond
C06 08 21 07	swab	blanco	Geen thermotolerante <i>Campylobacter</i> aangetoond
C06 08 21 08	swab	reïncultuur <i>Escherichia coli</i> (look-alike)	Geen thermotolerante <i>Campylobacter</i> aangetoond
C06 08 21 09	swab	blindedarmmest negatief	Geen thermotolerante <i>Campylobacter</i> aangetoond
C06 08 21 10	swab	reïncultuur <i>Campylobacter coli</i>	Thermotolerante <i>Campylobacter</i> aangetoond
C06 08 21 11	swab	reïncultuur <i>Escherichia coli</i> (look-alike)	Geen thermotolerante <i>Campylobacter</i> aangetoond
C06 08 21 12	borstvel	borstvel, <i>Campylobacter jejuni</i> positief	Thermotolerante <i>Campylobacter</i> aangetoond
C06 08 21 13	borstvel	borstvel, <i>Campylobacter jejuni</i> positief	Thermotolerante <i>Campylobacter</i> aangetoond
C06 08 21 14	borstvel	blanco borstvel ( <i>Campylobacter</i> status vooraf niet bekend)	Thermotolerante <i>Campylobacter</i> aangetoond

Titel: Opzetten van ringonderzoeken voor *Campylobacter*, toepasbaar binnen het monitoringsonderzoek in de vleeskuikenhouderij

#### Deelnemende laboratoria

ASG	Lelystad
GD	Deventer
RIKILT	Wageningen
VC-Someren	Someren
VMDC	Utrecht

Parallel aan het ringonderzoek is door de aanbieder ASG (onafhankelijk van het deelnemende ASG laboratorium) dagelijks bemonsterd gedurende 8 dagen. De monsters bestonden uit 8 setjes monsters van dezelfde batch, die bewaard werden bij 4°C.

19 dagen voor het versturen van de monsters werd in een e-mail naar de deelnemende laboratoria aangekondigd wanneer de monsters voor het ringonderzoek zou worden verstuurd en gevraagd of het aangegeven adres juist was. Aan de e-mail werden de begeleidende brief, de procedurebeschrijving en de testrapporten toegevoegd. Tijd van aankomst van de monsters bij het betreffende laboratorium werd via e-mail bevestigd. In de bijgestuurde testrapporten werd gevraagd de gebruikte media, als ook de namen van de leveranciers, temperaturen en incubatietijden te noteren. Ook werd gevraagd de dataloggers in de bijbehorende antwoord enveloppe te retourneren.

## Resultaten

Dit onderzoek was een pilot-study, uitgevoerd met 5 deelnemers. Deze deelnemers waren geselecteerde laboratoria, die uitstekend in staat zijn *Campylobacter* in mest aan te tonen. Voor 4 van de 5 laboratoria was het analyseren van borstvelmonsters geen routine. 2 van de 5 hebben daarom alleen de mestmonsters ingezet.

In tabel 2 zijn de resultaten van de swabs en borstvelmonsters uit het pilot-ringonderzoek samengevat. Laboratoria zijn random genummerd. Voor de identificatie van de laboratoria is een vertrouwelijk nummer gebruikt, bestaande uit 4 cijfers. In de begeleidende brief is aan elk laboratorium het bijbehorende nummer bekend gemaakt.

Tabel 2. Resultaten swabs pilot-ringonderzoek augustus 2006

Laboratorium	Swabs reïnculturen juist/totaal	Swabs blinde darmen juist/totaal	Borstvel juist/totaal
806.1	8/8	2/3	niet getest
806.2	8/8	3/3	0/3 (1*)
806.3	8/8	3/3	niet getest
806.4	8/8	3/3	0/3
806.5	8/8	3/3	0/3 (3*)
Controle aanbieder gedurende 8 dagen	8 dagen 8/8	8 dagen 3/3	eerste 6 dagen 3/3 laatste 2 dagen **

\* Wel groei op selectief medium en ook microscopisch karakteristiek voor *Campylobacter*, maar niet rein te kweken voor bevestiging

\*\* 7<sup>e</sup> en 8<sup>e</sup> dag wel microscopisch te bevestigen, maar niet rein te kweken door aanwezigheid stoorflora

Titel: Opzetten van ringonderzoeken voor Campylobacter, toepasbaar binnen het monitoringsonderzoek in de vleeskuikenhouderij

In bijlage 1 worden de door de laboratoria gebruikte methode en media met bijbehorende leveranciers gegeven.

In bijlage 2 zijn de wijze van bevestigen per laboratorium samengevat.

De door de laboratoria gemaakte opmerkingen zijn weergegeven in bijlage 3.

## Conclusie

De analyses van de swabs zijn nagenoeg allen goed, zowel van de positieve als ook van de negatieve monsters. Voor de resultaten van de borstvelmonsters is moeilijk een conclusie te trekken. Voor de deelnemende laboratoria was het analyseren van borstvelmonsters geen routine. Toch hebben 3 laboratoria daartoe een poging gedaan. 1 laboratorium heeft een andere methode gebruikt dan voorgeschreven in de PVE branchemethode een ander heeft deze methode niet juist uitgevoerd. Tijdens transport hebben grote temperatuurschommelingen plaatsgevonden. Dit heeft mogelijk geleid tot vals negatieve resultaten. De borstvelmonsters waren laag besmet wat in overeenstemming is met de mate van besmetting in de praktijk. In het controle traject werd gedurende 8 dagen in alle positieve monsters Campylobacter aangetoond. Na 7 en 8 dagen bewaren was in de borstvelmonsters reinkweken van de aanwezige Campylobacters niet meer mogelijk door aanwezigheid van te veel stoorflora. De monsters in het controle traject zijn echter niet op transport geweest en hebben dus die omstandigheden niet doorgemaakt. Bij een volgend ringonderzoek wordt voor een andere manier van transport gekozen en worden ook de controle monsters gedurende dezelfde tijd getransporteerd. In 2007 zal dit ringonderzoek worden aangeboden aan de door PVE erkende laboratoria, die de analyses volgens de PVE branchemethoden uitvoeren. Het zal duidelijk worden of met behulp van deze methode de borstvelmonsters juist kunnen worden geanalyseerd. Samengevat kan worden gesteld dat de analyses van de mestmonsters goed gelukt zijn en dat die van de borstvelmonsters in dit geval problemen hebben opgeleverd door de aanwezigheid van stoorflora.

Titel: Opzetten van ringonderzoeken voor Campylobacter, toepasbaar binnen het monitoringsonderzoek in de vleeskuikenhouderij

## Bijlage 1

De door de laboratoria gebruikte media met bijbehorende leveranciers, incubatie duur en temperaturen.

Laboratoriumcode	Medium	leverancier	microaëroob ja/nee	gaszakjes of anders	tijd/temperatuur
806.1	CCDA	BioTrading	ja	Anoxomat	172 u / 37°C en 42°C
806.2	CCDA	OXOID	ja	Gaszakjes BioMerieux	48-72 u 41,5°C
	Karmali	OXOID	ja		72 u 41,5°C
	Bolton	OXOID	nee		2 u 37°C en 48 u 41,5°C
	COS	BioMerieux	ja		72 u 37° en 48 u 37°C
806.3	CCDA	BioTrading	ja	Campygen OXOID	48 u 41,5°C
806.4	CCDA	BioTrading	ja	Anoxomat Mart	48 u 41,5°C
	Karmali	BioTrading	ja		48 u 41,5°C
	Preston	BioTrading	nee		24 u 41,5°C
806.5	CCDA	OXOID	ja	Anoxomat Mart	24 en 48 u 41,5°C
	Preston	OXOID	ja		24 u 41,5°C
Controle	CCDA	OXOID	ja	Anoxomat Mart	24 en 48 u 41,5°C
	Preston	OXOID	ja		24 u 41,5°C
	HIS	ACU media	ja		24 u 41,5°C

Titel: Opzetten van ringonderzoeken voor Campylobacter, toepasbaar binnen het monitoringsonderzoek in de vleeskuikenhouderij

## Bijlage 2

Wijze van bevestigen per laboratorium

Laboratorium code	Microscopisch			Oxidase		TSI		PCR
	Nat	Gram	Nat gekleurd Oost-Indische Inkt		Leverancier		Leverancier	
806.1		x						
806.2*	x			x	Merck			
806.3				x	BioTrading	x	BioTrading	
806.4		x		x	Merck	x	Eigen productie	
806.5			x					
Controle	x			x	Merck			x

\* Naast bovenstaande reacties werd door laboratorium 806.2 ook nog gekweekt bij 25°C microaëroob en bij 41,5°C aëroob gedurende 48 uur op COS medium



Titel: Opzetten van ringonderzoeken voor Campylobacter, toepasbaar binnen het monitoringsonderzoek in de vleeskuikenhouderij

### Bijlage 3

Op en/of aanmerkingen, zoals aangegeven door de laboratoria op de bijgeleverde formulieren

Laboratorium: 806.1

Verdachte Campylobacters (klinisch van belang) sturen wij door naar Lelystad ter bevestiging voor typering.

Laboratorium: 806.2

Omdat wij bij de monsters borstvel uitgestreken hebben op 2 verschillende media (CCDA en Karmali) hebben wij dubbele gegevens voor de tabel. De tabel was moeilijk aan te passen, daardoor hebben wij onze eigen tabel ingevoegd. De gevraagde gegevens staan hierin vermeld.

Laboratorium: 806.3

De monsters zijn aangeleverd in een kapotte doos. De koelelementen waren al ontdooid. De doos met de monsters is 2 dagen te laat aangeleverd op het laboratorium. De monsters zijn op dinsdag verstuurd en op vrijdag aangekomen op het laboratorium.

Laboratorium 806.4

Geen opmerkingen

Laboratorium: 806.5

Bij het inzetten van de borstvelen:

Stomacherzak zonder filter gebruikt en dus borstvel niet verwijderd. Hierdoor is te veel stoorflora op de platen gegroeid, waardoor rein kweken van Campylobacter niet mogelijk was.