

Biofilm hos salmonellaisolat från svenska djurbesättningar

Salmonellabakterier som kvarstår på kontaminerade ytor i form av biofilm är svåra att avlägsna vid rengöring och desinfektion. Förmåga att bilda biofilm är därför av relevans för bekämpning och kontroll såväl i djurbesättningar som foderfabriker. I denna studie undersöktes salmonellastammar från utbrott i svenska djurbesättningar avseende förmåga att bilda biofilm.

BAKGRUND

Det svenska salmonellakontrollprogrammet innebär att bekämpningsåtgärder måste vidtas i besättningar där salmonella påvisas. För att undvika återinfektion från miljön utförs rengöring och desinfektion av utrymmen och ytor som misstänks vara kontaminerade med salmonellabakterier. Återfall av salmonella i enskilda besättningar har ibland hänförs till brister i dessa åtgärder (Figur 1a och 1b). Biofilm försämrar effekten av rengöring och desinfektion av smutsiga ytor (2). Därför ville vi undersöka förmågan att bilda biofilm hos salmonellastammar som varit särskilt besvärliga att bekämpa i besättningen, eller där fodersmitta misstänkts.

BIOFILM

Biofilm består av ett hydrerat polymermatrix av bakterier som adhererar till varandra och till en yta (3). Bakterier kan tillväxa i den skyddande biofilmen men också frisättas, börja föröka sig och spridas i miljön (3).

Det är svårt att fullständigt reproducera naturlig biofilm i laboratorieexperiment och vanligen undersöks enskilda bakteriestammars adhesion till olika ytor. Förmåga till biofilmbildning hos *Salmonella enterica* har ofta undersökts

genom spektrofotometrisk mätning av adhesion till mikrotiterplattor. Benägenhet att bilda biofilm har associerats med olika serotyper av salmonella (1), men den enskilda bakteriestammen tycks ha större betydelse än serotyp (6). Ett flertal studier har undersökt sambandet mellan biofilm och persistens av salmonella i industriella miljöer för foderproduktion (10) och livsmedelsproduktion (4). Bara enstaka rapporter finns om samband mellan biofilm och persistens i djurbesättningar (7).

MATERIAL OCH METODER

20 stammar av *Salmonella enterica* subsp *enterica* från stamkollektionen vid statens veterinärmedicinska anstalt (SVA) användes i studien (se Tabell 1). Adhe-

sion till mikrotiterplattor mättes med spektrofotometri. Efter odling på blodagar tillsattes en bakteriekoloni till tio milliliter TSB (tryptic soy broth) och inkuberades över natt i 37°C. Därefter spädades fem mikroliter av buljongkulturen i 300 mikroliter TSB och triplikat av denna spädning applicerades i mikrotiterplattor av plast som inkuberades vid 37°C under 24 timmar respektive rumstemperatur (20°C) i 48 timmar. Efter inkubering sköljdes plattorna tre gånger med sterilt vatten för att avlägsna bakterier som inte fastnat på ytan. Kvarvarande adhererade bakterier fixerades med 100-procentig metanol i 15 minuter och färgades sedan med kristallviolett i fem minuter, sköljdes med sterilt vatten och avfärgades med 33-procentig acetonsyra. ➤

Tabell 1. SALMONELLASTAMMAR SOM UNDERSÖKTES AVSEENDE BILDANDE AV BIOFILM. OM INTE ANNAT ANGES FÖRELIGGER INGET EPIDEMIOLOGISKT ELLER NÄRA GEOGRAFISKT SAMBAND MELLAN STAMMARNAS.

Serotyp	ID-nummer*	Ursprung
1 <i>S cubana</i>	435/2003	Foderburet utbrott kopplat till foderfabrik ¹
2 <i>S cubana</i>	281/2008	Enstaka isolat, utan spridning, från grisbesättning
3 <i>S dublin</i>	187/2008	Utbrott i mjölkbesättning
4 <i>S dublin</i>	707/2007	Utbrott i mjölkbesättning
5 <i>S dublin</i>	859/2012	Utbrott i mjölkbesättning
6 <i>S mbandaka</i>	219/2013	Foderburet utbrott kopplat till foderfabrik
7 <i>S mbandaka</i>	471/2011	Slaktkycklingbesättning
8 <i>S mbandaka</i>	63/2004	Utbrott i mjölkbesättning
9 <i>S reading</i>	477/2007	Utbrott i mjölkbesättning ²
10 <i>S reading</i>	592/2007	Utbrott i mjölkbesättning ²
11 <i>S reading</i>	340/2009	Utbrott i mjölkbesättning ² (samma region som 592/2007)
12 <i>S thompson</i>	592/2010	Utbrott i grisbesättning
13 <i>S thompson</i>	936/2005	Utbrott i mjölkbesättning ³
14 <i>S typhimurium</i> DT104	84/2008	Utbrott i mjölkbesättning
15 <i>S typhimurium</i>	847/2008	Återkommande utbrott i slaktkycklingbesättning
16 <i>S typhimurium</i>	605/2008	Återkommande utbrott i värphönsbesättning
17 <i>S typhimurium</i> DT104	550/2004	Utbrott i mjölkbesättning
18 <i>S typhimurium</i> DT104	551/2004	Utbrott i mjölkbesättning (kopplat till 550/2004)
19 <i>S typhimurium</i>	767/2009	Grisbesättning, sparat till foderfabrik
20 <i>S typhimurium</i>	651/2010	Mjölkbesättning

* ID-nummer slutar med året då stammen isolerades.

¹ Se referens nr 10

² Se referens nr 4

³ Se referens nr 8

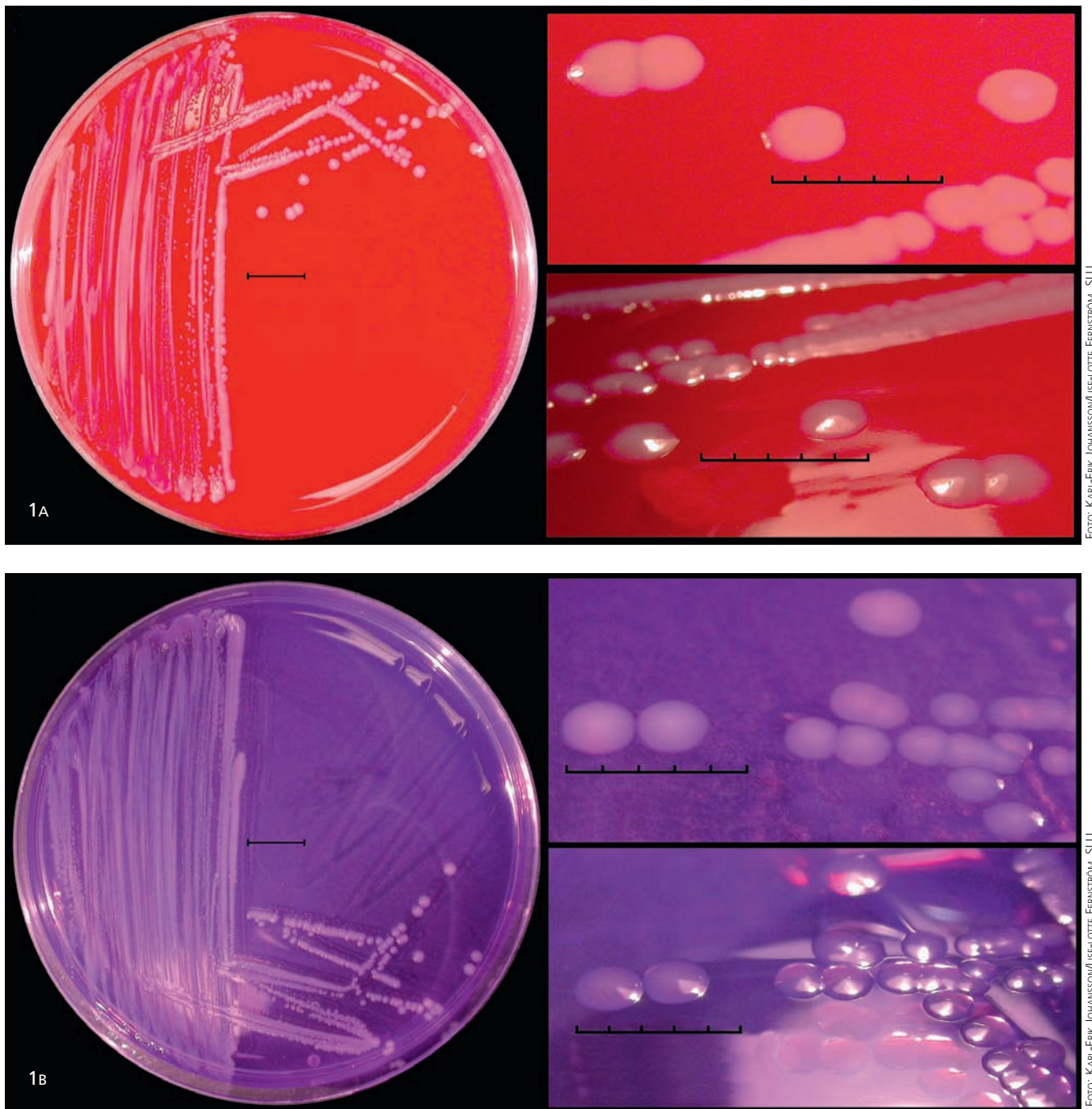


FOTO: KARL-ERIK JOHANSSON/LISE-LOTTE FERNSTRÖM, SLU

FOTO: KARL-ERIK JOHANSSON/LISE-LOTTE FERNSTRÖM, SLU

FIGUR 1. Återfall av salmonella i enskilda besättningar har ibland hänförs till brister i rengöring och desinfektion av ytor som misstänks vara kontaminerade med salmonellabakterier. Salmonella dublin, utstryk på blodagar (Figur 1a) och blåagar (Figur 1b).

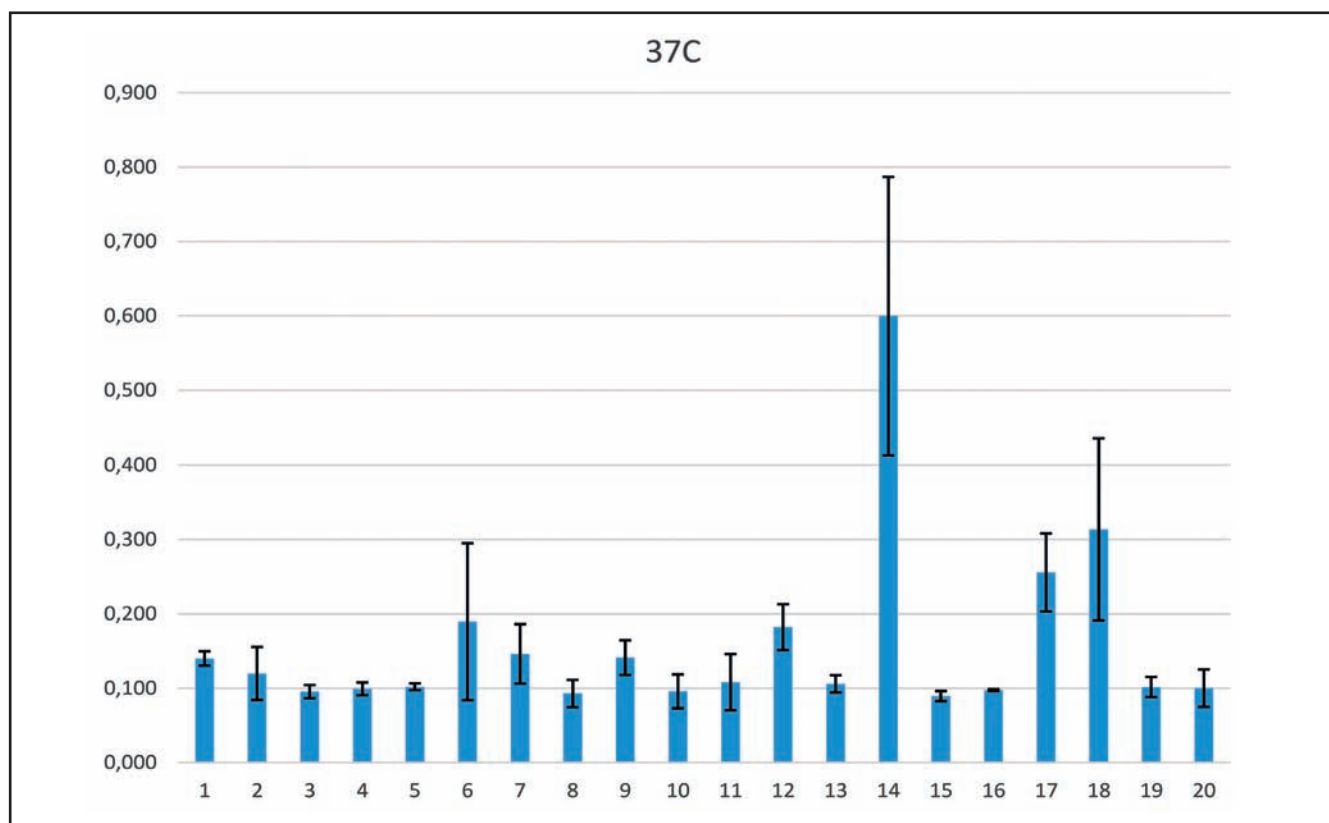
- Graden av infärgning (optisk densitet, OD) mättes i en Wallac VICTOR2 spektrofotometer vid 570 nanometer våglängd. Försöket upprepades tre gånger.

Resultaten beräknades som medelvärdet av varje triplikat. För varje stam beräknades även variationen inom och mellan plattorna, som standardavvikelsen delat med medelvärdet.

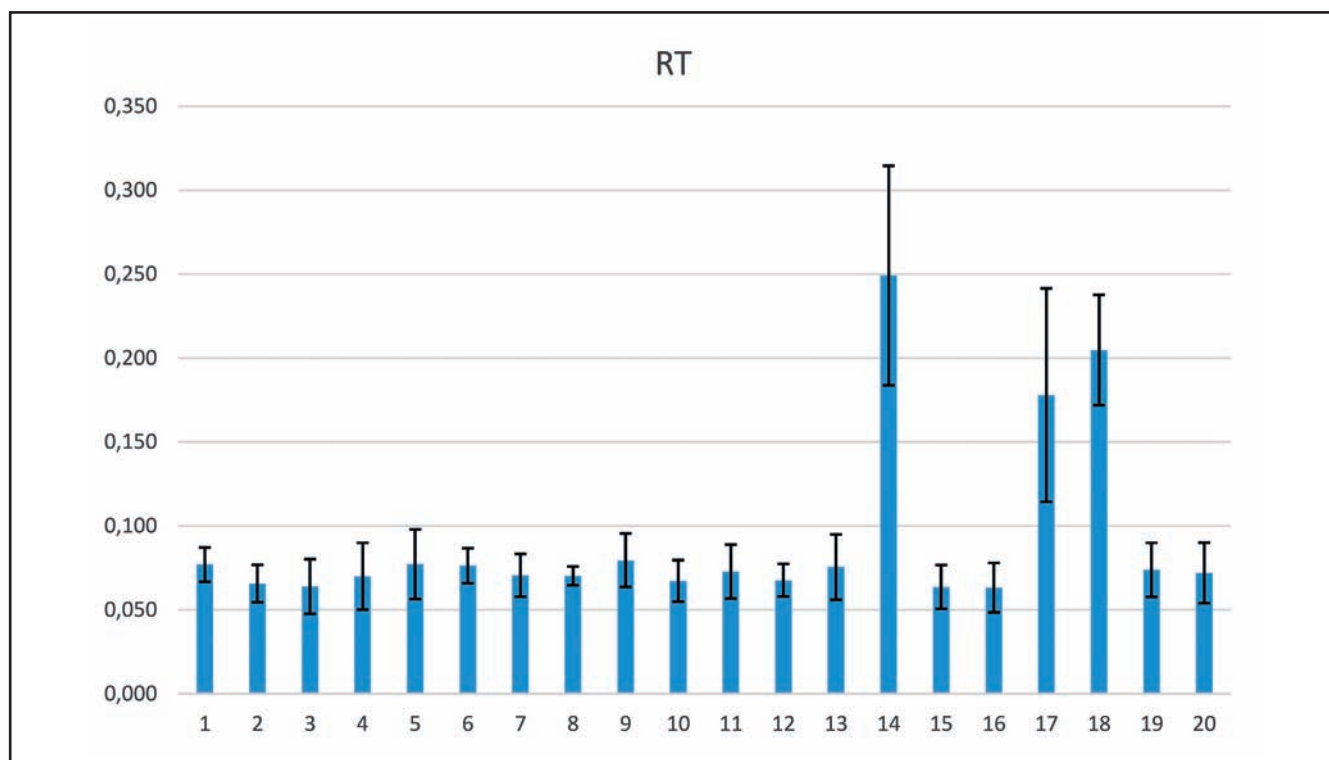
RESULTAT

Figur 2 och 3 visar OD-värden (medelvärde och standardavvikelse) för varje stam efter inkubering i 24 timmar vid 37°C (Figur 2) respektive 48 timmar vid rumstemperatur (Figur 3). Inga tydliga skillnader kunde ses mellan de olika stammarna, utom för de tre *S typhimurium* DT 104 (nummer 14, 17 och 18 i

Tabell 1). De senare uppvisade högre OD-värden vid båda inkuberingstemperaturerna. Variationen inom plattorna var 16 procent efter 37°C inkubering och 14 procent efter inkubering i rumstemperatur. Variationen mellan plattorna var 24 procent efter inkubering vid 37°C och 18 procent vid rumstemperatur.



FIGUR 2. Biofilm hos stammar av *Salmonella enterica* uppmätt som optisk densitet (OD), efter inkubering vid 37°C i 24 tim (37C). X-axeln visar stamnummer som angivet i Tabell 1. Y-axeln visar OD-värde, staplarna visar medelvärdet från tre plattor med triplikat, felstaplar inkluderar medelvärdet +/- en standardavvikelse.



FIGUR 3. Biofilm hos stammar av *Salmonella enterica* uppmätt som optisk densitet (OD), efter inkubering vid rumstemperatur i 48 tim (RT). X-axeln visar stamnummer som angivet i Tabell 1. Y-axeln visar OD-värde, staplarna visar medelvärdet från tre plattor med triplikat, felstaplar inkluderar medelvärdet +/- en standardavvikelse.

► METODASPEKTER

Det har hävdats att mätning av baktériers adhesion till polystyrenplattor inte är en optimal metod för att bedöma biofilmsbildning och andra, mer realistiska men resurskrävande modeller, har förespråkats (1, 2). För syftet med denna studie bedömdes dock den använda (och vanligaste) modellen som tillräcklig. Temperatur och odlingsmedium har visats påverka biofilmsbildning (6, 10). Den buljong som användes här har tidigare visats gynna bildandet av biofilm (8) och inkubering vid 20°C har framhållits som det mest realistiska för att bedöma naturlig biofilmsbildning (10).

DISKUSSION

Bildande av biofilm kunde, med den metod som användes här, inte associeras med vare sig foder som smittkälla eller benägenhet till persistens i besättningen. De tre stammarna av *S typhimurium* DT104, som var de enda som uppvisade ökad bildning av biofilm, hade inte kopplats till några särskilda svårigheter vid bekämpningen i besättningarna. Ingen av de andra stammarna som hade varit besvärliga att bekämpa och/eller kopplats till foderburen smitta, uppvisade någon särskild benägenhet att bilda biofilm i den modell som användes här. Sådana "besvärliga" stammar inkluderade en *S thompson* (nummer 13 i Tabell 1, besättningsutbrott beskrivet i referens nr 9), tre *S reading* (nummer 9, 10 och 11 i Tabell 1, besättningsutbrott beskrivet i referens nr 5), en *S cubana* (nummer 1 i Tabell 1, foderutbrott beskrivet i referens nr 11) och två *S typhimurium* (nummer 15 och 16 i Tabell 1). Där emot förväntades inte någon nämnvärd biofilmsbildning hos *S dublin*, eftersom persistens i besättningsmiljön anses vara av mindre betydelse för denna serotyp än anpassning till den huvudsakliga värden (nötkreatur).

Resultaten stödde alltså inte hypotesen att olika benägenhet att bilda biofilm eller adherera till ytor hänger samman med svårigheter att bekämpa olika salmonellastammar i enskilda besättningar. Detta överensstämmer med resultaten från en annan studie (7) även om det fortfarande är möjligt att andra egenskaper som har att göra med bildandet av biofilm kan skilja sig mellan olika

stammar. Biofilm är förmodligen av mindre betydelse för skillnader mellan olika salmonellautbrott. Ett antal olika faktorer påverkar utfallet av salmonella-introduktion och spridning av salmonella inom en djurbesättning. Några som kan nämnas är djurslag, produktionsform, besättningsstorlek och olika miljöfaktorer i den enskilda djurbesättningen.

SUMMARY

Biofilm formation in salmonella strains isolated from Swedish herds

The aim of the present study was to compare the biofilm formation of 20 salmonella strains isolated from outbreaks in Swedish farm animals, in order to assess if this could be associated with on-farm persistence or recurrence, or spread via feed. Spectrophotometry was used to assess the adhesion to microtiter plates.

Biofilm formation could not be associated with serotype or source of the strain. Three *S typhimurium* DT 104 strains appeared to have a higher biofilm formation capability. Except for these strains, there was little variation in the results for different strains.

TACK

Denna studie genomfördes med medel från Jordbruksverket. Författarna vill också tacka Lena Falkenäs på SVA för hjälp med att ta fram salmonellastammarna.

Referenser

- Corcoran M, Morris D, De Lappe N et al. *Salmonella enterica* biofilm formation and density in the Centers for Disease Control and Prevention's biofilm reactor model is related to serovar and substratum. *J Food Prot*, 2013, 76, 662–667.
- Corcoran M, Morris D, De Lappe N et al. Commonly used disinfectants fail to eradicate *Salmonella enterica* biofilms from food contact surface materials. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80, 1507–1514.
- Costerton JW, Stewart PS & Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 1999, 284, 1318–1322.
- Jakociune D, Bisgaard M, Pedersen K & Olsen JE. Demonstration of persistent contamination of a cooked egg product production facility with *Salmonella enterica* serovar Tennessee and characterization of the persistent strain. *J Appl Microbiol*, 2014, 117, 547–553.
- Lahti E, Ivarsson S, Ågren E et al. A prolonged outbreak of *Salmonella reading* affecting humans and animals in Sweden. In: Proceedings of I3S International Symposium on Salmonella and Salmonellosis, St Malo, France, 2010, 333–335.
- Lianou A & Kotsoumanis KP. Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella enterica* under various environmental conditions. *Int J Food Microbiol*, 2012, 160, 171–178.
- Schonewille E, Nesse LL, Hauck R et al. Biofilm building capacity of *Salmonella enterica* strains from the poultry farm environment. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2012, 65, 360–365.
- Stepanovic S, Cirkovic I, Ranin L & Svabic-Vlahovic M. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Lett Appl Microbiol*, 2004, 38, 428–432.
- Sternberg Lewerin S, Johnsson A, Aspan A et al. Case report: Outbreak of *Salmonella thompson* infection in a Swedish dairy herd. *Vet Rec*, 2008, 163, 596–599.
- Vestby LK, Møretø T, Langsrud S et al. Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal- and feed factories. *BMC Vet Res*, 2009, 5, 20.
- Österberg J, Vågsholm I, Boqvist S & Sternberg Lewerin S. Feed-borne outbreak of *Salmonella cubana* in Swedish pig farms: Risk factors and factors affecting the restriction period in infected farms. *Acta Vet Scand*, 2006 47, 13–22.

*SUSANNA STERNBERG LEWERIN, leg veterinär, VMD, professor, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, Sveriges lantbruksuniversitet, Box 7036, 750 07 Uppsala.
LISE-LOTTE FERNSTRÖM, biomedicinsk analytiker, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU, Box 7036, 750 07 Uppsala.

Fel författare till förra Epizteln

I veterinärtidningen nummer 10/16 (sidan 31) angavs att den som sammanställt texten om mjältbrandsutbrottet på Omberg var Cecilia Hultén. Det var fel, rätt författare till Epizteln 10/16 är Karl Ståhl, SVA. Redaktionen beklagar sammanblandningen.

Johan Beck-Friis