



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och
husdjursvetenskap

Institutionen för biomedicin och veterinär
folkhälsvetenskap

Kan bakteriofager användas för att reducera nivån av *Campylobacter* hos slaktkyckling?

**Can bacteriophages be used to reduce the level
of *Campylobacter* in broiler?**

Ellen Thor

*Uppsala
2019*

Kan bakteriofager användas för att reducera nivån av *Campylobacter* hos slaktkyckling?

Can bacteriophages be used to reduce the level of *Campylobacter* in broiler?

Ellen Thor

Handledare: Sofia Boqvist, Sveriges lantbruksuniversitet,
Institutionen för biomedicin och veterinär
folkhälsvetenskap

Examinator: Maria Löfgren, Sveriges lantbruksuniversitet,
Institutionen för biomedicin och veterinär
folkhälsvetenskap

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: Grundnivå, G2E

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kurskod: EX0862

Program/utbildning: Veterinärprogrammet

*Kursansvarig institution: Institutionen för biomedicin och
veterinär folkhälsvetenskap*

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2019

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: Bakteriofager, *Campylobacter*,
slaktkyckling, **Key words:** Bacteriophages,
Campylobacter, broiler

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsvetenskap

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	2
Inledning	3
Material och metoder	3
Litteraturoversikt	4
<i>Campylobacterios och smittspridning</i>	4
<i>Campylobacter</i> spp. hos slaktkyckling	4
Bakteriofager	5
<i>Fördelar med användning av bakteriofager</i>	5
<i>Nackdelar med användning av bakteriofager</i>	5
In vivo-studier på bakteriofager mot <i>Campylobacter</i>	6
<i>Metod och administrationssätt</i>	6
<i>Resultat och slutsatser</i>	7
<i>Resistensutveckling mot bakteriofager</i>	8
Bakteriofager mot biofilm skapad av <i>Campylobacter</i>	9
Diskussion	10
<i>Administrationssätt</i>	10
<i>Dos</i>	11
<i>Behandlingstid</i>	11
<i>Bakteriofagtyp</i>	11
<i>Biofilm</i>	11
<i>Resistensutveckling</i>	11
Utmaningar inför framtiden	12
Konklusion	12
Litteraturförteckning	14

SAMMANFATTNING

Campylobacter spp. är den vanligaste livsmedelsburna bakterien att orsaka sjukdom hos människa i Sverige och i EU. Bakterien orsakar problem som diarré, magont, kräkningar, illamående, feber och huvudvärk men kan också leda till allvarigare komplikationer som reaktiv artrit. Slaktkyckling är ett av de största risklivsmedlen och hur vi föder upp, slaktar och tillreder kycklingen har stor betydelse för smittspridningen. När *Campylobacter* kommer in i en kycklingflock kan prevalensen bli hög men djuren är oftast symptomfria, vilket gör infektionen svår att upptäcka.

År 1989 blev campylobacterios en anmälningspliktig sjukdom. Antalet humanfall har ökat de senaste åren och 2017 rapporterades hela 10 608 fall i Sverige. Denna siffra är slående hög och detta trots att många fall aldrig rapporteras.

Bakteriofager är virus som infekterar bakterier för att kunna föröka sig, vilket leder till att bakterierna avdödas. Bakteriofager finns överallt i miljön och har studerats sedan början av 1910-talet, men det är först på senare år forskare har tittat närmare på hur de skulle kunna användas för att kontrollera livsmedelsburna patogener. Idag genomförs många studier inom området och flera fördelar, men även svårigheter, kring användandet av bakteriofager har presenterats.

Syftet med denna litteraturstudie är att undersöka hur bakteriofager fungerar och om vi med hjälp av dem kan reducera förekomsten av *Campylobacter* spp. hos slaktkyckling och på så sätt även antalet humanfall smittade av bakterien via kyckling.

Fyra in vivo-studier redovisas i detta arbete och visar på styrkor och svagheter inom området. Generellt visar studierna att behandling av slaktkyckling med bakteriofager skulle kunna användas för att reducera nivåerna av *Campylobacter* till viss del. Det har även visats finnas förutsättningar för att bakteriofager skulle kunna användas för rengöring av biofilm som kan skapas av *Campylobacter* i kycklingstallar och även på så sätt kunna hålla nere smittspridningen. En av de stora riskerna som påträffats är en möjlig resistensutveckling mot bakteriofager hos bakterien. Det verkar dock finnas möjligheter att hålla den inom kontroll, och för att möjliggöra detta krävs mer forskning.

Det finns en hel del punkter som kräver vidare forskning för att kunna avgöra om bakteriofager är en lämplig behandlingsmetod och vilka de optimala behandlingsrekommendationerna då skulle vara. Det handlar om rätt dos, administrationsätt, kombination av bakteriofager samt tidpunkt för behandling och behandlingstid. Bakteriofagterapi för reduktion av *Campylobacter* hos slaktkyckling är ett ämne som kräver vidare forskning men som kan komma att vara möjligt i framtiden.

SUMMARY

Campylobacter spp. is the most common bacteria to cause gastrointestinal infection in humans in Sweden and within the EU. An infection often leads to diarrhea, nausea, stomach pain, fever, and headache but it can also induce more serious conditions such as arthritis. Broiler is one of the most common sources of human campylobacteriosis and how we keep, slaughter and prepare them before consumption are important aspects for the spread of the infection from the chicken to humans. When *Campylobacter* infect a broiler flock it will spread rapidly within the flock, however, the infection is mostly asymptomatic which makes it hard to detect.

In 1989 campylobacteriosis became a notifiable disease. The number of cases in Sweden has increased in recent years and during 2017, 10608 cases were reported. This number is high even though a lot of cases never is reported to the authorities.

Bacteriophages are viruses that infect bacteria to replicate and these organisms are naturally occurring in the environment. Bacteriophages have been studied since the early 1900s' but it is not until recently that scientists have started to investigate the potential of bacteriophages as a possibility to control foodborne pathogens.

The purpose of this study was to look into how bacteriophages function and if they can be used to reduce levels of *Campylobacter* spp. in broilers, and thereby also reduce the cases of human campylobacteriosis.

This study found that bacteriophage therapy might work as a method to reduce the levels of *Campylobacter* in broilers. It was also shown that bacteriophages potentially could be used to inactivate *Campylobacter* in biofilm in the broiler houses and in that way reduce the spread of the infection. One of the biggest risks with bacteriophage therapy was shown to be the possible development of phage resistant bacteria. However, studies show that it might be possible to control the resistance, but more research is required on this topic.

Four in vivo-studies are presented in this report and they show various strengths and weaknesses associated with phage therapy. A lot more research is needed to be able to tell if this is a suitable method to reduce *Campylobacter* in broiler chicken and if so, how we should treat the broilers. In this report, way of administration, suitable dosage, combinations of bacteriophages and time of treatment are discussed.

Treatment of broiler chicken with bacteriophages to reduce the levels of *Campylobacter* might be possible in the future, but it requires further research.

INLEDNING

Campylobacter spp. är i dagsläget den vanligaste orsaken till bakteriell gastrointestinal infektion i Sverige och i EU (EFSA & ECDC, 2016; Folkhälsomyndigheten, 2018). Under 2017 rapporterades 10 608 fall av campylobacterios i Sverige (Folkhälsomyndigheten, 2018) och att denna siffra är så pass hög trots att det en stor underrapportering (Boqvist *et al.*, 2018) är minst sagt oroväckande. Antalet rapporterade fall som blivit smittade i Sverige har ökat sedan år 1989 då sjukdomen blev anmälningspliktig. Den markanta ökningen de senaste åren beror framförallt på ökad förekomst av bakterien hos kycklingar på svenska gårdar (Folkhälsomyndigheten, 2018) men även andra faktorer spelar in. På senare år har det även varit ett antal utbrott av campylobacterios i Sverige (Folkhälsomyndigheten, 2017b). Allt detta visar på relevansen av forskning kring bakterien och dess smittspridning till människa samt forskning angående förebyggande åtgärder och behandling på gårdsnivå.

Campylobacter spp. koloniserar tarmen hos flera djurslag och en viktig smittväg till människa är via kontaminerat kött. Denna zoonos är asymtomatisk hos de flesta djurslag men orsakar hos människa oftast en självläkande gastroenterit (SVA, 2017).

På senare år har forskare undersökt möjligheten att potentiellt kunna använda bakteriofager för att minska förekomst av *Campylobacter* spp. på uppfödningnivå. Bakteriofager är virus som saknar enzymsystem och egen metabolism och därför infekterar de bakterier som intracellulära parasiter (Hagens & Loessner, 2007; Wernicki *et al.*, 2017). Mycket forskning pågår inom ämnet och några viktiga kriterier att uppfylla för att kunna använda bakteriofager mot livsmedelsburna bakterier är att de måste vara effektiva, praktiskt användbara samt säkra för djur och människa (Doyle & Erickson, 2006).

Syftet med denna litteraturstudie är att undersöka hur bakteriofager fungerar och om vi med hjälp av dem kan reducera förekomsten av *Campylobacter* hos slaktkyckling och på så sätt även antalet humanfall smittade av bakterien via kyckling.

MATERIAL OCH METODER

Litteraturen som användes för denna studie består huvudsakligen av artiklar som hittats via databaserna PubMed och Web of Science med sökorden *Campylobacter* AND (broiler OR poultry), *Campylobacter* AND phag* samt *Campylobacter* AND phag* AND (broiler OR poultry). Många relevanta artiklar hittades även i litteraturförteckningen hos dessa artiklar. Källor som Folkhälsomyndigheten och EFSA användes för information angående statistik, dagsläge och utbrott.

Eftersom syftet med denna studie har varit att undersöka om och hur bakteriofager kan användas hos kycklingproducenter så har jag valt att avgränsa arbetet till mestadels *in vivo*-studier då det varit mest relevant.

Ordet ”fag” är en förkortning av ”bakteriofag” och orden används synonymt i detta arbete.

LITTERATURÖVERSIKT

Campylobacterios och smittspridning

Campylobacter spp. är en vanligt förekommande bakterie som hos människa kan orsaka diarréer, kräkningar, feber, magsmärtor och illamående. Komplikationer som reaktiv artrit är dock också vanligt (Folkhälsomyndigheten, 2017a). De vanligaste underarterna att orsaka sjukdom hos människa är *Campylobacter jejuni* och *Campylobacter coli* (Acheson & Allos, 2001) och kött från slaktkyckling anses vara den viktigaste smittkällan av bakterien till människa (EFSA & ECDC, 2016). Bakterien förekommer dock ofta även hos andra djurslag, exempelvis gris och nöt (Folkhälsomyndigheten, 2017a)

Eftersom campylobacterios är anmälningspliktig finns det bra statistik på antalet rapporterade fall hos Folkhälsomyndigheten. Folkhälsomyndigheten följer säsongsvariationer över månader och år och kan på så vis jämföra med antalet fall under samma månad under tidigare år och det är, bland annat, på så sätt man kan avgöra om det är ett utbrott eller bara förväntade säsongsvariationer. Under 2014–2015 samt under 2016 konstaterade man två stora utbrott och dessa framförallt på grund av ökad förekomst av *Campylobacter* spp. hos de svenska kycklingproducenterna (Folkhälsomyndigheten, 2017b). Utbrotten kan dock även bero på andra saker så som slakthygien.

Kontaminering av bakterien från tarmkanalen till slaktroppen i samband med slakt är den vanligaste orsaken till *Campylobacter* på kycklingkött. Vid bristande upphettning av kycklingkött eller bristande livsmedelshygien finns det risk för smittspridning och insjuknande i campylobacterios (Folkhälsomyndigheten, 2017a).

Förebyggande arbete på gårdarna anses vara det mest effektiva sättet för att minska antalet smittade humanfall jämfört med insatser senare i produktionskedjan. En reducering av infekterade kycklingar betyder lägre smittryck på slakteriet och mindre risk för kontaminerade produkter på marknaden (EFSA, 2005; Wagenaar *et al.*, 2013).

***Campylobacter* spp. hos slaktkyckling**

Kycklingflockar smittas ofta med *C. jejuni* och *C. coli* utan märkbar påverkan hos djuren (Shane, 2000). Det är sällan man kan diagnosticera infekterade djur innan dag sju men från och med infektion förblir kycklingar ofta symptomlösa smittbärare fram till slakt (Gibbens *et al.*, 2001). När bakterien väl kommer in i en flock sprids infektionen väldigt fort och hela flocken blir vanligtvis infekterad (Wagenaar *et al.*, 2013). En anledning till den höga prevalensen är troligen den låga infektionsdosen på 400-500 bakterier (Moore *et al.*, 2005) i kombination med att så höga nivåer som 10^8 bakterier per gram utsöndras med avföringen (Wagenaar *et al.*, 2013).

Många faktorer påverkar hur *Campylobacter* kommer in i en kycklingflock. Stora risker associerade med förekomst av *Campylobacter* hos svenska kycklingproducenter är bland annat hållande av andra livsmedelsproducerande djur nära kycklingstallet samt delad slakt, det vill säga att man samlar ihop en del av kycklingarna för slakt medan man håller kvar en

del för ytterligare tillväxt. Flera byten av skor innan inträde i kycklingstallet samt god generell renlighet i stallarna minskar risken för *Campylobacter* (Hansson *et al.*, 2010).

Bakteriofager

Bakteriofager är virus som inte har någon egen metabolism och därför infekterar de bakterier för att kunna föröka sig (Hagens & Loessner, 2007; Wernicki *et al.*, 2017) och finns naturligt överallt i miljön där deras värd bakterier kan leva (Connerton *et al.*, 2011). Redan på 1910-talet studerades bakteriofager och man förstod snabbt att de kunde användas mot bakterieinfektioner, till exempel dysenteri (Sulakvelidze *et al.*, 2001). Fager förökar sig genom antingen lytisk infektion eller lysogen infektion, de båda sätten är liknande och går ut på att fagens DNA injiceras i bakteriens DNA vilket leder till en förökning av bakteriofager (Sulakvelidze *et al.*, 2001).

Fördelar med användning av bakteriofager

En viktig och användbar egenskap hos dessa intracellulära parasiter är att de är värdspecifika och bara kan infektera en specifik bakterieart eller bakteriestam (Hagens & Loessner, 2007) och därför påverkar de inte normalfloran (Moye *et al.*, 2018). Just det är en viktig skillnad jämfört med antibiotika där användandet även påverkar normalfloran vilket i sin tur kan leda till sekundära infektioner (Jamal *et al.*, 2019).

Det finns fler fördelar med att använda bakteriofager mot livsmedelsburna patogener än just värdspecifitet. Dessa organismer anses vara säkra för människan då de till största delen består av nukleinsyror och proteiner (Abedon & Thomas-Abedon, 2010; Loc-Carrillo & Abedon, 2011) men eftersom de är bakteriedödande kan det frigöras toxiner vid lysering och bakteriofagerna kan på så sätt påverka immunsystemet. Reaktionen anses dock vara mild och väldigt sällsynt (Abedon & Thomas-Abedon, 2010).

En annan fördelaktig egenskap hos bakteriofager som diskuteras är att de "autodoseras" i kroppen genom att de förökar sig där deras bakterievärd finns och på detta sätt själva bidrar till doseringen (Loc-Carrillo & Abedon, 2011). Detta ger hög potential för att en singeldos skulle räcka för att döda en stor andel bakterier (Abedon & Thomas-Abedon, 2010).

Nackdelar med användning av bakteriofager

Loc Carillo och Abedon (2011) skriver utöver fördelar även om potentiella nackdelar med bakteriofagterapi och beskriver det som följer i detta stycke. Alla bakteriofager är inte passande för ändamålet, man måste välja rätt typ av fager och ta fram tillförlitliga metoder för att säkerställa detta. Att de är så värdspecifika gör även att fagerna ofta måste blandas i så kallade "cocktails" vilket leder till att spektrumet för fagerna blir mycket bredare. Dock är inte spektrumet lika brett som hos många antibiotika med smalt spektrum. Som nämnt tidigare kan fagerna även interagera med kroppens immunsystem, men det är likadant med vissa antibiotika samt vaccin så det anses inte vara ett avgörande problem i frågan om säkerhet. En av de största utmaningarna angående bakteriofagterapi är enligt Loc Carillo och Abedon den bristande kunskapen i ämnet. De nämner att fager som virus kan misstolkas av allmänheten

som patogener vilka orsakar sjukdom, och därför är det enligt författarna möjligtvis en fördel att benämna dessa virus som just fager.

En osäkerhet i användandet av bakteriofager är potentiell utveckling av resistent bakteriestammar och många studier riktas därför mot det perspektivet. Det är en viktig del att kartlägga för att möjliggöra för bakteriofaganvändning i produktionsledet av humana livsmedel (Mahony *et al.*, 2011).

In vivo-studier på bakteriofager mot *Campylobacter*

Bakteriofager specifika mot *C. jejuni* och *C. coli* delas in i tre grupper beroende på genomets storlek samt organismens diameter (Sails *et al.*, 1998). Vid isolering av bakteriofager att testa mot *Campylobacter* i slaktkyckling är det vanligt att man gör blandningar av fager ur olika grupper. I en studie av Moye *et al.* (2018) upptäcktes till exempel att en ensam grupp ej var så effektiv i sig själv utan en blandning av två grupper var att föredra för optimal effektivitet.

Nedan följer fyra in vivo-studier där bakteriofager administrerats till kycklingar för att undersöka om det går att reducera *Campylobacter* genom användning av fager i besättningen. Dessa fyra studier har delats upp under ”Metod och administrationssätt” och ”Resultat” samt ytterligare studier av samma forskare från samma artiklar under ”Resistensutveckling”.

Metod och administrationssätt

I en studie av Carvalho *et al.* (2010) undersöktes effektiviteten hos en fag-cocktail innehållandes tre olika bakteriofagtyper samt effektiviteten hos två olika administrationsvägar. För försöket var det viktigt att nivån av *Campylobacter* hos kycklingarna var tillräckligt hög så att det skedde en konstant bakterieutsöndring i feces. En bra nivå ansågs, sett till naturlig kolonisation av *Campylobacter*, vara mellan 1×10^6 och 1×10^9 CFU (colony forming units) /g feces. I experiment 1 gavs 1×10^6 PFU (plaque forming unit) av en cocktail i 1 ml lösning med CaCO_3 via sond till kycklingar av en veckas ålder infekterade med *C. jejuni*. CaCO_3 gavs för att bakteriofagerna tros vara känsliga mot lågt pH i magsäcken och detta ämne är buffrande. I experiment 2 gavs cocktailen till *C. coli*-infekterade kycklingar både via sondmatning samt genom att blanda det i fodret. De som fick giva via sond fick samma dos som de i experiment 1 och de som fick bakteriofager i fodret fick 45 g foder med 1.5×10^7 PFU blandat i 1,5 ml buffertlösning. Dessa grupper jämfördes med en kontrollgrupp som bara fick buffrande substans (CaCO_3). Kontrollgruppen och experimentgrupperna hade samma nivå av *Campylobacter* vid start och kontrollgruppen hade stabil nivå (ingen statistisk signifikant skillnad) av bakterien under försöket vilket försäkrar att grupperna kan jämföras samt att djuren var väl koloniserade av bakterien inför försöken.

Loc Carillo *et al.* (2005) undersökte bland annat den optimala dosregimen för bakteriofagterapi mot *Campylobacter* samt vilken typ av bakteriofag som är mest effektiv. Kycklingar infekterades med 3-8 \log_{10} CFU *C. jejuni* i 1 ml lösning via sond vid 18-20 dagars ålder och resultaten jämfördes med oinfekterade kontrollgrupper. Bakteriofager av sorten CP34 samt CP8 i doserna \log_{10} 5, 7 och 9 PFU administrerades via sondmatning vid 25

dagars ålder i en 1 ml lösning med CaCO₃. Kontrollgruppen fick endast lösning med CaCO₃. Fåglar avlivades och undersöktes i 24-timmars intervall.

I en studie av Kittler *et al.* (2013) undersöktes den optimala tidpunkten för bakteriofagadministration till kycklingarna för att nivån av *Campylobacter* skulle vara så låg som möjligt när de kom till slakteriet. Tre fältförsök utfördes i olika flockar där kycklingarna gavs bakteriofager via dricksvattnet. Att efterlikna verkligheten i kommersiell kycklingproduktion användes inte någon buffrande lösning så som CaCO₃. Dosen av bakteriofager per kyckling beräknades vara log₁₀ 7.2, log₁₀ 7.9 respektive log₁₀ 7.5 PFU i de tre försöken.

Fischer *et al.* (2013) utförde en studie med syfte att utöka kunskapen om potentialen hos bakteriofager för reduktion av *Campylobacter* hos slaktkyckling. Dagsgamla kycklingar togs om hand och delades in i grupper om 92. På dag 6 avlivades fyra kycklingar per grupp för att konstatera att de var fria från *Campylobacter*. Till de andra kycklingarna administrerades en lösning med *Campylobacter* på 1 ml med koncentrationen 10⁴ CFU/ml direkt till krävan. Tre dagar senare fick fåglarna i behandlingsgruppen en 1 ml lösning av bakteriofager och CaCO₃ som buffrande ämne med en koncentration av fager på 10⁷ PFU/ml administrerat direkt till krävan. Denna lösning var en blandning av lika delar fag nummer 1, 2, 5 och 13. På levnadsdag 10, 12, 16, 23, 30, 37, 44 och 51 avlivades 11 fåglar i varje grupp för undersökning och dissektion. Därifrån gjordes två försök: ett där man jämförde behandlingsgrupp med kontrollgrupp som bara fått buffertlösning för förekomst av den aktuella bakterien och ett annat där man jämförde grupp som bara fått fag nummer 1 med grupp som fått fagblandningen av fyra sorter och även här fanns kontrollgrupp med fåglar som endast fått buffertlösning .

Resultat och slutsatser

I båda försöken av Carvalho *et al.* (2010) sågs en reduktion av *Campylobacter* hos grupperna givna bakteriofager jämfört med kontrollgruppen. I experiment 1 var det möjligt att fastställa en minskning av *C. jejuni* med 2.34 log₁₀ CFU/g feces och denna minskning var konstant under hela försöket. I experiment 2 sågs efter sju dagar, det vill säga i slutet av behandlingen, en något högre reduktion av bakterien hos de kycklingar där fager gavs via fodret än hos de som fick fager via sond. En högre reduktion av bakterien kunde även ses redan vid två dagar efter behandling. Djuren observerades under försöket för att se till att alla hade ätit av det behandlade fodret. Fag-koncentrationen i avföringen visar att kycklingarna infekterade med *C. jejuni* och *C. coli* utsöndrade stabila nivåer av bakteriofager under hela försöket vilket visar på att bakteriofager kunde replikeras och då även reducera populationen av *Campylobacter*.

I studien av Loc Carillo *et al.* (2005) visades CP34 vara generellt mer effektiva för reduktion av *C. jejuni* än CP8. Det kunde dock konstateras att CP8 var mer effektiv mot vissa bakterieisolat. Hos alla individer som fått CP34 var minskningen av bakterien signifikant på minst ett av de tre provsamlingsområdena oavsett om dosen var 5, 7 eller 9 log₁₀ PFU. De två lägre doserna var dock mer effektiva än den högsta, varför är inte helt klart. Med

kombinationen av bakteriofag CP8 och dosen 7 log₁₀ PFU kunde forskarna, inom loppet av 24h efter administration, se en så stor minskning av *C. jejuni* som log₁₀ 5.6 CFU/g administration (P = 0,00005).

Studien av Kittler *et al.* (2013) har visat att en reduktion av *Campylobacter* på upp till log₁₀ 3.2 CFU/g feces är möjlig hos kommersiella slaktkycklingproducenter med bakteriofagterapi. Den slutsats som drogs efter dessa försök var att administration av bakteriofager bör ske 2-4 dagar före slakt för optimal reducering av *Campylobacter*. Timing och passande cocktails beskrivs vara viktigt för bra resultat.

Fischer *et al.* (2013) såg att i försök 1 ledde bakteriofagbehandling till en signifikant (p<0,001) reducering av *Campylobacter* upp till tre dagar efter administrering av fager. I försök 2 konstaterades en reducering av bakterien på ett medelvärde av log₁₀ 1,3 CFU/g feces hos både gruppen med blandade fager och gruppen med en enda typ av fag. I det senare var nivån av bakterier i medel lägre hos båda behandlingsgrupper än kontrollgruppen, med undantag för dag tre för gruppen med bara 1 fagtyp. Mellan dag 7 och 35 var skillnaden mellan grupperna däremot signifikant (p<0,001-0,036). Största reduceringen av bakterier sågs dag 21 med log₁₀ 2,8 CFU/g feces. Forskarna kom med denna studie fram till att bakteriofager har god förmåga att reducera *Campylobacter* hos kyckling och att bakteriofager troligen kommer att spela en viktig roll i kampen mot *Campylobacter* på gårdsnivå och vidare även mot smittspridningen till människa. Genomtänkta kombinationer av bakteriofager är en väldigt viktig del för den framtida utvecklingen.

Bakteriofagernas potential för reduktion av *Campylobacter* har i dessa studier studerats på olika sätt med varierande doser, typer av fager, administrationssätt och tidpunkter för administrering samt provtagning. Alla fyra redovisade studier har visat att en reducering är möjlig men resultaten varierar från en minskning med log₁₀ 2.8 till log₁₀ 5.6 CFU/g feces. De olika studierna har haft olika fokusområden; effektiviteten hos en specifik cocktail, optimal dosregim, optimal behandlingstidpunkt respektive bakteriofagers potential att reducera antalet *Campylobacter* men gemensamt för alla fyra studier är att de kommer fram till att mer forskning behövs inom ämnet.

Resistensutveckling mot bakteriofager

Carvalho *et al.* (2010) genomförde i samma studie som ovan även resistensundersökningar. För att undersöka resistensutvecklingen mot bakteriofager hos kycklingarna infekterade med och behandlade för *C. jejuni* isolerades totalt 300 bakteriekolonier från alla djur i gruppen tillhörande experiment 1. Proven testades före och efter administrering av bakteriofager. Före administration observerades 6 % resistenta bakteriekolonier och 7 dagar efter behandling observerades 13 % resistenta kolonier. Slutsatsen av detta blev att resistensen kan ha utvecklats under försöket och i så fall skulle den resistenta fenotypen ha blivit den dominerade. Tidigare observationer har visat att resistenta fenotyper blir utkonkurrerade av de icke känsliga fenotyperna i tarmen och för att testa detta infekterades sju grupper om 15 kycklingar med fagkänsliga samt fagresistenta stammar från första resistensförsöket. Sju

dagar senare sågs ingen signifikant skillnad ($P > 0,05$) i nivåer av *Campylobacter* i avföringen mellan grupperna. Ännu ett försök gjordes där man slumpmässigt valde tre bakteriekolonier från fekala prover från varje kyckling i varje grupp och fastslog deras känslighet mot bakteriofag-cocktailen. 86,2 % av kolonierna som isolerades från kycklingar med resistentastammar förlorade den resistentastammen och 54 % av de resistentastammarna omvandlades till känsliga stammar.

Också Loc Carillo *et al.* (2005) utförde tester för undersökning av resistensutveckling. 11 % av de isolat som överlevt CP34-fager *in vitro* var resistentastammar mot fortsatt CP34-infektion. 4 % av kolonierna som isolerats från kycklingar efter behandling och behandlats med bakteriofag CP34 var resistentastammar. Spontan bakteriofagresistens kunde ej observeras hos kontrollgrupperna infekterade med *C. jejuni* utan bakteriofagterapi och man kunde även konstatera att korskontamination med andra campylobactstammar inte hade förekommit, resistensen hade utvecklats från originalstammen. 90 isolat från kycklingar som infekterats med två olika typer av resistentastammar testades också och av dessa hade 97 % omvandlats till fagkänsliga stammar.

I studien av Fischer *et al.* (2013) insamlades 1540 isolat av *Campylobacter* från försök 1 och testades för fagkänslighet för varje fagtyp samt för cocktailen. 2640 isolat samlades från djuren i försök 2 och testades för samma saker som i försök 1. Generellt beskrivs inledningsvis en minskning av känslighet mot fagerna men som sedan ökar igen mot slutet av försöket till 98% för cocktail och för 94 % för de som endast blivit utsatta av fag 1. Vilken typ av fag de blev resistentastammar mot skiljde sig mellan grupperna, till exempel utvecklade de cocktailbehandlade mer resistens mot fag nummer 1 än de som bara blivit utsatta för fag nr 1. Med denna studie visade dessa forskare att resistensen hos *Campylobacter* mot bakteriofager stabiliseras på en låg nivå efter en inledande ökning efter administration. Även kombinationen av fager spelar en viktig roll.

Dessa tre studier på resistensutveckling mot bakteriofager visar på att resistensutveckling sker under behandlingen men att känsligheten hos bakterierna återgår till en stabil nivå efter en tid samt att en stor procent av de resistentastammarna återgår till att bli känsliga. Det är även visat att resistensutvecklingen beror på hur många och vilka bakteriofager man behandlar kycklingen med.

Bakteriofager mot biofilm skapad av *Campylobacter*

C. jejuni har visats kunna skapa biofilm (Joshua *et al.*, 2006) och dessutom kan de integreras i befintlig biofilm av annan bakterie (Hanning *et al.*, 2008). Biofilm som skapas av bakterier är väldigt motståndskraftig och svår att få bort genom mekanisk och kemisk rengöring vilket gör att bakterierna kan leva vidare på stallinredningen (Harper *et al.*, 2014) Om bakterierna lever kvar i stallarna riskerar nästa kycklingflock bli infekterad.

Det finns inte så många studier gällande hur man kan använda bakteriofager mot biofilm av *Campylobacter* spp. (Aprea *et al.* 2018) men en studie av Siringan *et al.* (2011) visar på en reduktion med i genomsnitt 2 log cfu/cm² av *C. jejuni* på glas med hjälp av bakteriofager 24h

efter behandling. Även Harper *et al.* (2014) har beskrivit att bakteriofager kan rengöra biofilm men då ej biofilm skapad specifikt av *Campylobacter* spp.

DISKUSSION

Bakteriofager kan bevisligen reducera antalet *Campylobacter* hos slaktkyckling. En viktig fråga är dock om den möjliga reduktionen av bakterien är tillräcklig. Enligt en rapport från EFSA skulle en minskning av bakterien med 3 log₁₀-enheter reducera smittorisken till människa med minst 90% (EFSA, 2011) vilket såklart vore en otrolig framgång. I in vivo-studierna jag har redovisat har forskarna i de olika rapporterna kunnat uppmäta minskning av *Campylobacter* hos kyckling med 5.6, 2.34, 2.8 och 3.2 log₁₀ CFU/gram (Loc Carrillo *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2010; Fischer *et al.*, 2013; Kittler *et al.*, 2013). Det är alltså bara två av studierna som visar att en reduktion med 3 log₁₀-enheter är möjlig. Resultatet verkar vara mycket beroende av vilken typ av bakteriofag, dosstorlek, behandlingstidpunkt samt administrationssätt och jag tror att om man skulle träffa rätt i alla dessa punkter ökar möjligheten nå den gränsen.

Administrationssätt

För att få bakteriofagterapi att fungera ute på gårdarna måste bakteriofagerna kunna administreras till kycklingarna på ett bra sätt som säkerställer att alla kycklingar får i sig en tillräcklig dos. Det kan vara svårt att se till så att alla djur blir behandlade. Om man tillsätter bakteriofager till foder eller vatten kan sjuka/nedsatta djur som inte äter och dricker tillräckligt gå miste om behandlingen. Allmäntillståndet hos djur med infektion av *Campylobacter* påverkas dock inte (Shane, 2000) vilket betyder att de troligtvis äter och dricker som normalt. Dock kan de djuren ändå vara underlägsna och/eller sjuka av andra anledningar och därför inte dricka och äta tillräckligt. Men eftersom prevalensen är så pass hög och eftersom de fåglar som är tillräckligt friska för att klara sig fram tills tid för slakt ändå tros dricka och äta verkar det vara ett möjligt administrationssätt. I studierna har man använt sig av olika sätt – via dricksvattnet, fodret och sondmatning. Den enda studien där kycklingarna fick bakteriofager via dricksvattnet var i den av Kittler *et al.* (2013) och där sågs en reduktion på 2.34 log₁₀ CFU/g vilken är den lägsta av dessa studier. Den högsta siffran på reduktion av *Campylobacter* på 5.6 log₁₀ CFU/g nåddes av Loc Carrillo *et al.* (2005) och där var administrationssättet sondmatning. Giva via sondmatning är dock inte aktuellt för en lantbrukare med flera tusen slaktkycklingar. Den enda av dessa studier som jämförde administrationssätt var den av Carvalho *et al.* (2010) där de såg att administration via fodret gav bättre resultat än via sondmatning. Det är dock osäkert om det är administrationssättet eller det faktum att ingen buffertlösning tillsattes i försöket av Kittler *et al.* (2013) som förklarar den relativt låga siffran. Buffertlösning, CaCO₃, tillsattes i de andra försöken för att bakteriofager inte skulle dö i den sura miljön i magen. Det är med största sannolikhet alltså så att en del av bakteriofagerna som gavs via dricksvattnet till kycklingarna har dött på vägen till tarmen och det behöver inte betyda att administration via dricksvattnet är sämre än de andra sätten.

Dos

Loc Carillo *et al.* (2005) provade i sin studie olika doser och kom fram till att \log_{10} 7 PFU var bättre än \log_{10} 5 PFU och \log_{10} 9 PFU. Det är dock för få doser för att kunna säga att just denna är optimal, men den optimala dosen verkar ligga mellan \log_{10} 5-9 PFU. I studien av Carvalho *et al.* (2010) administrerades 1.5×10^7 PFU blandat i 1,5 ml buffertlösning med kycklingarnas foder medans det i de andra tre studierna användes doser mellan \log_{10} 6–7,9 PFU i 1 ml lösning. Vilken dos som är bäst är antagligen kopplat till val av administrationssätt vilket gör att det är svårt att dra slutsatser om huruvida dessa doser är effektiva eller inte, flera doser inom samma administrationssätt skulle behöva jämföras.

Behandlingstid

I studien av Kittler *et al.* (2013) kom forskarna fram till att behandling 2–4 dagar innan slakt verkar vara bäst för att nivån av *Campylobacter* ska vara så låg som möjligt när fåglarna kommer till slakteriet. Dock krävs mer forskning kring detta. En fråga kopplad till detta som kvarstår är också hur länge och i hur många omgångar kycklingarna bör genomgå bakteriofagterapi för att få bästa möjliga resultat. Abedon & Thomas-Abedon (2010) skriver om att en singeldos skulle räcka för att döda en stor andel bakterier, men frågan är om den andelen är så stor som 3 \log_{10} -enheter. Det beror även på administrationssätt, det är svårt att ge en singeldos i dricksvattnet.

Bakteriofagtyp

Loc Carillo *et al.* (2005) och Fischer *et al.* (2013) gjorde studier på olika typer och kombinationer av bakteriofager för att se hur man bäst kan bekämpa *Campylobacter* hos slaktkyckling. De visade att det skiljer sig i effektivitet beroende vilka fager man väljer att behandla med. Det man kan säga utifrån dessa studier är först och främst att det krävs ännu mer forskning på vilka sorter av bakteriofager man ska använda och i vilken blandning. Sen måste man dessutom utveckla ett bra sätt att veta vilken/vilka bakteriofager man ska använda i sin besättning eftersom olika bakteriofager fungerar olika bra mot olika stammar av *Campylobacter*.

Biofilm

Eftersom *Campylobacter* spp. har visats vara en bakterie som kan skapa biofilm är rengöringen av stallar väldigt viktig innan man tar in en ny flock. Eftersom det finns forskning som visar att man kan få bort biofilm med bakteriofager så tycker jag absolut att det är aktuellt att titta närmare på hur man kan ta fram en produkt som med bakteriofager rengör stallar, lokaler och inredning på ett effektivt sätt för att minska smittspridning.

Resistensutveckling

De tre in vivo-studierna som undersökt resistens som presenteras i den här rapporten har alla sett att resistens mot bakteriofagerna utvecklas under behandlingen, känsligheten blir lägre i början men sedan ökar den igen. Carvalho *et al.* (2010) och Loc Carillo *et al.* (2005) har sett att resistent bakteriestammar omvandlas till att återigen bli känsliga mot behandlingen av

bakteriofager. Dock skiljer sig deras siffror åt, där 54 % respektive 97 % av testade stammar har återgått till känsliga. Det kan bero på storleken av försöken, vilka stammar man tittat på och under hur lång tid försöket har pågått. Båda försöken visar dock att majoriteten av stammarna tappar resistens vilket är positivt, dock måste mer forskning utföras kring detta.

Fischer *et al.* (2013) visar i sin studie att olika grader av resistens utvecklas mot samma bakteriofag om campylobakterna utsätts för endast den eller flera typer av bakteriofager. Det tyckte jag var väldigt intressant och det visar på att det är viktigt med vidare forskning på hur man ska kombinera bakteriofager för att undvika resistensen i så hög grad som möjligt. Ju fler djur man behandlar desto större är risken för utbredd resistens hos *Campylobacter* spp. vilket för tankarna till hur vi bör välja att behandla infekterade slaktkycklingar. Här spelar antagligen även behandlingstid en viktig roll.

Utmaningar inför framtiden

Moye *et al.* (2018) diskuterar i sin artikel vilka utmaningar som återstår innan bakteriofager kan bli accepterat för användning för livsmedel och livsmedelsproducerande djur i större utsträckning. Den största tekniska utmaningen beskrivs vara effektiviteten hos bakteriofager. Det har bevisats att fager kan reducera en stor del bakterier men inte till 100% döda alla bakterier. Att man sett återväxt av bakterier efter behandling samt resistent stammar beskrivs också vara stora tekniska utmaningar. Vidare diskuteras även acceptansen hos kunderna som en utmaning. Trots att bakteriofager beskrivs som icke-kemiska, naturliga och säkra finns det ändå en oro i att samhället kan ha svårt att acceptera nya tekniker som ska användas i deras mat och tanken på att virus ska appliceras till livsmedel kan tänkas verka oroande.

I en färsk rapport av Hansson *et al.* (2018) redovisas en lång lista på brister i vår kunskap angående kontroll av *Campylobacter* för prevention av campylobacterios. Här presenteras brister på gårdsnivå, slakterinivå, gällande bakteriens karaktär, folkhälsa samt diagnostik. Det krävs alltså fortfarande mycket forskning och studier på bakterien för att förstå dess karaktär och för att kunna bekämpa den samt förebygga smittspridning i största möjliga mån.

Konklusion

Under denna litteraturstudie har jag hittat flera kunskapsluckor inom ämnet och det jag anser att forskare måste studera ytterligare är det bästa administrationssättet, den optimala dosen, den optimala behandlingstiden och tidpunkten för behandling samt hur man ska kombinera olika typer av fager för bästa möjliga resultat. Eftersom resistensutveckling mot bakteriofager sker hos *Campylobacter* spp. så är det även viktigt att forska mer på hur vi kan undvika resistent stammar i så stor utsträckning som möjligt. Om behandling med bakteriofager visar sig vara en välfungerande metod måste vi vara väldigt noga med hur vi behandlar kycklingarna för att undvika resistensutvecklingen så att möjligheten för behandling inte går förlorad.

Jag tror att det är avgörande för acceptansen av bakteriofagterapi att från början kunna presentera ett enkelt sätt administrera bakteriofager av rätt sort och i rätt dos för slaktkycklingproducenterna. För en producent med flera tusen kycklingar, som de flesta har, måste behandlingen vara genomförbar och ge resultat. Annars kommer bönderna aldrig vilja satsa på bakteriofagterapi. Risken finns då att marknaden avfärdar en möjlig lösning på problemet med en ökande förekomst av *Campylobacter* och antal människor insjuknade i campylobacterios.

Utifrån studierna jag har läst och redovisat anser jag att bakteriofagterapi har stor potential att kunna vara en av framtidens lösningar på den utbredda spridningen av *Campylobacter* spp. från slaktkyckling till människa. Om målet är att nå en reduktion av bakterier med 3 log₁₀-enheter måste man utveckla kunskapen om olika behandlingsparametrarna för att med säkerhet kunna överstiga denna gräns i alla försök med behandlingsgrupper. Mer forskning måste genomföras för att komma fram till det optimala sättet att behandla slaktkyckling med bakteriofager mot *Campylobacter*.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Abedon, S. & Thomas-Abedon, C. (2010). Phage Therapy Pharmacology. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 11(1), pp 28–47.
- Acheson, D. & Allos, B. M. (2001). Campylobacter jejuni Infections: Update on Emerging Issues and Trends. *Clinical Infectious Diseases*, 32(8), pp 1201–1206.
- Boqvist, S., Söderqvist, K. & Vågsholm, I. (2018). Food safety challenges and One Health within Europe. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 60.
- Carvalho, C. M., Gannon, B. W., Halfhide, D. E., Santos, S. B., Hayes, C. M., Roe, J. M. & Azeredo, J. (2010). The in vivo efficacy of two administration routes of a phage cocktail to reduce numbers of Campylobacter coli and Campylobacter jejuni in chickens. *BMC microbiology*, 10, p 232.
- Connerton, P. L., Timms, A. R. & Connerton, I. F. (2011). Campylobacter bacteriophages and bacteriophage therapy. *Journal of Applied Microbiology*, 111(2), pp 255–265.
- Doyle, M. P. & Erickson, M. C. (2006). Reducing the Carriage of Foodborne Pathogens in Livestock and Poultry. *Poultry Science*, 85(6), pp 960–973.
- Fischer, S., Kittler, S., Klein, G. & Glünder, G. (2013). Impact of a single phage and a phage cocktail application in broilers on reduction of Campylobacter jejuni and development of resistance. *PloS One*, 8(10), p e78543.
- Gibbens, J. C., Pascoe, S. J. S., Evans, S. J., Davies, R. H. & Sayers, A. R. (2001). A trial of biosecurity as a means to control Campylobacter infection of broiler chickens. *Preventive Veterinary Medicine*, 48(2), pp 85–99.
- Hagens, S. & Loessner, M. J. (2007). Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(3), pp 513–519.
- Hanning, I., Jarquin, R. & Slavik, M. (2008). Campylobacter jejuni as a secondary colonizer of poultry biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, 105(4), pp 1199–1208.
- Hansson, I., Engvall, E. O., Vågsholm, I. & Nyman, A. (2010). Risk factors associated with the presence of Campylobacter-positive broiler flocks in Sweden. *Preventive Veterinary Medicine*, 96(1), pp 114–121.
- Hansson, I., Sandberg, M., Habib, I., Lowman, R. & Engvall, E. O. (2018). Knowledge gaps in control of Campylobacter for prevention of campylobacteriosis. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65, pp 30–48.
- Harper, D. R., Parracho, H. M. R. T., Walker, J., Sharp, R., Hughes, G., Werthén, M., Lehman, S. & Morales, S. (2014). Bacteriophages and Biofilms. *Antibiotics*, 3(3), pp 270–284.
- Jamal, M., Bukhari, S. M. A. U. S., Andleeb, S., Ali, M., Raza, S., Nawaz, M. A., Hussain, T., Rahman, S. u. & Shah, S. S. A. (2019). Bacteriophages: an overview of the control strategies against multiple bacterial infections in different fields. *Journal of Basic Microbiology*, 59(2), pp 123–133.

Joshua, G. W. P., Guthrie-Irons, C., Karlyshev, A. V. & Wren, B. W. (2006). Biofilm formation in *Campylobacter jejuni*. *Microbiology*, 152(2), pp 387–396.

Kittler, S., Fischer, S., Abdulmawjood, A., Glünder, G. & Klein, G. (2013). Effect of Bacteriophage Application on *Campylobacter jejuni* Loads in Commercial Broiler Flocks. *Appl. Environ. Microbiol.*, 79(23), pp 7525–7533.

Loc Carrillo, C., Atterbury, R. J., el-Shibiny, A., Connerton, P. L., Dillon, E., Scott, A. & Connerton, I. F. (2005). Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni* colonization of broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), pp 6554–6563.

Loc-Carrillo, C. & Abedon, S. T. (2011). Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage*, 1(2), pp 111–114.

Mahony, J., McAuliffe, O., Ross, R. P. & van Sinderen, D. (2011). Bacteriophages as biocontrol agents of food pathogens. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(2), pp 157–163.

Moore, J. E., Corcoran, D., Dooley, J. S. G., Fanning, S., Lucey, B., Matsuda, M., McDowell, D. A., Mégraud, F., Millar, B. C., O'Mahony, R., O'Riordan, L., O'Rourke, M., Rao, J. R., Rooney, P. J., Sails, A. & Whyte, P. (2005). *Campylobacter*. *Veterinary Research*, 36(3), pp 351–382.

Moye, Z. D., Woolston, J. & Sulakvelidze, A. (2018). Bacteriophage Applications for Food Production and Processing. *Viruses*, 10(4).

Sails, A. D., Wareing, D. R. A., Bolton, F. J., Fox, A. J. & Curry, A. (1998). Characterisation of 16 *Campylobacter jejuni* and *C. coli* typing bacteriophages. *Journal of Medical Microbiology*, 47(2), pp 123–128.

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

Shane, S. M. (2000). *Campylobacter* infection of commercial poultry: -EN- -FR- -ES-. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, 19(2), pp 376–395.

Sulakvelidze, A., Alavidze, Z. & Morris, J. G. (2001). Bacteriophage Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(3), pp 649–659.

The applications of bacteriophages and their lysins as biocontrol agents against the foodborne pathogens *Listeria monocytogenes* and *Campylobacter* spp.: an updated look (2018). *Veterinaria Italiana*, (4), pp 293–303.

The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015 (2016). *EFSA Journal*, 14(12).

Wagenaar, J. A., French, N. P. & Havelaar, A. H. (2013). Preventing *Campylobacter* at the Source: Why Is It So Difficult? *Clinical Infectious Diseases*, 57(11), pp 1600–1606.

Wernicki, A., Nowaczek, A. & Urban-Chmiel, R. (2017). Bacteriophage therapy to combat bacterial infections in poultry. *Virology Journal*, 14(1), p 179.

