

Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Bacheloroppgave 2020

NMBU Veterinærhøgskolen
Erik Georg Granquist

**Forekomst av *L. monocytogenes* og
Campylobacter i rå melk fra
melkekyr**

Elinborg Steinunn Palsdottir, Henriette Sofie Ross
Pedersen

Bachelor Dyrepleie
Institutt for produksjonsdyrmedisin

Innhold

Forord.....	6
Sammendrag.....	7
Definisjoner.....	8
Innledning.....	11
Rå melk og pasteurisering	11
<i>Listeria</i>	12
<i>Campylobacter</i>	13
Fjøstyper	14
Formål	16
Materiale og metoder.....	18
Prøvesamling	18
Analyse av prøver	21
Analyse for <i>Listeria monocytogenes</i>	21
Analyse for <i>Campylobacter</i>	23
Litteratursøk	26
Studie A.....	28
Studie B.....	28
Studie C.....	29
Studie D.....	29
Resultater	31
Egen datainnsamling	31
<i>Listeria monocytogenes</i> -analyser	31

<i>Campylobacter</i> -analyser.....	34
Hygienescore	37
Litteraturstudier	40
Studie A: Occurrence, Persistence, and Contamination Routes of <i>Listeria monocytogenes</i> Genotypes on Three Finnish Dairy Cattle Farms: a Longitudinal Study	40
Studie B: Occurrence and growth of <i>Listeria monocytogenes</i> in packaged raw milk.....	41
Studie C: Foodborne pathogens in unpasteurized milk in Sweden	42
Studie D: Longitudinal Study of Shiga Toxin-Producing <i>Escherichia coli</i> and <i>Campylobacter jejuni</i> on Finnish Dairy Farms and in Raw Milk.....	42
Diskusjon.....	43
Funn av <i>L. monocytogenes</i>	43
Oversikt over <i>L. monocytogenes</i> -positive prøver samlet i denne studien.....	43
<i>L. monocytogenes</i> -funn i løsdrift og konvensjonelle besetninger	47
Resultater fra enkelte prøver	47
Uklare resultater	49
Funn av <i>Campylobacter</i>	50
Oversikt over <i>Campylobacter</i> -positive prøver.....	50
<i>Campylobacter</i> -funn i løsdrift og konvensjonelle besetninger	52
Resultater fra enkelte prøver	53
Hygienescore	54
Merknader ved begge bakterier	56

Feilkilder.....	57
Konklusjon.....	61
Takk til bidragsytene	63
Summary	64
Referanser.....	65

Forord

Vanligvis gjennomgår melk en varmebehandling som er svært effektiv for å redusere og eliminere smittestoff. Rå melk derimot, er upasteurisert melk til direkte konsum. Pasteurisering har vært viktig i bekjempelse av tuberkulose, brucellose og andre alvorlige sykdommer hos mennesker. Tidligere (siden 1952) har det vært forbudt å omsette rå melk, men et nytt forslag til forskrift åpner for direkte salg av inntil 5000 liter fra hvert gårdsbruk. Rå melk fra ku og dens egenskaper blir stadig viktigere å kjenne til som forbruker, og det har blitt en «trend» å kjøpe rå melk rett fra bonden. Denne oppgaven er derfor relevant for konsumenter i Norge i dag.

Vi valgte dette temaet på grunn av at vi begge to er erfarne med smådyr og jobb i klinikk, mens besetning og storfe er mindre kjent for oss. Vi så denne oppgaven som en anledning til å utvide vår kunnskap om produksjonsdyr og prøve noe nytt.

Sammendrag

Tittel: Forekomst av *Campylobacter* og *L. monocytogenes* i rå melk fra melkekyr

Forfattere: Elinborg Steinunn Palsdottir, Henriette Sofie Ross Pedersen

Veileder: Erik Georg Granquist, Institutt for produksjonsdyrmedisin.

Denne oppgaven er en blanding av deskriptiv studie og litteraturstudie, der målet var å se på forekomst og smitteveier av *L. monocytogenes* og *Campylobacter* i rå melk fra ku. Vi utførte to prøveuttak med fire måneders mellomrom der vi samlet tankmelkprøver, melkefiltere, spenemelkprøver, jursvabre, grovfôrsprøver og avføringsprøver fra 18 forskjellige gårder på Østlandet i Norge. Disse prøvene ble analysert for *L. monocytogenes* og *Campylobacter*. Vi brukte fire andre lignende studier for å sammenligne og evaluere våre analyser. I denne studien viser vi blant annet at dersom en bakterie påvises i tankmelken, finnes den samme bakterie i melkefilteret. Det er også en tydelig sammenheng mellom bakterieforekomst i miljøet og i melkefilter. Vi diskuterer hvordan disse bakteriene mest sannsynlig kom inn i melkeanlegget fra huden på juret under melking eller fra eksisterende belegg i melkesystemet. En sesongvariasjon i forekomst av bakteriene samt hygienescore kan beskrives ut ifra vår data, og er støttet fra de andre studiene inkludert i denne oppgaven. I litteraturstudiene ble det påvist flere bakterier og høyere hygienescore i vinterhalvåret enn over sommeren. Løsdriftsfjøs hadde tydelig høyere bakterieforekomst fra begge prøveuttak, grunnen til dette kan være større besetninger og vanskeligheter med å holde god hygiene i fjøset. Vår studie inkluderte ikke PCR eller kvantitativ analysing, så det er vanskelig å validere resultatene av studien.

Definisjoner

Tabell 1: Definisjoner av ord og beskrivelser brukt i denne studien

EHEC	Enterohemorragic <i>Escherichia coli</i> .
<i>Listeria monocytogenes</i>	En spesifikk type av <i>Listeria</i> som er blant dem som oftest forårsaker sykdom (Nicholl, 2019).
<i>Listeria spp.</i>	Fellesbetegnelse for alle typer <i>Listeria</i> . Hvis man tester for hvilken som helst type <i>Listeria</i> i prøvematerialet, tester man for <i>Listeria spp</i> (Nicholl, 2019).
<i>Campylobacter jejuni</i>	En spesifikk type av <i>Campylobacter</i> som er blant dem som oftest forårsaker sykdom i Norge. (Snelling et al., 2005).
<i>Campylobacter spp.</i>	Fellesbetegnelse for alle typer <i>Campylobacter</i> . Hvis man tester for hvilken som helst type <i>Campylobacter</i> i prøvematerialet, tester man for <i>Campylobacter spp</i> (Snelling et al., 2005).
Rå melk	Upasteurisert melk.
Pasteurisering	Når melken varmes opp over tid for å drepe mikroorganismer (72°C i 15sek).
PVA	Pepton vann.
Karusell	Runde, roterende melkestaller som kan melke flere kuer på en gang.
Melkegrav	Er en løsning for melking, kuen går til en plass over et nedsenket gulv, der bonden kan stå for melkingen.
Løsdrift fjøs	Kubesetning der kuene kan gå løst i fjøset mellom førestasjoner, liggebåser og der de melkes (Opplysningskontoret for Meieriprodukter, 2020).
Konvensjonelt fjøs / bås fjøs	Der kuene er fast oppstallet og melket i egen bås (Opplysningskontoret for Meieriprodukter, 2020).
Grovfôr	En type fôr for drøvtyggere og hester, der de kan utnytte fôret som karbohydratkilde med hjelp av mikroorganismer i vomma (drøvtyggere) eller tykktarm (hester). Grovfôr kan være beite, høy, surfôr og halm.
Kvalitativ påvisning	En type påvisning der det eneste man vil vite er om bakterien er til stede eller ikke, uten å måtte oppgi bakteriemengde (NMKL, 2007).
Buljong	I mikrobiologi er en buljong en væske som inneholder forskjellige næringsstoffer og brukes til å dyrke bakterier og andre mikroorganismer i kulturen.
DU	Direkte utsæd, der prøvemateriale, oftest væske, er sådd direkte ut på et medium for å måle for lave mengder bakterier.

ALOA	Agar <i>Listeria</i> i henhold til Ottaviani og Agosti (NMKL, 2010).
mCCDA	Modified Charcoal Cephoperazone Desoxycholate Agar (NMKL, 2007).
LMBA	<i>Listeria Monocytogenes</i> blodagarmedium (NMKL, 2010).
BA	Blod Agar.
Rhamnose test	Rhamnose forgjæringstest er brukt for å se om mikroben kan forgjære rhamnose, en type sukker, som en karbohydratkilde, der endeproduktet er en syre. Mikroben er påvist som rhamnose-positiv hvis syre er til stede.
Xylose test	Xylose test er samme som rhamnose test, men med sukkeren xylose istedenfor rhamnose.
Cytochrome C oksidase	Enzymet cytokrom c oksidase er et stort transmembranprotein-kompleks som finnes i bakterier, archaea og i eukaryoter i deres mitokondrier. Det er det siste enzymet i respirasjonselektron-transportkjeden av celler som ligger i membranen.
Oksidasetest	Tester for tilstedeværelse av cytochrome C oksidase i en bakterie. En dråpe av 1% tetramethyl-p-phenylenediamine blir lagt på en fuktig filter papir i en petriskål. En bakteriekoloni fra en BA skål blir strøket på petriskålen med en glasstav. Bakterien er oksidasepositiv hvis den blir mørk lilla innen 60 sekunder (Sirois, 2019).
Katalase	Katalase er et enzym som katalyserer nedbrytningen av hydrogenperoksyd til vann og oksygen.
Katalasetest	Tester for tilstedeværelse av enzymet katalase i bakterien. En bakteriekoloni fra en BA skål er lagt på et mikroskopglass og en dråpe av 3% hydrogen peroksid er dryppet på prøven. Bakterien er katalasepositiv hvis gass bobler produseres (Sirois, 2019).
Gramfarging	Gramfarging er utført for å skille mellom gram-negative og gram-positive bakterier. Forskjellen ligger i hvordan celleveggen er oppbygd. Gram-negative bakterier har en tynn peptidoglykan cellevegg med membran rundt seg og er ikke lett å farge med gram-farging. De er typisk rosa under mikroskopi. Gram-negative bakterier har derimot en tykk peptidoglykan cellevegg og ingen membran rundt seg, så de enkelt farges med gramfarging. De ser typisk lilla ut på mikroskopi (Sirois, 2019).
Pulsotype	Enhver tydelig bakteriestamme atskilt med pulse-felt gelelektroforese.
Pulse-felt gelelektroforese	En kraftig genotypingsteknikk som brukes for separasjon av store DNA-molekyler.

PCR	PCR (Polymerase Chain Reaction) er en vanlig laboratorieteknikk som brukes til å lage mange kopier av en bestemt DNA-region.
Patogen	En sykdomsfremkallende organisme.
Zoonose	Sykdommer som kan smitte mellom dyr og mennesker.
Validitet	Gyldighet av funnene i ett studie.
Ekstern validitet	Hvor korrekte resultatene er for en større populasjon.

Innledning

I denne bacheloroppgaven har vi sett på forekomst av *L. monocytogenes* og *Campylobacter* i rå melk fra storfe i Norge, Finland og Sverige. Vi prøver å kartlegge hvordan de nevnte bakteriene smitter over til rå melk. Melken er tilnærmet steril ved sekresjon, men kan bli kontaminert av ulike mikroorganismer allerede i juret (Thorsen et al., 2017).

Rå melk er upasteurisert melk, dvs. melken som kommer rett fra kuen. Rå melk kan være en risiko for folkehelsen siden melken kan inneholde zoonotiske patogener som kan føre til alvorlig sykdom og i verste fall død (Artursson et al., 2018).

Rå melk egner seg godt som grobunn for vekst av bakterier siden den inneholder mange viktige næringsstoffer og vitaminer som bakteriene trenger for å vokse og formere seg (Bækkelund and Narvhus, 2016). Dette er forhold som spesielt oppstår hvis melken blir stående i varmere temperaturer over tid. Det er hovedsakelig barn og mennesker med nedsatt immunforsvar som er utsatt for å utvikle alvorlig sykdom fra *Listeria* eller *Campylobacter* (Artursson et al., 2018).

Rå melk og pasteurisering

Det har blitt en økt etterspørsel etter rå melk i dagens samfunn (Rahn et al., 2017). En grunn til den økte etterspørselen, er at mange tror at rå melk er bra for mikrofloraen i tarmen og at melken har en bedre ernæringskvalitet enn pasteurisert melk. Mange tror også at rå melk reduserer risikoen for laktoseintoleranse, allergi og astma. Forskere

har derimot ikke funnet noe bevis på at disse påstandene stemmer (Artursson et al., 2018).

Pasteurisering er en prosess der målet er å drepe alle mikroorganismene som finnes i melken. Dette blir gjort ved hjelp av varmebehandling over tid. I Norge foregår pasteuriseringen ved at man varmer opp melken til 72°C i 15 sekunder (Thorsen et al., 2017). Pasteurisering fører også til at melken får forlenget holdbarhet. I Norge er det lovpålagt at melken må pasteuriseres hvis den skal selges i butikk, men man kan få kjøpt upasteurisert melk rett fra bonden (Thorsen et al., 2017).

Listeria

Listeria er en gram-positiv, anaerob, ikke spordannende coccobacillus. (Mohammed et al., 2009) som består av 17 ulike arter (Ricchi et al., 2019). *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) er den arten av *Listeria* som er mest patogen for mennesker og kan føre til sykdommen listeriose. Listeriose gir vanligvis feber og muskelsmerter, men kan også føre til diaré (Artursson et al., 2018). *L. monocytogenes* kan i sjeldne tilfeller føre til alvorlige og i verste fall dødelige symptomer der spesielt mennesker med nedsatt immunforsvar, er utsatt (Ricchi et al., 2019). Bakterien kan overføres fra mor til foster og føre til alvorlig sykdom hos fosteret eller abort (Coetzer and Tustin, 2004). Hos voksne kuer vil vanligvis sykdomsforløpet vare i én til to uker. I starten vil dyret utvikle feber, men kan etter hvert utvikle alvorlige nevrologiske symptomer eller abort hvis kuen er gravid. Listeriose kan i verste fall føre til alvorlige lammelser og død hos storfe (Coetzer and Tustin, 2004).

L. monocytogenes finnes naturlig i miljøet og har utviklet evnen til å overleve ved å produsere biofilm. Den har også utviklet resistens mot de vanligste desinfeksjonsmidlene (Ricchi et al., 2019). *L. monocytogenes* kan overleve og reprodusere i kjølige og saltkonsentrerte miljøer, noe som gjør at denne bakterien har blitt et viktig matbåren patogen (Ricchi et al., 2019). Det er spesielt matvarer med lang holdbarhetstid og som konsumeres uten varmebehandling, som er de største smittekilene. *Listeria* kommer vanligvis inn i matkjeden fra omgivelsene, som ved kontaminering fra skitten hud eller jur under melking, biofilm i tank og rør, samt utstyr. Syke dyr blir ikke brukt til mat, og melkes dermed ikke for konsum. Den optimale veksttemperaturen til *Listeria* er mellom 30°C og 37°C, men bakterien kan formere seg i temperaturer fra 4°C til 44°C (Coetzer and Tustin, 2004). Bakterien trives best i lave oksygenivåer med økt karbondioksid konsentrasjoner (Walker et al., 2004).

For å drepe *Listeria* kreves det tilstrekkelig varmebehandling som f.eks. ved pasteurisering, eller ved å introdusere bakterien til et miljø med en pH-verdi under 5,0 (Coetzer and Tustin, 2004, Mattilsynet, 2012).

Campylobacter

Campylobacter er gram-negativ, ikke-sporedannede, spiralformede staver (Fonseca et al., 2016). Det finnes 18 ulike arter av *Campylobacter* der 11 av dem kan føre til sykdom hos mennesker (Folkehelseinstituttet, 2010). Det er bakterien *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) som oftest fører til sykdomstilfellene her i Norge og *Campylobacter coli* (*C. coli*) er den nest vanligste årsaken (Folkehelseinstituttet, 2010). *C. jejuni* krever en infektiv dose på 500 til 10 000 organismer og en inkubasjonstid på 1-7 dager for å føre til sykdommen campylobacteriose (Snelling et al., 2005). *C. jejuni* fører til en

selvbegrensende gastrointestinal sykdom som kan vare i opptil 7 dager, med typiske symptomer som diaré og nedsatt allmenntilstand. (Snelling et al., 2005). Den kan i sjeldne tilfeller føre til reaktiv artritt eller lammelser hos pasienten (Folkehelseinstituttet, 2010).

Campylobacter er en bakterie som kan smitte mennesker fra forurenset vann, mat eller smittebærende dyr (Louwen et al., 2013). Den finnes naturlig i en rekke dyrearter uten at det fører til noen sykdom hos dyret. Det er fugler som er det største reservoaret for *Campylobacter* i Norge (Folkehelseinstituttet, 2010). *Campylobacter* overlever i kjøleskaptemperatur, men dør langsomt ved frysing. Den har dårlig overlevningsevne i tørre miljøer som på overflater i et kjøkken. Bakteriene dør ved tilstrekkelig varmebehandling. For å unngå smitte er det viktig med god personlig hygiene (Folkehelseinstituttet, 2019).

Fjøstyper

Det finnes hovedsakelig to typer fjøs: Løsdrift-, og båsfjøs (konvensjonelle fjøs). Av de besetningene vi besøkte, var 11 løsdriftsfjøs og 7 konvensjonelle fjøs. I Norge i dag (2020) er løsdriftsfjøs den vanligste oppstallingsformen for melkeproduksjon. Hele 58% av melkekuene gikk i løsdrift per 28.02.2019 (Opplysningskontoret for Meieriprodukter, 2020).

Et løsdriftsfjøs er en type fjøs der dyrene går fritt rundt inne i fjøset. Dette fører til en mer naturlig atferd blant kuene, noe som igjen kan føre til bedre helse og reproduksjon. Løsdriftsfjøs bruker som regel en melkerobot eller en melkegrav når kuene melkes. En ulempe med løsdriftsfjøs er at det er vanskeligere å opprettholde god hygiene inne i

fjøset, men det at kuene kan gå fritt rundt kan hjelpe med å slite klauvene og redusere behov for vedlikehold av klauvene i form av klauvskjæring eller trimming. Dette kommer an på hvilket underlag som er brukt og hvor det er brukt, da betong sliter mer enn f.eks. gummiunderlag (Bewley et al., 2017). Løsdriftsfjøs har som regel større besetninger enn konvensjonelle fjøs da de har større kapasitet for det, og er mer moderne.

I et konvensjonelt fjøs har kuene hver sin bås. Kuene har ikke frihet til å bevege seg som i et løsdriftsfjøs og blir melket til bestemte tider hver dag. Fordelen med konvensjonelle fjøs er at man lettere kan rengjøre fjøset og at det er lettere å ha oversikt over alle kuene. En ulempe med oppstalling i konvensjonelle fjøs er at det er høyere prevalens av halthet og klauvsykdommer enn det som finnes i løsdriftsfjøs (Bewley et al., 2017).

Fra 22. april 2004 er det krav på løsdrift i alle nye fjøs som bygges i Norge, samt ved utbygging av gamle fjøs, for å sikre et mer naturlig miljø og mulighet til bevegelse, som kan føre til bedre helse og fruktbarhet. Videre skal alle eksisterende konvensjonelle fjøs som ble bygd før den datoen og vært i bruk siden det, være utviklet til løsdrift innen 1. januar 2034 (matdepartementet, 2004).

Flere melkeprodusenter i Norge velger å bruke automatiske melkesystemer (AMS) som melkeroboter. I 2017 hadde 45% av melkefjøsene i Norge melkeroboter (Jenssen and Landrø, 2019). AMS er tilgjengelig for kuen døgnet rundt og kuen velger selv når den vil bli melket. AMS består av seks hoveddeler: melkebås, spenegjenkjenningssystem, robotarm for å feste spenekoppene, jurvasksystem,

kontrollsystem som inkluderer sensorer og en melkemaskin som inkluderer rengjøring av systemet (Meuring et al., 2002). Melken vil samles i en beholder som vil føre melken gjennom et melkefilter og over til melketanken der den lagres.

I konvensjonelle fjøs blir det ofte benyttet et melkeorgan for å melke kuene. Denne type melking foregår ved hjelp av et melkeorgan, en pulsator og vakuum. Melkeorganet består av fire spenekopper. Spenekoppen har to rom; et indre og ytre rom. Det indre rommet også kalt melkekammeret dannes av spenegummien som festes direkte til spenene og til en melkeslange med vakuum. Det ytre rommet (pulseringskammeret) er rommet mellom spenegummien og spenekopphylsen. Pulsatoren sørger for en regelmessig veksling av vakuum i spenekoppens ytre rom. Vakuumet fører til at spenegummien retter seg ut, slik at melken kommer ut fra spenen (SNL, 2009).

Formål

Formålet med denne oppgaven er å finne forekomst og smitteveier av *Campylobacter* og *L. monocytogenes* i norske melkekubesetninger og sammenligne med litteratur fra andre nordiske land. Dette vil vi gjøre for å finne ut om det er trygt å selge rå melk uten å pasteurisere den. Vi har delt oppgaven inn i tre ulike delmål, som alle er spørsmål vi ønsket å besvare.

Delmål 1: Hvis det oppdages bakterier i tankmelk eller melkefilter, hvor kommer smitten fra? Hva er assosiasjonen mellom bakterieforekomsten i rå melk fra tank, og

smitteveiene vi undersøker: Miljøsmitte (dvs. utstyr, grovfôr eller avføring i miljøet) eller smitte fra kuen (smitte rett fra juret).

Delmål 2: Er det en sammenheng mellom lav hygienescoring i besetninger og forekomst av en eller begge bakteriene?

Delmål 3: Er det en sammenheng mellom forekomst av *L. monocytogenes* og *Campylobacter* og type fjøsdrift? Her undersøker vi hvordan bakterieforekomsten påvirkes av ulike hygienerutiner, fjøstyper og besetningsstørrelser.

Vi ønsket å undersøke forekomst av sykdomsforårsakene bakterier i rå melk fra melkekuer på Østlandet, og om det er en tydelig sammenheng mellom hygienerutiner og forekomst i fjøsmiljøet. Deretter ønsket vi å se om bakterier i den rå melken kommer fra miljøet, kuen, eller melkesystemet. Vi ville sammenligne våre resultater med funn i andre land samt funn i andre deler av Norge.

Materiale og metoder

Vår oppgave er todelt med tanke på materiale og metoder. Den første delen er innsamling av prøver og analyse av prøver i forbindelse med vår egen datainnsamling. Den andre delen er litteratursøk og gjennomgang av de artiklene vi fant, og kriterier for sammenligning med vår egen datainnsamling.

Prøvesamling

Prøveinnsamlingen ble utført i samarbeid med Stipendiat Lene Idland, som bruker utvidede resultater til en doktorgradsavhandling (PhD). Alle tre (studenter og stipendiaten) utførte gårdsbesøk, men Lene Idland analyserte prøvene for forekomst av *Campylobacter* og *L. monocytogenes*.

I forbindelse med denne oppgaven har vi dratt på besetningsbesøk til 18 forskjellige melkefjøs på Østlandet på to forskjellige tidspunkter, første gang i august 2019 og andre gang i januar 2020. Fem til seks prøveuttak ble tatt i hver besetning ved hver besøk. Syv av besetningene var konvensjonelle besetninger og 11 var løsdriftsbesetninger. Besetningene ble valgt ved å søke i Brønnøysundregisteret og tilfeldig valgt fra fire forhåndsbestemte geografiske områder: Blaker, Mysen/Rakkestad, Hokksund/Nedre Eggedal og Hadeland.

Tabell 2: Oversikt over besetninger

Gård	Ca. antall melkekyr	Type	Melkesystem
1	90	Løsdrift	Melkegrav
2	18	Konvensjonell	Båsmelking
3	79	Løsdrift	Robot
4	49	Løsdrift	Robot
5	38	Løsdrift	Robot
6	25	Løsdrift	Robot
7*			
8	25	Konvensjonell	Båsmelking
9	16	Konvensjonell	Båsmelking
10	15	Konvensjonell	Båsmelking
11	130	Løsdrift	Karusell
12	33	Konvensjonell	Båsmelking
13*			
14	55	Løsdrift	Robot
15	55	Løsdrift	Robot
16	17	Konvensjonell	Melkegrav
17	28	Løsdrift	Robot
18	14	Konvensjonell	Båsmelking
19	55	Løsdrift	Båsmelking
20	44	Løsdrift	Robot

(*) Ombestemte seg etter oppstart av studien.

Inklusjonskriteriene inkluderte melkebønder med fjøs i områdene nevnt over, som var villig til å delta. Totalt skulle det være 10 løsdriftsbesetninger og 10 med melking på bås. To deltakere trakk seg fra studien før prøvetakingen startet og ble ikke erstattet. Vi endte opp med 11 løsdriftsfjøs og syv konvensjonelle fjøs.

Tabell 2 gir en oversikt over identitetsnummer, type fjøs og antall melkekyr i denne studien.

Det opprinnelige målet med denne oppgaven var å måle for *Campylobacter*, *L. monocytogenes* og EHEC, men pga. forsinkelser i analyser for EHEC ville ikke disse være ferdige før slutten av sommeren, så vi var nødt til å ekskludere disse prøvene etter endt prøvetaking. Derfor nevner denne oppgaven i enkelte tilfeller, tredelte prøver.

Tankmelkprøvene samlet vi i fire 50 ml Falconrør. De ble tatt fra kranåpningen på melketanken hvis tanken hadde dette, eller fra en inspeksjonsluke på toppen, med en steril øse. Alle fire rørene ble så lagret i en kjølebag med kjøleelementer fram til laboratorieanalysen, som ble startet samme dag som prøvetakingen.

Melkefilteret ble tatt ut av melkesystemet før vask hvis dette var mulig. Filteret ble tatt ut av filterbeholderen med rene nitrilhansker på en tilnærmet aseptisk måte, og lagt i

en steril Stomacher pose som videre ble lagt i en kjølebag, med kjøleelementer. Innen én time ble filteret klippet i tre langsgående strimler med autoklavert saks og lagt i tre forskjellige buljongflasker, én Half Fraser-buljong for analysering av *L. monocytogenes*, én Bolton-buljong for analysering av *Campylobacter*, og én mTSB buljong for analysering av EHEC.

Minst 30 gram fersk avføring ble tatt med rene nitrilhansker fra minst fem forskjellige steder i fjøset. Avføringen ble lagt i sterile Stomacherposer og lagret i kjølebag med kjøleelementer fram til laboratorieanalysen som ble startet samme dag.

Minst 30 gram grovfôr ble tatt med rene nitrilhansker fra minst fem forskjellige steder på fôrbrettet, lagt i stomacherposer og lagret i kjølebag med kjøleelementer fram til selve lab analysen som ble startet samme dag.

Det ble tatt fem til ti svaberprøver av jur fra kuer i hvert fjøs. I første uttak brukte vi bomullsvaber som ble vætet opp i rent peptonvann (PVA) rett før svabring. Rett etterpå ble de lagt i hvert sitt reagensrør med 3 ml PVA. I andre prøvetakning fulgte vi samme fremgangsmåte, men satt alle svabrene i ett Falconrør som en samleprøve. Prøvene ble lagret i kjølebag med kjøleelementer fram til lab analysen som ble startet samme dag.

I andre prøvetakingsperiode tok vi i tillegg ut spenemelkprøver. Spenene ble vasket med bomull og sprit før prøvetaking. Melk ble tatt fra alle fire spener om mulig og samlet i ett Falconrør. Det ble tatt minst 30 ml fra hver besetning, fra de samme kuene

som det ble tatt jursvaberprøver fra. Melken ble lagret i kjølebagg med kjøleelementer fram til lab analysen, som ble startet samme dag.

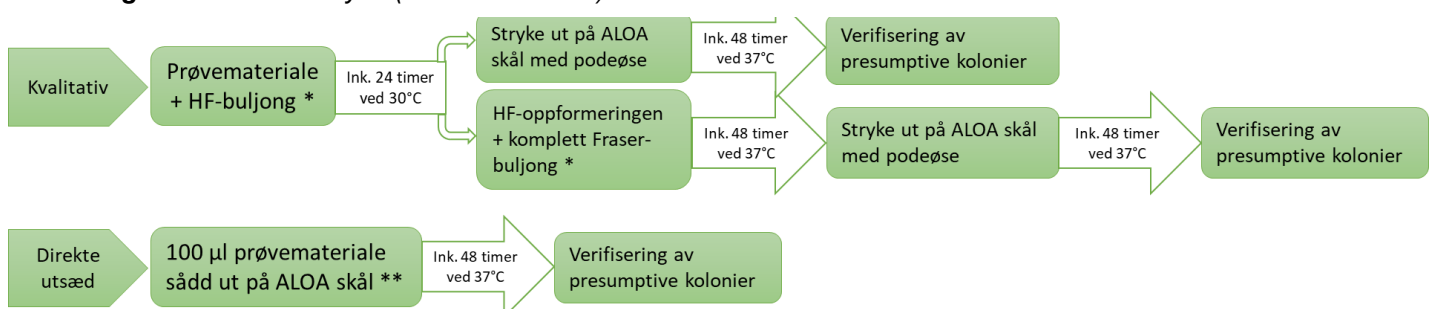
Vi graderte 30% av kuene i hver besetning for hygienescore. Vi graderte jurene, bakbeina og flanken til kuen på en skala 0-3, der 0 er rent og 3 er veldig skittent. De tre scorene ble så lagt sammen for en helhets hygienescore mellom 0 – 9 for hver ku. Deretter regnet vi et gjennomsnitt for alle kuene som ble testet i besetningen. Dette ble gjort i begge prøveuttaksperioder for å se om høyere hygienescore hadde sammenheng med positive bakterieprøver.

Analyse av prøver

Analyse for *Listeria monocytogenes*

Kvalitativ analyse for *L. monocytogenes* ble utført med en standard metode (NMKL 136:2010) (NMKL, 2010) som samsvarer med ISO 11290 part 1 og 2, 1996 og er også brukt for analysering i litteraturstudie A (Castro et al., 2018). Grovfôrsprøvene ble kun analysert for *L. monocytogenes* siden *Campylobacter* ville ikke overleve på grovfôret uansett. Direkte utsæd på agar ble bare utført på tankmelk-, melkefilter-, og spenemelkprøvene.

Figur 1: *Listeria* analyse (NMKL 136:2010)



(*) I fortynningsforholdene 1:10

(**) Direkte utsæd ble bare utført på tankmelk, melkefilter-buljong og spenemelk

Ved kvalitativ analysering for *L. monocytogenes* ble hver av de seks prøvene blandet med Half Fraser-buljong (HF-buljong) i forfynningsforholdet 1:10, ristet godt i 30 sekunder, og så inkubert i 24 timer ved 30°C.

For analyser av tankmelkprøvene ble det tatt 25 g av tankmelk som ble blandet med 225 g av HF-buljong. For analyser av både avførings- og grovfôrsprøvene ble det tatt 10 g av prøvematerialet som ble blandet med 90 g av HF-buljong. For jursvabrene i første uttak ble det tatt 1 ml fra hvert reagensrør (5 ml totalt) og blandet med 45 ml av HF-buljong. I andre uttak ble svabrene satt direkte i en Falconrør med 15 ml PVA. Ved forfynning blandet vi 5 ml fra Falconrøret med 45 ml av HF-buljong. For melkefiltrerene, ble de klipt i tre deler med autoklavert saks på en aseptisk måte, og én del satt i 200 ml av HF-buljong.

Etter 24-timers inkubasjon i 30°C i HF-buljongen ble det tatt 0,1 ml av den primære oppformeringen og blandet med 10 ml av komplett Fraser-buljong og inkubert videre i 48 timer ved 37°C. En podenål ble brukt for å så ut ca. 10 µl av den primære og sekundære oppformeringskulturen på hver sin ALOA skål. Disse stod i 15 minutter og begge ble inkubert i 48 timer ved 37°C før avlesning, der *L. monocytogenes* er typisk blågrønne omgitt med ugjennomsiktig sone.

For verifisering av *L. monocytogenes* ble antatte kolonier sådd ut på en BA skål (blodagarskål) og inkubert i 24 timer ved 37°C. Karakteristisk for *L. monocytogenes*, er at de har en hemolysesone rundt koloniene. Videre verifisering ble utført med katalasetest, der *L. monocytogenes* er katalasepositiv, samt ved gramfarging. Vi testet

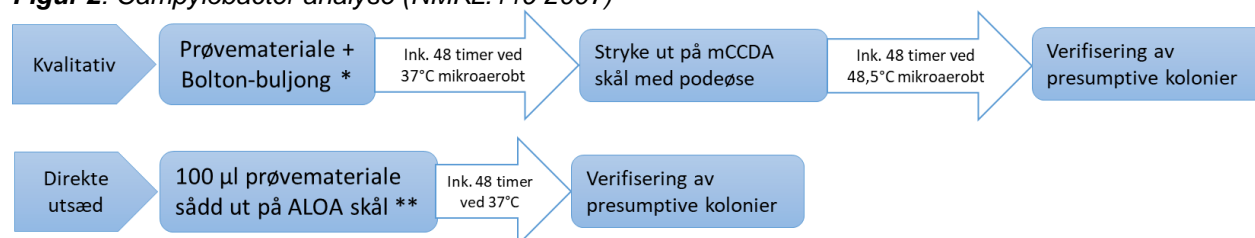
også for karbohydratgjæring med å stryke ut antatte kolonier på en rhamnoseskål og en xylozeskål, som begge to ble inkubert i 1-5 dager ved 37°C. *L. monocytogenes* er vanligvis rhamnose-positiv og xylose-negativ.

For direkte utsæd ble 100 µl av tankmelk, spenemelk og godt blandet HF-buljong med en tredjedel av melkefilter sådd ut på hver sin ALOA for kvantifisering av *L. monocytogenes*, og videre inkubert i 48 timer ved 37°C. Verifisering ble utført på samme måte som ved kvalitativ analyse.

Analyse for *Campylobacter*

Kvalitativ analyse på *Campylobacter* ble utført med en standard metode (NMKL 119:2007) (NMKL, 2007) som samsvarer med ISO 17995, 2005. Direkte utsæd på agar ble bare utført på tankmelk-, melkefilter-, og spenemelkprøvene. Kvantitativ påvisning av *Campylobacter* på måten beskrevet her er påvisning av flere typer *Campylobacter* som er termofile. Disse typer *Campylobacter* er som vanlig sykdomsfremkallende i mennesker.

Figur 2: *Campylobacter* analyse (NMKL:119 2007)



(*) I fortynningsforholdene 1:10

(**) Direkte utsæd ble bare utført på tankmelk, melkefilter-buljong og spenemelk

Ved kvalitativ analysering for *Campylobacter* ble hver av de fem prøvene blandet med Bolton-buljong (HF-buljong) i fortynningsforholdet 1:10, ristet godt i 30 sekunder, og så inkubert i 48 timer ved 37°C i mikroaerobt miljø.

For analyser av tankmelkprøvene ble det tatt 25 g av tankmelk og blandet med 225 g av Bolton-buljong. For analyser av avføringsprøvene ble det tatt 10 g av prøven og blandet med 90 g av Bolton-buljong. For jursvabrene i første uttak ble det tatt 1 ml fra hvert reagensrør (5 ml totalt) og blandet med 45 ml av Bolton-buljong. I andre uttak ble svabrene satt direkte i en Falconrør med 15 ml PVA. Ved fortynning blandet vi 5 ml fra Falconrøret med 45 ml av Bolton-buljong. For melkefiltrene, ble de klipt i tre deler med autoklavert saks på en aseptisk måte, og én del satt i 200 ml av Bolton-buljong.

Etter 48 timers inkubasjon i 37 °C av Bolton-buljongen ble det brukt en podenål for å så ut ca. 10 µl av oppformert Bolton-buljong, hentet fra like under overflaten, på en mCCDA skål. Den ble videre inkubert i 48 timer ved 41,5°C i mikroaerobt miljø før avlesing.

Campylobacter gir typisk flate eller konvekse, gråhvite og glinsende kolonier, 2-4 mm i diameter, ned til pin point størrelse. For verifisering eller avvising av *Campylobacter* ble de presumptive koloniene strøket ut på en BA skål og inkubert ved 41,5°C i mikroaerobt miljø.

Verifisering av kolonier ble utført med oksidase- og katalasetest, der begge måtte være positive. Videre ble morfologi og motilitet undersøkt med fasekontrastmikroskopi ved bruk av BHI-buljong (brain heart infusion buljong). I fasekontrastmikroskop kan *Campylobacter* identifiseres ved sin høye motilitet med spiralbevegelse, og spiral morfologi. Hvis vi fortsatt var usikre, ble antatte kolonier sådd ut på en ny BA skål og

inkubert ved 41,5°C i et aerobt miljø. Hvis kolonien vokste opp igjen var den negativ, ettersom *Campylobacter* ikke vokser i oksygenrike miljøer.

For direkte utsæd ble 100 µl av tankmelk, spenemelk og godt blandet HF-buljong med en tredjedel av melkefilter sådd ut på hver sin mCCDA skål for kvantifisering, og videre inkubert i 48 timer ved 37°C. Avlesning og verifisering ble utført på samme måte som ved kvalitativ analysing.

Litteratursøk

I denne oppgaven har vi en blanding av egne datainnsamlinger, analyser, og litteratursøk. Vi har valgt å bruke litteratur fra og med 2015 for å ekskludere utdatert litteratur.

Tabell 3: Litteratursøk kriterier

Beskrivelse av litteratursøk	Vi søkte opp studier som hadde sammenlignbart mål og metode for analysering av prøver som vår egen studie. Etersom det var viktig at geografisk område og kultur i litteratursøket var sammenlignbart med vårt eget studie, begrenset vi brukbare studier til de som var utført i Nordiske land.
Inklusjonskriterier	Studie publisert i fagfelleverderte tidsskrifter
Eksklusjonskriterier	Studier utført utenfor norden, deskriptive studie, studier om ostelaging, studier som ikke omhandler kyr
Databaser	Oria
Søkeord	(<i>Campylobacter</i> ELLER <i>Listeria</i>) OG («raw milk» ELLER «unpasteurised milk» ELLER «tank milk») OG (Sweden ELLER Norway ELLER Finland ELLER Denmark) IKKE (cheese ELLER outbreak)
Tidsbegrensning	2015-2020

Den 28. januar 2020 slo vi opp i databasen «Oria» med søkeordene (*Campylobacter* ELLER *Listeria*) OG («raw milk» ELLER «unpasteurised milk» ELLER «tank milk») OG (Sweden ELLER Norway ELLER Finland ELLER Denmark) IKKE (cheese ELLER outbreak) der *Listeria* og *Campylobacter* ble søkt etter i emne, «raw milk», «unpasteurised milk» og «tank milk» ble søkt i alle felter, og Sweden, Norway, Finland og Danmark ble søkt i alle felter. Vi valgte å utelate artikler med «cheese» og «outbreak» i emnefeltet for å utelukke artikler som handlet om ostelaging eller bakterieutbrudd, siden disse emnene faller utenfor det vi jobber med. Videre

avgrenset vi søket til artikler som ble utgitt i fagfelleverderte tidsskrifter i de siste fem årene, enten på norsk eller engelsk.

Med disse kriteriene fikk vi 123 treff etter å ha eliminert fire studier som dukket opp to ganger. Vi gjennomgikk og ekskluderte deretter studier med feil studieområde, feil type studie (dvs. ikke deskriptive studier) eller studier i feil geografisk område. Dessverre fant vi ingen studier med sammenlignbart studieområde som her i Norge. Se tabell 3 for oversikt over litteratursøket. Til sist satt vi igjen med fire relevante studier. For oversikt over dem, se tabell 4.

Tabell 4: Oversikt over studier.

	Studier	Geografisk område	Bakterier analysert for	Type prøve ^a	Mengde prøver	% prev per prøve (Wilson's 95% CI)
A	(Castro et al., 2018)	Finland	<i>L. Monocytogenes</i>	TM	186	13 (9-19)
				MF	224	29 (24-36)
				ML	1702	16 (14-18)
B	(Castro et al., 2017)	Finland	<i>L. monocytogenes</i>	TM	115	3.5
				MF	23	57
				M	50	8
C	(Artursson et al., 2018)	Sverige	<i>Listeria</i>	MF	94	17
				TM	15	0
			<i>Campylobacter</i>	MF	94	7.6
				TM	15	0
D	(Jaakkonen et al., 2019)	Finland	<i>Campylobacter</i>	TM	785	0
				MF	631	<1
				F	257	53
				VS	199	5

(a) Type prøver varierte mellom tankmelk TM, melkefilter MF, miljø ML, avføring F og vannstasjon VS.

Av disse fire studiene var det enkelte som også analyserte med molekylære metoder, som vi ikke hadde anledning til å benytte på våre egne prøver. I disse tilfellene har vi fokusert på de sammenlignbare resultatene og utelatt PCR. Vi har utelatt resultater som ikke har noen relevans for vår studie.

Studie A

I studie A (tabell 4) (Castro et al., 2018) ble det til sammen tatt 186 melketankprøver, 224 melkefiltre og 1702 miljøprøver fra tre forskjellige gårder i Finland i perioden 2013 til 2016. Prøvene ble analysert for *L. monocytogenes* med en standard NMKL 136:2010 metode der de brukte LMBA (*Listeria monocytogenes* blood agar medium), og i tillegg utførte de direkte utsæd på samme agar medium. Miljøprøver ble tatt av forskjellige overflater, underlag, fôringsstasjoner, vannstasjoner, avføring, svabre av jur og fra melkesystemet.

Studie B

I studie B (tabell 4) (Castro et al., 2017) ble det analysert for *L. monocytogenes* fra en finsk gård som også produserte rå melk for salg.

Prøveperioden var fra november 2013 til september 2015. Prøver fra tankmelken og melkefiltrene ble tatt 23 ganger i løpet av denne perioden. Under prøvetakningen ble tatt ett melkefilter og fem 50 ml beger av melk fra melketanken. Prøvene ble alltid tatt på morgenen etter melking slik at en del av tankmelkprøvene hadde passert gjennom melkefilteret. Totalt ble det hentet ut 23 melkefiltre og 115 tankmelkprøver. De ble også kjøpt tre til fem 1 liters pakker rå melk fra butikk som ble pakket enten samme dato som tankmelkprøven ble hentet ut, eller tre dager etter. Totalt ble det kjøpt 105 prøver av pakket rå melk. Miljøprøvene ble tatt 10 ganger i løpet av den nevnte perioden. Det ble tatt svaber av overflater og fra melkesystemet, totalt 50 prøver.

Prøvene ble analysert for *L. monocytogenes* innen 24 timer fra uttak, og brukte de den standard NMKL 136:2010, som er sammenlignbar med ISO 11290-1:1996 og ISO 11290-2:1998.

Studie C

I studie C (tabell 4) (Artursson et al., 2018) ble melkefiltre fra forskjellige melkebesetninger i Sverige testet for *Campylobacter jejuni*, *salmonella*, *Yersinia*, *Listeria spp*, verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) og *Staphylococcus aureus*. Besetningene kunne bestå av kuer, geiter eller sauer. Vi bruker bare resultater for *Listeria* og *Campylobacter* fra kubesetningene.

Prøvene ble tatt over to perioder, den første i september til november 2011 der prøvene ble sendt fra gårdene i plastposer, og den andre i juni til august 2012 der prøvene ble sendt, lagret i Cary Blair medium. Et ekstra prøveuttak ble utført i mai til juni 2014 på samme måte som i andre prøveuttak, men da inkluderte de bare gårder som hadde testet positivt for et av patogene i tidligere uttak, og det ble også tatt tankmelkprøver. Prøvene ble analysert for *Campylobacter* med metode etter ISO 10272: part 1. For å analysere for *Listeria spp* brukte de metode etter SS-EN ISO/IEC 17025; 2005.

Studie D

I studie D (tabell 4) (Jaakkonen et al., 2019) analyserte forskerne for *C. jejuni* og Shiga toxin-produserende *E. coli* (STEC) i miljøet hos kviger og melkekuer fra tre forskjellige gårder i sør-Finnland i løpet av ett år mellom 2014 og 2015, men vi bruker bare resultater for *C. jejuni*.

Ved analysering av avføring, tankmelk og melkefiltre ble det brukt en standard ISO 10272-1:2006 og drikkevann med bruk av ISO 17995:2005 for påvisning av *Campylobacter spp.* I begge metoder ble det ikke utført 24 timers berikelse. Gårdene ble valgt på grunn av at de hadde testet positivt for begge bakterier før. Den studien er laget etter at en streng hygieneprotokoll ble iverksatt. På gård 1 var 30 kuer stallet opp løst i oppvarmet fjøs, med en separat melkestasjon. Gård 2 og 3 hadde 60 kuer hver, også stallet løst i oppvarmet fjøs, men med en melkerobot. Melkefiltre og tankmelkprøver ble hentet 52 til 53 ganger gjennom året, for totalt 631 melkefiltre og 785 tankmelkprøver.

Resultater

Siden denne oppgaven omfatter egen datainnsamling og eksisterende litteratur deler vi opp resultater i to deler.

Egen datainnsamling

I denne delen presenterer vi resultater fra prøveuttak som vi utførte i august 2019 og januar 2020. Vi presenterer først resultatene fra *L. monocytogenes*-analysene som ble gjennomført, deretter tar vi for oss resultatene fra *Campylobacter*-analysene. Analysering av direkte utsæd av prøvemateriale fra begge prøvetakingsrunder ga negative resultater i alle tilfeller. Vi presenterer derfor bare resultater fra kvalitativ analysering i de følgende kapitlene. Til sist presenterer vi hygienescorene som ble gitt til gårdene og hvordan disse prøvene samsvarte med bakteriefunn på gårdene vi besøkte.

Listeria monocytogenes-analyser

Første prøveuttak

Ved første prøveuttak tok vi 18 tankmelkprøver, 18 melkefiltre, 17 jursvaberprøver, 16 avføringsprøver og 18 grovfôrsprøver, og analyserte dem for forekomst av *L. monocytogenes*. Til sammen ble 87 prøver tatt på første besøk, hvor 52 kom fra løsdriftsbesetninger og 35 kom fra konvensjonelle besetninger. Ingen av tankmelkprøvene eller jursvaberprøvene testet positivt for *L. monocytogenes*. Av melkefiltrene som ble tatt var 5,6% positive. Av avføringsprøvene som ble tatt var det 25% som testet positivt og av grovfôrprøvene var 22,2% positive.

Tabell 5: Prøveuttak 1, resultater for *L. monocytogenes*-analyser.

Gård nummer	L/B	Hyg. score	Tank n=18	Filter n=18	Spene melk	Jur n=17	Avføring n=16	Grovfôr n=18	Sum
1	L	1,6	0	0	-	0	- ^a	0	0
2	B	4,0	0	0	-	0	0	0	0
3	L	2,8	0	1 ^b	-	0	0	0	1
4	L	2,7	0	0	-	0	0	0	0
5	L	2,3	0	0	-	0	- ^a	1	1
6	L	0,9	0	0	-	0	0	1	1
8	B	2,1	0	0	-	0	0	0	0
9	B	2,0	0	0	-	0	1	0	1
10	B	5,3	0	(1)	-	0	0	0	(1)
11	L	2,4	0	0	-	0	0	0	0
12	B	2,5	0	0	-	0	1	0	1
14	L	1,3	0	0	-	0	(1)	1	1 (2)
15	L	2,5	0	0	-	0	0	0	0
16	B	3,0	0	0	-	0	(1)	0	(1)
17	L	- ^c	0	(1)	-	- ^c	1	0	1 (2)
18	B	2,4	0	0	-	0	0	0	0
19	L	1,3	0	0	-	0	1	1	2
20	L	2,1	0	0	-	0	0	0	0
Sum positive løs			0	1 (2)		0	2 (3)	4	7 (9)
Sum positive bås			0	(1)		0	2 (3)	0	2 (4)
Sum positive total (N=87)			0	1 (3)		0	4 (6)	4	9 (13)

I tabellen er 0 negativt resultat, 1 er positivt resultat og L/B er løsdrift (L) eller båsdrift (B). Tall i parentes (n) er usikker påvisning og sum inkludert usikker påvisning.

(a) Avføringsprøver tatt fra gård 1 og gård 5 var utydelig merket. De var derfor utelatt.

(b) Gårdsassistent tok på melkefilteret.

(c) Kuer var ute på beit og ikke aktuelt for besøker å gå dit.

Av de 52 prøvene som kom fra løsdriftsbesetninger under det første uttaket var det 13,5% som testet positivt, og av de 35 prøvene som kom fra konvensjonelle besetninger var det 5,7% som var positive, det vil si at det er mer enn dobbelt så høy prevalens av *L. monocytogenes* i prøver tatt fra løsdriftsbesetninger. Totalt var det 10,3% av alle prøver tatt over begge typer gårder som testet positivt for *L. monocytogenes*.

Ved analysering av prøvene var det 4,6% som ga uklare resultater. Forholdsvis var det flere uklare resultater fra konvensjonelle besetninger, da 3,8% av prøvene fra løsdriftsbesetninger, og 5,7% av prøvene fra konvensjonelle besetninger hadde uklare resultater.

Melkefilteret fra gård 3 testet positivt for *L. monocytogenes*, men tilhørende miljøprøver var negative. Filteret fra gård 10 som ga uklart resultat hadde tilhørende miljøprøver som var negative, men filteret fra gård 17 som også ga uklart resultat, hadde en tilhørende avføringsprøve som var *L. monocytogenes*-positiv.

Andre prøveuttak

Ved andre prøveuttak tok vi 18 tankmelkprøver, 18 melkefiltre, 18 spenemelkprøver, 18 jursvaberprøver, 18 avføringsprøver og 18 grovførsprøver: Totalt 108 prøver, hvor 66 var fra løsdriftsbesetninger, og 42 kom fra konvensjonelle besetninger. Ingen tankmelk-, eller spenemelkprøver testet positivt for *L. monocytogenes*. 5,6% av melkefiltre testet positivt, samt 5,6% av jursvabrene, 16,7% av avføringsprøvene og 44,4% av grovførsprøvene.

Tabell 6: Prøveuttak 2, resultater for *L. monocytogenes*-analyser.

Gård nummer	L/B	Hyg. score	Tank n=18	Filter n=18	Spene Melk n=18	Jur n=18	Avføring n=18	Grovfør n=18	Sum
1	L	3,03	0	(1)	0	0	1	1	2 (3)
2	B	3,1	0	0	0	0	0	1	1
3	L	3,5	0	0	0	1	1	(1)	2 (3)
4	L	3,8	0	0	0	0	0	0	0
5	L	2,2	0	0	0	0	0	1	1
6	L	2,2	0	0	0	0	(1)	0	(1)
8	B	1,3	0	0	0	0	0	0	0
9	B	7,0	0	0	0	0	0	0	0
10	B	4,7	0	0	0	0	0	1	1
11	L	4,6	0	(1)	(1)	0	(1)	0	(3)
12	B	4,6	0	0	0	0	(1)	1	1 (2)
14	L	2,1	0	1	0	0	(1)	1	2 (3)
15	L	3,2	0	0	0	0	0	0	0
16	B	1,4	0	0	0	0	0	1	1
17	L	3,9	0	0	0	(1)	0	1	1 (2)
18	B	2,0	0	0	0	0	0	0	0
19	L	2,4	0	0	0	0	1	(1)	1 (2)
20	L	2,5	0	0	0	0	0	0	0
Sum positive løs			0	1 (3)	(1)	1 (2)	3 (6)	4 (6)	9 (18)
Sum positive bås			0	0	0	0	(1)	4	4 (5)
Sum positive total (N=108)			0	1 (3)	(1)	1 (2)	3 (7)	8 (10)	13 (23)

I tabellen er 0 negativt resultat, 1 er positivt resultat og L/B er løsdrift (L) eller båsdrift (B). Tall i parentes (n) er usikker påvisning og sum inkludert usikker påvisning.

Av de 66 prøvene som ble tatt fra løsdriftsbesetninger testet 13,6% positivt for *L. monocytogenes*, mot 9,5% av de 42 prøvene som ble tatt fra konvensjonelle besetninger. Det er om lag samme andel positive prøver fra løsdriftsbesetninger ved første uttak og andre uttak. Prosentandelen for positive prøver fra konvensjonelle besetninger gått opp fra 5,7% ved første uttak, til 9,5% ved andre uttak. Totalt testet 12% av alle prøver fra begge besetningstyper positivt for *L. monocytogenes*.

Ved analysering av prøvene var det 9,3% som ga uklare resultater. Andel uklare resultater fra løsdriftsbesetninger var 13,6% og 2,4% fra konvensjonelle besetninger. Dette utgjør en tydelig økning uklare resultater, hovedsakelig fra løsdriftsbesetninger.

Gårdene som hadde *L. monocytogenes* -positive melkefiltre, testet negativt for *L. monocytogenes* i melkefiltrene ved andre uttak. Det ble gjort funn av *L. monocytogenes* i avføringsprøver ved gjentakende besøk, det gir et intervall på 5,6-16,7% av besetningene som var positive avhengig av om de uklare resultatene er faktisk positive. Funn av *L. monocytogenes* i grovførsprøvene var påvist ved gjentakende besøk, det kan dermed være et intervall på 11,1-16,7% av besetningene avhengig av om de uklare resultatene er faktisk positive.

Campylobacter-analyser

Første prøveuttak

Ved første uttak analyserte vi 18 tankmelkprøver, 18 melkefiltre, 17 jursvaberprøver og 16 avføringsprøver for *Campylobacter*. Totalt var det 69 prøver som ble analysert for *Campylobacter*, derav 41 prøver som kom fra løsdriftsbesetning og 28 som kom fra konvensjonelle besetninger. Ved analyse av prøvene var det 11,1% av

tankmelkprøvene som var positive, 16,7% av melkefiltrene, 5,9% av jursvaberprøvene, og 56,3% av avføringsprøvene som var positive for *Campylobacter*.

Tabell 7: Prøveuttak 1, resultater for *Campylobacter*-analyser.

Gård nummer	L/B	Hyg. score	Tank n=18	Filter n=18	Spene melk n=18	Jur n=17	Avføring n=16	Grovfôr	Sum
1	L	1,6	1	1	-	0	-	-	2
2	B	4,0	0	0	-	0	0	-	0
3	L	2,8	0	1 ^a	-	0	1	-	2
4	L	2,7	1	1	-	0	0	-	2
5	L	2,3	0	0	-	0	-	-	0
6	L	0,9	0	0	-	0	1	-	1
8	B	2,1	0	0	-	0	1	-	1
9	B	2,0	0	0	-	0	0	-	0
10	B	5,3	0	0	-	0	0	-	0
11	L	2,4	0	0	-	0	1	-	1
12	B	2,5	0	0	-	0	0	-	0
14	L	1,3	0	0	-	0	1	-	1
15	L	2,5	0	0	-	0	1	-	1
16	B	3,0	0	0	-	0	1	-	1
17	L	- ^b	0	0	-	- ^b	0	-	0
18	B	2,4	0	0	-	0	0	-	0
19	L	1,3	0	0	-	1	1	-	2
20	L	2,1	0	0	-	0	1	-	2
Sum positive løs			2	3	-	1	7	-	13
Sum positive bås			0	0	-	0	2	-	2
Sum positive total (N=69)			2	3	-	1	9	-	15

I tabellen er 0 negativt resultat, 1 er positivt resultat og L/B er løsdrift (L) eller båsdrift (B).

(a) Gårdsassistent tok på melkefilteret.

(b) Kuer var ute på beite.

Av de 41 prøvene som kom fra løsdriftsbesetninger var det 31,7% som var *Campylobacter*-positive, og av de 28 prøvene som ble tatt fra konvensjonelle besetninger var det 7,1% som var positive for *Campylobacter*. Det er derfor mer enn tre ganger så høy prevalens av *Campylobacter* i prøver fra løsdriftsbesetninger enn i prøver fra konvensjonelle besetninger. Totalt testet 21,7% av alle prøver fra begge gårdstyper positivt for *Campylobacter*, 86,7% fra løsdriftsbesetninger og 13,3% fra konvensjonelle besetninger.

På gård 1 og gård 4 ble det påvist *Campylobacter* i både melkefilter og tankmelkprøvene, men tilsvarende miljøprøver var negative. Gård 3 hadde ett *Campylobacter*-positivt melkefilter og en *Campylobacter*-positiv avføringsprøve.

Andre prøveuttak

Ved andre uttak analyserte vi 18 tankmelkprøver, 18 melkefiltre, 18 jursvaberprøver, 18 spenemelkprøver og 18 avføringsprøver for *Campylobacter*. Totalt var det da 90 prøver som ble analysert for *Campylobacter*, derav 55 fra løsdriftsbesetninger og 35 fra konvensjonelle besetninger. Ved analyse av prøvene var det ingen av tankmelkprøvene eller melkefiltrene som testet positivt for *Campylobacter*. 5,6% av spenemelkprøvene var *Campylobacter*-positive, samt 16,7% av jursvaberprøvene og 61,1% av avføringsprøvene.

Tabell 8: Prøveuttak 2, resultater for *Campylobacter*-analyser.

Gård nummer	L/B	Hyg. score	Tank n=18	Filter n=18	Spene melk n=18	Jur n=18	Avføring n=18	Grovfôr	Sum
1	L	3,03	0	0	1	1	0	-	2
2	B	3,1	0	0	0	0	0	-	0
3	L	3,5	0	0	0	1	1	-	2
4	L	3,8	0	0	0	0	1	-	1
5	L	2,2	0	0	0	0	1	-	1
6	L	2,2	0	0	0	0	0	-	0
8	B	1,3	0	0	0	0	1	-	1
9	B	7,0	0	0	0	0	1	-	1
10	B	4,7	0	0	0	0	0	-	0
11	L	4,6	0	0	0	1	0	-	1
12	B	4,6	0	0	0	0	0	-	0
14	L	2,1	0	0	0	0	1	-	1
15	L	3,2	0	0	0	0	0	-	0
16	B	1,4	0	0	0	0	1	-	1
17	L	3,9	0	0	0	0	1	-	1
18	B	2,0	0	0	0	0	1	-	1
19	L	2,4	0	0	0	0	1	-	1
20	L	2,5	0	0	0	0	1	-	1
Sum positive løs			0	0	1	3	7	-	11
Sum positive bås			0	0	0	0	4	-	4
Sum positive total (N=90)			0	0	1	3	11	-	15

I tabellen er 0 negativt resultat, 1 er positivt resultat og L/B er løsdrift (L) eller båsdrift (B).

Av de 55 prøvene som kom fra løsdriftsbesetninger var det 20% som var *Campylobacter*-positive. Av de 35 prøvene som kom fra konvensjonelle besetninger var det 11,4% som var positive. Det er nesten dobbelt så høy prevalens av *Campylobacter* i prøver fra løsdriftsbesetninger. Totalt testet 16,7% av alle prøver fra

begge besetningstyper positivt for *Campylobacter*. Derav 73,3% fra løsdriftsbesetninger og 26,7% fra konvensjonelle besetninger.

De gårdene som hadde *Campylobacter*-positive tankmelkprøver og melkefiltre fra første uttak, var negative for *Campylobacter* i tankmelkprøver og melkefiltre fra andre uttak. Det ble imidlertid gjort funn av *Campylobacter* i avføringsprøver ved begge besøk i 33,3% av besetningene.

Hygienescore

Tabell 9: Oversikt over hygienescore fra begge uttak.

Gård nummer	L/B	1. uttak	2. uttak	Gjennomsnitt
1	L	1,6	3,03	2,32
2	B	4,0	3,1	3,55
3	L	2,8	3,5	3,15
4	L	2,7	3,8	3,25
5	L	2,3	2,2	2,25
6	L	0,9	2,2	1,55
8	B	2,1	1,3	1,7
9	B	2,0	7,0	4,5
10	B	5,3	4,7	5,0
11	L	2,4	4,6	3,5
12	B	2,5	4,6	3,55
14	L	1,3	2,1	1,7
15	L	2,5	3,2	2,85
16	B	3,0	1,4	2,2
17	L	-	3,9	3,9
18	B	2,4	2,0	2,2
19	L	1,3	2,4	1,85
20	L	2,1	2,5	2,3
Gj. snitt løs		2,0	3,0	2,6
Gj. snitt bås		3,0	3,16	3,2
Gj. snitt total		2,4	3,2	2,9

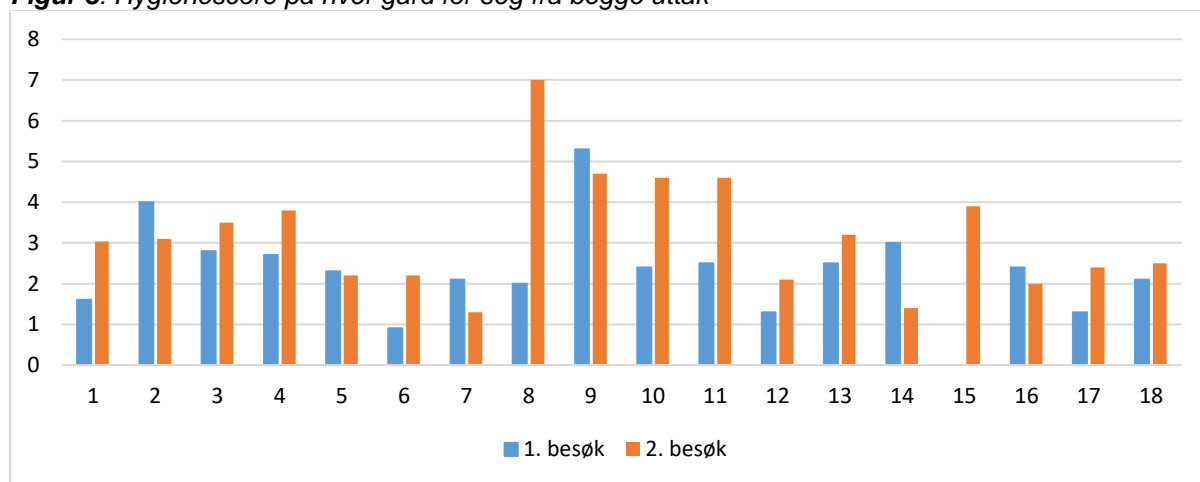
L/B er løsdrift (L) eller båsdrift (B).

Tabell 9 viser en oversikt over hygienescorene som ble satt på hver gård ved begge uttak, samt gjennomsnittlig score fra de to besøkene. Her kan vi se at løsdriftsbesetninger har en gjennomsnittlig hygienescore på 2,6 over begge uttak, lavere enn den gjennomsnittlige hygienescore fra konvensjonelle besetninger på 3,2.

Vi ser også en gjennomsnittlig økning i hygienescore for begge besetningstyper i andre uttak, som ble utført på vinterhalvåret.

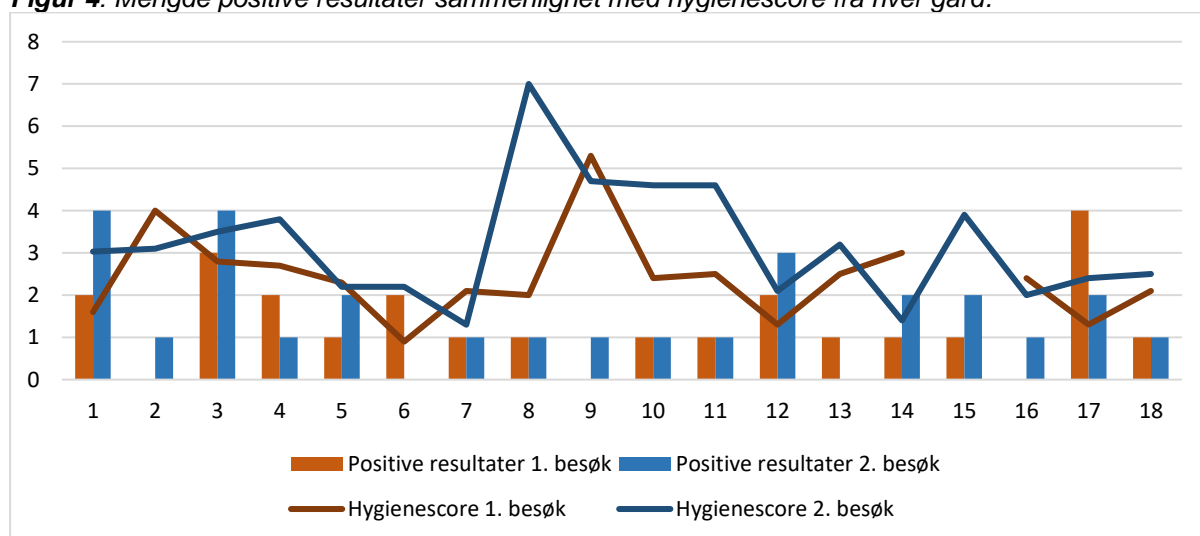
For å se om mengde positive eller usikre resultater har en sammenheng med hygienescore har vi laget noen figurer:

Figur 3: Hygienescore på hver gård for seg fra begge uttak



Fra figur 1 kan vi se at av de 17 gårdene som ble gitt hygienescore på begge besøk, var det 11 gårder (64,7%) som fikk høyere hygienescore på andre besøk. Av de som fikk høyere score, var det særlig seks gårder som scoret betraktelig høyere enn på første besøk, med tilnærmet dobbelt så høy score, eller høyere, i andre besøk.

Figur 4: Mengde positive resultater sammenlignet med hygienescore fra hver gård.



Fra figur 2 kan vi se at ni (50%) av gårdene hadde flere positive resultater på andre besøk og fem (27,8%) hadde like mange på begge besøk. Fire (22,2%) av gårdene hadde flere positive resultater på første besøk enn på andre besøk. Det er ikke noen tydelig sammenheng som ble funnet mellom hygienescore og mengde positive resultater per gård, men både antall positive prøver og gjennomsnittlig hygienescorene gikk opp fra første til andre besøk.

Det ble totalt samlet inn 354 resultater. Av disse var 214 resultater fra løsdriftsbesetninger og 140 resultater fra konvensjonelle besetninger. Av de 354 prøvene hadde 52 (14,7%) positive bakteriefunn og 14 (4%) ga uklart resultat. Alle uklare resultater kom fra *L. monocytogenes*-analysering, men 22 av de 52 positive prøvene var *L. monocytogenes*-positive og 30 var *Campylobacter*-positive. Av disse 214 prøvene som kom fra løsdriftsbesetninger var det 40 (18,7%) som var positive og 11 (5,1%) som ga uklare resultater. Av de 140 resultatene som kom fra konvensjonelle fjøs var det 12 (8,6%) som ga positive bakteriefunn og tre (2,1%) som ga uklare resultat. Andelen av positive prøver fra løsdriftsfjøs er dermed mer enn dobbelt så stor som i konvensjonelle fjøs.

Det var 28 positive prøver av totalt 156 fra begge typer gårder på første besøk, og 38 av totalt 198 prøver fra begge typer gårder på andre besøk. Det var da 18% av resultatene fra første besøk som var positive og 19,2% resultater som var positive på andre besøk.

Det var åtte tilfeller der det var *Campylobacter*-, eller *L. monocytogenes*-positive tankmelkprøver og/eller melkefiltre og/eller spenemelkprøve. Av de åtte tilfellene var

det bare fire prøver som var knyttet til sammenfallende miljøprøver (grovfôr, avføring og juroverflater) som testet positivt eller ikke-entydig for samme bakterie.

Av de gårdene som hadde *Campylobacter*-, eller *L. monocytogenes*-positive resultater på analyser av tankmelkprøven, melkefilteret eller jursvabrene, var det ingen som også testet positivt ved andre besøk.

Litteraturstudier

Vi gjorde en inngående vurdering av fire studier for å kunne sammenligne dem med vår egen datainnsamling. Noen av studiene analyserer forekomst av flere bakterier enn *Campylobacter* og *L. monocytogenes*.

Studie A: Occurrence, Persistence, and Contamination Routes of *Listeria monocytogenes* Genotypes on Three Finnish Dairy Cattle Farms: a Longitudinal Study

I studie A (tabell 4) ble det funnet at *L. monocytogenes* var mest prevalent på overflater (52%) og der hvor kuene melkes (48%), men fantes også i store mengder på overflater i melkerommene (42%). To av pulstypene (I og IV) som fantes på juroverflater og i melkesystemet var også ofte funnet i tankmelkprøvene. *L. monocytogenes* viste seg å være over dobbelt så prevalent i melkefiltre som i tankmelk, men prevalens av *L. monocytogenes* i melkefiltre varierte mellom gårder; fra 13% og helt opp til 48% på en av gårdene. Til sammen testet 13% av tankmelkprøvene, 29% av melkefiltre og 16% av miljøprøvene positivt for *L. monocytogenes*. Av de 63 melkefiltrene tatt var det 20,6% som var *L. monocytogenes*-positive og hadde samhørende *L. monocytogenes*-positiv tankmelkprøve.

På gård 1 i studie A var det bare 3 av 375 tankmelkprøver som var positive på direkte utsæd, der det var tall på 1 til 4 CFU/ml. På gård 2 var det 4 av 295 prøver som var positive på direkte utsæd, med tall på 1 til 2 CFU/ml, og på gård 3 var det 2 av 250 tankmelkprøver som var positive på direkte utsæd, med tall på 1 til 3 CFU/ml.

Studie B: Occurrence and growth of *Listeria monocytogenes* in packaged raw milk

I studie B (tabell 4) ble det funnet at syv av 105 prøver fra pakket rå melk, var *L. monocytogenes*-positive. Av disse syv var fem positive for *L. monocytogenes*. To av disse fem, begge fra august 2014, var sådd ut direkte på agar og hadde henholdsvis en og 13 CFU/ml. Begge to kom fra samme tankmelk, men det var to forskjellige pulsotyper (type II og III). Samsvarende melkefilter testet også positiv for *L. monocytogenes*, men var av pulsotype IV. Av 115 tankmelkprøver var det fire prøver (3,5%), som testet positivt for *Listeria spp.*, hvor to testet positivt for *L. monocytogenes*. En av disse tankmelkprøvene hadde *L. monocytogenes* tall på 1 CFU/ml via direkte utsæd. Begge tankmelkprøvene var fra desember 2013. Samsvarende melkefilter og prøve fra pakket rå melk testet positiv for samme *L. monocytogenes* pulsotype (I). Av de 23 melkefiltrene som ble tatt, var det 13 som testet positivt for *Listeria spp.*, derav var det ni som testet positivt for *L. monocytogenes*. Når en tankmelkprøve var positiv for *L. monocytogenes* eller en annen *Listeria spp.*, var melkefilteret fra samme uttak også positivt. Av de 50 miljøprøvene som ble hentet, var det bare fire av dem som testet positivt for *Listeria spp.* Ingen av dem testet positivt for *L. monocytogenes*.

Studie C: Foodborne pathogens in unpasteurized milk in Sweden

I studie C (tabell 4) var 94 melkefiltre, derav 16 (17%) var positive for *Listeria* og syv (7,6%) positive for *Campylobacter*. Denne studien konkluderte med at analysering av *Listeria* og *Campylobacter* i melkefiltre er en gunstigere måte å måle bakteriemengde på enn fra tankmelk, og at det å lagre prøvene i en Cary Blair medium beholdt prøvematerialet bedre enn hvis de ble lagret i plastpose med fryseelement.

Studie D: Longitudinal Study of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and *Campylobacter jejuni* on Finnish Dairy Farms and in Raw Milk

I studie D (tabell 4) var ingen av tankmelkprøvene positive for *C. jejuni*, og bare én av 631 melkefiltre testet positivt for *C. jejuni*. Avføringsprøver og prøver fra vanningspunkter ble hentet ut 11 ganger gjennom året. Totalt ble det samlet 257 avføringsprøver og 199 vanningspunktprøver. Av 257 avføringsprøvene som ble tatt, testet 136 av dem positivt for *C. jejuni*, dvs. 53%. Av 199 vanningspunktprøver testet 10 av dem positivt for *C. jejuni*, dvs. 5%. Prevalens av *C. jejuni* positive avføringsprøver varierte mye mellom gårder, fra 16% til 87%. På samme måte varierte *C. jejuni* positive vanningspunkter mellom gårder, fra 0% til 18%.

Diskusjon

I dette kapitlet skal vi diskutere de resultatene vi har fått og hva de kan bety. Vi starter med resultater fra *L. monocytogenes*-analyser, så *Campylobacter*-analyser, og til slutt forskjell på bakteriefunn mellom de to uttakene. Etter det, tar vi for oss hygienescore og sammenheng mellom det og bakteriefunn, samt sesongvariasjon. Til slutt diskuterer vi mulige feilkilder som kan ha påvirket våre resultater.

Funn av *L. monocytogenes*

Oversikt over *L. monocytogenes*-positive prøver samlet i denne studien.

Ved analysering av prøver i første uttak var det totalt 10,3% *L. monocytogenes*-positive, men det gikk opp til 12% ved andre uttak. Vi hadde flere prøver ved andre uttak, og en del prøver som måtte utelates ved første uttak så dette kan kanskje ha påvirket resultatene. Som vist i tabell 10, er den økningen i forekomst forårsaket av en økning av *L. monocytogenes*-positive grovfôrsprøver. Dette kan skyldes at på vinterhalvåret har grovfôret blitt eldre og vekstforholdene til *L. monocytogenes* er gunstigere.

Tabell 10: Prosent positive prøver fra begge uttak i vår datainnsamling.

Uttak	Tankmelk	Melkefilter	Spenemelk	Jursvaber	Avføring	Grovfôr	Total
1	0 (n=18)	5,6% (n=18)	-	0 (n=17)	25% (n=16)	22,2% (n=18)	10,3% (n=87)
2	0 (n=18)	5,6% (n=18)	0 (n=18)	5,6% (n=18)	16,7% (n=18)	44,4% (n=18)	12% (n=108)
1. og 2.	0 (N=36)	5,6% (N=36)	0 (N=18)	2,9% (N=35)	20,6% (N=34)	33,3% (N=36)	11,3% (N=195)

Det er likevel ikke store forskjeller i resultatene fra de ulike prøveperiodene, men det ble funnet flere bakterier i prøvene som ble tatt i vintermånedene. Dette stemmer overens med litteraturstudie A, som også fant flere *L. monocytogenes*-positive prøver

på vinteren. I en litteraturstudie fra Slovenia ble det funnet at prevalensen av *Listeria* i avføringsprøvene var høyere i de kaldere månedene av året (Bandelj and Ocepek, 2018). Grunnen til den økte prevalensen av *L. monocytogenes* på vinterhalvåret kan være dårligere kvalitet på fôret, økt dyretetthet, dårlig renhold eller bruk av husdyrgjødsel i fôrproduksjonen (Bandelj and Ocepek, 2018).

Vår egen studie viser derimot lavere forekomst av *L. monocytogenes* i avføringsprøvene fra vinterhalvåret. Dette kan skyldes feil ved prøvetaking, feil ved analysering eller andre omstendigheter ved de andre studiene som ikke lignet på våre. *L. monocytogenes* finnes naturlig i miljøet, bakterien kan dermed enkelt kontaminere grovfôret spesielt hvis fôret ligger på gummi- eller andre type underlag der *L. monocytogenes*-bakterien kan lage biofilm (Latorre et al., 2010).

Det var en del uklare resultater ved analysering av avføringsprøvene, både ved første uttak og andre uttak. Hvis vi inkluderer de uklare resultatene i våre data hadde 37,5% av avføringsprøver tatt fra første uttak vært positive, og 38,9% av prøvene ved andre besøk. Dette ville ha stemt bedre med eksisterende litteratur på forekomst av *L. monocytogenes* ved forskjellige sesonger, selv om vi hadde forventet enten høyere tall ved andre besøk eller lavere tall ved første besøk. Hvis de to avføringsprøvene som var utelatt ved første uttak hadde vært negative, hadde prosenttallet fra første uttak falt videre til 33,3%. Men siden de ble ikke analysert kan vi ikke trekke noen konklusjoner.

To av litteraturstudiene (A og B) som vi presenterte i tidligere kapiteler, så bare på forekomst av *Listeria monocytogenes* i rå melk. Under studie A fant de ut at *L. monocytogenes* var mest prevalent på overflater (52%) og på steder der kuene melkes

(48%), men dette er miljøprøver som vi ikke har inkludert i vårt eget materiale. Studie A kom fram til at prevalensen av *L. monocytogenes* var høyere på vinteren enn på sommeren, dette stemmer overens med vår studie også, selv om vi bare inkluderte to besøk. Det hadde derfor vært interessant å se på prøver, tatt fra våre deltagende gårder på våren og sommeren, for å se om det er en tydelig økning mellom utesesongen og innesesongen. Våre data er dessverre begrenset til starten av innesesongen i august, og midten av januar. Basert på studie A, kan vi tenke oss at vi kunne hatt flere positive prøver ved slutten av innesesongen.

I studie B fant de ut at hvis en tankmelkprøve testet positiv for *L. monocytogenes*, testet melkefilteret fra samme gård også positivt for *L. monocytogenes*. Uansett var det ingen tankmelkprøve som var positiv for *L. monocytogenes* i vår studie, så det er vanskelig å si om melkefilteret hadde vært *L. monocytogenes*-positiv hvis tankmelkprøven var positiv i våre data. Grunnen til at de gjorde disse funn i studie B, kan være at *L. monocytogenes* har potensialet til å lage biofilm på overflater av rustfritt stål, gummi og plast. Dette er materialer som blir mye brukt i melkesystemet (Latorre et al., 2010). Bakteriene kan lett danne biofilm i melkerestene og dermed raskere formere seg, og føre til kontaminering av tankmelken og melkefilteret (Weiler et al., 2013). Det ble funnet veldig få bakterier i melketanken, både i vår studie og i litteraturstudiene. Det kan være flere grunner til dette. Mengden av melk i tank kan ha vært så pass mye at konsentrasjonen av bakterier gikk ned slik at de ikke kunne påvises. En annen mulighet er at metoden som ble brukt for dyrkning, ikke hadde nok vekstmedier for bakteriene til å vokse og formere seg. En tredje grunn kan være at det er god melkehygiene som unngår kontaminasjon fra miljøet rundt og god rengjøring av melketanken og melkefilter-beholderen for å unngå dannelse av biofilm. For å få et

mer presist resultat burde det tas flere prøver over lengere tid for å bedre kunne estimere prevalensen av bakteriene (Carolina et al., 2018).

Det er interessant å se at i motsetning til studie B der 56,6% av melkefiltrene var *L. monocytogenes*-positive, var bare 5,6% av melkefiltrene fra vår studie positive for *L. monocytogenes*. Dette kan skyldes generelt bedre hygienerutiner i norske besetninger. Det kan også hende at ettersom gården fra studie B, pakket rå melk for salg, var det større smitterisiko med tanke på besøk av ansatte. Men man kunne også forventet bedre hygiene fra en gård som pakket rå melk, der strenge hygienerutiner er nødvendig. Miljøprøvene tatt i litteraturstudie B argumenterer for bedre hygiene i fjøset. Av de 50 miljøprøvene som ble tatt var det bare fire (8%) som var *L. monocytogenes*-positive. Dette samsvarer ikke med de miljøprøvene som ble tatt under litteraturstudie A, der det ble funnet flest bakterier i miljøprøvene. Det ble også funnet flest bakterier i miljøprøvene i vårt datasett, der største delen av bakterier ble funnet enten var i grovfôrsprøvene eller i avføringsprøvene. Hvor bakterien oppsto i miljøet har vi ikke noe grunnlag for å uttale oss om, bakterien kan ha oppstått f.eks. i avføring eller i grovfôret, som er påvist i vår studie.

I studie C (se tabell 4) var det 17% av alle melkefiltre, tatt over tre uttak, som testet positivt for *Listeria*. Dette stemmer overens med våre tall. Denne studien har derimot, et annet opplegg enn vår studie og de andre litteraturstudiene fordi det var bonden på hver gård som tok ut melkefilteret og sendte til laboratoriet. Bøndene og deres ansatte hadde ikke nødvendigvis kunnskapen om riktige aseptiske prøvetakings-metoder, bonden kan derfor ha påvirket resultatene.

L. monocytogenes-funn i løsdrift og konvensjonelle besetninger

Våre analyser viser at forekomsten av *Listeria monocytogenes* er høyere i løsdriftsbesetninger enn i konvensjonelle besetninger. Gjennomsnittlig var det 13,6% av prøver tatt fra løsdriftsbesetninger og 7,6% av prøver fra konvensjonelle besetninger som var *L. monocytogenes*-positive. Dette er nesten to ganger mer *L. monocytogenes*-forekomst i løsdriftsbesetninger. Det er en stor forskjell i antall løsdrifts besetninger og antall konvensjonelle besetninger som var med i studien, men vi ser uansett en tydelig sammenheng mellom type drift og mengde positive resultater. Noen mulige forklaringer til dette er at løsdriftsfjøsene ofte har større besetninger, kuene kan gå fritt rundt og eventuelt lettere spre bakterier innad i besetningen. Det er også vanskeligere å holde et løsdriftsfjøs rent. Det er også visse ulikheter i type fôr og fôrtildeling mellom konvensjonelle fjøs og løsdriftsfjøs. De litteraturstudiene vi presenterer i resultater ser dessverre ikke noe på forskjell på forekomst av bakterier i løsdriftsbesetninger mot konvensjonelle besetninger.

Resultater fra enkelte prøver

Ved første uttak var det bare ett melkefilter som var *L. monocytogenes*-positivt fra gård 3, og den sammenfalt med miljøprøver som alle var negative. Vi kan derfor ikke si noe om hvor det smittede kom fra, men det nevnes at dette melkefilteret ble tatt på av gårdsassistent ved uttak fra melkesystemet. Dette kan ha påvirket resultatet, men det er høyest usannsynlig at bakterien fantes på hånden til gårdsassistenten i høy nok mengde til å påvises på analysen. Derfor kan vi ikke utelukke at dette er en reelt positiv prøve og at smitten kom fra en kilde som vi ikke tok prøver av, som f.eks. fra biofilm i fra rørene til melkesystemet, da den kan dannes lett på rustfritt stål (Weiler et al., 2013). En annen mulighet er at det har kommet bakterier inn under melking.

Melkefilteret tatt fra gård 17 (første uttak) ga uklare resultater på *L. monocytogenes*-analysen. Denne prøven kom fra en gård som hadde en *L. monocytogenes*-positiv avføringsprøve, men jursvaber ble ikke tatt under det samme besøket fordi kuene var ute på beite. Vi kan derfor ikke vite om svaberprøver av jur hadde vært positiv eller negativ for *L. monocytogenes*. Det kunne ha vist en smittevei, dersom det uklare resultatet er positivt. Da hadde vi sett en smittevei fra avføring til juroverflate, og fra juroverflate til melkefilteret. Men uansett om jursvabrene hadde vært positive, og det uklare resultatet er en reell positiv prøve, er det vanskelig å si om juroverflater hadde vært en del av smittekjeden. Som nevnt tidligere, er jursvabrene samleprøver av en andel av kuene i besetningen, og bakteriene kan stamme fra jur som vi ikke tok prøve av.

Ved andre uttak var det igjen bare ett melkefilter som var *L. monocytogenes*-positivt fra gård 14, og den sammenfalt med en grovfôrsprøve som var *L. monocytogenes*-positiv og en avføringsprøve som ga uklart resultat. Man kan vurdere om det er smittekjeden, dvs. at smittet kom fra grovfôr-, eller avføringsprøven, som deretter smittet til juroverflater og videre til melken. Selv om jursvabrene og spenemelkprøvene fra denne gården var negative, så kan det hende at bakterien fantes på kuer som vi ikke tok prøver av.

Ett melkefilter som ble tatt fra gård 11 ved andre uttak hadde også et uklart resultat på *L. monocytogenes*-analysen, og sammenfalt med spenemelkprøver og avføringsprøve som også ga uklare resultater. Disse resultatene kan være faktisk positive fordi det er samme type *L. monocytogenes* som er vanskelig å dyrke opp, men siden jursvabrene

var negative, er det vanskelig å være sikker. Da kan man også spekulere om hvor smittet i spenemelken kom fra, siden jursvabrene var negative. En grunn til dette kan for eksempel være at ved prøveuttak ikke var aseptisk. Det er vanskelig å påvise dette i etterkant.

Uklare resultater

Noen av *L. monocytogenes* prøvene som ble tatt under begge prøveuttakene fikk ett usikkert resultat, dette var ikke tilfellet med *Campylobacter* prøvene. Det kan derfor vurderes om det er noe ved *L. monocytogenes* som gjør at den er vanskelig å dyrke opp. Enkelte typer *L. monocytogenes* er vanskelig å gjenkjenne, der det er nødvendig å bruke mer presise metoder, som f.eks. PCR, for å kunne identifisere den. Denne metoden kunne vi dessverre ikke utføre, så det er umulig å si om de uklare resultatene er faktisk positive eller negative.

Måten vi analyser for *L. monocytogenes* og *Campylobacter* kan også være grunnen til denne forskjellen. Vi inkuberer prøver vi skal analysere for *Campylobacter* ved høye temperaturer og i et mikroaerobt miljø som er veldig spesifikt for mange typer sykdomsassosierte *Campylobacter*. Hvis det var tvil om det var *Campylobacter*-kolonier, inkuberte vi en BA skål med utstryk av de presumptive koloniene ved 41,5°C, og i et aerobt miljø. Hvis bakterien fortsatt oppformerte seg, avkreftet dette tilstedeværelse av *Campylobacter*. I motsetning til *Campylobacter*-analyser, så forsøkte vi i våre analyser å analysere for *L. monocytogenes* utelukkende, med bruk av HF- og Fraser-buljong, i aerobt miljø. Det kan hende at det er flere typer *Listeria* som lager kolonier slik at det var vanskelig å vite om de koloniene inneholdt *L.*

monocytogenes. For å karakterisere typen *Listeria* måtte vi ha brukt PCR, men det var ikke aktuelt.

Det er ulike faktorer som kan ha påvirket resultatet fra dyrkning i laboratoriet som blant annet mangel på spesifikke næringsstoffer bakterien trenger for å kunne vokse, oksygennivå, temperatur, pH og osmotiske forhold eller manglende vekstfaktor (Vester et al., 2015).

Funn av *Campylobacter*

Oversikt over *Campylobacter*-positive prøver

Ved analysing av prøver i første uttak var det totalt 21,7% som var *Campylobacter*-positive, men dette gikk ned ved andre uttak der det var 16,7% av prøvene som var positive for *Campylobacter*. Selvom total positive prøver gikk ned, så var det flere *Campylobacter*-positive jursvaberprøver og avføringsprøver ved andre uttak. Dette er noe som er støttet av litteraturen, da andre uttaket var utført på vinterhalvåret og man kunne forventet høyere bakteriefunn i miljøet på grunn av tetthet i fjøset over lang tid (Gölz et al., 2018). Uansett gikk antall tankmelk-, og melkefilterprøver tydelig ned mellom besøkene, da det var ingen *Campylobacter*-positive tankmelk-, eller melkefilterprøve ved andre uttak, som vist i tabell 11. Det kan tenkes at bonden ble mer bevisst på hygiene i løpet av vinteren på grunn av vansker ved å holde fjøset rent i den tiden.

Tabell 11: Prosent *Campylobacter* positive prøver fra begge uttak i vår datainnsamling.

Uttak	Tankmelk	Melkefilter	Spenemelk	Jursvaber	Avføring	Total
1	11,1% n=18	16,7% n=18	-	5,9% n=17	56,3% n=16	21,7% N=69
2	0 n=18	0 n=18	5,6% n=18	16,7% n=18	61,1% n=18	16,7% N=90
1. og 2.	5,6% N=36	8,3% N=36	5,6% N=18	11,4% N=35	58,8% N=34	18,9% N=159

På de samme gårdene som hadde *Campylobacter*-positive tankmelkprøver ved første uttak, var også melkefilteret *Campylobacter*-positivt og begge gårder var løsdriftsfjøs. Dette kan forklares med at kontaminerte melkefilter kan føre til en potensiell kontaminering av den rå melken i melketanken, siden bakteriene har en god levedyktighet i melkefilteret (Serraino et al., 2013). Det antas at *Campylobacter spp* også kan kontaminere rå melk gjennom sekundær fekal forurensning som ved melking eller gjennom håndtering av rå melken (Bianchini et al., 2014). I en studie fra Japan ble det funnet at 47% av avføringsprøvene tatt fra slaktet kjøttfe i Saitama i Japan, var positive for *Campylobacter* (Saito et al., 2005). Avføring er derfor en aktuell smittekilde i våre data, da mer enn halvparten av avføringsprøvene vi tok både ved første og andre uttak var *Campylobacter*-positive.

Litteraturstudie C (tabell 4) viste at av alle melkefiltrene tatt over 3 uttak på forskjellige tidspunkter i året, var 7,6% av dem *Campylobacter*-positive. Studie C hadde større uttak enn det vi hadde og det kan derfor hende at våre tall er litt annerledes i forhold til tallene de fikk i studie C, eller at metodene for uttak var annerledes enn våre ved datainnsamlingen. Dette kan ha påvirket resultater på *Campylobacter*-analyser, men uansett stemmer dette overens med tall vi har, da 8,3% av alle melkefiltre i vår studie, var *Campylobacter*-positive.

I studie D (tabell 4) testet de for *Campylobacter* i prøver tatt fra tre forskjellige gårder. Av 785 tankmelkprøver testet ingen av prøvene positivt for *C.jejuni*, og kun én av 631 melkefilter testet positivt for *C.jejuni*. Dette stemmer delvis overens med vår studie, selv om vi hadde høyere andel melkefiltre og tankmelkprøver som var positive for *Campylobacter*, vi hadde derimot ikke like mange prøver som litteraturstudie C. Det

ble hentet ut 257 avføringsprøver der 53% av prøvene var *C.jejuni* positive. Antallet positive prøver varierte fra gård til gård. Det er ikke veldig overraskende at så mange avføringsprøver er positive, ettersom mange friske dyr skiller ut *Campylobacter* i avføringen uten å vise kliniske symptomer. Gårdene som var med i studien hadde testet positivt for bakterien før og hadde nå innført strengere hygieneprotokoller. Det er tydelig færre positive prøver i studie D enn i de andre litteraturstudiene, men også færre enn i vår studie. Vi kan derfor anta med at god hygiene er svært viktig for å begrense smitte av *Campylobacter* innad i besetningen.

Miljøprøvene var de prøvene som i størst grad var positive, dette gjaldt både for egne prøver og prøvene fra litteraturstudiene. Dette gir mening siden *Campylobacter* naturlig finnes i miljøet (Mattilsynet, 2012). Det ble kun tatt avføringsprøver i ett av litteraturstudiene (studie D), her ble det funnet 136 *Campylobacter* positive prøver. Avføringsprøvene var den typen prøve som oftest testet positivt for *Campylobacter* i vår studie. Siden *Campylobacter* naturlig finnes i tarmfloraen til en rekke dyrearter uten å føre til noen sykdom, gir det mening at bakteriene fantes i avføringen til kuene og trenger ikke å bety dårlig hygiene i fjøset. Det viser uansett at dette er en viktig smittekilde av *Campylobacter* og derfor må hygienerutiner som forebygger smitte fra avføring til melken opprettholdes.

Campylobacter-funn i løsdrift og konvensjonelle besetninger

Ved analysing av prøver fra første og andre uttak var gjennomsnittlig 25,9% av prøver tatt fra løsdriftsbesetninger, *Campylobacter*-positive. Til sammenligning, var gjennomsnittlig 9,25% av prøver tatt fra konvensjonelle besetninger, *Campylobacter*-positive. Disse tallene viser at det er nesten tre ganger så stor forekomst av

Campylobacter i løsdriftsfjøs enn i konvensjonelle fjøs. Dette kan være forårsaket av at løsdriftsbesetninger er større enn konvensjonelle besetninger, og i tillegg kan bakterien lettere spres rundt i fjøset der kuene går fritt rundt. Som nevnt tidligere er det en forskjell på antall konvensjonelle besetninger og løsdriftsbesetninger som er med i studien, noe som kan ha påvirket resultatene våre.

Resultater fra enkelte prøver

Våre resultater viser at hvis tankmelkprøven er positiv for *Campylobacter*, er melkefilteret det også. Tankmelkprøven og melkefilteret tatt fra gård 1 under første uttak, var begge positive, men tilhørende jursvaber var negativ. Smitten kan ha kommet fra kuer som vi ikke tok svaber av i denne besetningen. Det var ingen avføringsprøve fra gård 1 i dette materialet, så det er vanskelig å si om avføringen er smitekilden. Totalt var 56,3% av avføringsprøver tatt i første uttak, *Campylobacter*-positive. Analyser av tankmelkprøve og melkefilter fra gård 4 i første uttak, viser at begge var positive. Tilhørende miljøprøver var alle negative, så man kan anta at smittet kom fra en kilde vi ikke testet.

Jursvaberprøve fra gård 19 under første uttak var *Campylobacter*-positiv og sammenfalt med en avføringsprøve som også var positiv. Tilhørende tankmelkprøve og melkefilter negativ. Dette betyr at selv om juroverflater er *Campylobacter*-smittet, trenger det ikke bety at det overføres til melken. Prøver tatt fra gård 1 under andre uttak støtter dette, da både spenemelkprøven og jursvabrene var *Campylobacter*-positive, men tilhørende tankmelkprøve og melkefilter var negative.

Hygienescore

Hygienescoren viste at selv om gården hadde en høy hygienescore var det ikke alltid funn av bakterier. Den gården som hadde høyest hygienescore (7,0) hadde kun én positiv prøve, som var avføringsprøven. En annen gård som hadde en score på 1,6 fikk påvist *Campylobacter* i tankmelken. Det er dermed ikke noen direkte forklaring mellom dårlig hygiene og bakterier på gården vist i vårt datasett. Denne studien er i hovedsak deskriptiv og har derfor ikke benyttet statistiske verktøy til å finne årsakssammenhenger. Ved bruk av kausalorientert statistikk, vil man i større grad kunne avdekke faktorer som disponerer for forekomst av patogene bakterier i ulike prøver og fra ulike kilder. Dette er teknikker som vil benyttes i andre deler av prosjektet.

Videre, kan det være andre typer bakterier som har sammenheng med hygienescore, som for eksempel *E. coli*. I en litteraturstudie ble det lagt fram at kuer som hadde en høy hygienescore spesielt ved juret (kategorisert som skitne) hadde en 1,5-ganger større sannsynlighet for å skille ut patogene i melkeprøver sammenlignet med kuer som hadde jur som ble kategorisert som rene. I samme studie ble det ikke funnet noen signifikant sammenheng mellom høy hygienescore og mastitt (Schreiner and Ruegg, 2003).

Snittet for hygienescore under første besøk hos løsdriftsbesetningene var 2,0, og 3,0 hos de konvensjonelle besetningene. Under det andre besøket var snittet 2,96 i løsdriftsbesetningene og 3,16 hos konvensjonelle besetninger. Dette betyr at kuene var mer skitne under den siste prøveperioden i februar 2020. I en studie fra Storbritannia ble det funnet at kuene var mer skitne på vinteren enn på sommeren siden de hadde mindre plass til å bevege seg og færre liggeplasser, det er også

vanskeligere å holde underlaget rent (Zucali et al., 2011). I en annen studie ble det diskutert at kuer som har høyt fôrinntak også har høy fekal produksjon som gir dem større sannsynlighet for å bli skitne (Ellis et al., 2007). I tillegg kan det være klimatiske faktorer som øker luftfuktigheten inne i husdyrrommet og dermed gjør at strømateriale har mindre absorpsjonsevne.

Det ble funnet færre positive resultater under første besøk, der 18% av resultatene var positive for bakteriene. Dyrene hadde i gjennomsnitt lavere hygienescore ved første besøk, på 2,4. Ved andre besøk var det 19,2% av resultatene som var positive og var da gjennomsnittet av hygienescore på 3,2 over begge typer besetninger. Det er ikke noe tydelig skille mellom hygienescoren mellom løsdrifts besetninger og konvensjonelle besetninger som vi kan se. Den gården med høyest hygienescoring på 7,0 var et konvensjonelt fjøs med 16 melkekuer, og den laveste hygienescoren på 0,9 var i et løsdriftsfjøs med 25 melkekuer. Vårt datasett gir ikke grunnlag for å si at antallet kuer på gården eller type gård har noen påvirkning på den samlede hygienescoringen til besetningen. Derimot kan vi se en liten sammenheng mellom snittet av hygienescore og mengde positive prøver, som begge går opp i innesesongen.

Det er stor variasjon mellom besetninger når det kommer til hygienescore. I konvensjonelle fjøs med langbåser vil kuene ofte skitte rett i bakkant av båsen. Spesielt hvis kutrenerne ikke fungerer som skal gjøre at kuen rygger bakover når hun gjør fra seg (Oltenacu et al., 1998). Målet er at kuen skal rygge så langt tilbake at hun gjør fra seg i møkkrenna og ikke i båsen. Dette er viktig for hvis hun legger seg i møkka, vil hun bli hun skitten og vil få en høy hygienescore. Det er derfor viktig at bonden måker unna møkk ofte og særlig rett etter at kuene reiser seg. Dette skjer ofte ved fôring og

melking. En bonde som ikke er hjemme og kanskje har annet arbeid, vil ikke fange opp dette og får dermed mer møkkete kyr.

I løsdrifter er det ofte to systemer. Såkalt «feed first» eller fri dyretrafikk. I «feed first» skal kuene gå til fôrbrettet etter melking før de går i liggeavdelingen. Da rekker spenekanalen å lukke seg etter melking og det er mindre risiko for mastitt (Deming et al., 2013). I tillegg vil hun gjøre fra seg på veien til liggeplassen og det blir reinere der hun ligger. I fri dyretrafikk er det verre. I dette systemet kan kua gå rett fra roboten til liggearealet. Dette kan føre til dårligere hygienescore og større risiko for å utvikle mastitt hos kuene

Merknader ved begge bakterier

Ingen av kuene som var med i vår studie hadde kliniske symptomer på listeriose eller campylobacteriose selv om de skilte ut bakteriene i avføring. Tilstedeværelsen av *L. monocytogenes* og *Campylobacter* i avføringen til klinisk friske dyr antyder at dette kan være en potensiell smittekilde til rå melken (Vilar et al., 2007).

Det ble funnet omtrent like mye *L. monocytogenes* og *Campylobacter* blant disse prøvene. De positive avføringsprøvene har ikke påvirket melkeprøvene eller melkefiltrene. Det ble også funnet en del *L. monocytogenes*-positive grovfôrsprøver som kan ha en liten sammenheng med de *L. monocytogenes*-positive avføringsprøvene. I tillegg var det hos flere gårder at småfugler kommet seg inn til kuene. Dette kan også ha ført til å spre spesielt *Campylobacter* innad i fjøset siden fugler potensielt kan være smittebærere av dette.

Feilkilder

Under prøvetaking og analysering oppsto noen uventede hendelser. Som er nevnt tidligere, måtte vi markere en liten del av resultatene som usikre på grunn av komplikasjoner ved dyrkning av *L. monocytogenes* ved analysering av prøver fra begge uttak. I tillegg til dette var det i andre uttak, ikke tatt nok spenemelk fra gård 6 for å kunne utføre direkte utsæd ved analysering på laboratoriet.

Ved prøvetaking i første runde var det to avføringsprøver tatt fra gård 1 og 5 som var utydelig merket så vi kunne ikke være sikre på hvilken prøve som tilhørte hvilken gård. For å ikke risikere feil resultat på feil gård, ble de to avføringsprøvene utelatt. Ved samme prøveuttak mangler vi jursvabre og hygienescore fra gård 17. Dette er på grunn av at kuene var ute på beitet. Videre var positivt resultat av et melkefilter fra gård 3 mulig kontaminert, da en gårdsassistent kom i fysisk kontakt med filteret. Et reelt positivt resultat av filteret kan derimot ikke utelukkes, så den er inkludert i våre data.

I denne type studie kan det ofte være feilkilder til stede. Resultatene fra egen studie kan være en underdrivelse eller overdrivelse av den virkelige utbredelsen av de zoonotiske bakteriene som ble undersøkt i denne oppgaven. Det er flere faktorer som kan ha påvirket resultatet både under planleggingen, prøvetakingen og på laboratoriet.

I vår studie er det med 18 gårder på Østlandet der 11 er løsdrift og syv er konvensjonelle fjøs. Det ville vært optimalt å ha like mange løsdriftsfjøs som konvensjonelle fjøs for å bedre kunne sammenligne de ulike type fjøsene, men dette var dessverre ikke mulig. Vi fikk bare tatt prøver fra gårder på Østlandet, siden det ikke

var mulighet til å reise over hele landet for å samle inn prøver. Dette betyr at resultatet i denne oppgaven ikke vil være representativt for hele Norge, studien kan derfor ha en begrenset ekstern validitet. Det beste ville vært om vi hadde med prøver fra gårder over hele landet for å få et bredere resultat. I tillegg visste bøndene at vi skulle komme å ta prøver på forhånd, som kan ha ført til at de vasket litt grundigere dagen før vi kom, som kan ha påvirket resultatet.

Det var store størrelsesforskjeller på besetningene som var med i studien. Det ble derfor tatt prøver av en bestemt prosentandel av besetningen for å lettere kunne sammenligne resultatene. En feilkilde kan være at vi ikke fikk tatt prøver av representativt utvalg av besetningen. Det ble bare tatt prøver av en del av besetningen. Det kan derfor være deler av besetningen som vi ikke tok prøve fra som var smittebærere. Det ideelle ville vært og tatt prøver av hele besetningen, men det var ikke gjennomførbart med tanke på materiale, økonomi og tid.

I denne oppgaven har vi kun inkludert resultater fra august og februar, dermed vil ikke resultatene fra vår studie kunne si noe nøyaktig om forekomsten av bakteriene avhengig av årstid.

Forurensning av prøver er en viktig feilkilde. Kuer lever i urene miljøer, og selv om prøvetakningen ble gjort så aseptisk som mulig er sannsynligheten til stede for at noen av prøvene har blitt kontaminert. Spesielt speneprøvene kunne lett bli kontaminert siden skitt fra juret lett kunne havne oppi prøven. For å prøve å unngå dette så godt som mulig ble juret tørket med papir før det ble vasket med bomull og sprit, og speneprøven ble også samlet i en mindre beholder ved andre prøveuttak. Noen av

bøndene hadde melket kuene før speneprøvene ble tatt, noe som gjør at jurene allerede var vasket og det var ikke så mye melk igjen. Dette kan ha påvirket jur svaberprøvene siden juret var vasket før prøvene ble tatt.

Siden de fleste prøvene som ble tatt var samleprøver kan man ikke si noe om bakteriene på individnivå. Så selv om en gård hadde f.eks. *Campylobacter*-positive jursvaberprøver og positive spenemelkprøver, kan man ikke si noe om dette var fra den samme kuen.

På et fåtall gårder ble det samlet inn for lite materiale av noen av prøvene, dette førte til det ikke ble noe resultat av den prøven. Mangel på noen av resultatene vil påvirke det helhetlige resultatet.

I hver besetning ble det satt hygienescore på ca. 30% av melkekuene, dette ble hovedsakelig gjort av to forskjellige personer. Ulike personer kan ha ulik oppfatning av hvor rene/skittene kuene var. Dette kan påvirke resultatet om det finnes flere bakterier i uhygieniske besetninger.

Melkefilteret ble som regel tatt ut når vi var på gården, dette ble gjort på en så aseptisk måte som mulig. I enkelte tilfeller hadde bonden tatt ut filteret på forhånd og lagt det i en vanlig pose, noe som vil kunne føre til kontaminering av filteret. De ulike gårdene hadde forskjellige typer melkefiltre som kan ha påvirket resultatet. Rett etter prøvetakingen ble melkefilteret klippet opp og lagt i forskjellige buljonger, men i de tilfellene der vi manglet utstyr (hansker eller autoklaverte sakser) ble det ikke gjort før

ved ankomst til laboratoriet. Dette kan ha påvirket vekst av bakteriene og dermed påvirket resultatene.

De fleste bøndene hadde melketanker med en kran for å ta ut melken, men på noen gårder måtte man ta ut melkeprøvene med en steril øse og det kan ha skjedd en grad av kontaminering under denne prosessen.

Konklusjon

Etterspørselen etter rå melk i dagens samfunn øker. Vi har i denne oppgaven sett på forekomst av *L. monocytogenes* og *Campylobacter* i rå melk og mulige smitteveier. Til tross for dagens gode hygienerutiner er det fortsatt funn av *L. monocytogenes* og *Campylobacter* i rå melk, dette betyr at det fortsatt vil være nødvendig å pasteurisere melken for å unngå sykdom hos konsumenten.

I starten av denne oppgaven satt vi oss mål og delmål som vi skulle besvare i løpet av oppgaven. Hovedmålet var å se på forekomsten av *L. monocytogenes* og *Campylobacter* og mulige smitteveier. I Delmål 1 skulle vi undersøke om bakterier i tankmelk eller melkefiltre hadde en sammenheng med bakterier i miljøprøvene eller jursvabrene. Våre tester fant at hvis det var funn av bakterier i tankmelk, så fantes den samme bakterien i det tilhørende melkefilteret. Dette ble også påvist i litteraturstudie B.

Av de tankmelkprøvene og melkefiltrene som testet positivt for en eller begge bakterier, var halvparten av de tilhørende miljøprøvene positive for samme bakterie. Vi kan derfor si at det er en sammenheng mellom positive tankmelkprøver og positive miljøprøver siden ut ifra vår data kan vi si at 50% er sannsynligvis smittet fra enten avføring eller grovfôr, eller begge deler. Siste halvdel kunne ha fått smitten fra kilder som vi ikke testet. I studie A (Castro et al., 2018) fant de ut av at *L. monocytogenes* smitten stort sett kom fra juroverflater og melkesystemet. I vår studie fant vi ikke noen sammenheng mellom jursvabre og positive tankmelkprøver. Vi så at hvis tankmelkprøven var positiv for *Campylobacter*, så var melkefilteret det også. Det kan

derfor være en sammenheng mellom smitte i tankmelk og bakterieforekomst i melkesystemet.

I delmål 2 undersøkte vi om det var en sammenheng mellom høy hygienescore på individuelle gårder og mengde positive prøver på samme gård. Ingen av litteraturstudiene vi så på inkluderte hygienescore i sin studie, men i vår egen studie så vi ingen sammenheng. En gård kunne ha høy hygienescore, men ingen positive prøver, og motsatt. Vår studie er ikke så omfattende, og det kan derfor hende at det er en sammenheng på en større skala. Vi så likevel en sammenheng mellom mengde positive resultater og hygienescore mellom de to besøkene, da begge resultatene økte ved andre besøk.

Vårt siste delmål handlet om fjøstyper og besetninger og om det er en sammenheng mellom fjøstype og mengde positive prøver. I litteraturstudiene var ikke fjøstyper noe som ble undersøkt nøyaktig, så vi konkluderer derfor kun fra egne data. I våre data ser vi en tydelig sammenheng mellom type fjøs og forekomst av bakterier. Av resultater som kom fra prøver fra løsdriftsbesetninger var det 18,7% som var positive for en bakterie. Derimot var det bare 8,6% av resultater fra konvensjonelle besetninger som var positive for en bakterie. Disse tallene kan også si noe om sammenheng mellom størrelse av en besetning og mengde positive resultater, da løsdriftsbesetninger vanligvis har mange kuer, mens tradisjonelle besetninger har mindre antall dyr. Om det er størrelsen av besetningen eller typen fjøs som forårsaker smitte i løsdriftsfjøs er vanskelig å si noe om, dette er noe som må undersøkes grundigere før det kan fastslås. Det kan heller ikke utelukkes at det er røkterfaktorer som spiller inn. Løsdriftsfjøs er ofte av nyere dato og det er investert mer i bygningene. Dette vil kunne

påvirke graden av motivasjon til å holde god hygiene og stell av dyra samt generell kvalitet på arbeidet som utføres i besetningen. Om gårdbrukeren har jobb utenom fjøset vil også kunne påvirke i hvilken grad han eller hun følger opp dyra i løpet av dagen og holder god hygiene i dyrerom og melkerom. Disse faktorene ble ikke undersøkt i denne studien.

Videre så vi en forskjell i hygienescore på de to besøkene. Hygienescoren var stort sett høyere på andre besøk, dvs. i innesesongen. Vi fikk også litt flere positive resultater fra andre besøk enn fra første besøk, dette kan derfor være sesongrelatert. Selv om vi fant en samlet økning i både hygienescore og mengde positive bakterieprøver på andre besøk, har vi ikke grunnlag til å konkludere for hver enkelt gård.

Takk til bidragsyttere

Vi vil først og fremst takke vår veileder, Erik Georg Granquist, for hans veiledning i vår oppgave og konstruktive kommentarer. Vi vil også spesielt takke Lene Ildland som delte sine prøvesvar med oss og var med oss på å hente prøver. Vi vil også takke bøndene som har vært med i studien for at de lot oss ta prøver. Sist vil vi takke våre familier og venner for deres støtte og oppmuntring og deres tro på at vi skulle komme i mål til slutt.

Summary

Title: Occurrence of *Campylobacter* and *L. monocytogenes* in raw milk from dairy cows

Authors: Elinborg Steinunn Palsdottir, Henriette Sofie Ross Pedersen

Instructor: Georg Erik Granquist, Department of Production Animal Medicine

This thesis is a mixture of a descriptive study and a literature study, where the aim was to look at the occurrence and pathways of contamination of *L. monocytogenes* and *Campylobacter* in raw milk from cattle. We conducted two sample extractions with a four-month interval where we collected tank milk samples, milk filter socks, udder milk samples, udder swabs, roughage feed samples and faecal samples from 18 different farms in the Østlandet region in Norway. These samples were analysed for *L. monocytogenes* and *Campylobacter*. We used four other similar studies to compare and support or reject our conclusions. We found that if we found bacteria in the tank milk, the same bacteria would also be present in the milk filter sock. There is also a clear connection between bacterial occurrence in the environment samples and in the milk-filter socks. The contamination was most likely originated from udder surfaces or from the milking system. A seasonal variation in the prevalence of bacteria as well as a variation in hygiene scores can be described from our data, and is supported by the other studies included in this thesis, where more bacteria and higher hygiene scores have been observed in the winter months than during the summer. Farms with free stall housing had a higher bacterial occurrence in both sample collections, the possible reason being greater number of cattle and difficulties in keeping the stall housing clean. Our study is not very comprehensive and did not include PCR or quantitative analysis, so it is difficult to say anything about the validity of our results.

Referanser

- ARTURSSON, K., SCHELIN, J., LAMBERTZ, S., HANSSON, I. & ENGVALL, E. 2018. Foodborne pathogens in unpasteurized milk in Sweden. *International Journal of Food Microbiology*, 284, 120.
- BÆKKELUND, O. N. & NARVHUS, J. 2016. *Pseudomonas* isolert fra rå melk : vekst og proteolytisk aktivitet i UHT-melk ved ulike temperaturer. Norwegian University of Life Sciences, Ås.
- BANDELJ, P. & OCEPEK, M. 2018. Risk factors associated with fecal shedding of *Listeria monocytogenes* by dairy cows and calves. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 32, 1773-1779.
- BEWLEY, J. M., ROBERTSON, L. M. & ECKELKAMP, E. A. 2017. A 100-Year Review: Lactating dairy cattle housing management. *Journal of Dairy Science*, 100, 10418-10431.
- BIANCHINI, V., BORELLA, L., BENEDETTI, V., PARISI, A., MICCOLUPO, A., SANTORO, E., RECORDATI, C. & LUINI, M. 2014. Prevalence in Bulk Tank Milk and Epidemiology of *Campylobacter jejuni* in Dairy Herds in Northern Italy. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 1832.
- CAROLINA, M., GUSTAVO, V., VALERIA, B., VICTORIA, V., RUBEN, E. G. & RODOLFO, R. 2018. Detection of *Listeria* spp. in cattle and environment of pasture-based dairy farms. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 38, 1736-1741.
- CASTRO, H., JAAKKONEN, A., HAKKINEN, M., KORKEALA, H., LINDSTRÖM, M. & CASTRO, H. 2018. Occurrence, Persistence, and Contamination Routes of *Listeria monocytogenes* Genotypes on Three Finnish Dairy Cattle Farms: a Longitudinal Study. *Applied and environmental microbiology*, 84.
- CASTRO, H., RUUSUNEN, M. & LINDSTRÖM, M. 2017. Occurrence and growth of *Listeria monocytogenes* in packaged raw milk. *International Journal of Food Microbiology*, 261, 1.
- COETZER, J. A. W. & TUSTIN, R. C. 2004. *Infectious diseases of livestock : 3*, Cape Town, Oxford University Press Southern Africa.
- DEMING, J. A., BERGERON, R., LESLIE, K. E. & DEVRIES, T. J. 2013. Associations of housing, management, milking activity, and standing and lying behavior of dairy cows milked in automatic systems. *Journal of Dairy Science*, 96, 344-351.
- ELLIS, K. A., INNOCENT, G. T., MIHM, M., CRIPPS, P., MCLEAN, W. G., HOWARD, C. V. & GROVE-WHITE, D. 2007. Dairy cow cleanliness and milk quality on organic and conventional farms in the UK. *Dairy cow cleanliness and milk quality on organic and conventional farms in the UK*, 74, 302-310.
- FOLKEHELSEINSTITUTTET. 2010. *Campylobacteriose - veiledere for helsepersonell* [Online]. fhi.no. Available: <https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/campylobacteriose--veileder-for-he/> [Accessed 19/01 2020].
- FOLKEHELSEINSTITUTTET. 2019. *Tarminfeksjon med Campylobacter* [Online]. Helsenorge.no. Available: <https://helsenorge.no/sykdom/mage-og-tarm/campylobacter> [Accessed 17/01 2020].

- FONSECA, B. B., FERNANDEZ, H. & ROSSI, D. A. 2016. *Campylobacter* spp. and Related Organisms in Poultry : Pathogen-Host Interactions, Diagnosis and Epidemiology. 1st ed. 2016. ed. Cham: Springer International Publishing : Imprint: Springer.
- GÖLZ, G., KITTLER, S., MALAKAUSKAS, M. & ALTER, T. 2018. Survival of *Campylobacter* in the Food Chain and the Environment. *Current Clinical Microbiology Reports*, 5, 126-134.
- JAAKKONEN, A., CASTRO, H., HALLANVUO, S., RANTA, J., ROSSI, M., ISIDRO, J., LINDSTRÖM, M., HAKKINEN, M. & JAAKKONEN, A. 2019. Longitudinal Study of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and *Campylobacter jejuni* on Finnish Dairy Farms and in Raw Milk. *Applied and environmental microbiology*, 85.
- JENSSEN, E. & LANDRØ, A. 2019. Sammenligning av automatiske og konvensjonelle melkesystem. En analyse av datamaterialet i Driftsgranskningene i jordbruket 2013 - 2017. *NIBIO rapport*.
- LATORRE, A. A., VAN KESSEL, J. S., KARNS, J. S., ZURAKOWSKI, M. J., PRADHAN, A. K., BOOR, K. J., JAYARAO, B. M., HOUSER, B. A., DAUGHERTY, C. S. & SCHUKKEN, Y. H. 2010. Biofilm in milking equipment on a dairy farm as a potential source of bulk tank milk contamination with *Listeria monocytogenes*. *Journal of Dairy Science*, 93, 2792-2802.
- LOUWEN, R., HORST-KREFT, D., DE BOER, A. G., VAN DER GRAAF, L., DE KNEGT, G., HAMERSMA, M., HEIKEMA, A. P., TIMMS, A. R., JACOBS, B. C., WAGENAAR, J. A., ENDTZ, H. P., VAN DER OOST, J., WELLS, J. M., NIEUWENHUIS, E. E. S., VAN VLIET, A. H., WILLEMSSEN, P. T., VAN BAARLEN, P. & VAN BELKUM, A. 2013. A novel link between *Campylobacter jejuni* bacteriophage defence, virulence and Guillain-Barré syndrome. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 32, 207-9723.
- MATDEPARTEMENTET, L.-O. 2004. Forskrift om hold av storfe. In: MATDEPARTEMENTET, L.-O. (ed.). Lovdata.
- MATTILSYNET. 2012. *Listeria* [Online]. Mattilsynet. Available: https://www.mattilsynet.no/mat_og_vann/smitte_fra_mat_og_drikke/bakterier_i_mat_og_drikke/listeria/ [Accessed 19/01 2020].
- MEUERING, A., DE KONING, K. & VAN DER VORST, Y. 2002. *Automatic milking: Experience and development in europe* [Online]. Milkproduction.com: DeLaval. Available: <http://www.milkproduction.com/Library/Scientific-articles/Milk--milking/Automatic-milking/> [Accessed 16.04 2020].
- MOHAMMED, H. O., STIPETIC, K., MCDONOUGH, P. L., GONZALEZ, R. N., NYDAM, D. V. & ATWILL, E. R. 2009. Identification of potential on-farm sources of *Listeria monocytogenes* in herds of dairy cattle. *Identification of potential on-farm sources of Listeria monocytogenes in herds of dairy cattle*, 70, 383-388.
- NICHOLL, J. 2019. *Listeria spp. vs Listeria Monocytogenes* [Online]. Food Safety, Supply Chain: Safe Food Alliance. Available: <https://safefoodalliance.com/food-safety/listeria-spp-vs-listeria-monocytogenes/> [Accessed 13/02 2020].
- NMKL 2007. Thermotolerant *Campylobacter*. Detection, semi-quantitative and quantitative determination in foods and drinking water, 3. utg. *NMKL 119*.
- NMKL 2010. *Listeria monocytogenes*. Detection in foods and feeding stuffs and enumeration in foods, 5. utg. *NMKL 136*.
- OLTENACU, P. A., HULTGREN, J. & ALGERS, B. 1998. Associations between use of electric cow-trainers and clinical diseases, reproductive performance and culling in Swedish dairy cattle. *Preventive Veterinary Medicine*, 37, 77-90.

- OPPLYSNINGSKONTORET FOR MEIERIPRODUKTER. 2020. *Velferd* [Online]. melk.no. Available: <https://www.melk.no/Melkekilden/Melkekua/Velferd> [Accessed 18/01 2020].
- RAHN, W. M., GOLLUST, S. E. & TANG, X. 2017. Framing Food Policy: The Case of Raw Milk. *Policy Studies Journal*, 45, 359-383.
- RICCHI, M., SCALTRITI, E., CAMMI, G., GARBARINO, C., ARRIGONI, N., MORGANTI, M. & PONGOLINI, S. 2019. Short communication: Persistent contamination by *Listeria monocytogenes* of bovine raw milk investigated by whole-genome sequencing. *Journal of Dairy Science*, 102, 6032-6036.
- SAITO, S., YATSUYANAGI, J., HARATA, S., ITO, Y., SHINAGAWA, K., SUZUKI, N., AMANO, K.-I. & ENOMOTO, K. 2005. *Campylobacter jejuni* isolated from retail poultry meat, bovine feces and bile, and human diarrheal samples in Japan: Comparison of serotypes and genotypes. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 45, 311-319.
- SCHREINER, D. & RUEGG, P. 2003. Relationship between udder and leg hygiene scores and subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 86, 3460-3465.
- SERRAINO, A., FLORIO, D., GIACOMETTI, F., PIVA, S., MION, D. & ZANONI, R. G. 2013. Presence of *Campylobacter* and *Arcobacter* species in in-line milk filters of farms authorized to produce and sell raw milk and of a water buffalo dairy farm in Italy. *Journal of Dairy Science*, 96, 2801-2807.
- SIROIS, M. 2019. *Laboratory Manual for Laboratory Procedures for Veterinary Technicians*, St. Louis, Elsevier.
- SNELLING, W. J., MATSUDA, M., MOORE, J. E. & DOOLEY, J. S. G. 2005. *Campylobacter jejuni*. *Letters in Applied Microbiology*, 41, 297-302.
- SNL. 2009. *Melkemaskin* [Online]. Store Norske Leksikon: Store Norske Leksikon. Available: <https://snl.no/melkemaskin> [Accessed 17/04 2020].
- THORSEN, I. M. H., SIV, S. & DAVIDE, P. 2017. Kartlegging av mikrobiota i melk fra gårdstank til utgått holdbarhet i standardisert helmelk. Norwegian University of Life Sciences, Ås.
- VESTER, J., GLARING, M. & STOUGAARD, P. 2015. Improved cultivation and metagenomics as new tools for bioprospecting in cold environments. *Microbial Life Under Extreme Conditions*, 19, 17-29.
- VILAR, M. J., YUS, E., SANJUÁN, M. L., DIÉGUEZ, F. J. & RODRÍGUEZ-OTERO, J. L. 2007. Prevalence of and Risk Factors for *Listeria* Species on Dairy Farms. *Journal of Dairy Science*, 90, 5083-5088.
- WALKER, R. L., HIRSH, D. C. & MACLACHLAN, N. J. 2004. *Veterinary microbiology*, Ames, Iowa, Blackwell.
- WEILER, C., IFLAND, A., NAUMANN, A., KLETA, S. & NOLL, M. 2013. Incorporation of *Listeria monocytogenes* strains in raw milk biofilms. *International Journal of Food Microbiology*, 161, 61-68.
- ZUCALI, M., BAVA, L., TAMBURINI, A., BRASCA, M., VANONI, L. & SANDRUCCI, A. 2011. Effects of season, milking routine and cow cleanliness on bacterial and somatic cell counts of bulk tank milk. *Journal of Dairy Research*, 78, 436-441.



Norges miljø- og biovitenskapelig universitet
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway