TEKNOLOGISK INSTITUT

Rapport

Reduktion af *Campylobacter* i fersk kylling ved skalfrysning

Challengetest 1, 2, 3 og 4

Marie Tøstesen, Laurits Beck Nielsen og Anette Granly Koch

18. december 2018
Proj.nr. 2006248
Version 1
AGLK/MTOS/LABN/

Sammendrag

Formål

Formålet med projektet er at undersøge, om det er muligt ved skalfrysning at reducere antallet af *Campylobacter* på fersk kylling til et sådant niveau, at kyllingeslagterierne kan leve op til det proceshygiejnekriterie, som implementeres for *Campylobacter* spp. pr. 1. januar 2018. I disse kriterier er m og M 1.000 cfu/g, n=50. c reduceres i løbet af en årrække fra 50 til 10. Således er c=50 i 2019; i 2020 er c=15 og i 2025 er c=10. Tilfredsstillende resultater er, når antallet af prøver med over 1.000 cfu/g (m) er under c-værdien. Dvs. at der i 2025 skal være mindre end 10 prøver ud af 50, som er over 1.000 cfu/g.

Konklusion

Behandlingen med flydende nitrogen kan reducere antallet af Campylobacter på overfladen af slagtede kyllinger. Aerobt totalkim (naturlig baggrundsflora) påvirkes derimod ikke.

Resultaterne indikerer, at behandlingstiden i nitrogenbadet har betydning for effekten.

Behandling med flydende nitrogen i 45 sekunder i spraykabinen kan reducere antallet af campylobacter med op til 2 log cfu/g (kyllingerne er podet med 5,5-6 log campylobacter/g).

Der er tendens til, at blodårerne i vingerne fremstår mere røde og tydeligere i behandlede kyllinger end i kontrollerne – MEN enkelte kontrolkyllinger har også haft tydelige røde blodårer på vingerne.

Et lille labforsøg på kyllingelår (n=3) viste, at ved neddypning i flydende nitrogen i 15 sekunder kan der opnås en 0,7 log reduktion af campylobacter (vand gav 0,4 log reduktion). Behandlingstiden kan således ikke nedsættes til maks. 15 sekunder pr. kylling ved at anvende neddypning i stedet for spraybehandling.

Indledning

Baggrund

Campylobacter er i dag den væsentligste årsag til bakterielle tarminfektioner i Danmark, og fjerkræ (især kyllinger) menes at være den vigtigste smittekilde (Statens Seruminstitut, 2017).

Nationalt såvel som internationalt er der derfor stort fokus på at reducere forekomsten af *Campylobacter* i fjerkræprodukter, og især synes det vigtigt at fokusere på de økologiske flokke, da økologisk opdræt anses for at have en højere prævalens og eksponering. En af metoderne til at fjerne *Campylobacter* er at dekontaminere kyllingerne efter slagtning. Dette kan gøres på flere måder, men det er vigtigt, at det er en skånsom metode, som bevarer kvaliteten af kyllingerne, samt at behandlingen kan foretages hurtigt.

Formål

Formålet med projektet er at undersøge, om det er muligt ved skalfrysning at reducere antallet af *Campylobacter* på fersk kylling til et sådant niveau, at kyllingeslagterierne kan leve op til det proceshygiejnekriterie, som implementeres for *Campylobacter* spp. pr. 1. januar 2018. I disse kriterier er m og M 1.000 cfu/g, n=50. c reduceres i løbet af en årrække fra 50 til 10. Således er c=50 i 2019; i 2020 er c=15 og i 2025 er c=10. Tilfredsstillende resultater er, når antallet af prøver med over 1.000 cfu/g (m) er under c-værdien. Dvs. at der i 2025 skal være mindre end 10 prøver ud af 50, som er over 1.000 cfu/g.

Fremgangsmåde

Princip

I samarbejde med teknologileverandør (AGA) blev en cryofrysningskabine udviklet til test på DMRI og et kyllingeslagteri.

Anvendelse af skalfrysning til reduktion af *Campylobacter* på overfladen af kylling er en relativ ny metode, og der er kun ganske få studier af denne applikation i litteraturen. I et studie fra 2009, hvor naturligt kontamineret kyllingebryst blev skalfrosset i en CO_2-båndfryser til -1°C, sås et konsistent fald på 0,42 log cfu/prøve. Holdetid og vindhastighed blev ikke angivet (Boysen & Rosenquist, 2009).

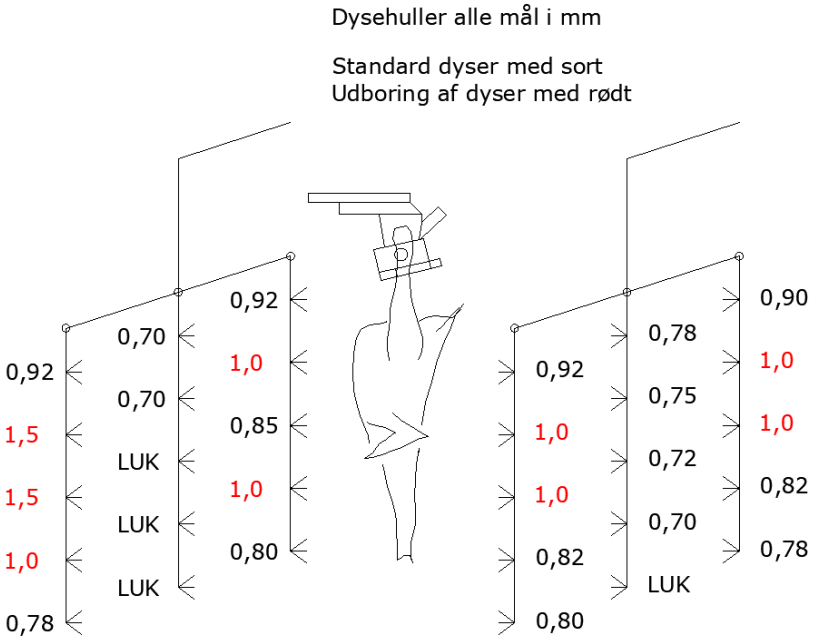
Indkøring af udstyr

Cryoanlæg

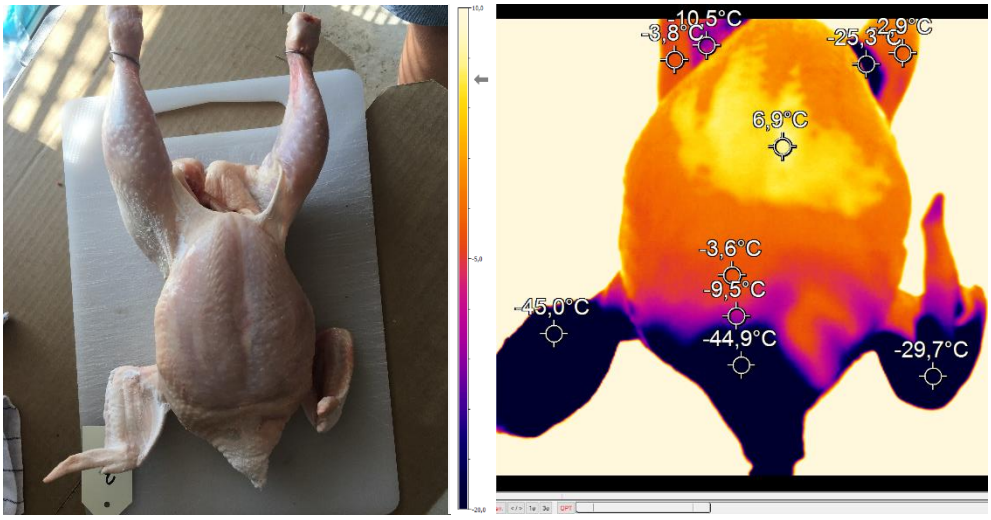
Et billede af anlægget opstillet hos DMRI er vist nedenfor. Der kan være en enkelt kylling i kabinen, hvor der kan tilføres flydende N_2.

Anlægget består af en plexiglaskabine med ophæng til kyllinger samt to rørforgreninger med hver 3 stk. ¼" rør og et antal indsprøjtningsdyser. De 2 forgreninger er koblet til hver deres LN2-tank. Tankene har et indhold på 230 L LN2 ved et konstant tryk på 1,5 bar(g), som kun varierer minimalt ved afgasning af mindre mængder fra beholderen. Trykket holdes nede på 1,5 bar(g) vha. en reguleringsventil, som konstant "siver" en smule, og tankene er udstyret med 2 sikkerhedsventiler, som åbner ved et tryk på 4 bar(g). Ved forsøg blev frysekabinen foret/isoleret med et lag bølgepap, da de store temperaturforskelle i plexiglaspladerne får dem til at sprænges ved længere tids drift.

Udstyrets dyse konfiguration kan ses på billederne nedenfor:



Effekten af 45 sekunders behandling ses grafisk afbilledet ved et termografisk fotografi nedenfor. Billedet er taget cirka 20 sekunder, efter behandlingen er tilendebragt.



Ved den efterfølgende optimering af udstyret blev 4 af de midterste dysehuller blændet af, hvilket tvang mere kvælstof ud af de andre huller og gav en mere jævn frysebehandling af kyllingen. Frysebehandlingen blev evalueret visuelt ved optimeringen, og der blev ikke efterfølgende taget flere fotos med termografisk kamera. Der er en væsentlige usikkerhed på de termografiske måleresultater, og disse skal derfor kun bruges til at evaluere den termiske fordeling.

Challengetest 1

Kyllinger

Til forsøget blev der indkøb 20 ferske kyllinger fra det lokale supermarked.

Der blev anvendt 1.200 g budgetkyllinger samt 1.800 g kæmpekyllinger. Kyllingerne blev opbevaret ved 10°C natten over samt yderligere opvarmet/tempereret ved at placere dem på bordet i laboratoriet ved 20°C i ca. 3 timer. Det blev gjort for at simulere slagtegang ved "frysebehandlingen" (rumtemperaturen var 18,2°C. Vandbad i rummet var 24,2°C). Kyllingernes overfladetemperatur blev ikke målt.

Fra hver kylling blev udtaget prøver af bryst, lår og hals efter behandling.

Hold A1: behandling i 45 sekunder (4 kyllinger)
Hold A2: behandling i 25 sekunder (4 kyllinger)
Hold B: kontrol, dækket af pose ved -1,9°C natten over (4 kyllinger)
Hold C: kontrol, uemballeret ved -1,9°C natten over (4 kyllinger)

Kulturer

Følgende kultur blev anvendt:

DMRICC	Species
4385 (PX)	*Campylobacter Jejuni*

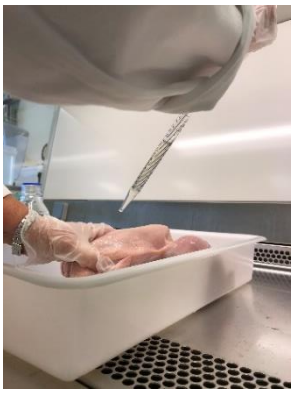
Stamme 4397 udgik pga. forurening.

Kulturerne blev vækket fra frost, og renheden blev kontrolleret. 1 koloni blev opformeret i 10 ml BHI (3 rør a 10 ml). Campylobacter blev opformeret i BHI-B ved 41,5°C, mikroaerofilt, 2 døgn (vækstoptimum er 37-42°C). Forventet kimtal 8 log cfu/ml.

Medier

Chromogen Brilliance CampyCount Agar (støbte plader indkøbt)
BHI-A
FKP (se substratdatablad nr. 06.01)
FK (til podning)

Podning



De tempererede kyllinger blev podet med ca. 10^5 cfu/cm^2.

En hel tempereret kylling blev placeret i en steril hvid bakke (44 x 26 cm). 20 ml podesuspension blev fordelt på hele kyllingens overflade. Der blev masseret og gnedet grundigt. Laboranten havde sterile handsker på.

Der blev fremstillet 300 ml podesuspension ved at overføre ca. 30 ml kultur til en steril flaske og fortynde til -1 med FK (ikke FKP).

Den anvendte kultur havde et kimtal på 8,1 log cfu/ml. Podesuspensionen havde et kimtal på 6,7 log cfu/ml.

Behandling i frysekabinet

Kyllingerne blev hængt med metaltråd/-bøjle i toppen af kabinettet. "Hængejernet" blev desinficeret i sprit mellem hver anvendelse.

For hver behandling blev 4 podede kyllinger anvendt. Prøveudtagningen blev varieret mellem venstre og højre side.

Behandling A1:	45 sekunders behandling
Behandling A2:	25 sekunders behandling
Behandling B:	køleskab ved -1,9°C MED pose over for at bevare høj fugtighed (kæmpekyllinger 1.800 g)
Behandling C:	køleskab ved -1,9°C UDEN pose (kæmpekyllinger 1.800 g)

Luftfugtighed og temperatur blev logget med Testo logger 174H (AGLK). 1 logger i pose (behandling 3) og 1 logger i inkubator (behandling 4).

Prøveudtagning

Fra hver kylling blev der udtaget: 2 brystskindprøver, 2 over- og underlårsskindprøver samt halsprøve. Der blev anvendt skindprøver og ikke svaberprøver for at detektere evt. "skjulte" campylobacter i hårsække, revner m.v.

Skindprøverne blev skåret/klippet af med en steril saks/skalpel (se bilag 1).

Kontrol af podeniveau blev bestemt løbende under forsøgets afvikling, ved at første og sidste/næstsidste kylling blev analyseret før behandling. Lår- og brystprøve fra den ene side af en kylling blev anvendt.

Prøveforberedelse

Skindprøver af bryst og lår vejede 10-12 g, og halsprøver vejede ca. 12-15 g. Alle prøver blev fortyndet 1:9 i FKP (-1 fort).

Der blev spredt i fortyndinger -2, -3 og -4 på Chromogen-agar (overflade, 41,5°C, mikroaerofilt) og BHI-A (overflade, 41,5°C, mikroaerofilt) samt BHI-A dybde (fortynding -3, -4, -5 til aerobt total kim ved 20°C/5 dage). Det giver en detektionsgrænse for campylobacter på 100-100.000 cfu/g på Chromogen-agar og BHI-agar (overflade).

På BHI-A (dybde) blev spredt i -3, -4, -5 fortynding (1 ml i dybden, detektionsgrænse 10^3-10^7 cfu/g, totalkim).

Inkubation

BHI-agar (dybde). Total kim 20°C/5 dage (aerobt).

Chromogen og BHI-A (overflade) pladerne blev inkuberet i 44 timer ± 4 timer ved 41,5°C i mikroaerofil atmosfære (6% CO_2, 6% O_2 og 88% N_2).

Aflæsning af plader

For Chromogen-mediet (Brilliance CampyCount Agar) gælder, at Campylobacter danner mørkerøde kolonier på en klar baggrund. Der tælles fortrinsvis plader med mellem 15 og 150 kolonier.

Data

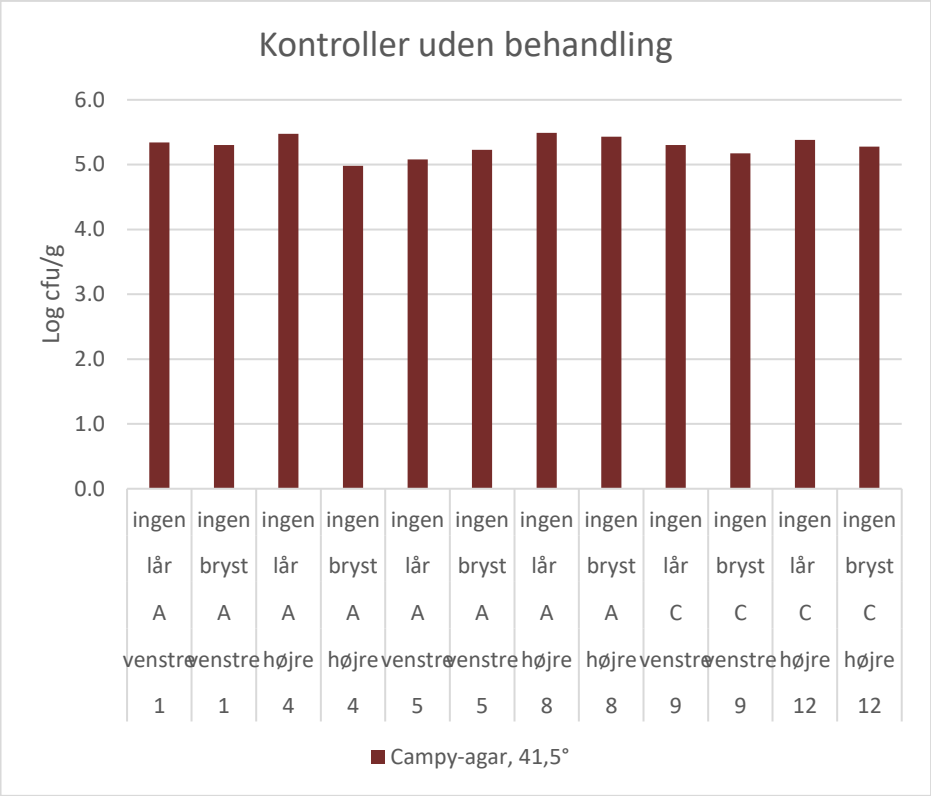
Mikrobiologiske data er samlet i Excelark.
Challengetest 1:
file:///\\localdom.net\TI%20Folders%20D05\Projects\P2006248_FAF%2027%20Reduktion%20af%20Campylobacter%20i%20fersk%20kylling%20ved%20skalfr\Data\Test%20forsøg%20Delforsøg%202.xlsx

Resultater challengetest 1

Podeniveau

Podningen af kyllingernes overflade var meget ensartet med en middelværdi på bryst på 5,2 ± 0,1 log cfu/g og på lår 5,3 ± 0,1 log cfu/g.

Data er vist i figur 1.



Figur 1. Podeniveau på 6 forskellige kyllingers lår og bryst. Kylling 1, 4, 5, 8, 9 og 12.

Gennemsnit for behandlinger og kontroller er samlet i tabel 1. Heraf ses, at den bedste drabseffekt opnås med 45 sekunders behandling af de første 3 kyllinger. Ved behandling af kylling nr. 3 knækkede plexiglaspladen på kabinens højre side. Effekten på kylling 4 var begrænset, ligesom behandlingen i 25 sekunder var begrænset.

Det kan ikke konkluderes, om den begrænsede effekt ved 25 sekunders behandling skyldes den knækkede plade eller den kortere behandlingstid.

Køling i køleskab (hold B og C) ved -1,9°C (jf. TI-overvågningssystem) gav under ½ log reduktion af campylobacter, uanset om kyllingerne tørrede kraftig ud (hold C uden pose), eller blev beskyttet mod udtørring med en pose (hold B). Temperatur og fugtighed er vist i figur 5. I perioden 5 timer til 21 timer (målt med Testo-logger 174H) var den gennemsnitlige temperatur og luftfugtighed:

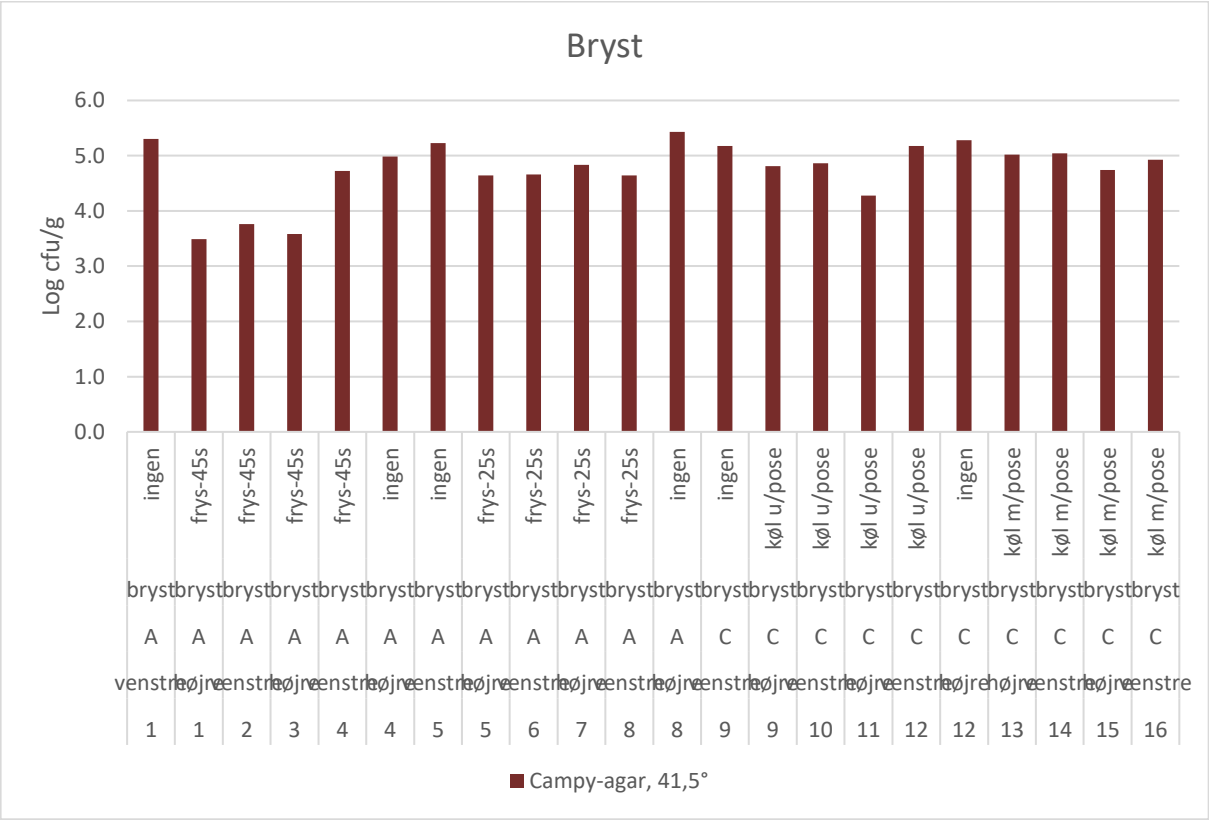
- Uden pose (hold C): -1,2°C og 79,3% RH
- Med pose (hold B): -0,9°C og 92,2% RH

Kyllinger opbevaret natten over i køleskab ved under -1°C uden pose var meget hårde på overfladen.

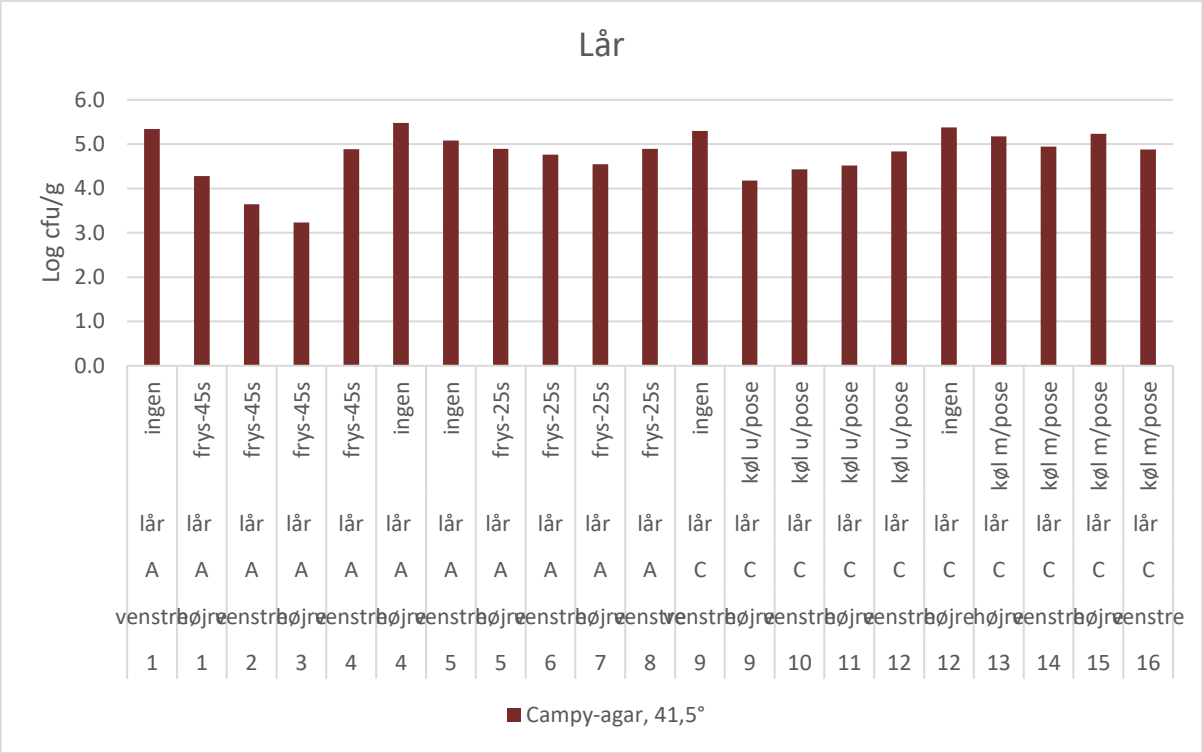
Tabel 1. Gennemsnit og spredning på kontrol (n=6) og behandlede kyllinger (n=4). Kimtal på Campy-agar.

MIDDEL	Ingen beh.	45 sek.	25 sek.	Køl u/pose	Køl m/pose
BRYST	5,2 ± 0,1	3,9 ± 0,6	4,7 ± 0,1	4,8 ± 0,4	4,9 ± 0,1
LÅR	5,3 ± 0,1	4,0 ± 0,7	4,8 ± 0,2	4,5 ± 0,3	5,1 ± 0,2
HALS	-	3,8 ± 0,7	4,6 ± 0,3	5,4 ± 0,2	5,3 ± 0,2
Reduk-tion	**Bryst**	**1,3**	**0,5**	**0,5**	**0,3**
	Lår	**1,3**	**0,6**	**0,9**	**0,3**

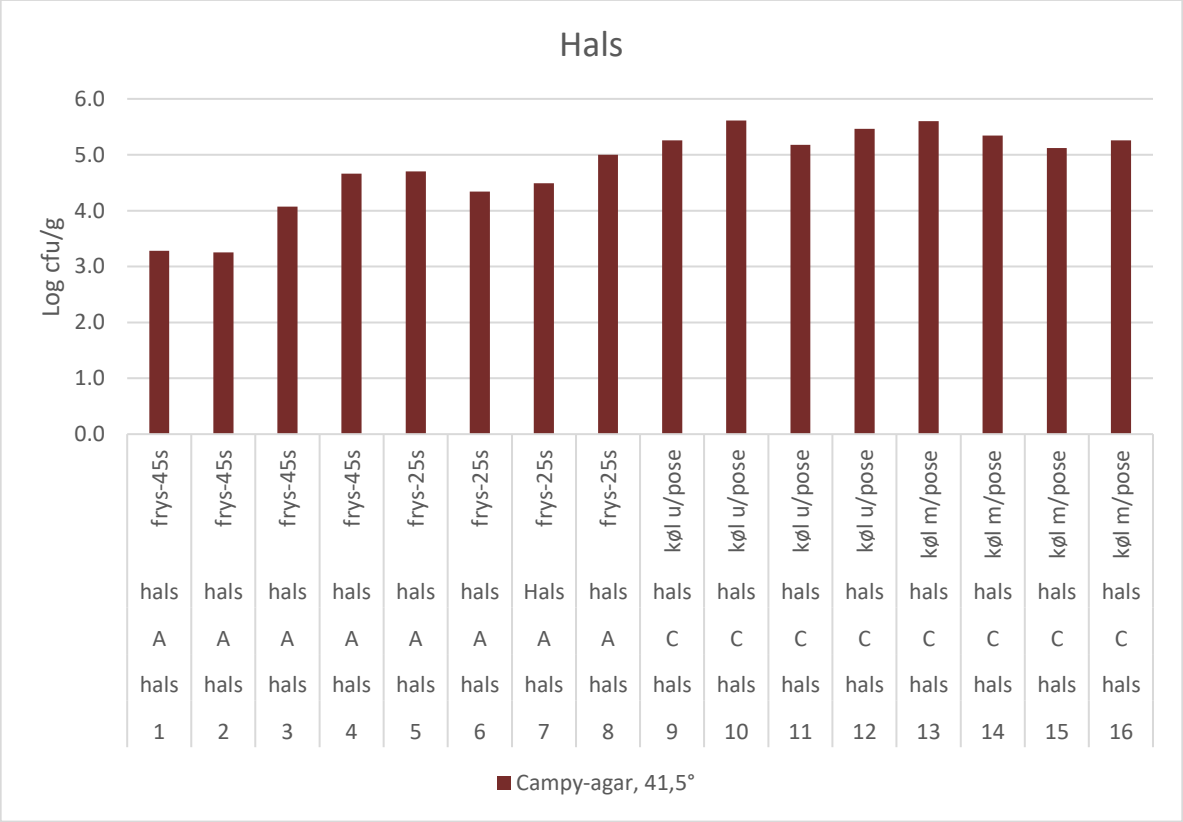
Data er også vist i figur 2 (bryst), figur 3 (lår) og figur 4 (hals). Kabinettets højre side (mod kyllingens ryg) knækkede under behandling af kylling 3.



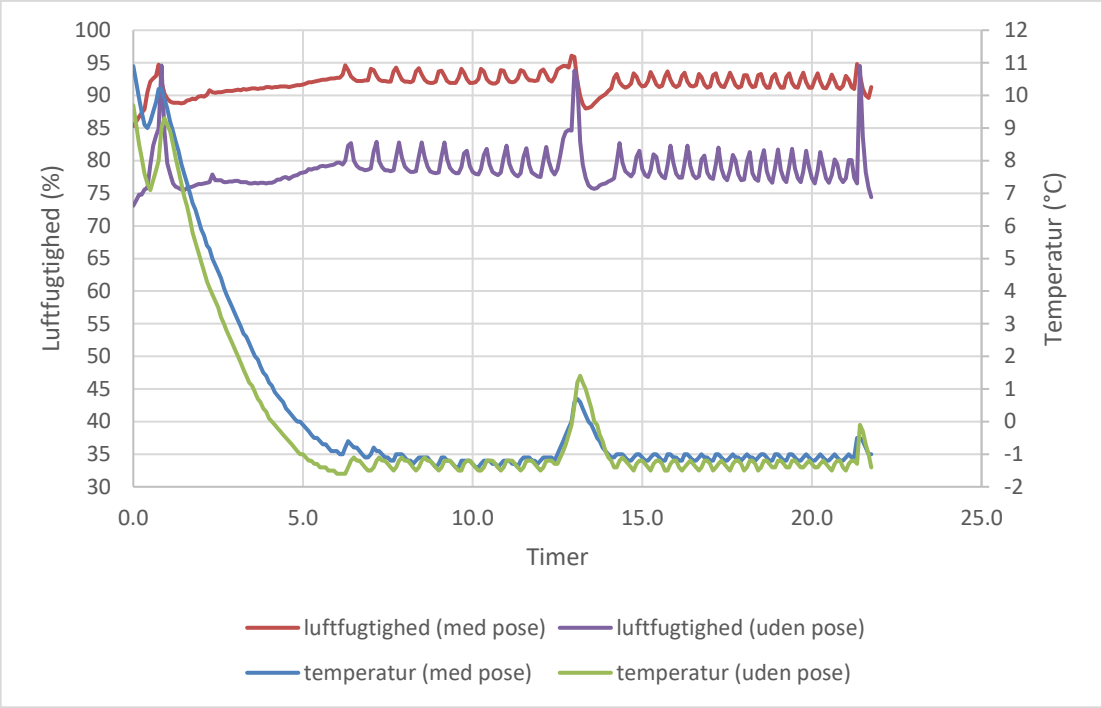
Figur 2. Inaktivering af Campylobacter i nitrogen-kabine (brystprøver). 1-16 angiver kylling.



Figur 3. Inaktivering af Campylobacter i nitrogen-kabine (lårprøver). 1-16 angiver kylling.



Figur 4. Inaktivering af Campylobacter i nitrogen-kabine (halsprøver. Ingen kontrolanalyser af podeniveau på hals). 1-16 angiver kylling.

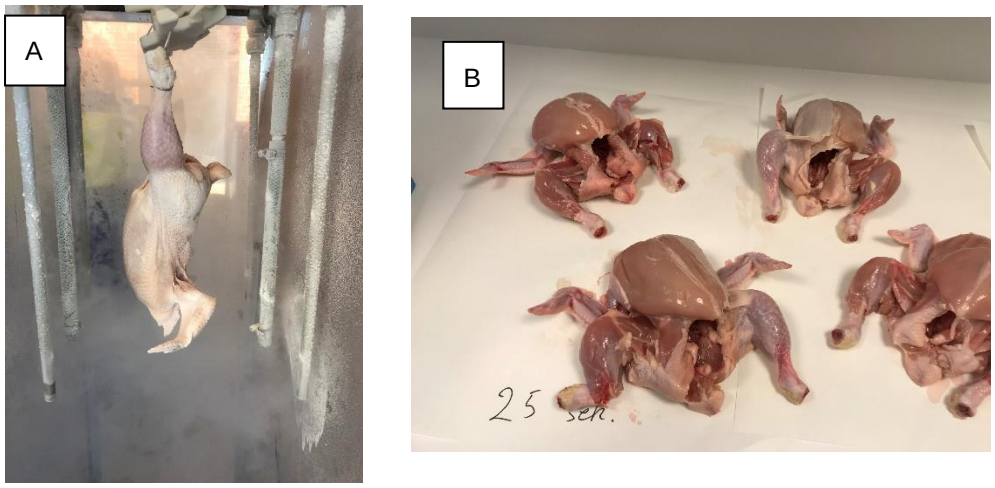


Figur 5. Temperatur og luftfugtighed for kontrolhold opbevaret i køleskab ved -1,9°C.

Udseende af behandlede kyllinger ses i figur 6-9. Heraf ses, at kort tid efter åbning af kabinen ser der ud til at være forskelle på, hvor meget rim der er dannet på kyllingens overflade. Efter udtag af prøver til mikrobiologisk analyse er der ingen tydelige forskelle på kyllingerne. Kyllinger opbevaret i køleskab natten over uden pose var meget hårde og tørre. Kyllinger opbevaret i køleskab natten over med pose havde ingen tydelige forandringer.

Figur 6. Ubehandlet kylling i nitrogen-kabinen (A) hhv. i køleskab (B).

Figur 7. Kyllinger behandlet i 45 sekunder i flydende nitrogen. A) Efter afdampning af kabinen ses, at skalfrysningen af skindet varierer. Dette fortager sig dog meget hurtigt. B) efter prøveudtagning i lab.



Figur 8. Kyllinger behandlet i 25 sekunder i flydende nitrogen. A) Efter afdampning af kabinen ses, at skalfrysningen af skindet varierer. Dette fortager sig dog meget hurtigt. B) efter prøveudtagning i lab.

Figur 9. Kyllinger behandlet uden pose natten over ved -1,9°C. Meget tør overflade. Meget hårde kyllinger.

Figur 10. Kyllinger behandlet med pose natten over ved -1,9°C. Ingen synlige forandringer.

Totalfloraen blev ikke reduceret ved behandlingerne, hvilket ses af tabel 2.

Tabel 2. Gennemsnit på kontrol (n=6) og behandlede kyllinger (n=4). Kimtal på BHI-agar (20°C, 5 dage).

MIDDEL	Ingen beh.	45 sek.	25 sek.	Køl u/pose	Køl m/pose
BRYST	6,8	6,6	7,0	6,5	6,7
LÅR	6,8	6,7	7,0	6,4	6,6
HALS	-	7,2	7,3	7,0	7,1
Reduktion	**Bryst**	**0,2**	**-0,2**	**0,3**	**0,1**
	Lår	**0,1**	**-0,3**	**0,4**	**0,1**

Konklusion challengetest 1
Nitrogenkabinen skal optimeres med flere dyser på rørene for at sikre mere ensartet behandling af kyllingernes overflade, samt for at hindre punktfrysning af plexiglaspladen.

Ny plexiglasplade skal isættes.

Ved challengetest 2 testes behandlingstiderne 45 sek., 35 sek. og 25 sek.

Challengetest 2

Kulturer

Følgende kulturer blev anvendt:

DMRICC	Species
4385 (PX)	*Campylobacter Jejuni*
4397 (PX)	*Campylobacter Jejuni*

Kulturerne blev vækket fra frost, og renheden blev kontrolleret. 1 koloni blev opformeret i 10 ml BHI (3 rør a 10 ml). Campylobacter blev opformeret i BHI-B ved 41,5°C, mikroaerofilt, 2 døgn (vækstoptimum er 37-42°C). Forventet kimtal 8 log cfu/ml.

Kyllinger

Kølede ferske kyllinger (Vores kylling 1.400 g) blev anvendt til forsøget. Temperering, podning og prøveudtagning blev foretaget som beskrevet i challengetest 1.

På grund af tekniske problemer med gassen henstod de podede kyllinger i 3,5 time ved stuetemperatur, før behandlingerne blev påbegyndt.

Podningen af kyllingernes overflade er meget ensartet med en middelværdi på bryst på 4,9 ± 0,4 log cfu/g, på lår 5,2 ± 0,2 log cfu/g og på hals 5,5 ± 0,2 log cfu/g.

Behandlinger

Følgende behandlinger indgik i forsøget:

Ubehandlede kontrolprøver til fastlæggelse af podeniveau
Behandling i 45 sekunder
Behandling i 35 sekunder
Behandling i 25 sekunder

Trykket på gas fra beholder var lavere denne gang pga. ny levering, som ikke var kommet op i temperatur.

Start 1,2 og 1,4 bar (sidste gang 1,5 bar)
Slut 0,8 og 1,0 bar (sidste gang 1,5 bar)

Trykket faldt gennem forsøgsgangen i modsætning til sidste gang, hvilket må skyldes, at væskemængden i tankene ikke nåede helt op til stuetemperatur efter påfyldning, så ekspansionens nedkølingseffekt havde en større indflydelse, som forårsagede mætningstilstand ved et lavere tryk i beholderen.

Der blev kompenseret for det lavere tryk ved at have en længere indkøring ved hver kørsel (før kyllingerne blev anbragt i kabinen). Indkøringstiden blev valgt ud fra, at man kunne høre, at der blev sprøjtet flydende kvælstof.

Kyllingerne blev hvide af is/frost som sidst – så effekten var synlig. Men denne afvigelse i trykket kan evt. have haft indflydelse på spredningen af "kulde" på kyllingerne, da tilgangstrykket i dyserne påvirker spredningsmønsteret.

Dagen før forsøget blev udstyret testet for ensartet behandling af overfladerne. Efter adskillige behandlinger blev kyllingerne fotograferet (figur 11). Kyllingerne ser ikke ud til at have ændret udseende.

De to kyllinger blev lagt i plastpose og lagt på køl (4°C) til næste dag. Vurdering af kyllingerne viste, at blodårer på undersiden af vingen fremstod meget røde (figur 12). Der var ingen væskeudtræk i posen.

Figur 11. Udseende efter adskillige behandlinger af de samme kyllinger (dagen før podeforsøg). De anvendte ferske, kølede kyllinger var af mærket "Vores kylling" 1.400 g. Tempereret til stuetemperatur før test.

Figur 12. Udseende efter adskillige behandlinger af de samme kyllinger (dagen før podeforsøg). De anvendte ferske kølede kyllinger af mærket "Vores kylling" 1.400 g. Tempereret til stuetemperatur før test. Opbevaring natten over ved 4°C (aerobt i plastpose) efter behandling.

Data

Mikrobiologiske data er samlet i Excelark.
Challengetest 2:
Y:\Projects\P2006248_FAF 27 Reduktion af Campylobacter i fersk kylling ved skalfr\Data\challengetest 2\challengetest 2 august 2018.xlsx

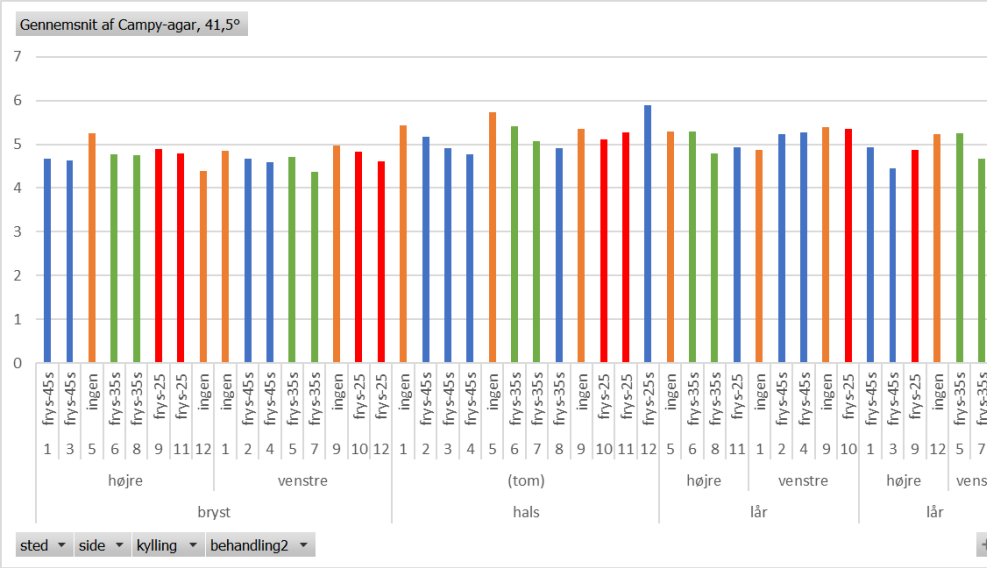
Resultater challengetest 2

Data er vist i tabel 3 og 4 samt i figur 13. Heraf ses, at behandlingen ved dette forsøg ikke reducerede antallet af campylobacter på overfladen af kyllingerne.

Årsagen er ukendt, men det vurderes, at det skyldes det manglende tryk i beholderen og dermed for lille tilførsel af flydende nitrogen på kyllingernes overflade.

Tabel 3. Gennemsnit og spredning på kontrol (n=4) og behandlede kyllinger (n=4) ved challengetest 2. Kimtal på Campy-agar.

MIDDEL	Ingen beh.	45 sek.	35 sek.	25 sek.
BRYST	5,2	5,0	5,0	5,1
LÅR	4,9	4,6	4,6	4,8
HALS	5,5	5,0	5,1	5,4
Reduktion	**BRYST**	0,2	0,2	0,1
	LÅR	0,2	0,2	0,1
	HALS	0,6	0,4	0,1



Figur 13. Inaktivering af Campylobacter i nitrogenkabine (brystprøver). 1-12 angiver kylling. Højre/venstre angiver, fra hvilken side af kyllingen prøven er taget.

Totalfloraen blev ikke reduceret ved behandlingerne, hvilket ses af tabel 4. Der er en tendens til, at antallet på halsprøverne stiger. Det kan være tilfældig variation, men måske kan det skyldes henstand i spande (3,5 timer), mens trykket skulle stige i nitrogentanken. Under henstand kan podesuspensionen måske være "sevet" ned på halsdelen.

Tabel 4. Gennemsnit på kontrol (n=6) og behandlede kyllinger (n=4). Kimtal på BHI-agar (20°C, 5 dage).

BHI	**Middel**	**Ingen**	**45 sek.**	**35 sek.**	**25 sek.**
n=4	**Lår**	6,1	6,0	6,1	6,2
n=4	**Bryst**	5,5	5,8	5,8	5,9
n=3	**Hals**	6,0	6,3	6,3	6,6
	Reduktion				
	Lår		**0,1**	**0,0**	**-0,1**
	Bryst		**-0,2**	**-0,3**	**-0,4**
	Hals		**-0,3**	**-0,3**	**-0,5**

Konklusion challengetest 2

Den anvendte dekontaminering med flydende nitrogen havde ingen effekt på antallet af campylobacter på bryst, lår eller hals.

Der gennemføres et nyt forsøg, hvor kyllinger behandles i 45 sekunder.

Challengetest 3

Podeniveau

Ved forsøget blev der udtaget 2 prøver bryst, 2 prøver lår og 2 prøver hals til fastlæggelse af podeniveau.

Det målte podeniveau på de tre prøvesteder var 5,6-6,1 log cfu/g (tabel 5). Dette er på samme niveau som ved de tidligere challengetest.

Indstilling udstyr

Tryk på forsyning: 1,5 bar
Dyser: optimeret som i challengetest 2
Behandlingstid: 45 sekunder fra nitrogen kunne høres

Data

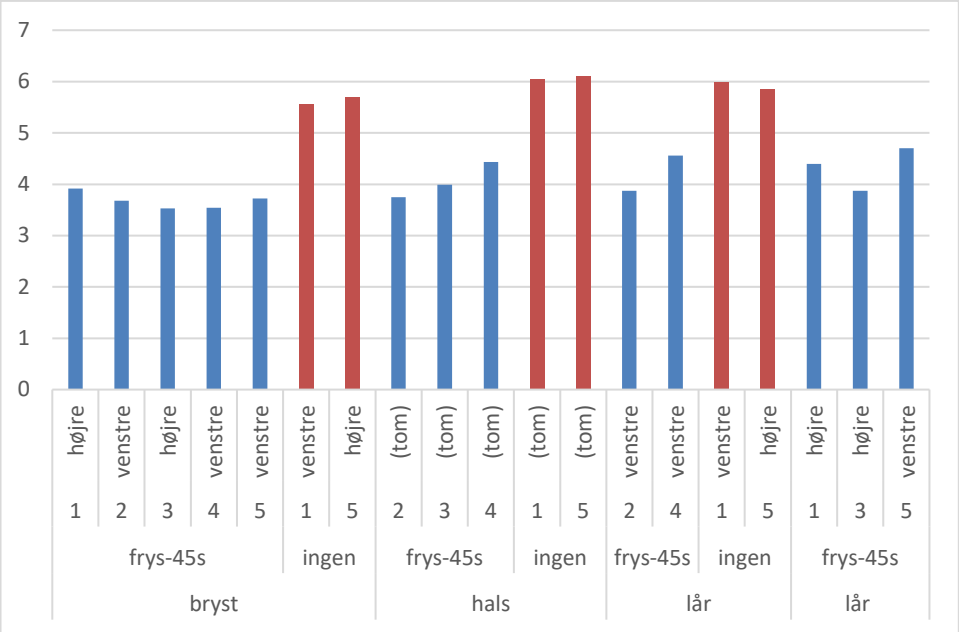
Mikrobiologiske data er samlet i Excelark.
Challengetest 3:
Y:\Projects\P2006248_FAF 27 Reduktion af Campylobacter i fersk kylling ved skalfr\Data\Challengetest 3\challengetest 3 september 2018.xlsx

Resultater challengetest 3

Gennemsnit for behandlede og kontroller er samlet i tabel 5.

Tabel 5. Gennemsnit og spredning på kontrol og behandlede kyllinger ved challengetest 3. Kimtal på Campy-agar.

Middel	**Ingen (n=2)**	**45 sek. (n=3-5)**
Lår	5,9±0,1	4,3±0,4 (n=5)
Bryst	5,6±0,1	3,7±0,2 (n=5)
Hals	6,1±0,0	4,1±0,3 (n=3)
Reduktion (log cfu/g)		
Lår		**1,6**
Bryst		**2,0**
Hals		**2,0**



Figur 14. Inaktivering af Campylobacter i nitrogenkabine (bryst-, lår- og hals-prøver). 1-5 angiver kylling. Højre/venstre angiver, fra hvilken side af kyllingen prøven er taget. De røde søjler viser kontrol uden behandling. De blå søjler viser de behandlede kyllinger.

Behandlingen havde, som i challengetest 1 og 2, ingen effekt på total-kim. Data er vist i tabel 6.

Tabel 6. Gennemsnit på kontrol og behandlede kyllinger. Total aerobt kimtal på BHI-agar (20°C, 5 dage).

Middel	**Ingen (n=2)**	**45 sek. (n=3-5)**
Lår	5,4	5,5 (n=5)
Bryst	5,5	5,3 (n=5)
Hals	5,9	5,6 (n=3)
Reduktion (log cfu/g)		
Lår		**-0,1**
Bryst		**0,2**
Hals		**0,3**

De visuelle bedømmelser viser, at kyllingerne får et hvidt udseende, hvilket viser, at de er kølet/skalfrosset.

Dagen efter er der, som i de tidligere forsøg, en tendens til, at blodårer i vingerne fremstår tydeligere på de nitrogenbehandlede kyllinger end på de ubehandlede kontrolprøver.

Der ses også røde "trykmærker" på ryggen, men det ses på både ube-handlede kontroller og på de nitrogenkølede.

Eksempler på udseende er vist i figur 15 og 16.

Figur 15. Ubehandlet kontrol, dagen efter forsøg.

Figur 16. Behandlet 45 sekunder, tryk 1,5 bar

Konklusion challengetest 3

Behandling med flydende nitrogen i 45 sekunder giver 1,6-2 log reduktion af Campylobacter på overfladen. Nitrogenbehandlingen har ingen effekt på totalkim.

Der er tendens til, at blodårerne i vingerne fremstår mere røde og tydeligere i de behandlede kyllinger end i de ubehandlede kyllinger.

En behandlingstid på 45 sekunder er for lang tid på en slagtelinje. Det er muligt, at tiden kan reduceres væsentlig, hvis dyserne, der anvendes, optimeres, så der kan fordeles en større mængde nitrogen på kyllingernes overflade. En anden mulighed er, at kyllingerne i stedet køres igennem et nitrogenbad.

I projektet er der ikke ressourcer til at bygge et nitrogenbad til afprøvning af hele kyllinger. Men et bad, hvor kyllingelår (underlår+overlår) kan afprøves i laboratorieskala. Et sådant forsøg vil kunne indikere, om det er mængden af nitrogen på overfladen, der har afgørende betydning, eller om behandlingstiden også har betydning.

Challengetest 4

Formål

Målet med dette delforsøg var at teste, om behandlingstiden kunne reduceres ved at neddyppe kyllingerne i flydende nitrogen. Ønsket var en behandlingstid på maks. 15 sekunder.

Podning

Opformeringer fremstilles som tidligere beskrevet. Kyllingelårene tempereres til ca. 20°C. Over- og underlår blev placeret i en steril hvid bakke (44 x 26 cm). 3 ml podesuspension (-1 fort.) blev fordelt på hele lårets overflade. Der blev masseret og gnedet grundigt. Laboranten havde sterile handsker på.

Efter behandling blev lårskindsprøve udtaget som for de hele kyllinger.

Fastlæggelse af tid til behandling

Ved et forforsøg blev tiden for neddypning fastlagt. Billederne viser, at op til 15 sekunders neddypning gav en acceptabel overfladefrysning (rim på overfladen).

Behandling

Kyllingelår (underlår) blev behandlet ved neddypning i flydende nitrogen. I beholderen kunne dyppes stykker på maks. 9 cm i diameter og 16 cm i højden.

Låret blev fastholdt med en grilltang, mens det blev dyppet under nitrogenoverfladen i hhv. 10 og 15 sekunder. Der blev ikke skifter nitrogen mellem behandlingerne.

Figur 17. Kyllingelår behandlet ved neddypning i flydende nitrogenbad i 10 sekunder. Foto er taget lidt efter optagning fra nitrogenbadet.

Figur 18. Kyllingelår behandlet ved neddypning i flydende nitrogenbad i 15 sekunder. Foto taget lidt efter optagning fra nitrogenbadet.

Ved visuel bedømmelse ses, at kyllingerne får et hvidt udseende efter behandlingen (figur 17 og 18).

Som kontrol blev medtaget tre ubehandlede lår og tre lår, som blev dyppet i vand (10 sekunder). Ved neddypning i vand blev der anvendt et stort bægerglas med 4°C koldt vand. Der blev anvendt et nyt glas for hvert lår for at undgå krydskontaminering.

For hver behandlingstid ved neddypning i flydende nitrogen blev der analyseret 3 prøver. Til sidst blev en svaberklud dyppet i væsken for at måle eventuelle campylobacter i nitrogenbadet.

Det resterende nitrogen afdampede, hvorefter beholderens inderside blev svabret for detektion af eventuelle overlevende campylobacter.

Data

Mikrobiologiske data er samlet i Excelark.
Challengetest 4:
Y:\Projects\P2006248_FAF 27 Reduktion af Campylobacter i fersk kylling ved skalfr\Data\Challenge test 4.xlsx

Resultater challengetest 4

Prøveoversigt

Gennemsnit for behandlinger og kontroller er samlet i tabel 7. Resultaterne fra behandlingstid er opgivet ved neddypning i flydende nitrogen i hhv. 10 og 15 sekunder. Det ses, at den bedste effekt opnås med 15 sekunders behandling af 3 kyllingelår.

Tabel 7. Gennemsnit og spredning på kontrol og behandlede kyllingelår ved challengetest 4. Kimtal på Campy-agar og BHI-agar.

Prøve (alle er podet)	Kimtal Campy	Totalkim (BHI)
Ubehandlet (n=3)	6,1 ± 0,16	5,1 ± 0,1
Dyppet i sterilt vand – 10 sek. (n=3)	5,7 ± 0,08	5,2 ± 0,2
Dyppet i Nitrogen – 10 sek. (n=3)	5,6 ± 0,13	5,1 ± 0,08
Dyppet i Nitrogen – 15 sek. (n=3)	5,3 ± 0,06	5,1 ± 0,11
Gazeklud, dyppet i nitrogen-bad (n=1)	ikke påvist	-
Svabring af beholder før rengøring	ikke påvist	-
Reduktion (log cfu/g)		
Dyppet i sterilt vand – 10 sek. (n=3)	0,4	-0,1
Dyppet i Nitrogen – 10 sek. (n=3)	0,5	0,0
Dyppet i Nitrogen – 15 sek. (n=3)	0,7	0,0

Konklusion challengetest 4 – neddypning

Behandlingen af kyllingelår ved neddypning i flydende nitrogen gav en reduktion af Campylobacter på overfladen. Ved dyp under nitrogenbad i 10 sekunder, blev der opnået ca. 0,5 log reduktion af kimtal på Campy-agar beregnet på gennemsnit. Ved neddypning i flydende nitrogen, under nitrogenoverfladen i 15 sekunder, blev der opnået ca. 0,7 log reduktion på Campy-agar beregnet på gennemsnit. Behandlingen havde, som i challengetest 1, 2 og 3, ingen effekt på totalkim målt på BHI. Kontrolbehandlingen, hvor kyllingelårene blev dyppet i 4°C sterilt vand, gav en 0,4 log reduktion af kimtal på Campy-agar beregnet på gennemsnit.

Resultaterne indikerer, at behandlingstiden i nitrogenbadet har betydning, ligeså har mængden af nitrogen på overfladen. Man kunne forstille sig, at en øget reduktion måske kan opnås ved at sætte behandlingstiden i badet op til 30 og 45 sekunder.

På svaberklud, som er dyppet i nitrogenbadet, er der ikke påvist campylobacter.

Konklusion

Behandlingen med flydende nitrogen giver reduktion af Campylobacter på overfladen af slagtede kyllinger. Resultaterne indikerer, at behandlingstiden i nitrogenbadet har betydning, ligeså har mængden af nitrogen på overfladen.

Behandling med flydende nitrogen i 45 sekunder i spraykabinen kan reducere antallet af campylobacter med op til 2 log cfu/g (kyllingerne var podet med 5,5-6 log campylobacter/g).

Der er tendens til, at blodårerne i vingerne fremstår mere røde og tydeligere i behandlede kyllinger end i kontrollerne – MEN enkelte kontrolkyllinger har også haft tydelige røde blodårer på vingerne.

Næste trin er at teste, om effekten også kan måles på naturligt kontaminerede kyllinger. Dette skal foregå på slagteri.

I et mindre laboratorieforsøg på kyllingelår (n=3) vistes en 0,46 log reduktion efter 10 sekunder og en 0,74 log reduktion efter 15 sekunder af kimtal på Campy-agar (gennemsnit af 3 prøver). Dette skal ses i relation til neddypning i vand som gav 0,4 log reduktion. Hvis neddypning skal anvendes, vil behandlingstiden sandsynligvis skulle øges tilsvarende den anvendt ved spraybehandlingen. I spraykabinen gav 25 sekunder under 1 logs reduktion, mens 45 sekunders behandling gav op til 2 logs reduktion.

Referencer

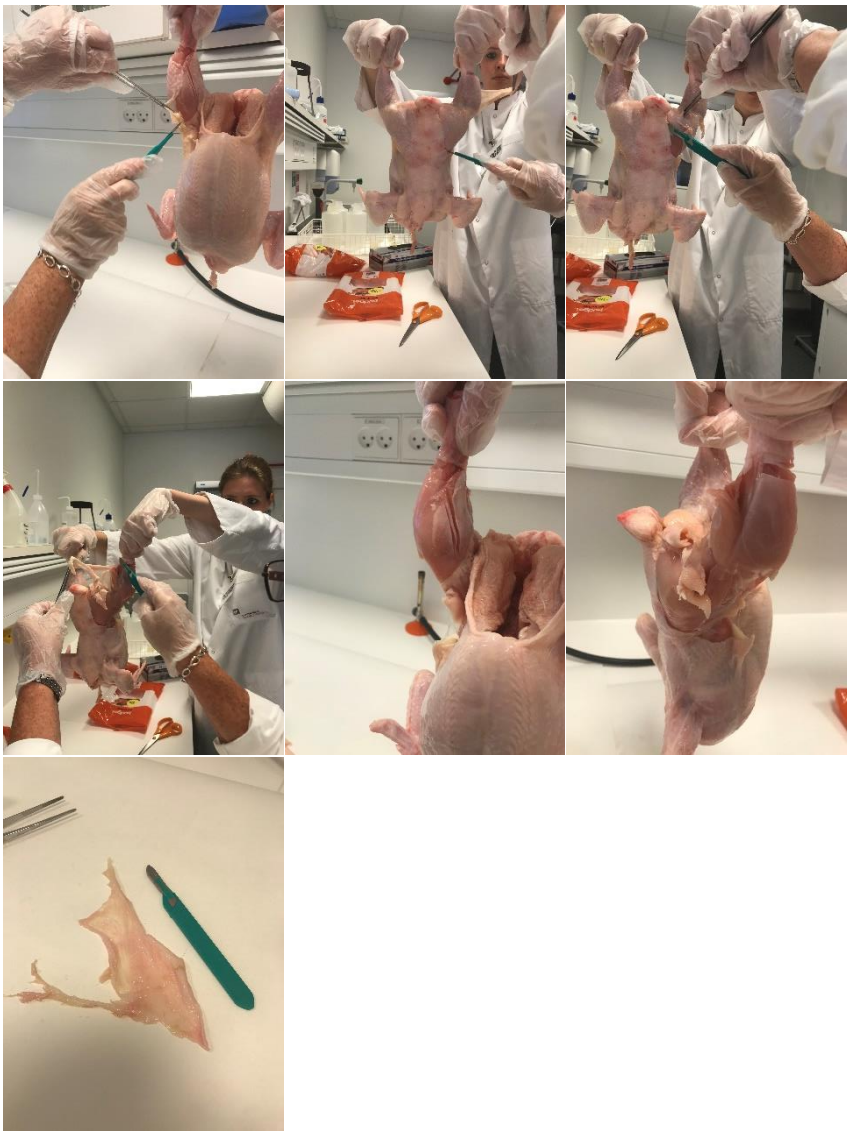
Boysen, L.; Rosenquist, H. (2009). Reduction of Thermotolerant Campylobacter Species on Broiler Carcasses following Physical Decontamination at Slaughter. Journal of Food Protection, 72(3): 497–502.

Statens Seruminstitut (2017). http://www.ssi.dk. Tilgået 15. juni 2017

Bilag 1

Prøveudtagning

Lår Med skalpel løsnes skindet rundt om over-/underlår. Skindet skæres/trækkes af i hinden. Gumpen og de bløde hudfolder inde i kyllingen medtages ikke. På en 1.200 g budgetkylling giver det skind svarende til 11,4 g.



Bryst Med skalpel løsnes skindet rundt om brystet. Skindet skæres/trækkes af i hinden. Halsskind medtages ikke. På en 1.200 g budget kylling giver det skind svarende til 13,7 g.

Lår bryst