



Rapport

Reduktion af *Campylobacter* i fersk kylling ved skalfrysning
Verifikation af inaktivering på friskslagtede naturligt kontaminerede
kyllinger

Marie Tøstesen og Anette Granly Koch

20. december 2018
Proj.nr. 2006248
MTOS/CCH/AGLK/MT

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 proceshygiejnekrav, som implementeres for *Campylobacter* spp. 1. januar 2018 og løbende skærpes i krav til forekomst.

Formålet med dette forsøg er at verificere inaktiveringen af *campylobacter* på naturligt kontaminerede friskslagtede kyllinger. Desuden testes holdbarheden af hele kyllinger under lagring ved 5°C (mikrobiologi samt lugt og udseende ved sidste holdbarhedsdag).

Konklusion

Inaktivering af campylobacter Med en p-værdi på 0,000242 er der statistisk påvist en signifikant effekt af nitrogenbehandlingen på 45 sekunder i forhold til kontrolprøverne for reduktionen af *campylobacter*. 10 ud af de 20 nitrogenbehandlede kyllinger opnåede en reduktion >1 log cfu/g, hvor den højeste reduktion var 2,1 log cfu/g. Derfor kan det konkluderes, at behandlingen med flydende nitrogen kan reducere antallet af *campylobacter* på overfladen af naturligt kontaminerede friskslagtede kyllinger.

Derimod er der ikke signifikant forskel i niveauet af totalmikroorganismer mellem nitrogenbehandlede (skalfrosne) kyllinger og ubehandlede kontrolkyllinger. Aerob totalmikroorganismer (naturlig baggrundsflora) påvirkes derfor ikke af behandlingen.

Der blev ikke observeret røde vinger efter skalfrysningen. Det blev derimod observeret i de test, som blev foretaget på kølede kyllinger indkøbt i de lokale supermarkeder og dernæst podet med *campylobacter* før skalfrysningen.

*Holdbar-
hed*

Baseret på et meget lille datagrundlag er der ingen indikation på, at skalfrysning reducerer holdbarheden af MA-pakkede kyllinger. Tværtimod kan der måske være en lille holdbarhedsforlængende effekt. Det kræver dog et væsentligt større datamateriale, før man endeligt kan konkludere effekten. Der skal testes kyllinger på flere dage og fra forskellige slagterier for at få en større variation i den baggrundsflora, der testes og analyseres på.

Efter 10 dages lagring i MAP ved 5°C er det gennemsnitlige aerobe totale kimtal 0,8 log cfu/g lavere i de skalfrosne kyllinger. Statistisk er forskellen bekræftet signifikant (Student t-test, $p=0,000046$).

De sensoriske analyser viser, at lugten i de ubehandlede kontrolkyllinger var uacceptabel (lugtgennemsnit 2,9) mens de skalfrosne kyllingers lugt var acceptabel (lugtgennemsnit 1,6).

Indledning

Baggrund *Campylobacter* er i dag den væsentligste årsag til bakterielle tarminfektioner i Danmark, og fjerkræ (især kyllinger) menes at være den vigtigste smitekilde (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. En af metoderne til at fjerne *Campylobacter* er ved at dekontaminere kyllingerne efter slagtning.

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. 1. januar 2018 og løbende skærpes i krav til forekomst.

Formålet med dette forsøg er at verificere inaktiveringen af *Campylobacter* på naturligt kontaminerede friskslagtede kyllinger, samt i et lille tillæg at teste holdbarhed af hele kyllinger under lagring ved 5°C (mikrobiologi samt lugt og udseende ved sidste holdbarhedsdag).

Litteraturopsamling

Forekomst af Campylobacter *Campylobacter* er en mikroaerofil bakterie, der overlever bedst under iltfattige forhold. Den formerer sig kun ved temperaturer over 30°C, og den vil derfor ikke formere sig i kølede fødevarer, men kan godt overleve. Udover at *Campylobacter* findes i og omkring gumpen, vil færdigslagtede kyllinger også typisk have bakterien indesluttet i hudfolder, porer og hårsække, hvortil den er blevet spredt via krydskontaminering fra gumpen under slagteprocessen (Umaraw et al., 2015).

Frysning til inaktivering af Campylobacter Det er velkendt, at frysning reducerer forekomsten af *Campylobacter* i færdigslagtet fjerkræ, og metoden benyttes også flere steder i industrien til at reducere niveauet i kyllinger fra positive flokke (Asakura et al., 2015; Awadallah et al., 2014; Sampers et al., 2010; Boysen & Rosenquist, 2009; Georgsson et al., 2005). Frysebetingelser som temperatur, frysehastighed og holdetid har dog stor betydning for effektiviteten, idet det antages, at bakterien skades og dør under frysning grundet oxidativ stress, osmotisk stress og/eller udtørring (Garénaux et al., 2008; Umaraw et al., 2015).

I længden er det dog ikke formålstjenligt at fryse kødet fra alle positive flokke, da forbruget bevæger sig fra frosset til fersk kylling. Dvs. anvendelse af egnet frysemetode til dekontaminering af fjerkræ skal sikre, at produktet stadig kan sælges under kategorien fersk kød.

Skalfrysning er en metode, hvor overfladen af produktet lynfryses og holdes ved lav temperatur i så kort tid, at selve kødet ikke når at blive frosset.

Denne nedkølingsmetode anvendes fx på de fleste danske svineslagterier til nedkøling af friskslagtede svin. Efter skalfrysningen flyttes svinekroppen til almindeligt batchkølerum, hvor der sker en udligning af temperaturen i svinekroppen.

I forhold til *Campylobacter* har flere studier på DMRI vist, at skalfrysning af svinekroppen reducerer forekomsten af *Campylobacter* på overfladen. Ved en effektiv tunnelkøling (vindhastighed 3 m/s og -18°C) opnås en reduktion af *Campylobacter* på ca. 1 log cfu/cm². Reduceres vindhastigheden til 1 m/s mindskes reduktionen af *Campylobacter* fra 1 log cfu/cm² til 0,5 log cfu/cm², mens nedsættelse af den relative luftfugtighed fra over 95% til ca. 75% ikke øger drabet af *Campylobacter*. Dvs. vindhastigheden synes at være meget vigtig for et effektivt drab i det relevante fugtighedsområde (Nersting et al., 2006).

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 CO₂ båndfryser til -1°C , sås et konsistent fald på 0,42 log cfu/prøve. Holdetid og vindhastighed blev ikke angivet (Boysen & Rosenquist, 2009).

I et studie på *campylobacter*podede kyllinger fra 2007 sås en reduktion på 3,17 log cfu/cm² fra et udgangspunkt på ca. 5,68 log cfu/cm², hvor hele kyllinger med skind blev dampbehandlet i 10 sekunder efterfulgt af skalfrysning i luft ved -35°C i 23 minutter, -10°C i 70 minutter og derefter $+15^{\circ}\text{C}$ i 30 minutter. Dog var der nogle kvalitetsforringelser i udseende af kyllingen ved dampbehandlingen, og den mest optimale behandling fra dette studie uden kvalitetsforringelse blev fundet ved at udskifte de 10 sekunders damp til 80°C varmt vand i 20 sekunder. Dette gav en reduktion på 2,9 log cfu/cm² fra et udgangspunkt på ca. 5,78 log cfu/cm². Lufthastigheden blev ikke angivet (James et al., 2007).

I et studie fra 2012 blev effekten af skalfrysning på podede kyllingelår (podet med 5 log CFU/g *C. jejuni*) med skind testet ved tre forskellige lufttemperaturer (-5 , -15 og -27°C) og tre forskellige indfrysningstider (henholdsvis 70, 15 og 6 minutter) til en skindtemperatur på mellem -6 og $-2,5^{\circ}\text{C}$. Alle behandlinger medførte signifikant reduktion i niveauet af *C. jejuni* på ca. 1 log cfu/g i snit. Desuden sås et forøget dryptab, især ved den højeste temperatur (-5°C). Effekten på skindfarven var minimal (Haughton et al., 2012).

I et studie fra 2016 blev princippet for hurtig overfladekøling undersøgt ved at neddyppe naturligt kontaminerede kyllingeskind i flydende nitrogen i 20 sekunder. Dette medførte et fald på ca. 1 log cfu/g. For hele naturligt kontaminerede kyllinger sås en reduktion på i snit 0,9-1,5 log cfu/g ved på-

sprøjtning af flydende nitrogen under 40 sekunders passage i en sprøjtetunnel uden blæst. Overfladetemperaturen under brystskindet blev målt til -2°C (Burfoot et al., 2016).

Krav til inaktiveringens størrelse Det har store samfundsmæssige fordele, hvis sygdomsfrekvensen på grund af Campylobacter kan nedbringes. Rosenquist et al. (2003) har vist, at en 2-log reduktion af antallet af Campylobacter på kyllingekroppe vil nedbringe hyppigheden af campylobacteriosetilfælde med en faktor 30. EFSA (2011) konkluderede i en grundig gennemgang ligeledes, at en reduktion på 1 log cfu/g enheder af Campylobacter på kyllingeslagtekroppe vil reducere sundhedsrisikoen fra campylobacteriosetilfælde med 50-90%. En reduktion på 2 log cfu/g enheder vil reducere sundhedsrisikoen fra campylobacteriosetilfælde med over 90%.

Fremgangsmåde

Resume af forforsøg I samarbejde med teknologileverandør (AGA) har DMRI konstrueret en kabine, hvori kyllinger kan skalfrysnes.

Skalfrysning kan anvendes, uden at produktet skal mærkes med frysning.

Skalfrysning i 45 sekunder har vist 1,5-2 log reduktion af campylobacter på podede ferske kyllinger (Tøstesen et al, 2018). Behandlingen påvirkede ikke dryptab, men der kan være en tendens til, at blodudtrækninger under huden fremstår tydeligere efter skalfrysningen. Det skal bemærkes at disse observationer blev gjort på kølede kyllinger som blev podet og anvendt til testene.

Forsøgsdesign og hypotese Effekten af skalfrysning på inaktivering af campylobacter testes her på naturligt kontaminerede friskslagtede kyllinger. Der testes for forskel mellem 20 prøver nitrogenbehandlede kyllinger mod 20 prøver ubehandlede kontrolkyllinger. Samme kylling analyseres før og efter behandling. På skift vælges højre og venstre side til analyse før behandling hhv. efter behandling. Der ønskes en forskel på minimum 1 log cfu/g ved behandlingen, hvilket er baggrunden for valg af antal kyllinger til forsøget.

Desuden testes holdbarhed i et mindre forsøg (mikrobiologi samt lugt og udseende ved sidste holdbarhedsdag).

Forsøget tester to hypoteser, som skal forkastes/modbevises for at bevise, at behandlingen har en effekt.

Hypotese for campylobacterreduktion: Der er ingen signifikant forskel i niveauet af totalmikroorganismer og campylobacter mellem nitrogenbehandlede (skalfrosne) kyllinger og ubehandlede kontrolkyllinger.

Hypotese for holdbarhedsforsøg: Der er ingen signifikant forskel i holdbarhed mellem nitrogenbehandlede (skalfrosne) kyllinger og ubehandlede kontrolkyllinger.

Hypoteserne accepteres eller forkastes med et signifikansniveau på 5%. Hvis hypoteserne forkastes, er der en signifikant effekt af behandlingerne.

Fremgangsmåde

Fremgangsmåde på slagteriet

Udtag af kyllinger til campylobacterforsøg

- 20 kyllinger hentes løbende på slagtegangen.
- Der tages foto af kyllingerne (ryg, bryst og vinger – fokus på blodårer og røde mærker (fotograferes igen dagen efter for at se, om der er forskel).
- Der udtages prøver til analyse af kimtal på ubehandlet kylling. Skift mellem højre og venstre side.
- Skalfrysning i 45 sekunder.
- Prøveudtagning af behandlet kylling.
- Læg i pose og flyt til køl.
- Transporteres kølet til DMRI.

Dernæst udtag af kyllinger til holdbarhedsforsøg

- 20 kyllinger hentes løbende på slagtegangen.
- Skalfrysning i 45 sekunder af 10 kyllinger.
- 10 kyllinger forbliver ubehandlede.
- Køles i pakkepose.
- Transporteres kølet til DMRI.
- MA-pakning på DMRI.
- Prøveudtagning af brystskind på dag 0 og dag 9.
- Fotografering for at se på blodudtræk – alle kyllinger fotograferes.

Fryseanlæg

Forsøgsopstillingen er vist i figur 1. Der kan være en enkelt kylling i kabinen, hvor der kan tilføres flydende N₂.



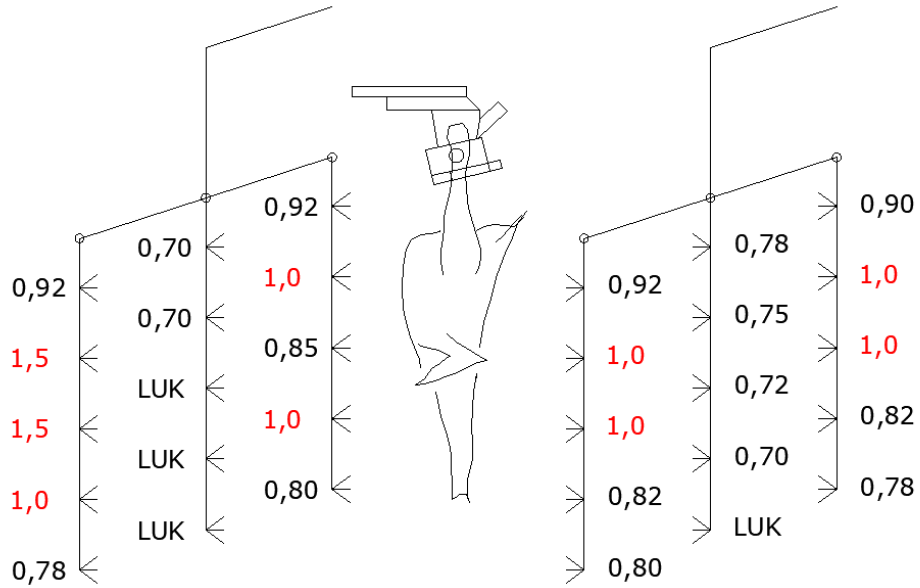
Figur 1. Forsøgsopstillingen.

Anlægsbeskrivelse Anlægget består af en plexiglaskabine med ophæng til kyllinger samt to rørforgreninger med hver 3 stk. ¼" rør samt et antal indsprøjtningdyser. De 2 forgreninger er koblet til hver deres LN2-tank. Tankene har et indhold på 230L 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 udstyret foret/isoleret med et lag bølgepap, da de store temperaturforskelle i plexiglaspladerne fik dem til at sprænges ved længere tids drift.

Udstyrets dyse konfiguration kan ses på figur 2, og i figur 3 vises en kylling, som er fotograferet umiddelbart efter behandling (efter "afdampning" af kabinen).

Dysehuller alle mål i mm

Standard dyser med sort
Udboring af dyser med rødt



Figur 2. Dysekonfiguration.



Figur 3. Frysebehandling af kylling.

Valg af analysesteder på kyllingerne

Valg af prøvested er baseret på viden fra tidligere projekter, hvor fx forekomst af *E. coli* er analyseret på forskellige dele af kyllinger og på forskellige steder i processen. Resultaterne viste:

- Før EVC (eviseration): forekomst af *E. coli* på halsskind knap 2 log højere end på lår.
- Efter EVC: forekomst af *E. coli* på halsskind ca. 1 log højere end på lår.
- Efter køl: forekomst af *E. coli* på halsskind ca. 0,5 log højere end på lår.
- Færdigt produkt: Forekomst af *E. coli* på vinger var ½-1 log lavere end på lår og bryst, som ikke var forskellige. Halsskind blev ikke analyseret.

I et andet forsøg blev følgende fundet:

- Før EVC: forekomst af *E. coli* på halsskind ca. 1½ log højere end på lår.
- Efter EVC: Ingen forskel i antal *E. coli* på lår og halsskind.

Campylobacter forventes at spredes ligesom *E. coli* under slagtingen, da de begge må formodes at blive overført via fækal kontaminering.

Af hensyn til projektøkonomien, variation mellem kyllinger og forsøgsdesign vælges det at analysere flere prøver på en kylling, og det vælges, at den samme kylling analyseres på den ene side før "frysebehandling" og på den anden side efter "frysebehandling".

Da det ikke vides, hvor de fleste campylobacter findes naturligt (nogle mener halsskind andre mener lår), og da de indledende forsøg viste ens effekt på lår og bryst samt lidt bedre effekt på halsskind, vælges det at udtage en samleprøve bestående af halvdelen af halsskind + brystskind + lårskind (se bilag 1). Der skal anvendes skindprøver og ikke svaberprøver for at detektere evt. "skjulte" campylobacter i hårsække, revner m.v.

Antal kyllinger

Forsøget tester alene effekten af frysebehandlingen. Tidligere forsøg har vist at vask+køl ikke reducerer antallet af Campylobacter (c.f. Hansen & Sørensen, 2013). Ligeledes viste kontrollforsøg ved challengetest 1 i dette projekt, at henstand ved -1,9°C natten over ikke reducerede antallet af campylobacter på skindet (Tøstesen, 2018).

Statistisk anbefales 5 kyllinger pr. besætning fordelt på 4 flokke. Dette er ikke muligt på en dag. Derfor vælges at udtage kyllinger fra de fritgående og ØKO-flokke, som slagtes, den dag forsøget gennemføres, dvs. 1 flok eller 2 flokke, men fordelt hen over produktionsdagen.

Til dette forsøgsdesign skal anvendes 20 kyllinger pr. behandling.

Dette er baseret på: ca. 54% forekomst af campylobacter på økologiske kyllinger og et niveau på 2 log cfu/g halsskind ($\pm 0,6$) (Rosenquist et al., 2013).

Et andet studium (årsrapport, FVST, 2015) har vist, at forekomsten af Campylobacter i økologiske kyllinger er 78%. I 46% af kyllingerne var antallet <100 cfu/g, og i 7,8% af kyllingerne var antallet >1000 cfu/g. Det gennemsnitlige indhold var 2 log cfu/g (kyllingelår analyseret). Dette er sammenligneligt med indholdet målt i 2013 og 2014. Forekomsten er højest i 3. og 4. kvartal.

I et andet FAF-projekt på KU/L&F er der udtaget hele kyllinger og kyllingelår til undersøgelse af henfald under lagring i høj ilt MAP. På disse kyllinger blev der i august fundet 100% positive (15 kyllinger) og i september var 80% positive (12 ud af 15 kyllinger). Niveauerne varierede, men der var ca. 4000 campylobacter pr. kylling (personlig kommunikation med Marianne Halberg, KU).

Hvis en kylling har et indhold af Campylobacter på 400-4000 cfu/kylling, vil der på en halv kylling (hals- + bryst- + lårskind) være ca. 200-2000 cfu. Lår- + bryst- + halsskind estimeres til at veje ca. 30 g. Det giver 7-67 cfu/g. De 30 g tilsættes 30 ml FKP og stomacheres (= 0 fort.). Det giver ca. 200-2000 cfu/30 ml = 7-67 cfu/ml i 0-fort.

Dokumentation (foto) Før prøveudtagning og behandling tages der foto af kyllingerne (ryg, bryst og vinger – fokus på blodårer og røde mærker dvs. 3 foto pr. kylling). De samme kyllinger fotograferes efter 1 døgn kølelagring – aerobt.

Prøveudtagning Der blev anvendt 40 kyllinger: 20 til test af frysebehandling og 20 til holdbarhedsforsøg. Kyllinger blev udtaget efter EVC og før køl.

Fryseforsøg:

Hold 1 (kontrol): ubehandlet

Hold 2: behandlet i 45 sekunder

For hver kørsel med kabinettet anvendes 1 kylling

Kylling 1: venstre side ubehandlet (kontrolprøve); højre side frys 45 sek.

Næste behandling:

Kylling 2: Højre side ubehandlet (kontrolprøve); venstre side frys 45 sek.

Osv. til kylling 20.

Før "frysebehandling" udtages en samlet prøve fra højre eller venstre side (½ hals + bryst + lår).

Efter "frysebehandling" udtages en samlet prøve fra højre eller venstre side (½ hals + bryst + lår).

Skindprøverne skæres/klippes af med en steril saks/skalpel (se bilag 1), pakkes i sterile stomacherposer ved at presse overskydende luft ud og køles (2-4°C) i kølebil. Skindprøverne transporteres til Lab M hos DMRI, og analysen påbegyndes samme dag.

Ved ankomst til DMRI vejes skindprøverne (noter vægten), og 50 ml FKP (0-fortynding) tilsættes.

På Cromogen-agar spredes:

1 ml fra 0-fort. på 3 plader (1 cfu = ca. 1 cfu/g; 100 cfu = ca. 100 cfu/g)

0,1 ml fra 0-fort. på 1 plade (1 cfu = ca. 10 cfu/g; 100 cfu = ca. 1.000 cfu/g)

0,1 ml fra -1-fort. på 1 plade (1 cfu = ca. 100 cfu/g; 100 cfu = ca. 10.000 cfu/g)

25 ml fra 0-fortyndingen overføres til 225 ml Bolton Broth til opformering og analyse for påvist/ikke påvist i prøven (1 cfu/ca. 25 g).

På BHI-A (dybde) spredes i -2, -3, -4 fortynding (1 ml i dybden).

Inkubation og aflæsning af plader Påvist/ikke påvist følger forskriften af F. Hansen (laboratiemappe) med følgende trin:
BHI-agar inkuberes aerobt ved 20°C i 5 dage og alle kolonier tælles.

Chromogenagarpladerne inkuberes 44 ± 4 timer ved 41,5°C i mikroaerofil atmosfære (6% CO₂, 6% O₂ og 88% N₂) og danner mørkerøde kolonier på en klar baggrund. Der tælles fortrinsvis plader med mellem 15 og 150 kolonier.

Bolton broth med prøve inkuberes mikroaerofilt i 44 ± 4 timer ved 41,5°C (preopformering i 4-6 timer ved 37°C udelades pga. tidspres). Herfra spredes på Chromogenagar (10 µl øjepodenål). Pladerne inkuberes mikroaerofilt i 44 timer \pm 4 timer ved 41,4°C. Mørkerøde kolonier på en klar baggrund indikerer, at prøven er positiv for campylobacter.

Konfirmation Der udtages 5 suspekter kolonier til verificering fra hver prøve. De 5 kolonier udstreges på Blod Agar og inkuberes i 24 timer ved 41,5°C i mikroaerofil atmosfære (6% CO₂, 6% O₂ og 88% N₂).

Følgende konfirmation anvendes på de rencykede kolonier:

- Opstik til bouillon for opdykning og mikroskopi. Campylobacter er spiraller, som er bevægelige.
- KOH-test for gramnegativ reaktion (trådtræk).

- L-ALA test (O.B.I.S. campy kit, code ID0800, Oxoid). Campy er L-ALA negative.

For yderligere detaljer om campylobactermetoderne henvises til laboratorieforskriften.

Acinetobacter kan vokse med mørkerøde kolonier på Brilliance-agar, og de er forventelige at finde på kyllinger. Acinetobacter er gramnegative, små ubevægelige stave. Forventes at være L-ALA positive.

Analyse

Resultatet angives som: kimtal *Campylobacter* = *Campylobacter* tællletal x fortyndingsgrad.

Tælltallet angiver cfu/ml i 0-fortyndingen (g skind i 50 ml FKP)

Eksempel:

$45 \times 10^3 = 4,5 \times 10^4$ *Campylobacter* pr. ml (0 fort.)

Hvis der er udtaget 35 g, som er fortyndet i 50 ml, giver det følgende beregning: $4,5 \times 10^4$ cfu/ml 0 fort. x 50 ml/35 g = $6,4 \times 10^4$ cfu/g.

Hvis kolonierne er verificerede. For 5 kolonier korrigeres tælltallet som følger:

5 positive kolonier	tællletal x 1,0
4 positive kolonier:	tællletal x 0,8
3 positive kolonier:	tællletal x 0,6
2 positive kolonier:	tællletal x 0,4
1 positiv koloni:	tællletal x 0,2
0 positive kolonier:	tællletal x 0,0

I dette tilfælde angives resultatet som "verificeret kimtal *Campylobacter*" = *Campylobacter* tællletal x fortyndingsgrad x korrektionsfaktor:

fx $45 \times 10^3 \times 0,6 =$ Verificeret *Campylobacter* pr. (gram/ml/prøve)

Hvor der er påvisning i prøven, er der minimum 0,04 cfu/g og teoretisk mindre end 1 cfu/g. Derfor er det valgt i T-test at beregne disse tilfælde som middelværdi af min. og maks. 0,5 cfu/g er fx $\log(0,5) = -0,3$ log cfu/g.

Fremgangsmåde ved holdbarhedsforsøg

For at få en indikation på, om holdbarheden påvirkes, udtages 20 kyllinger fra slagtekæden.

10 kyllinger pakkes i MAP (ubehandlede)

10 kyllinger nitrogenbehandles i 45 sekunder og pakkes i MAP

Til analyse af kimtal og campylobacter udtages en samleprøve af halsskind + brystskind + lår (fra halvdelen af kyllingen). Prøven fortyndes 1:9 i FKP. Der spredes på BHI og chromogenagar.

BHI (20°C, 5 dage):

dag 0: -2, -3, -4

dag 9: -4, -5, -6

Cromogenagar (41,5°C, 2 dage):

Dag 0: 0, -1, -2

Dag 9: 0, -1, -2

Lugt og udseende beskrives med skalaen 1-4 på dag 9:

Lugt:

1: frisk, acceptabel

2: ikke helt frisk, acceptabel

3, ufrisk begyndende sur, putrid m.v., uacceptabel

4: helt rådden, sur m.v., uacceptabel

Udseende:

1: ingen misfarvning, acceptabel

2: begyndende misfarvning, acceptabel

3, begyndende slim, misfarvning m.v., uacceptabel

4: helt rådden, sur m.v., uacceptabel

Beskrivelse af udseende og lugt skal relateres til fordærv.

Resultater – inaktivering af campylobacter

Resume af forsøget 20 friskslagtede kyllinger indgik i test med 45 sekunders nitrogenbehandling i et parret test set-up. Kontrolprøver er taget fra alle kyllinger inden behandling fra skiftevis højre og venstre side. Efter behandling på 45 sekunder med flydende nitrogen er der fra alle kyllinger udtaget prøve fra den modsatte side end den dertilhørende kontrolprøve. For BHI-agar er alle kolonier talt. For Campy Count Agar blev fortrinsvis plader med mellem 15 og 150 kolonier talt, og de blev angivet som verificeret *Campylobacter* (se metode). Alle resultater for de 20 kyllinger er vist i tabel 1.

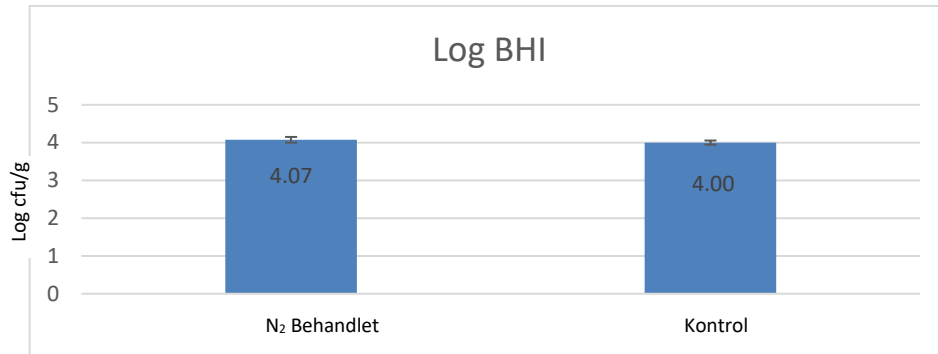
Tabel 1. Reduktion af Campylobacter ved skalfrysning af friskslagtede kyllinger. Frysebehandlet med flydende nitrogen i 45 sekunder samt dertilhørende kontrol uden behandling (log cfu/g).

Kylling	Frysebehandlet		Kontrol	
	Log BHI cfu/g	Log Campy cfu/g	Log BHI cfu/g	Log Campy cfu/g
1	4,12	0,29	4,21	0,91
2	4,26	-0,30	4,32	1,62
3	3,64	-0,30	4,14	0,87
4	5,17	-0,55	4,08	1,25
5	3,79	0,49	3,65	1,58
6	4,23	0,93	4,30	1,49
7	3,99	-0,30	3,95	0,89
8	3,83	1,37	4,21	3,03
9	3,73	0,55	4,37	1,67
10	3,93	0,74	4,04	0,63
11	3,84	0,62	3,84	1,11
12	3,96	2,09	3,69	2,85
13	3,86	1,76	3,80	3,03
14	4,12	-0,30	4,25	-0,30
15	4,50	0,87	3,86	-0,30
16	4,16	-0,30	3,52	-0,30
17	4,10	-0,30	3,78	-0,30
18	3,82	-0,30	3,79	-0,30
19	4,09	-0,30	4,09	1,83
20	4,33	-0,30	4,12	1,19
GNS	4,07	0,32	4,00	1,12
Std. afvigelse	0,34	0,78	0,25	1,08
SE	0,08	0,17	0,06	0,24

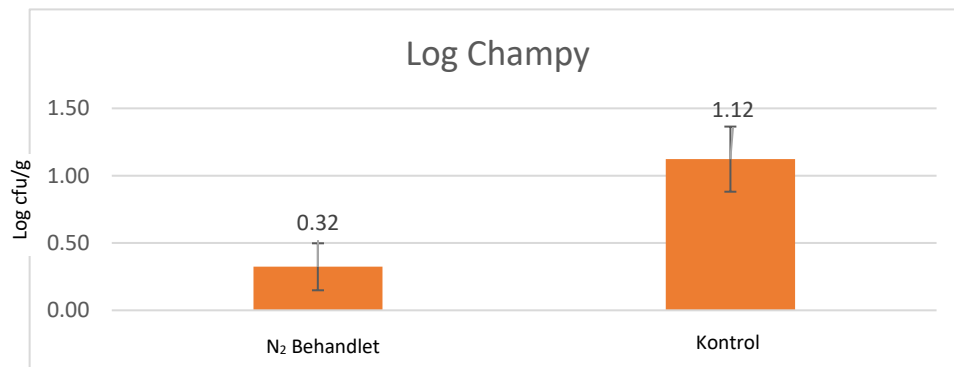
* Hvor der er påvisning i prøven, er der minimum 0,04 cfu/g og teoretisk mindre end 1 cfu/g. Derfor er det valgt at angive disse tilfælde som middelværdi af min. og maks. 0,5 cfu/g er fx $\log(0,5) = -0,3$ log cfu/g.

Gennemsnit og SE (standardfejl) fra 20 testkyllinger på hhv. totalkim talt på BHI og verificeret campylobacter er illustreret i diagrammerne i figur 4 (totalkim) og figur 5 (campylobacter). Det er valgt at plote SE for at præcisere sikkerheden på gennemsnittet af de 20 prøver. SE er valgt, fordi standardafvigelsen er høj, og fordi standardafvigelsen forklarer, hvor langt de enkelte målinger spreder sig fra middelværdien.

For totalkim er gennemsnitsværdierne og SE stort set identiske, figur 4. For campylobacter er gennemsnitsværdien mindre for de kyllinger, der er behandlet med nitrogen, hvilket indikerer en drabseffekt af campylobacter på naturligt kontaminerede friskslagtede kyllinger. Gennemsnittet på de nitrogenbehandlede kyllinger er på 0,32 log cfu/g og tilsvarende kontrol er på 1,12 log cfu/g, figur 5. Standardafvigelsen er dog tilsvarende meget høj, 0,78 for de behandlede kyllinger og 1,08 på kontrol, dvs. spredningen er større end gennemsnittet (tabel 1).

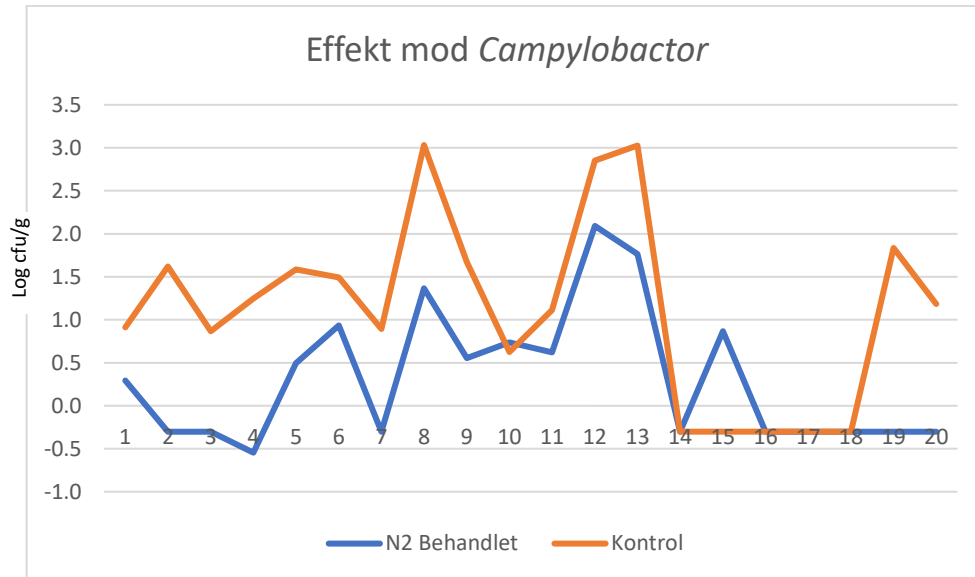


Figur 4. Totalkim på BHI-agar (log cfu/g). Gennemsnit fra 20 kyllinger angivet med SE og gennemsnit.



Figur 5. Verificeret campylobacter (log cfu/g) på kyllinger behandlet med nitrogen (N₂) samt deres tilsvarende kontrol. Gennemsnit fra 20 kyllinger angivet med SE og gennemsnit.

Forskellen mellem kontrol og behandling kan ses i figur 6, hvor det verificerede antal Campylobacter log cfu/g-niveau i kylling 1-20 i et parret test setup er visualiseret. Generelt er campylobacterniveauet reduceret i de nitrogen (N₂)-behandlede kyllinger (blå graf) sammenlignet med deres tilsvarende kontrol (orange graf), med undtagelse af kylling 15. Kontrolprøven fra kylling 15 er beregnet ud fra, at campylobacter er påvist i prøven. De højeste campylobacter-reduceringer er opnået i kylling nr. 2, 4, 8, 19 og 20 med en reduktion på 1,5-2,1 log cfu/g. 10 ud af de 20 kyllingeprøver havde en reduktion på >1 log cfu/g.



Figur 6. Verificeret *Campylobacter* log cfu/g niveau i kylling 1-20 i et parret test set-up. Kontrolprøver (orange) er verificeret fra alle kyllinger inden nitrogen (N₂)-behandling (blå).

Det er valgt at teste hypotesen statistisk i en students parret t-test, med en tosidet fordeling. P-værdier angiver sandsynligheden for, om hypotesen holder, tabel 2.

Tabel 2. Students parret t-test, med en tosidet fordeling, tester hypotesen for campylobacter-reduktion

Parret T-test	Totalkim BHI	Campy
P-værdi	0,413403	0,000424

Hypotese for campylobacterreduktion: Der er ingen signifikant forskel i niveauet af totalkim og campylobacter mellem nitrogenbehandlede (skal-frosne) kyllinger og ubehandlede kontrolkyllinger.

Med en p-værdi på 0,413, som er højere end signifikansniveauet, viser evidensen, at der ikke er signifikant forskel i niveauet af totalkim på BHI mellem nitrogenbehandlede (skal-frosne) kyllinger og ubehandlede kontrolkyllinger. For totalkim er hypotesen sand.

Med en p-værdi på 0,000424 er der vist stærk evidens for signifikant forskel i antallet af campylobacter mellem nitrogenbehandlede (skal-frosne) kyllinger og ubehandlede kontrolkyllinger. For campylobacter er hypotesen derfor falsk.

Statistisk er der påvist en signifikant effekt af nitrogenbehandlingen i forhold til kontrolprøverne for reduktion af campylobacter. Effekten i dette forsøg kan reducere antallet af campylobacter op til 2,1 log cfu/g.

Før prøveudtagning og behandling samt efter behandling og lagring i et døgn blev kyllingerne fotograferet (ryg, bryst og vinger – fokus på blodårer og røde mærker).

Der blev ikke observeret røde udtræk på/under vinger hverken før eller efter skalfrysning eller efter 1 døgn køleopbevaring.

Et eksempel på udseende af kylling før og efter behandling samt prøveudtagning ses i figur 7.

Fotoserien findes i denne mappe:

Y:\Projects\P2006248_FAF 27 Reduktion af Campylobacter i fersk kylling ved skalfr\Data\forsøg på slagteri\billeder før og efter frys og lagring 1 dag\



Figur 7. Eksempel på kylling før og efter skalfrysning samt efter 1 døgn køleopbevaring.

Resultater – holdbarhedstest

Holdbarhedstest på frisk-slagtede kyllinger

For at få en indikation af om holdbarheden påvirkes, blev 20 kyllinger fra slagtekæden udtaget – hvor 10 kyllinger blev MA-pakket som ubehandlet kontrol, og 10 kyllinger blev nitrogenbehandlet i 45 sekunder og efterfølgende MA-pakket.

Resultater fra analyse af total aerobt kimtal og suspekterede Campylobacter er vist i tabel 3. Verifikationen viste, at kun én prøve indeholdt Campylobacter. Derfor er det valgt at vise gennemsnit og standardafvigelse for talte suspekterede campylobactertilfælde – altså kimtal på campylobacter Cromogen agaren. På denne agar vokser Acinetobacter for eksempel som kolonier, der ligner Campylobacter.

Tabel 3. Gennemsnit og standardafvigelse på totalkim målt på BHI og antallet af kimental på campylobacter chromogen agar. Verifikation viste, at der kun var campylobacter i én prøve. NB: bemærk totalkim er angivet i log cfu/g mens suspekterede campylobacter er angivet i cfu/g

		dag 0 (Frys)	dag 9 (kontrol)
Log BHI cfu/g			
	<i>Frysebehandlet</i>	3,8 ± 0,20	5,9 ± 0,19
	<i>Kontrol</i>	4 ± 0,32	6,7 ± 0,26
Suspecte campylobacter cfu/g			
	<i>Frysebehandlet</i>	7,7 ± 3,29	7,8 ± 2,43
	<i>Kontrol</i>	82,5 ± 81,88	16,1 ± 11,81

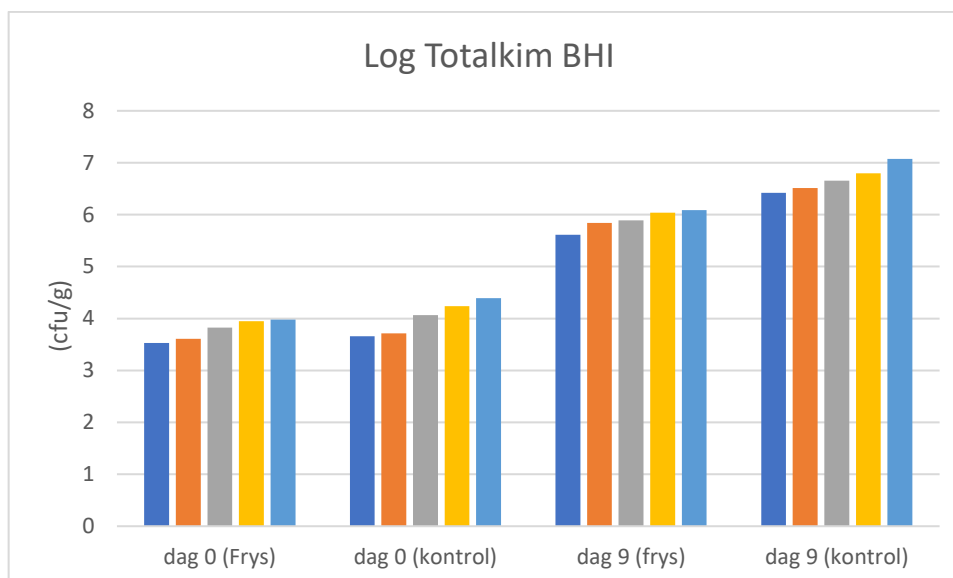
Kyllingernes mikrobiologiske holdbarhed afhænger primært af antallet og typen af bakterier, som påføres under slagtning og pakning. Det aerobe totalkim er en måde, hvorpå kyllingens baggrundsflora kan måles, og dette tal kan give en indikation (det er et lille datagrundlag) for, om skalfrysningen påvirker holdbarheden.

Kimtallet i de ubehandlede kontrolkyllinger stiger fra 4 log cfu/g til 6,7 log cfu/g under 10 dages lagring ved 5°C (MAP). Kimtallet i de skalfrosne kyllinger stiger fra 3,7 log cfu/g til 5,9 log cfu/g under samme lagringsforhold (tabel 3).

Figur 8 viser det aerobe totalkim i de 20 forskellige kyllinger (+/- skalfrysning; analyseret på pakkedagen (dag 0) og efter 10 dages lagring ved 5°C (dag 9)). Det gennemsnitlige aerobe total kimtal på dag 9 (n=5) er 0,8 log cfu/g lavere i de skalfrosne prøver. Det er uvist, om dette skyldes skalfrysningen, eller om der er tale om tilfældigheder pga. det lille datamateriale.

Statistisk er der meget stærk signifikant forskel i kimtal mellem ubehandlede kontrolkyllinger og skalfrosne kyllinger efter de 10 dages opbevaring (Student t-test, P = 0,000046). Denne forskel var ikke til stede på dag 0 (Student t-test, P = 0,12).

Den opstillede hypotese kan derfor statistisk afvises på baggrund af t-testens resultater. Det kræver dog et væsentligt større datamateriale, før man endeligt kan konkludere effekten. Der skal testes kyllinger på flere dage og fra forskellige slagterier for at få en større variation i baggrundsflora til test og analyse.



Figur 8. Totalkim målt på 20 forskellige kyllinger (hver søjle repræsenterer en kylling). 10 ubehandlede kyllinger (kontrol) og 10 nitrogenbehandlede kyllinger (frys). 5 kyllinger fra hver gruppe er analyseret dag 0 og dag 9.

Sensoriske data De sensoriske vurderinger er foretaget på dag 9 (talt fra dag 0, dvs. efter 10 dage). Bedømmelserne blev foretaget af interne dommere (n=5), hvor lugt og udseende blev vurderet ud fra skalaen 1-4 (se beskrivelse i afsnittet om fremgangsmåde). Gennemsnitsresultater er angivet i tabel 4

Tabel 4. Sensoriske vurderinger efter opbevaring i 10 dage

	LUGT	UDSEENDE
GNS kontrol (n=5)	2,9	1,4
GNS behandlet (n=5)	1,6	1,4

Med et gennemsnit på 2,9 i lugt er de fem kontrolkyllinger tæt på et uacceptabelt niveau. Et gennemsnit på 2,9 viser, at flere af dommerne fandt lugten af kyllingerne uacceptabel (17 ud af 20 bedømmelser fik karakteren 3). De fem nitrogenbehandlede kyllinger har et lugtgennemsnit på 1,6, som er acceptabelt, dog ikke helt friskt (ingen af de 20 bedømmelser fik karakteren 3). Både behandlede og kontrolkyllinger havde et gennemsnit på 1,4 i udseende – som er mellem frisk, acceptabel til begyndende misfarvning, men stadig acceptabel.

Konklusion

Inaktivering af campylobacter

Med en p-værdi på 0,000242 er der statistisk påvist en signifikant effekt af nitrogenbehandlingen på 45 sekunder i forhold til kontrolprøverne for reduktionen af campylobacter. 10 ud af de 20 nitrogenbehandlede kyllinger opnåede en reduktion >1 log cfu/g, hvor den højeste reduktion var 2,1 log cfu/g. Derfor kan det konkluderes, at behandlingen med flydende nitrogen kan reducere antallet af campylobacter på overfladen af naturligt kontaminerede friskslagtede kyllinger.

Derimod er der ikke signifikant forskel i niveauet af totalmikroorganismer mellem nitrogenbehandlede (skalfrosne) kyllinger og ubehandlede kontrolkyllinger. Aerob totalmikroorganismer (naturlig baggrundsflora) påvirkes derfor ikke af behandlingen.

Der blev ikke observeret røde vinger efter skalfrysningen. Det blev derimod observeret i de test, som blev foretaget på kølede kyllinger indkøbt i de lokale supermarkeder og dernæst podet med campylobacter før skalfrysningen.

Holdbarhed

Baseret på et meget lille datagrundlag er der ingen indikation på, at skalfrysning reducerer holdbarheden af MA-pakkede kyllinger. Tværtimod kan der måske være en lille holdbarhedsforlængende effekt. Det kræver dog et væsentligt større datamateriale, før man endeligt kan konkludere effekten. Der skal testes kyllinger på flere dage og fra forskellige slagterier for at få en større variation i den baggrundsflora, der testes og analyseres på.

Efter 10 dages lagring i MAP ved 5°C er det gennemsnitlige aerobe totale kimtal 0,8 log cfu/g lavere i de skalfrosne kyllinger. Statistisk er forskellen bekræftet signifikant (Student t-test, $p=0,000046$).

De sensoriske analyser viser, at lugten i de ubehandlede kontrolkyllinger var uacceptabel (lugtgennemsnit 2,9) mens de skalfrosne kyllingers lugt var acceptabel (lugtgennemsnit 1,6).

Referencer

Asakura, H.; Yamamoto, S.; Tachibana, M.; Yoshimura, M.; Yamamoto, S.; Igimi, S. (2015). Studies on efficacy of freezing on the reduction of Campylobacter jejuni in chicken meat. Japanese Journal of Food Microbiology, 32(3): 159-166.

Awadallah, M. A. I.; Ahmed, H. A.; El-Gedawy, A. A.; Saad, A. M. (2014). Molecular identification of C. jejuni and C. coli in chicken and humans, at Zagazig, Egypt, with reference to the survival of C. jejuni in chicken meat at refrigeration and freezing temperatures. International Food Research Journal, 21 (5): 1801-1812.

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.

Burfoot, D.; Hall, J.; Nicholson, K.; Holmes, K.; Hanson, C.; Handley, S.; Mulvey, E. (2016). Effect of rapid surface cooling on Campylobacter numbers on poultry carcasses. *Food Control*, 70: 293-301.

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

FVST (2015) Campylobacter i fersk, kølet, konventionelt og økologisk kyllingekød på slagterier. J. nr. 2014-28-61-00010.

Garénaux, A.; Ritz, M.; Jugiau, F.; Rama, F.; Federighi, M.; de Jonge, R. (2008). Role of Oxidative Stress in *C. jejuni* Inactivation During Freeze-Thaw Treatment. *Current Microbiology*, 58:134–138.

Georgsson, F.; Porkelsson, E. A.; Geirsdóttira, M.; Reiersen, J.; Stern, N. J. (2005). The influence of freezing and duration of storage on Campylobacter and indicator bacteria in broiler carcasses. *Food Microbiology*, 23: 677–683.

Hansen F. & Sørensen, R (2013). Fortrolig opgave for L&F

Haughton, N.; Lyng, J.; Cronin, D.; Fanning, S.; Whyte, P. (2012). Effect of crust freezing applied alone and in combination with ultraviolet light on the survival of Campylobacter on raw chicken. *Food Microbiology*, 32: 147-151.

James, C.; James, S.J.; Hannay, N.; Purnell, G.; Barbedo-Pinto, C.; Yaman, H.; Araujo, M.; Gonzalez, M. L.; Calvo, J.; Howell, M.; Corry, J. E. L. (2007). Decontamination of poultry carcasses using steam or hot water in combination with rapid cooling, chilling or freezing of carcass surfaces. *International Journal of Food Microbiology*, 114: 195–203.

Nersting, L.; Boes, J.; Alban, L.; Sørensen, L. L. (2006). Campylobacter i svin og svinekød – Status. Slagteriernes Forskningsinstitut, SF dokumenter: 29408.1, Ref. nr.: 18422.

Rosenquist, H.; Nielsen, N. L.; Sommer, H. M.; Nørrung, B.; Christensen, B. B. (2003). Quantitative risk assessment of human campylobacteriosis associated with thermophilic Campylobacter species in chickens. *International Journal of Food Microbiology*, 83: 87-103.

Rosenquist, H., Boysen, L., Krogh, A:L., Jensen, A.N., Nauta M. (2013). Campylobacter contamination and the relative risk of illness from organic broiler meat in comparison with conventional broiler meat. *International Journal of Food Microbiology* 162 (2013) 226–230.

Sampers, I.; Habib, I.; De Zutter, L.; Dumoulin, A.; Uyttendaele, M. (2010). Survival of Campylobacter spp. in poultry meat preparations subjected to freezing, refrigeration, minor salt concentration, and heat treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 137: 147–153.

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

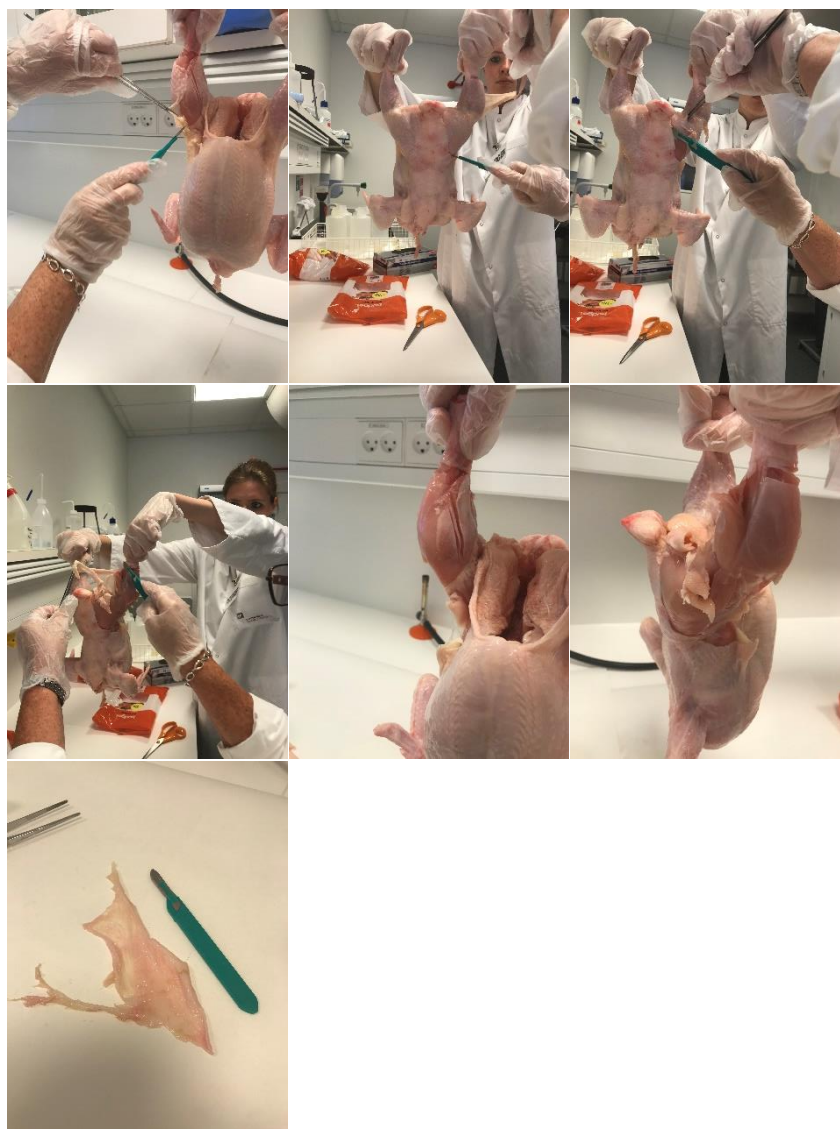
Tøstesen, M., Nielsen, L. B., Koch, A.G. (2018): Reduktion af Campylobacter i fersk kylling ved skalfrysning. *Challengetest 1, 2, 3 og 4*. Rapport Proj.nr. 2006248. December 2018.

Umaraw, P.; Prajapati, A.; Verma, A. K.; Pathak, V; Singh, V. P. (2015). Control of Campylobacter in Poultry Industry from Farm to Poultry Processing Unit – a Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, April: DOI:10.1080/10408398.2014.935847.

Prøveudtagning

Hals Halvdelen af halsskindet (på den lange led) klippes af før skalfrysning, og den anden halvdel udtages efter nitrogenbehandling (ingen foto).

Lår Med skalpel løsnes skindet rundt om over-/underlår. Skindet skæres/trækkes af i hinden. Gumpen og de bløde hudfolder ind i kyllingen medtages ikke. På en 1200 g budgetkylling giver det skind svarende til 11,4 g.



bryst

Med skalpel løsnes skindet rundt om brystet. Skindet skæres/trækkes af i hinden. Halskind medtages ikke. På en 1200 g budget kylling giver det skind svarende til 13,7 g.



Lår

bryst