

UTRECHT UNIVERSITY

DRINKWATER: INFECTIEROUTE VOOR GESPEENDE BIGGEN?

Onderzoekstage Faculteit Diergeneeskunde Universiteit Utrecht

Luijten, P.J.

Februari 2014

Begeleider Universiteit Utrecht: Dr. Leo van Leengoed

Onderzoekstage Universiteit Utrecht: Drs. P.J. Luijten

CONTENTS

1. Abstract	3
2. Inleiding.....	4
2.1. Drinkwater.....	4
3. Biofilms in het drinkwatersysteem.....	5
3.1. Biofilmformatie.....	6
3.2. Biofilmvormende bacterien bij varkens.....	7
3.2.1. Actinobacillus pleuropneumoniae	8
3.2.2. Streptococcus Suis	8
4. Doelstelling.....	8
5. Hypothese	8
6. Onderzoeksvraag.....	9
7. Materiaal en methoden	10
7.1. Bedrijven.....	10
7.2. Monstername	10
7.3. Monsters.....	11
7.4. DNA isolatie	11
7.5. Primers	11
7.6. qPCR	12
8. Resultaten	13
8.1. Bedrijven.....	13
8.2. Actinobacillus Pleuropneumoniae PCR	15
8.3. Streptococcus Suis type 2 en type 9 PCR.....	15
9. Discussie en conclusie	18
10. Referenties.....	21
11. Dankwoord.....	23
12. Bijlages	24
12.1. Drinkwaterleiding reinigingsproducten.....	24

12.1.1.	Di-o-clean Liquid 0,35% van MS Schippers	24
12.1.2.	MS Pipe-clean van MS Schippers	25
12.1.3.	Cid 2000 van Cid lines	26
12.2.	Water additieven	27
12.2.1.	MS goldfeed health van ms schippers	27

1. ABSTRACT

Biofilms are found in most water systems, and therefore also in drinking water. Biofilms are a population of bacteria in a slime matrix called Extracellular Polymeric Substance (EPS). A biofilm can be attached to a surface or a loose flock of cells. Sessile bacteria in biofilms can cause infections in weaned pig. Water medication is often used in pig farms and can be a cause for biofilms formation in the farms water system due to excipients. The excipients are added to the drugs, in order to help them dissolve in water. Examples of these excipients are lactose, sucrose and nitrate. Lactose, sucrose are nutrients for bacteria and biofilms growth. The two most important biofilm producing pathogens in Dutch pig farms are *Actinobacillus pleuropneumonia* en *Streptococcus Suis* type 2 and 9. The aim of this study is to determine whether the use of antibiotics in drinking water influences the presence of either one of these pathogens in biofilm. Eighteen water samples and 17 swabs samples at eight Dutch pig farms are taken from the piglet drinking nipples. Samples are tested with qPCR for presence of DNA of *Actinobacillus pleuroneumoniae* and *Streptococcus Suis* type 2 and 9. Only two water samples of the thirty-five collected samples are positive for both bacteria. One for *Actinobacillus pleuropneumonia*, that is taken at a farm that does not use water medication. And one for *Streptococcus Suis* type 9, that is taken at a farm that does use water medication. Due to lack of results the current study reveals no relation between the presence of biofilm producing bacteria in drinking water and pathophysiology in piglets.

2. INLEIDING

2.1. DRINKWATER

Drinkwater kan een bron zijn van pathogenen. Het belangrijkste voorbeeld hiervan is de cholera-epidemie in Londen in 1854, waarbij drinkwater de verspreider was van de bacterie *Vibrio cholerae*. De onderzoeker Dr. John Snow ontdekte dat besmet water uit de waterpomp de oorzaak was van de epidemie. Hij wordt gezien als een van de grondleggers van de huidige epidemiologie (Snow).

In Nederland ziet de Nederlandse overheid toe op de kwaliteit en veiligheid van het publieke drinkwater. Dit is de taak van de Inspectie Leefomgeving en Transport (ILT) van het Ministerie van Infrastructuur en Transport. Het ILT houdt toezicht op de drinkwaterbedrijven conform de Drinkwaterwet en het Drinkwaterbesluit, waarin de kwaliteitseisen beschreven staan. Voor de microbiologische parameters uit het Drinkwaterbesluit (*Escherichia coli*, *Legionella* spp. en enterococci) geldt dat ieder monster dat positief is, de norm overschrijdt. In dit geval wordt er opnieuw getest. Als het herhalingsmonster positief is wordt er een kookadvies afgegeven door de drinkwaterbedrijven en het water wordt gespuid; water onder druk weg laat lozen uit het drinkwatersysteem. Na deze handeling zou het water in het herhalingsmonster weer onder de norm moeten zijn (ILT, 2012).

Nederlandse varkensbedrijven maken gebruik van drinkwater uit eigen bronnen, of van water uit de drinkwaterleiding. De varkensbedrijven met drinkwater afkomstig uit eigen bron controleren jaarlijks verplicht de kwaliteit van het drinkwater op de parameters genoemd in figuur 1 voor de IKB (Integrale Keten Beheersing) (IKBvarken). Hieronder weergegeven staan de eisen voor de waarden van het drinkwateronderzoek van IKB varken. Bij de waarden in kolom "Goed" is het water veilig voor de varkens. Bij waarden gelijk of groter dan in de kolom "Afwijkend" wordt er geadviseerd te overleggen met de dierenarts of de Gezondheidsdienst voor Dieren welke acties er ondernomen moeten worden. De monsternamen voor de IKB is niet gedefinieerd wat betreft plaats in het leidingsysteem waar monsters genomen moeten worden.

Parameters	Goed	Afwijkend
<u>Chemisch onderzoek</u>		
pH	5 tot 8,5	< 4 of > 9
Ammonium (mg/L)	< 1,0	> 2,0
Nitriet (mg/L)	< 0,10	> 1,00
Nitraat (mg/L)	< 100	> 200
Chloride (mg/L)	< 250	> 2.000
Natrium (mg/L)	< 400	> 800
Sulfaat (mg/L)	< 150	> 250
IJzer (mg/L))	< 0,5	> 10,0
Mangaan (mg/L)	< 1,0	> 2,0
Hardheid (°D)	< 20	> 25
<u>Bacteriologisch onderzoek</u>		
Schimmels en gisten (cellen/L)	-	> 10.000
E. Coli (KVE/ml)	< 10	> 100
Totaal Kiemgetal (KVE/ml)	< 10.000	> 100.000

Figuur 1 Eisen drinkwateronderzoek IKB varken 2014

3. BIOFILMS IN HET DRINKWATERSYSTEEM

Uit onderzoek in de pluimveehouderij blijkt dat grondwater een bron van infecties met *Campylobacter jejuni* en *Campylobacter coli* kan zijn (Perez-Boto, 2010). In de varkenshouderij vindt men soms pathogene agentia in het drinkwater, zoals *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Loera-Muro, 2013). Onderzoek uit Engeland toont aan dat pathogenen in biofilms, in dit geval *Helicobacter* spp., voor komen in humane drinkwaterleidingen en daarmee een gevaar kunnen zijn voor de volksgezondheid (Park, 2001) (Watson, 2004). Uit deze onderzoeken blijkt dat drinkwater door nog steeds een bron van infectie kan zijn voor dier en mens.

Er zijn verschillende plaatsen van waaruit pathogenen het drinkwater kunnen infecteren. Ten eerste kan de bron zelf geïnfecteerd zijn (Perez-Boto, 2010). Bacteriën kunnen zich ophouden in biofilms in de waterleidingen, zoals in het onderzoek van (Loera-Muro, 2013) of de transmissie van bacteriën tussen varkens vindt plaats via de drinkwaterbak. Varkens die besmet zijn met pathogene bacteriën, zoals *Actinobacillus pleuropneumoniae*, drinken uit de nippel. Daardoor kan speeksel en neusuitvloeiing niet alleen de drinknippel besmetten maar ook het gehele watersysteem waardoor andere varkens kunnen worden geïnfecteerd.

Drinkwatermedicatie wordt gebruikt in de varkenshouderij en kan vorming van biofilms in de hand werken. Aan drinkwatermedicatie voor varkens zijn vaak hulpstoffen toegevoegd, zodat de antibiotica en andere geneesmiddelen goed oplossen in het water. Voorbeelden van hulpstoffen zijn lactose, sacharose en zouten. Deze producten kunnen de bacteriegroei en ook de vorming van biofilms bevorderen. Uit het onderzoek van Grenier, 2009 blijkt dat glucose, sucrose (of sacharose) en fructose goede energie bronnen zijn voor biofilm vorming, in dit geval bij *Streptococcus suis*. Lactaat is een minder goede bron voor biofilm groei, maar wel goed voor bacterie groei (Grenier, 2009). Voorbeelden van medicijnen met hulpstoffen zijn: Ampisol 20%, waaraan lactose

monohydraat en natriumcarbonaat zijn toegevoegd als hulpstoffen. Trim/Sul 80/420, waaraan lactaat is toegevoegd. Drinkmix Colistine waaraan polyethyleenglycol en lactose monohydraat zijn toegevoegd. Panacur poeder 4% waaraan calciumcarbonaat, maïszetmeel, lactose als hulpstof aan zijn toegevoegd. Doxycycline –hyclaat 20 %, waaraan lactose en sacharose zijn toegevoegd (CBG-MED, 2014).

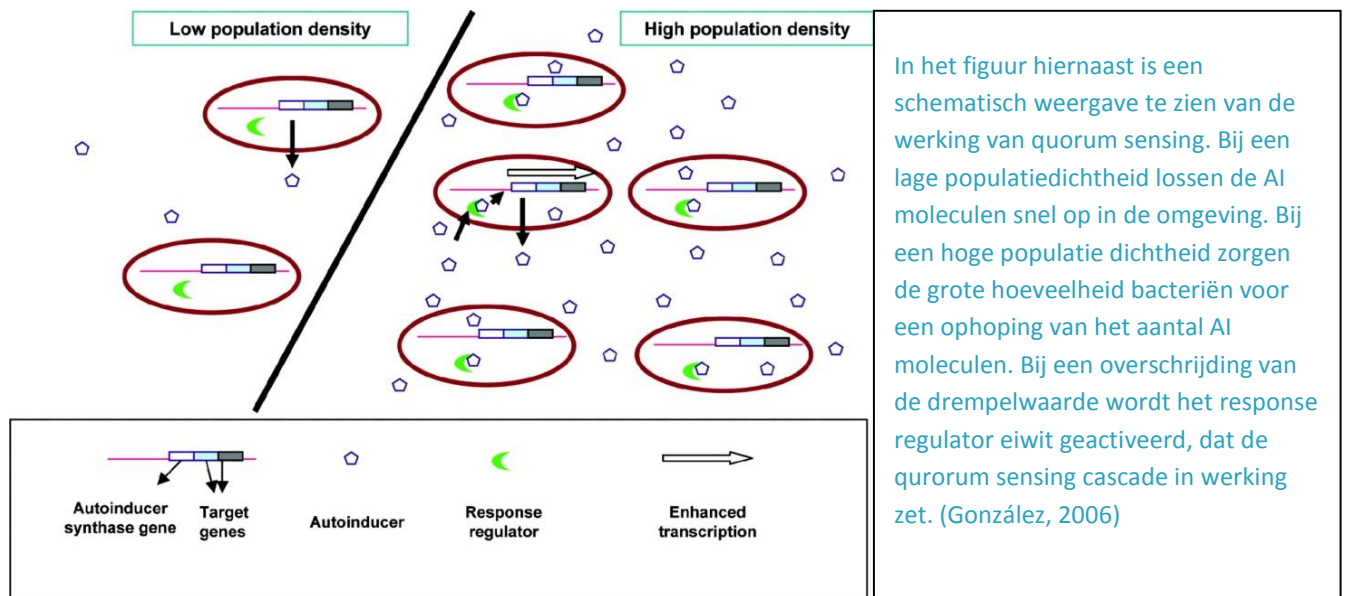
De Nederlandse overheid verplicht de varkenshouderijbedrijven, die drinkwatersystemen hebben die aangesloten zijn op het waternet, om een “controleerbare terugslagklep” te installeren. Deze klep zorgt ervoor dat, wanneer het bedrijfsgedeelte direct is aangesloten op het waternet, het “besmette water” niet kan terugstromen in het waternet (Vewin, 2011). Bij bedrijven met bronwater is een terugslagklep niet verplicht. Er kan dus niet vanuit worden gegaan dat op alle varkensbedrijven een terugslagklep in het drinkwatersysteem aanwezig is. Maar ook wanneer het bedrijf niet op het waternet is aangesloten en gebruik maakt van een eigen bron betekent het gemis van een terugslagklep dat besmet water uit een bepaalde afdeling bij het wegvallen van de waterdruk kan terugstromen door het gehele drinkwatersysteem op het bedrijf.

Desinfectantia in drinkwater zoals chloor en chlooramine verminderen wel degelijk aanwezige biofilms in de leidingen. Het materiaal van de leidingen heeft geen significante invloed op biofilmvorming (Wang, 2014).

3.1. BIOFILMFORMATIE

De definitie van een biofilm is “een microbiologisch afgeleide sessiele gemeenschap gekenmerkt door cellen die onomkeerbaar gehecht zijn aan een substraat van interface of aan elkaar, ingebed in een matrix van extracellulaire polymere stoffen die zij hebben geproduceerd, en een veranderd fenotype vertonen met betrekking tot groei en gen transcriptie”.

Een biofilm bestaat uit een meerdere cellen in een slijm matrix. Ze kunnen vast zitten aan een oppervlak (sessiel). Losse cellen worden ook wel “vlokken” genoemd en hebben dezelfde eigenschappen als biofilms (Hall-Stoodley, 2004). Een biofilm kan een basis zijn voor een persisterende of chronisch bacteriële infectie. Voor het vormen van biofilms is goede interne communicatie tussen bacteriën nodig, die ook wel “quorum sensing” wordt genoemd. Quorum sensing is een regulatie van gen expressie, in relatie tot de dichtheid van de bacterie populatie. Er wordt door bacteriën chemische signaal moleculen geproduceerd die ook wel autoinducers (AI) worden genoemd. Bij een bepaalde drempelwaarde van het aantal autoinducers, verandert de gen expressie (Miller, 2001). Quorum sensing wordt gedaan door sessiele kiemen en door planktonische bacteriën (losse uitgegroeide enkele bacterie cellen) (Stoodley, 2002).



Figuur 2 Schematische weergave quorum sensing (González, 2006)

Biofilms vormen een bescherming voor de bacteriën tegen omgevingsfactoren zoals, UV-licht, zuren, metalen, uitdroging, zouten, fagocytose en bepaalde antibiotica en antimicrobiële agentia (Hall-Stoodley, 2004).

Er zijn drie mechanismen die ervoor zorgen dat biofilms een weerstand hebben tegen biocide middelen. De eerste is de EPS (Extracellular Polymeric Substance) oftewel het 'slijm' van de biofilm, dat weerstand biedt tegen beekmiddel, metalen en immunoglobulinen. Verder werkt deze barrière ook tegen uitdroging en UV-licht (Hall-Stoodley, 2004). De tweede barrière is de fysische toestand van de biofilm, de bacteriën in de biofilm zijn in bepaalde zones in stationaire fase; een slapende toestand. De ASG (average specific growth) van de bacteriën in biofilms is $0,032 \text{ h}^{-1}$ en die in planktonische bacteriën $0,59 \text{ h}^{-1}$. Dit komt omdat zuurstof en nutriënten zoals glucose niet ver genoeg doordringen in de biofilm en daardoor de bacteriën weinig of helemaal niet groeien. Dit beschermt vooral tegen de werking van antimicrobiële agentia (Anderl, 2003). Een voorbeeld is de β -lactam antibiotica, die werken op de celwand-synthese, waarbij de actieve vermeerdering van bacteriën essentieel is voor de werking van de antibiotica. Het derde mechanisme is de aanwezigheid van fenotypische resistente subpopulaties in de biofilm, deze worden ook wel 'persisters' genoemd (Hall-Stoodley, 2004).

3.2. BIOFILMVORMENDE BACTERIEN BIJ VARKENS

Twee pathogene biofilm-producerende bacterie-species die voorkomen bij varkens zijn *Actinobacillus pleuropneumonia* en *Streptococcus Suis*. Er is gekozen deze twee bacteriën te onderzoeken in de drinkwaterleidingen, omdat ze wereldwijd veel voorkomen en een hoge lethaliteit en morbiditeit hebben (Taylor, 2006).

3.2.1. ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE

Actinobacillus pleuropneumoniae is een gram negatieve staaf. Het veroorzaakt respiratoire problemen, zoals een fibrineus tot hemorrhagische necrotiserende pleuropneumonie. Klinische infecties hebben een hoge lethaliteit. Een duidelijk klinisch beeld is ernstig expiratoire dyspneu, cyanose met bloederig schuim uit de neus en mond net voor het sterven van de big. Dit wordt gezien bij gespeende biggen en vleesvarkens. De bacterie bevindt zich in de neusholte, op de tonsillen en de bovenste luchtwegen. De morbiditeit is hoog. De verspreiding gebeurt via de lucht. *Actinobacillus pleuropneumoniae* komt wereldwijd veel voor. (Taylor, 2006)

Biofilmformatie in *Actinobacillus Pleuropneumoniae* is afhankelijk van de productie van het polymeer β -1,6-N-acetyl-D-glucosamine (PGA), deze component van de biofilm is nodig om te hechten aan abiotische oppervlakten (Kaplan, 2004). De biosynthese van PGA is afhankelijk van de eiwitten die gecodeerd zijn door het operon *pgaABCD*. Het histon achtige eiwit H-NS onderdrukt de uiting van het operon *pgaABCD* (Bossé, 2010). Verder zijn er meer genen aangetoond die invloed hebben op de biofilmformatie in *Actinobacillus Pleuropneumoniae* (Grasteau, 2011).

3.2.2. STREPTOCOCCUS SUIS

Streptococcus Suis is een gram positieve bacterie die infectieziekten veroorzaakt zoals septikemie, artritis en meningitis bij zuigende biggen en pas gespeende biggen (Taylor, 2006). Er zijn 35 serotypes *Streptococcus Suis* bekend, waarbij type 2 het meeste wordt geïsoleerd wereldwijd. In Nederland komt op de eerste plaats vooral *Streptococcus Suis* type 9 voor en op de tweede plaats type 2 (Wisselink, 2000).

Streptococcus Suis heeft het vermogen om biofilms te vormen en blijkt in die vorm meer bestand tegen Penicilline G en Ampicilline. Voor beiden is een MIC (minimal inhibitory concentrations) en MBC (minimal bactericidal concentration) van $>1000 \mu\text{g/mL}$ in een biofilm gemeten. In planktonische cellen is een MIC van $0,06 \mu\text{g/mL}$ en MBC van $3,9 \mu\text{g/mL}$ voor Penicilline G en MIC van $0,24 \mu\text{g/mL}$ en MBC van $7,8 \mu\text{g/mL}$ voor Ampicilline gemeten (Grenier, 2009). *Streptococcus Suis* type 9 lijkt een sterkere mogelijkheid te hebben om biofilms te vormen dan type 2 (Dawei, 2012). Een belangrijke eiwit voor de formatie van biofilms in *Streptococcus Suis* is het *LuxS* gen, die de productie van autoinducer 2 (AI-2) reguleert. (Vendeville, 2005)

4. DOELSTELLING

Het doel van dit onderzoek is na te gaan of er in de gespeende biggenafdelingen, na reiniging de drinkwaterleidingen, zich nog steeds pathogene bacteriën in de leidingen bevinden die zich op kunnen houden in biofilms. Bij het toevoegen van watermedicatie in de vorm van antibiotica, aan het drinkwater, hebben bacteriën in biofilms een hogere MIC en MBC dan de planktonische bacteriën (Grenier, 2009). Dit betekent dat planktonische bacteriën sneller afsterven dan de bacteriën die zich ophouden in biofilms. Als er drinkwatermedicatie met hulpstoffen (zoals lactaat) is gebruikt op het bedrijf hebben de planktonische bacteriën en biofilms hier profijt van.

5. HYPOTHESE

Onze hypothese is dat bedrijven die watermedicatie gebruiken een hogere incidentie van biofilm vormende bacteriën in de leidingen hebben in de vorm van *Actinobacillus pleuropneumoniae* en *Streptococcus Suis* type 2 en type 9.

6. ONDERZOEKSVRAAG

Is er verschil tussen bedrijven die wel of geen watermedicatie gebruiken met betrekking tot de incidentie van de biofilm vormende bacterien *Actinobacillus pleuropneumoniae* en *Streptococcus Suis* type 2 en type 9 in de waterleidingen bij gespeende biggen?

7. MATERIAAL EN METHODEN

7.1. BEDRIJVEN

We hebben monsters genomen van acht verschillende vermeerderingsbedrijven. Deze bedrijven zijn voorgedragen via MS Schipper Water Solutions te Bladel. De bedrijven die gekozen zijn door MS Schippers controleren de kwaliteit van het drinkwater meer dan één keer per jaar. Bij deze uitslagen zijn de microbiologische waarden veel lager dan de norm van <10.000 KVE/ml (kolonie vormende eenheid) gesteld door IKB varken. Op die manier wordt uitgesloten dat de pathogenen afkomstig zijn uit de bron. De afdelingen, die op de gebruikelijke manier gereinigd zijn, worden bemonsterd voordat de dieren aanwezig zijn. Daarnaast wordt rekening gehouden met het gebruik van drinkwaterwatermedicatie.

Verschillende factoren zijn van ieder bedrijf gemonitord:

- De grootte van ieder bedrijf (aantal zeugen).
- De drinkwater voorziening methode: via het waterleidingnet of via een bron en in dat geval, de diepte daarvan.
- De middelen die worden toegevoegd aan het drinkwater, anders dan antibiotica.
- Of er wel of geen medicatie aan het drinkwater wordt toegevoegd.
- Het reinigingsmiddel dat wordt gebruikt voor de leidingen en de frequentie daarvan.
- Aanwezigheid van problemen met infectieziekte op het bedrijf, of symptomen daarvan.
- Het aantal genomen monsters van ieder bedrijf (watermonsters en swabs).
- De optische beoordeling van de swabs op aanwezigheid van vuil: wit = - tot helemaal zwart = +++ en op de aanwezigheid van zichtbaar slijm.

7.2. MONSTERNAME

De monstername bestaat uit een watermonster en een swabmonster. Het watermonster wordt eerst genomen om de eventuele bacteriën die al in het einde van de leiding en dus dicht bij de nippel zitten, op te vangen. Het swabmonster nemen we daarna, dit is bedoeld om de eventuele biofilm die zich dicht bij de nippel bevindt op te nemen in de swab.

We nemen de monsters van de drinknippel in de stal op het moment dat er geen dieren in de stal zijn en nadat de stal is gereinigd en gedesinfecteerd op gebruikelijke wijze. Ook de leidingen zijn op gebruikelijke wijze voor het bedrijf schoongemaakt.

Watermonster: bestaat uit 50 ml watermonster van de eerste hoeveelheid water uit de leiding, om zo veel mogelijk water dat vlak bij de nippel zit te verkrijgen. Daarna wordt de drinknippel los gedraaid voor het maken van de swab. Bij de monstername worden de volgende voorzorgsmaatregelen in acht genomen:

- Steriele flacon.
- Dragen van schone handschoenen.
- Geen andere dingen aanraken met de binnenkant van de deksel en flacon.

- Zo veel mogelijk het eerste gedeelte van de water straal opvangen (water dat dicht tegen de nippel aan zit).
- Meteen sluiten van flacon na het nemen van het monster.

Swabmonster: We nemen een swab van de wand van de leiding net boven de nippel ongeveer 10 cm diep. Bij het nemen van de swab worden de volgende voorzorgsmaatregelen in acht genomen:

- Steriele swab.
- Handschoenen dragen voor het nemen van de swab.
- Niets aanraken met de swab, behalve de binnenkant van de leiding.
- 10 cm diep in de leiding draaiende beweging maken van 10 seconden over de hele omtrek van de leiding.
- Na het nemen van de swab, deze direct terug doen in de buis.

Monsters worden koel en donker bewaard tot verwerking in het lab.

7.3. MONSTERS

De watermonsters van 50 ml worden over twee buizen verdeeld en concentreren door centrifugatie (3000 g, 15 min lang). Het pellet wordt per buis gesuspendeerd in 0,5 ml 0.9% steriele NaCl oplossing, en doen deze samen in één epje in de vriezer op -20 °C.

We plaatsen de swabs in 10 ml 0.9% steriele NaCl oplossing, 15 min lang op de rollerbank. We concentreren de monsters door centrifugatie (3000 g, 15 min lang). Daarna suspenderen we het pellet in 1 ml 0.9% steriele NaCl oplossing en plaatsen het monster in een epje in de vriezer op -20 °C.

Voor verder onderzoek is van elk monster is 1 epje van 1ml bewaard voor DNA isolatie op -20 °C.

7.4. DNA ISOLATIE

De Instagene Matrix kit (BioRad) wordt gebruikt voor de DNA isolatie en voeren uit volgens de gebruiksinstructies van de producent. De methode voor de DNA isolatie staat beschreven in Tobias 2012 (Tobias, 2012).

7.5. PRIMERS

7.5.1. ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE

Er is gekozen voor het *apxIVA* gen als geschikt qPCR target gen, omdat het specifiek is voor alle *A. pleuropneumoniae* serotypes en omdat de test in andere onderzoeken gevalideerd is in qPCR testen (Tobias, 2012) (Cho, 2003). De twee primers die zijn APXIVANEST1-F (5'-GGGGACGTAAGTTCGGTGATT-3') en APXIVANEST1-R (5'-GCTCACCAACGTTTGCTCAT-3'), de probe die is apxIVAPr (5'-FAM-CGGTGCGGACACCTATATCT-BHQ1-3') (Tobias, 2012).

7.5.2. STREPTOCOCCUS SUIS TYPE 2 EN 9

De real time PCR wordt uitgevoerd met het *cps9H* gen voor type 9 met de primer sequentie 5'-GGCTACATATAATGGAAGCCC-3' en 5'-CCGAAGTATCTGGGCTACTG-3'. Voor type 2 het *cps2J* gen met de primer sequentie 5'-CAAACGCAAGGAATTACGGTATC-3' en 5'-AGTATCTAAAGAATGCCTATTG-3' (Dekker, 2013) (Smith, 1999).

7.6. QPCR

De real-time PCR van *Actinobacillus pleuropneumoniae* wordt uitgevoerd volgens de methode gebruikt in het onderzoek van Tobias, 2012 (Tobias, 2012). De monsters zijn in duplo ingezet. De real-time PCR van *Streptococcus suis* type 2 en type 9 volgens het onderzoek van (Dekker, 2013).

8. RESULTATEN

8.1. BEDRIJVEN

Bedrijf	Aantal zeugen	Drinkwater bron	Water toevoeging	Drinkwater medicatie	Reiniging leidingen	Freq. reiniging leidingen	Probleem op bedrijf qua infectie ziekten	Aantal monsters (w en s)***	Vervuiling swabs	Afdeling bijzonderheden	PCR Resultaat APP en SS****
1 (Tul)	220	35 m bron +	Zuur + koper	Nee	geen	-	Dunne gele mest	6 (2 w, 4 s)	+++		-
2 (Har)	280 (biol.)	2 bronnen 25 m +	-	Nee	di-o-clean	2 w voor monster name	Diarree na spenen	5 (2 w, 3 s)	+		-
3 (Meij)	520	85 m bron -	-	Nee	geen	-	Meningitis en gewrichtsontsteking door streptococce n	4 (2 w, 2 s)	+++	+/- Zeug aanw*	1 w op APP
4 (Tae)	400	Leiding Water -	-	Ja	CID 2000	1 ^e 14 d na opleg	Slingerziekte	4 (2 w, 2 s)	+++		-
5 (Agri)	1250	120 m bron +	-	Ja	Pipe-clean	1 keer per w	Meningitis en gewrichtsontsteking door streptococce n (ernstig)	4 (2 w, 2 s)	+	Water in drinkbak	1 w op SS type 9
6 (Stee)	300	Bron -	-	Ja	di-o-clean	onbekend	Meningitis en gewrichtsontsteking door streptococce n	4 (2 w, 2 s)	+++	Big aanw**	-
7 (Til)	500	110 m bron +	Goldfeed Health (zuur)	Nee	di-o-clean	onbekend	PMWS door PCV2	4 (2 w, 2 s)	++		-
8 (Steg)	500	80 m bron +	-	Nee	di-o-clean	continu	Meningitis en gewrichtsontsteking door streptococce n	4 (2 w, 2 s)	++		-

Figuur 3 Bemonsterde bedrijven

* De zeug wa ongeveer 5 minuten in het hok aanwezig voor de monstername

** De biggen waren ongeveer 30 minuten in de afdeling aanwezig voor de monstername

*** w = watermonster, s = swab

**** SS = Streptococcus suis, APP= Actinobacillus pleuropneumoniae

Van de acht bedrijven zijn er zeven met bronwater voorziening van verschillende diepten. Eén bedrijf heeft leidingwater voorziening als drinkwater.

Van de acht bedrijven zijn er drie die medicatie toepassen via drinkwater en vijf die geen medicatie toevoegen aan het drinkwater.

Onderzoekstage Universiteit Utrecht: Drs. P.J. Luijten

Er zijn twee bedrijven die geen reinigingsproduct speciaal voor de leidingen gebruiken, waarvan er één wel drinkwateradditieven. De drinkwateradditieven die ze gebruiken zijn zuur en koper bij bedrijf 1, waarvan de naam van het product onbekend is, en alleen zuur, en in dit geval Gold Feed Health van MS Schippers, bij bedrijf 7.

De drinkwaterleiding reinigingsmiddelen die de bedrijven gebruiken zijn: Di-o-clean van MS Schippers, bij bedrijf 2, 6, 7 en 8 Pipe-clean van MS Schippers bij bedrijf 5 en CID 2000 van CID Lines, bij bedrijf 4. Voor de productinformatie zie Di-o-clean Liquid 0,35% van MS Schippers.

De frequentie van reiniging van de leidingen is bij bedrijf 1 en 3 niet van toepassing; bedrijf 2 reinigt met Di-o-clean 2 weken voor de monsternamen. Bedrijf 4 reinigt altijd de eerste 14 dagen na het opleggen continu en daarna niet meer. Bij bedrijf 6 en 7 is het onbekend hoe vaak ze reinigen met Di-o-clean en bedrijf 8 reinigt continu met Di-o-clean.

De problemen met infectieziekten op het bedrijf zijn dunne gele mest bij bedrijf 1, diarree na het spenen bij bedrijf 2, meningitis en gewrichtsontsteking door streptococci bij bedrijf 3, 6 en 8 en ernstig bij bedrijf 5 als er niet behandeld wordt. Bij bedrijf 4 komt slingerziekte voor en bij bedrijf 7 Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) door PCV2.

Bedrijf 1. Het aantal monster is zes, waarvan twee watermonsters en vier swabs, twee van het gedeelte bij de nippel en twee verder in de slang. De swabs zijn +++ vuil, maar niet slijmerig.

Bedrijf 2, heeft vijf monsters, waarvan twee watermonsters en drie swabs, de swabs zijn + vuil en niet slijmerig.

Bedrijf 3 heeft vier monsters, waarvan twee watermonsters en twee swabs uit twee verschillende hokken, waarvan in één hok de zeug al 5 minuten aanwezig is. De zeug drinkt uit de zelfde nippel als de biggen. De swabs zijn +++ vuil, maar niet slijmerig.

Bedrijf 4 heeft vier monsters, waarvan twee watermonsters en twee swabs van dezelfde afdeling, de swabs zijn +++ vuil en niet slijmerig.

Bedrijf 5 heeft vier monsters, waarvan twee watermonsters en twee swabs uit twee verschillende hokken op een afdeling. De swabs zijn + vuil en niet slijmerig. Er zitten drinkbakken met rest water zijn onder de nippel gesitueerd. Tijdens de watermonsternamen komt een gedeelte van het water uit de drinkbak in het flacon terecht.

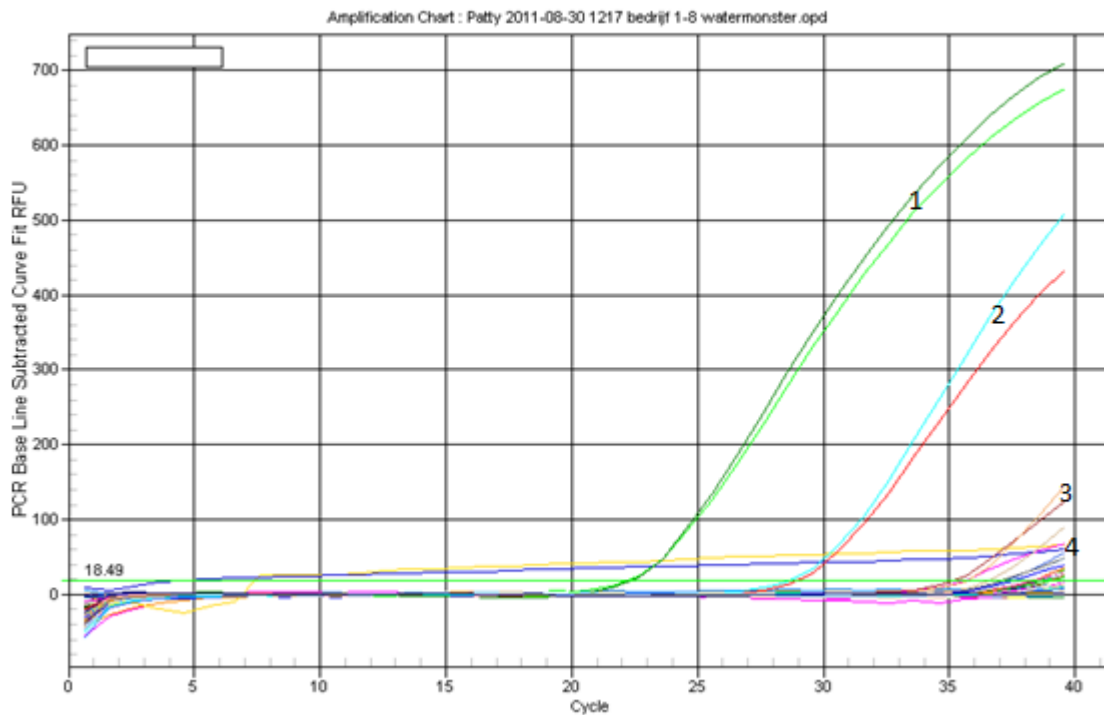
Bedrijf 6 hebben we vier monsters genomen, waarvan twee watermonsters en twee swabs, deze zijn +++ vuil en niet slijmerig. Er is alleen van 5 cm diep een swab genomen. Op het moment van monsternamen zijn er al een half uur de biggen aanwezig op de afdeling.

Bedrijf 7 hebben we vier monsters genomen, waarvan twee watermonsters en twee swabs, de swabs zijn ++ vuil en niet slijmerig.

Bedrijf 8 hebben we vier monsters genomen, waarvan twee watermonsters en twee swabs, de swabs zijn ++ vuil en niet slijmerig.

8.2. ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE PCR

Uit de resultaten van de PCR blijkt dat van de 35 monsters, 1 watermonster en geen van de swab-monsters positief is op *Actinobacillus Pleuropneumoniae*. Er zijn twee monsters laag positief, deze blijven onder de afkapwaarde en worden niet als positief gezien. Het positieve monster is van Bedrijf 3.



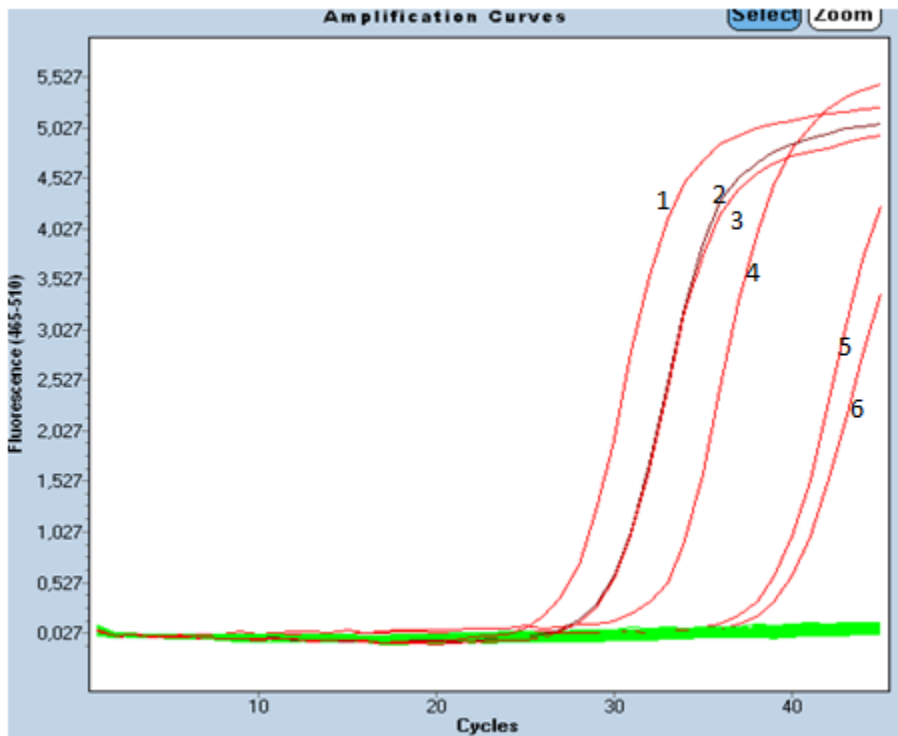
Figuur 4 Real Time PCR resultaten APP

In de grafiek van figuur 4 is te zien dat 1 de twee positieve controles zijn van 89000 g.c. (genomic copies) APP, curves 2 zijn de twee positieve controles van 890 g.c. en curves 4 zijn de twee positieve controles van 8.9 g.c. Het onderzoek is gevalideerd op 5 g.c. per reactie. Curves 3 zijn het positieve watermonster van bedrijf 3 bevat 14.4 g.c. per reactie. Daarnaast zijn twee monster laag positief (niet in de grafiek te zien) van 2.5 g.c. en 3.98 g.c. en dus onder de afkapwaarde van 5 g.c. per reactie. Deze monster zijn een watermonster van bedrijf 1 en een swab van bedrijf 2.

8.3. STREPTOCOCCUS SUIS TYPE 2 EN TYPE 9 PCR

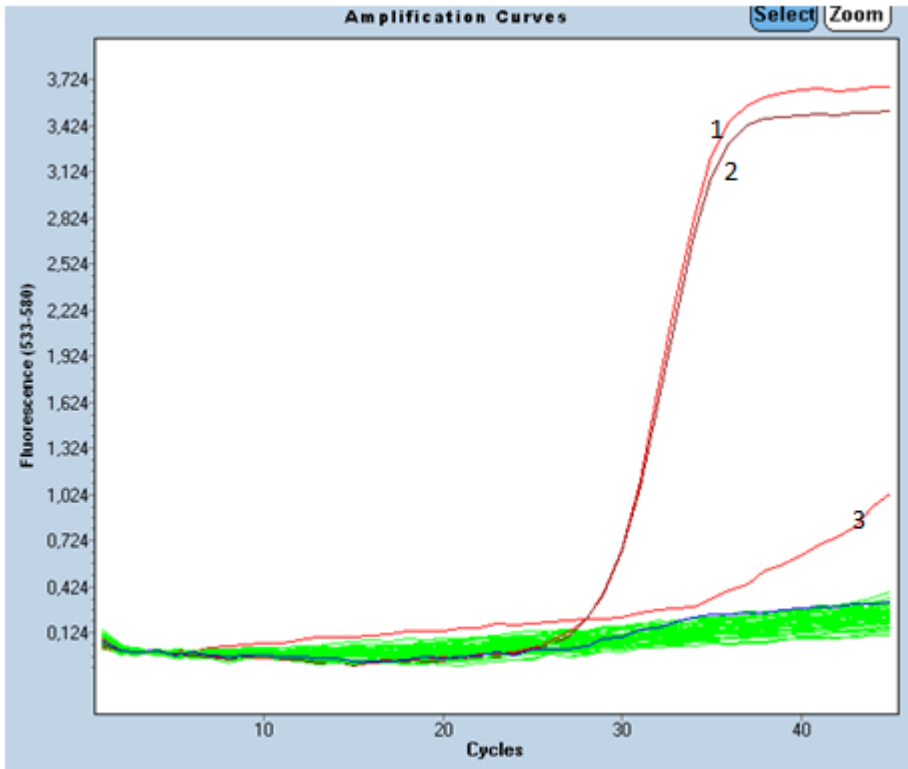
Uit de resultaten van de PCR van *Streptococcus Suis* blijkt dat van de 35 monsters, 1 watermonster en geen van de swab-monsters positief is op *Streptococcus Suis* type 9 en geen op *Streptococcus Suis* type 2. In figuur 5 zijn de resultaten van de PCR op *Streptococcus Suis* type 9 te zien. Curve 1 is het eigen positieve monster van *Streptococcus suis* type 9, deze heeft 2570 g.c. per reactie en heeft een crossing point (CP) van 27,27 cycles. Curve 2 en 3 zijn de standaarden. Curve 2 heeft 544 g.c. per reactie met een CP van 29,56 en curve 3 heeft 529 g.c. met een CP van 29,60 cycles. Curve 4 is het positieve watermonster van bedrijf 5. Het positieve monster heeft concentratie van 53.5 g.c. per reactie en een CP van 32,91 cycles. Curve 5 en 6 zijn twee andere monsters die mooi verlopen, maar

met een afkapwaarde die hoger is dan de gestelde 37,49 cycles . De CP van curve 5 is 40 cycles en lijn 6 39,31 cycles. Met respectievelijk 0,315 g.c per reactie en 0,529 g.c. per reactie. Deze monsters zijn positief verdacht, maar mogen niet positief genoemd worden. De eerste is het andere watermonster van bedrijf 5 en de tweede is een het watermonster van bedrijf 3 dat ook positief is voor *Actinobacillus pleuropneumoniae*.



Figuur 5 PCR Streptococcus suis type 9

In figuur 6 zijn de resultaten van de PCR op *Streptococcus Suis* type 2 te zien. Curves 1 en 2 zijn de standaarden van respectievelijk 1860 g.c. per reactie en een CP van 29,01 cycles en 1840 g.c. per reactie met een CP van 29,02 cycles. De afkapwaarde voor de CP is gesteld op 40,04 cycles. Curve 3 is een watermonster van bedrijf 5 en heeft 39,4 g.c. en een CP van 34,21 cycles, maar mag niet als positief worden beschouwd, omdat deze een afwijkende curve heeft ten opzichte van de twee standaarden.



Figuur 6 PCR Streptococcus suis type 2

	<i>Actinobacillus Pleuropneumoniae</i>		<i>Streptococcus Suis</i>			
			Type 2		Type 9	
	Watermonster	Swab	Watermonster	Swab	Watermonster	Swab
PCR +	1	0	0	0	1	0
PCR -	17	17	18	17	17	17
Totaal	18	17	18	17	18	17

Tabel 1 Uitslagen qPCR

9. DISCUSSIE EN CONCLUSIE

In dit onderzoek is geen verschil in aanwezigheid van de onderzochte agentia tussen de groep met en zonder watermedicatie aangetoond. Een mogelijke reden is het gering aantal positieve monsters.

Hoewel het aantal positieve uitslagen in dit onderzoek gering is, is zowel voor *Actinobacillus pleuropneumoniae* als *Streptococcus suis* type 9 een positief monster gevonden. Dit impliceert dat er een potentieel risico van transmissie van de onderzochte pathogenen is tussen opeenvolgende ronden bij (zogende en) gespeende biggen. Wel is het aantal positieve monsters laag en dit kan mogelijk er op wijzen dat de sensitiviteit van de onderzoeksmethode laag is. De sensitiviteit verhogen voor vervolgend onderzoek, kan door meerdere aanpassingen.

Er kunnen meer monsters per bedrijf genomen worden. Loera-Muro voert een onderzoek uit naar *Actinobacillus pleuropneumoniae* in drinkwater (Loera-Muro, 2013) met watermonsters die samengesteld zijn uit 4 verschillende aftappingen van ieder 10 ml en 5 -10 en 10 - 20 samengestelde monsters per bedrijf, van 12 bedrijven. Van de 120 samengestelde monsters (480 aftappingen van 10 ml) waren 24 positief op *Actinobacillus pleuropneumoniae* met de qPCR. Dit lijkt een veel sensitievere methode voor het nemen van watermonsters. Per nippel is er meer kans op aanwezigheid van de bacterie. Dit onderzoek laat zien dat er geen grote hoeveelheid water nodig zijn om een bacterie te vinden, maar wel meer monsterpunten. Er zijn verschillen met dit onderzoek. Bij het onderzoek van Loera-Muro zijn in de hokken wel varkens aanwezig, maar voor het nemen van de monsters wordt de nippel 1 minuut lang gesteriliseerd door het verhitten met een vlam en laat men het water 1 minuut lang lopen om speeksel en neusuitvloeiing te verwijderen. Het onderzoek wordt niet uitgevoerd op een gereinigde afdeling zoals in dit onderzoek. Verder zijn er geen gegevens bekend over de microbiologische waarden van de waterbron. Water in het onderzoek van Loera-Muro komt uit een natuurlijke bron, zonder toevoegingen van chloor en dergelijken.

Verder is het aantal genomen swabs laag. De swab wordt tot 10 cm diep genomen. In het onderzoek van (Wang, 2014) is er een swab genomen van een oppervlakte van 60 cm². De biofilm kan zich verder van de nippel vandaan in de leiding bevinden. De bemonstering zou dieper kunnen gebeuren (met langere swabs). Op die manier wordt ook een groter oppervlak bemonsterd. Ook wordt de kans dat een biofilm wordt meegenomen in de swab groter als er meer swabs per bedrijf worden genomen. Bijvoorbeeld van iedere nippel minstens 1 en van meerdere nippels per afdeling en van meerdere afdelingen. Uitgaande van de recent gepubliceerde resultaten van Loera-Muro, waarvan 20% van de monsters positief zijn (n=120) en 50% van de bedrijven (n=12), zou met deze aanpassingen de prevalentie van positieve monsters verhogen.

Een andere reden kan de reiniging van de leidingen zijn. Bedrijf 3 gebruikt geen schoonmaakmiddel voor de leidingen. Hierdoor zijn er meer biofilms in de leiding aanwezig. Op andere bedrijven wordt bijvoorbeeld Di-o-clean gebruikt. Dit middel verwijdert volgens de productinformatie biofilms en voorkomt de vorming ervan bij regelmatig gebruik (zie Bijlages Di-o-clean Liquid 0,35% van MS Schippers).

Een reden waarom het monsterwatermonster van bedrijf 3 dat positief is voor *Actinobacillus pleuropneumoniae* kan zijn omdat het is genomen in een hok waar de zeug al in geplaatst was. Het

kan zijn dat de zeug al had gedronken. Het speeksel van de zeug kan het drinkwater eventueel verontreinigen.

Een reden waarom bij bedrijf 5 een watermonster positief is op *Streptococcus suis* type 9, kan zijn omdat er drinkbakken onder de nippel aanwezig zijn, waardoor bij het nemen van het monster een beetje van het resterende water uit de drinkbak in het flacon terecht kwam. Het is dus niet met zekerheid te zeggen dat de bacterie, die we met de PCR vinden, uit de leiding komt, of nog in het resterende water van de drinkbak aanwezig is. Los daarvan wijst een positief monster op aanwezigheid van de bacterie. Een positief monster kan betekenen dat nieuwe naïeve groepen die in deze afdeling komen geïnfecteerd kunnen worden met *Streptococcus Suis* van de vorige groep. Dit bedrijf vermeldt in de anamnese dat er veel problemen zijn met streptococci als er niet behandeld wordt met antibiotica via het voer. Het schoonmaakregime binnen het bedrijf zorgt ervoor dat *Streptococcus Suis* zich kan blijven manifesteren. Verder onderzoek zou dit moeten bevestigen.

In de anamnese van vier bedrijven wordt vermeld dat meningitis en gewrichtsontsteking door streptococci een probleem is. In één van de zestien monsters van deze bedrijven is *Streptococcus Suis* type 9 aangetoond. Dit lage aantal positieve monsters kan betekenen dat *Streptococcus suis* zich niet ophoudt in de leidingen, maar op andere locaties in de stal, zoals de genoemde drinkbak.

In Nederland komt *Streptococcus Suis* type 9 meer voor dan type 2. Type 9 is in Nederland tussen (Wisselink, 2000). Het sterkere biofilm vormende vermogen van type 9 (Dawei, 2012) kan een reden hiervoor zijn.

Een andere reden voor het vinden van het agens kan de reiniging van de leidingen zijn. Bedrijf 5 gebruikt hiervoor Pipe-clean van MS Schippers. In de productinformatie van Pipe-clean staat geen vermeldingen over het verwijderen van biofilms, wat ze in de productinformatie van Di-o-clean wel vermelden (zie Bijlage MS Pipe-clean van MS Schippers). Dit kan erop wijzen dat na de schoonmaak van de leidingen er nog steeds biofilms aanwezig kunnen zijn.

In ons huidige onderzoek controleren we niet of de aanwezigheid van de wateradditieven of andere stoffen effect hebben op de resultaten van de PCR. Het kan zijn dat de additieven de PCR een vals positief of vals negatief resultaat geven. Dit kan men uitsluiten door aan een watermonster van het bedrijf één kolonie van de bacterie toe te voegen en dit gebruiken als positieve controle in de PCR. Bij een gelijk PCR resultaat als de standaard positieve controle heeft de samenstelling van het water van het bedrijf geen effect op de PCR.

In ons huidige onderzoek wordt de aanwezigheid van DNA gelijk gesteld aan de aanwezigheid van levende bacteriën die in een biofilm zitten. Ten eerste wil het vinden van DNA van de bacterie niet zeggen dat er levende bacteriën aanwezig zijn, ze kunnen ook dood aanwezig zijn. Om zeker te weten dat er levende bacteriën aanwezig zijn is een levensvatbaarheid test nodig, zoals in het onderzoek van (Loera-Muro, 2013) met Live/DeadBacLight Viability kit.

Daarnaast wordt het vinden van DNA gelijk gesteld aan de aanwezigheid van de biofilm. Het is mogelijk dat er geen biofilm is gevonden, maar planktonische bacteriën in het water. Ook de waarnemingen dat alleen watermonsters positief zijn en de swabmonsters er niet slijmerig uitzien, kunnen dit punt bevestigen. Als de swabmonsters positief zijn op PCR en kweek, dan kan men

aannemen dat er een biofilm gevonden is. Om te testen op aanwezigheid van de biofilm is fluorescent in situ hybridization (FISH) een mogelijkheid (Loera-Muro, 2013).

De resultaten van *Actinobacillus pleuropneumoniae* geven één positief monster bij de afkapwaarde van 5 g.c. per reactie. Er zijn twee monsters die laag positief zijn, omdat ze lager zijn dan de afkapwaarde. Deze twee zijn van 2.5 g.c. en 3.98 g.c. Deze afkapwaarde is gebruikt in het onderzoek van (Tobias, 2012). Als deze afkapwaarde lager is, bijvoorbeeld van 2,4 g.c. per reactie, dan zijn deze monsters wel positief.

De positieve curve van de *Actinobacillus pleuropneumoniae* PCR geeft aan dat er 14,4 genomic copies aanwezig waren in 10 µl. Voor de positieve curve van *Streptococcus Suis* type 9 PCR zijn dit 39,4 genomic copies. Dit zou betekenen dat ongeveer 576 genomic copies aanwezig waren in het 50 ml monster van *Actinobacillus pleuropneumoniae* en 1576 g.c. in het positieve monster voor *Streptococcus Suis* type 9. Als dit levende bacteriën zijn, is het de vraag of het genoeg is om een dier te infecteren.

De resultaten van *Streptococcus Suis* type 9, geven één positief monster bij de afkapwaarde van de CP op 37,29 cycles. Als we de afkapwaarde van de CP hoger dan 40 cycles zouden instellen, zijn deze monsters positief te noemen. Dit zijn bedrijven die in al een keer positief bevonden zijn. Een andere optie is de PCR herhalen, om onzekerheden uit te sluiten.

Zelfs als alle vier de laagpositieve monsters uit de PCR van *Streptococcus Suis* type 9 (bedrijf 3 zonder drinkwatermedicatie en bedrijf 5 met drinkwater medicatie) en *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Bedrijf 1,2 en 3 zonder drinkwatermedicatie) worden meegenomen in de analyse, is de hypothese nog steeds niet te onderbouwen. Integendeel, er blijken dan meer monsters positief te zijn van bedrijven die geen watermedicatie gebruiken, dan van bedrijven die wel watermedicatie gebruiken.

De conclusie van dit onderzoek is dat bedrijven die watermedicatie gebruiken geen hogere incidentie van biofilm vormende bacteriën in de leidingen hebben in de vorm van *Actinobacillus pleuropneumoniae* en *Streptococcus Suis* type 2 en type 9. Er is meer onderzoek nodig om de hypothese te onderbouwen. De bovenstaande discussie punten moeten meegenomen worden in vervolg onderzoek.

10. REFERENTIES

- Anderl, F. N. (2003). Role of Nutrient Limitation and Stationary-Phase Existence in *Klebsiella pneumoniae* Biofilm Resistance to Ampicillin and Ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* April vol. 47, 1251-1256.
- Bossé, J. S. (2010). Regulation of pga operon expression and biofilm formation in *Actinobacillus pleuropneumoniae* by sigmaE and H-NS. *J. Bacteriol.*, (192) 2414–2423.
- CBG-MED. (2014). *cbg-med.nl*.
- Chandy, J. A. (2001). DETERMINATION OF NUTRIENTS LIMITING BIOFILM FORMATION AND THE SUBSEQUENT IMPACT ON DISINFECTANT DECAY. pp. 2677–2682: Wat. Res. Vol. 35, No. 11,.
- Cho, W. C. (2003). PCR detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* apxIV gene in formalin-fixed, paraffin-embedded lung tissues and comparison with in situ hybridization. *Letters in Applied Microbiology*, 37, 56–60.
- Dawei, G. L. (2012). IN VITRO BIOFILM FORMING POTENTIAL OF STREPTOCOCCUS SUIIS ISOLATED FROM HUMAN AND SWINE in china. *Brazilian Journal of Microbiology*, 993-1004.
- Dekker, N. A. (2013). Effect of Spatial Separation of Pigs on Spread of *Streptococcus suis* Serotype 9 . *PLoS ONE* 8(4).
- González, J. E. (2006). Messing with Bacterial Quorum Sensing. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* Dec. 70 no.4, 859-875.
- Grasteau, A. T. (2011). Novel genes associated with biofilm formation of *Actinobacillus*. *Veterinary Microbiology* 153 , 134–143.
- Grenier, D. L. (2009). Characterisation of biofilm formation by a *Streptococcus suis* meningitis isolate. *The Veterinary Journal* 179, 292–295.
- Hall-Stoodley, L. C. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious disease. *Nature reviews microbiology* (2), 95-108.
- IKBvarken. (n.d.). <http://www.ikbvarken.nl/Over-IKB-Varken/Drinkwater.aspx>.
- ILT. (2012). *De kwaliteit van het drinkwater in Nederland, in 2011*. Utrecht: Inspectie Leefomgeving en Transport, Ministerie van Infrastructuur en Milieu.
- Kaplan, J. V.-M. (2004). Genes Involved in the Synthesis and Degradation of Matrix Polysaccharide in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* Biofilms. *J. Bacteriol.* , 186(24):8213-8220.
- Loera-Muro, V. J. (2013). Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in drinking water from pig farms. *Microbiology*, (159)536–544.
- Miller, M. B. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 55 , 165–199.
- Park, S. M. (2001). *Helicobacter* sp. recovered from drinking water biofilm sampled from a water distribution system. *Water Research*, (35) April 1624–1626.

- Perez-Boto, D. G.-P.-M.-P.-C. (2010). Drinking water as the source of *Campylobacter coli* infection in grandparent heavy breeders. *Avian Pathology*, december 39(6)483-487.
- (n.d.). *rivm*.
- Shore. (2008, dec). Detection of Staphylococcal Cassette Chromosome mec-Associated DNA. *Antimicrob. Agents Chemother.*, p. 4407–4419.
- Smith, H. V. (1999). The *cps* genes of streptococcus suis serotypes 1, 2, and 9: Development of rapid serotype-specific PCR assays. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 3146–3152.
- Snow, w. D. (n.d.). <http://www.ph.ucla.edu/epi/snow.html>.
- Stoodley, P. K. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol*, 56:187–209.
- Taylor, D. G. (2006). *Diseases of Swine*. Glasgow: Dr.D.J. Taylor.
- Tobias, T. A. (2012). Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs by real-time quantitative PCR for the *apxIVA* gene. *The Veterinary Journal* 193, 557–560.
- Vancraeynest, H. H. (2004 103). Genotypic and phenotypic screening of high and low virulence *Staphylococcus aureus* isolates from rabbits for biofilm formation and MSCRAMMs . *Veterinary Microbiology* , 241-247.
- Vendeville, A. K. (2005). Making 'sense' of metabolism: autoinducer-2, LUXS and pathogenic bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 3, 383-396 .
- Vewin. (2011). *Model aansluitvoorwaarden drinkwater 2011*.
- Wagenaar. (2009 134). Veegerelateerde MRSA: epidemiologie in dierlijke productieketens, transmissie naar mens en karakterisering van de kloon. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* , 1032-1035.
- Wang, H. M. (2014). Effect of Disinfectant, Water Age, and Pipe Materials on Bacterial and Eukaryotic Community Structure in Drinking Water Biofilm. *Environ. Sci. Technol.*, 48, 1426–1435.
- Watson, C. L.-L. (2004). Detection of *Helicobacter pylori* by PCR but not culture in water and biofilm samples from drinking water distribution systems in England. *Journal of Applied Microbiology* (97), 690–698.
- Wisselink, H. (2000). Distribution of capsular types and production of muramidase-released protein (MRP) and extracellular factor (EF) of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs in seven European countries. *Veterinary Microbiology* 74, 74 237-248.
- www.cidlines.com, C. L. (n.d.).
- www.schippers.nl, M. S. (n.d.).

11. DANKWOORD

Bij deze wil ik graag mijn dank uitspreken naar mijn begeleider Dr. Leo van Leengoed voor zijn commentaar, suggesties en hulp bij het schrijven van mijn onderzoek. Verder wil ik MS Schippers Water Solutions te Bladel bedanken voor het aanleveren van de contactgegevens van de twee groepen bedrijven. Daarnaast wil ik Dr. Tijs Tobias heel hartelijk bedanken voor de advisering voor de monsternamen en begeleiding in het labonderzoek. Ook wil ik Ineke Daemen heel hartelijk danken voor de hulp in het lab met de PCR.

12. BIJLAGES

12.1. DRINKWATERLEIDING REINIGINGSPRODUCTEN

12.1.1. DI-O-CLEAN LIQUID 0,35% VAN MS SCHIPPERS

MS Di-O-Clean is toepasbaar voor drinkwaterbehandeling en het reinigen en desinfecteren van drinkwatersystemen in de professionele veehouderij. Di-O-Clean bestaat uit twee componenten welke, na samenvoegen, een 99,9% zuivere chloordioxide oplossing genereren zonder chloor of andere giftige bijproducten.

Voordelen MS Di-O-Clean:

- Verwijdert de biofilm in de waterleiding en voorkomt de vorming ervan bij permanent gebruik
- Verwijdert ijzer- en mangaanaanslag in de leiding
- Werkt na doseren niet corrosief op het drinkwatersysteem
- Niet pH-afhankelijk (effectief bij pH 2-10).
- Toepasbaar bij de behandeling van zwavelhoudend water
- Is 260% effectiever dan een ontsmettingsmiddel op basis van chloor (natriumhypochloride, javel water, actieve chloor, etc.)
- Reageert direct met de celwand micro-organismen (o.a. bacteriën, salmonella, gisten, schimmels en virussen). Hierdoor kunnen micro-organismen geen resistentie opbouwen
- Vormt geen giftige bijproducten zoals THM, HAA, Mutagen X en chloorphenolen, zoals bij het gebruik van chloor
- Heeft geen enkele invloed op de geur en smaak van het water, in tegenstelling tot bijvoorbeeld chloor
- Is zeer gemakkelijk in het gebruik
- Maakt van water een veilig en waardevol nutriënt

Gebruik biociden veilig. Lees vóór gebruik eerst het etiket en de productinformatie.

Toepassing:

Fase 1: Reiniging

- Verwijderen van biofilm
- Verwijderen van ijzer- en mangaanaanslag
- Duur: 3-6 weken, afhankelijk van de vervuiling
- Dosering: 330 ml / 1000 liter water
- Toepasbaar met dieren in de stal

Fase 2: Onderhoud

- Voorkomen hergroei van biofilm
- Verlagen van kiemdruk
- Duur: continu
- Dosering: 50-100 ml / 1000 liter water, afhankelijk van de kiemdruk
- Toepasbaar met dieren in de stal

Fase 3: Na gebruik van additieven

- Verwijderen van resten van het gebruikte additief
- Duur: 3 dagen
- Dosering 150-200 ml / 1000 liter water
- Toepasbaar met dieren in de stal
- Na 3 dagen terugschakelen naar onderhoudsfase

Gebruiksaanwijzing:

- Afzonderlijke componenten bewaren op een donkere plaats bij een temperatuur van minimaal 10°C
- Voeg de inhoud van de fles (component B) bij de inhoud van de jerrycan (component A)
- Sluit de jerrycan en schud deze voorzichtig
- Wacht 30 minuten en de oplossing is klaar voor gebruik
- Doseren op het drinkwatersysteem middels de daarvoor bestemde Digi Doser Di-O 2,5 of 10
- De oplossing na aanmaken bij voorkeur binnen 30 dagen verbruiken, en uiterlijk binnen 45 dagen (www.schippers.nl)

12.1.2. MS PIPE-CLEAN VAN MS SCHIPPERS

MS Pipe-clean is een reinigingsmiddel, op basis van waterstofperoxide, voor het reinigen van drinkwatersystemen in de professionele veehouderij. Het reinigingsmiddel verwijdert grondig alle aanslag van organische aard en desinfecteert de leidingen.

Voordelen MS Pipe-Clean:

- Het is een oxiderend reinigingsmiddel
- Verwijdert effectief alle organische vervuiling
- Bestrijdt zowel bacteriën, schimmels als gisten
- Ook zeer effectief bij hoge temperaturen
- Geschikt om zowel curatief als preventief te gebruiken

Gebruik biociden veilig. Lees vóór gebruik eerst het etiket en de productinformatie.

Aanvullende informatie:

Toediening:

Oplossen in water en verdelen in het drinkwatersysteem.

Dosering:

- Voorkomen van aanslag van organische aard: 5 tot 10 ml doseren per 100 liter. Voorafgaand echter eerst aanwezige aanslag verwijderen.
- Verwijderen van aanslag van organische aard in een lege stal: 1 tot 3 liter oplossen per 100 liter water en deze oplossing in het drinkwaterstelsel brengen.
- Verwijderen van aanslag van organische aard in een in gebruik zijnde stal: 25 tot 50 ml doseren per 100 liter water.

Bevat:

Waterstofperoxide 50 gew.%, optimaliseringsadditieven, stabilisatoren en kleurstoffen.
(www.schippers.nl)

12.1.3. CID 2000 VAN CID LINES

Speciaal ontwikkeld voor de optimale drinkwaterhygiene. Cid 2000 heeft een drievoudige werking:

1. Reiniging van het drinkwatersysteem
2. Ontsmettende werking
3. Optimaliseren van de zuurtegraad (pH) van het drinkwater.

Eigenschappen

CID 2000 is samengesteld uit gestabiliseerde waterstofperoxide, organische zuren, tensio-actieven, bevochtigers en stabilisatoren

Aanwending

Tussen de rondes, voor de volledige reiniging van het drinkwatersysteem :

Gebruik 2% CID 2000 oplossing

Contacttijd : 4-6 uren

Spoel daarna grondig met zuiver water

2. Tijdens de productie: voor het ontsmetten en reinigen van het drinkwater :

Gebruik 300-400 ml CID 2000 per 1000 L drinkwater gedurende 2-3 dagen per week om de dag of in delicate periodes 3 tot 4 opéénvolgende dagen.

Technische kenmerken

Uitzicht: Niet schuimende kleurloze vloeistof

pH (1%): 3,7

Dichtheid (20°C): 1123 kg/l

Vriespunt: -30°C

Materiaalgevoeligheid / voorzorgsmaatregelen

- Stop toedienen van CID 2000 24 uur voor vaccinatie en behandeling met antibiotica.
- Gebruik CID 2000 met Teflon pompen (anders : maak een 1% oplossing) - CID 2000 nooit mengen met andere producten.
- Verifieer met de MSDS.

Removes biofilm

Biofilm inside water lines is known as a polysaccharide layer (organic matter). It can block the nipples, reduce the pipe volume by 70 to 80% and hence reduce the water flow from the drinking system considerably. The biofilm can "harbour" a lot of microorganisms. It adversely affects vaccines and vitamins administered through the water. Simple high pressure flushing will not remove it. Chlorination neither. Oxygenating the lines will indeed.

Onderzoekstage Universiteit Utrecht: Drs. P.J. Luijten

Cid 2000™ consists of 20 % stabilized hydrogen peroxide (H₂O₂) that dissolves in water into (H₂) and oxygen (O₂). The free gaseous oxygen will “scrub” along the biofilm, release it and dissolve it.

Removes scale

Scale is a layer of inorganic matter. It is mostly consisting of calcium (Ca) and magnesium (Mg) deposits. Only acids will remove scale. Cid 2000™ also consist of peroxy acetic acids and acetic acids. Those organic acids will remove scale. Scale can equally block the nipples and reduce the water flow. Scale can also harbour microorganisms. A 2% dilution will remove the scale in 12-24 h contact time.

(www.cidlines.com)

12.2. WATER ADDITIEVEN

12.2.1. MS GOLDFEED HEALTH VAN MS SCHIPPERS

Productbeschrijving:

MS Goldfeed Health is een gezondheidsadditief op basis van organische zuren en etherische oliën voor verstrekking via het drinkwater.

Kenmerken MS Goldfeed Health:

- Ondersteunt de maag om de pH op het juiste niveau te houden
- Stimuleert productie van verteringsenzymen
- Uitermate geschikt voor jonge dieren, waarbij het verteringsstelsel nog op gang geholpen moet worden
- Doodt schadelijke bacteriën in de maag effectief af
- Zeer goede antibacteriële werking in de dunne darm door een hoog aandeel melkzuur en een combinatie van etherische oliën
- Veilige buffering, waardoor de pH optimaal gereguleerd wordt
- Zeer smakelijk product, waardoor een goede wateropname verzekerd is
- Stimuleert de productie van darm epitheelcellen
- Positief effect op voerbenuiting
- Verbeterd de darmgezondheid
- Verhoogt de weerstand
- Toepasbaar voor varkens en pluimvee
- Kan zowel preventief worden ingezet bij dieren met een verminderde weerstand, als curatief bij dieren die last hebben van een verhoogde bacteriedruk (zoals E-coli en Salmonella)

Aanvullende informatie:

Dosering:

Vanaf 1 liter tot 2 liter per 1000 liter water, dit afhankelijk van de bufferende werking van het water. De pH-waarde dient tussen de 3,5 en 4,2 te liggen.

Samenstelling:

Mierenzuur: 53%, Propionzuur: 13%, Melkzuur: 8%, Essentiele Oliën: 2%, Natrium: 5%

Onderzoekstage Universiteit Utrecht: Drs. P.J. Luijten

Bijzonderheden:

Goldfeed Health blijft tot 1 jaar houdbaar na productiedatum

Technisch:

Goldfeed Health

Netto Energiewaarde Varkens (NEv): 2,45 MJ

Omzetbare Energie (OE): 3,11 MJ (www.schippers.nl)