

***Streptococcus suis* is aanwezig in het maagdarmkanaal van biggen op Varkens Innovatie Centrum Sterksel**

Henk Wisselink^{1*}, Conny van Solt-Smits¹, Nienke Dirx-Kuiken²,
Rudolph Raymakers³ en Carola van der Peet-Schwering⁴

¹Centraal Veterinair Instituut van Wageningen UR, Postbus 65, 8200 AB Lelystad

²Varkens Innovatie Centrum Sterksel, Vlaamseweg 17, 6029 PK Sterksel

³Veterinair Centrum Someren BV, Slievenstraat 16, 5711 PK Someren

⁴Wageningen UR Livestock Research, Postbus 65, 8200 AB Lelystad

Rapport no. 12/CVI0093

* Voor correspondentie:

henk.wisselink@wur.nl

0320-238403

Inhoudsopgave

Samenvatting	4
1. Inleiding	5
2. Materiaal en Methoden	6
2.1 Selectie biggen	6
2.2 Pathologisch en bacteriologisch onderzoek biggen op <i>S. suis</i> infecties	7
2.3 Monsternamen maagdarmkanaal biggen	7
2.3 Uitvoering <i>S. suis</i> PCR testen	7
2.4 Onderzoek faeces op <i>S. suis</i>	8
3. Resultaten	9
3.1 Pathologisch en bacteriologisch onderzoek biggen op <i>S. suis</i>	9
3.3 Onderzoek van faeces met PCR op <i>S. suis</i>	12
4. Discussie	13
Literatuur	15

Voorwoord

Het onderzoek naar aanwezigheid van *Streptococcus suis* in het maagdarmkanaal van biggen is uitgevoerd in opdracht van het ministerie van Economische Zaken, Landbouw en Innovatie, het Productschap Vee en Vlees en het Productschap Diervoeder. Het projectteam bestond naast de auteurs uit Bas Swildens van de Faculteit Diergeneeskunde en Frits Bouwkamp van de Gezondheidsdienst voor Dieren. Bedankt voor jullie constructieve bijdrage aan het project.

Henk Wisselink

Projectleider

Het onderzoek beschreven in dit rapport is gesubsidieerd door:

Productschap Vee en Vlees

Productschap Diervoeder

Ministerie van Economische Zaken, Landbouw & Innovatie (EL&I)



Ministerie van Economische Zaken,
Landbouw en Innovatie



Samenvatting

In opdracht van het Productschap Vee en Vlees, het Productschap Diervoeder en het ministerie van EL&I wordt onderzocht welke aanpassingen aan het voer, zowel voersamenstelling als voermanagement, bijdragen aan het verminderen van het aantal biggen met klinische verschijnselen van *Streptococcus suis*. Daartoe is op Varkens Innovatie Centrum (VIC) Sterksel een voedingsexperiment met gespeende biggen uitgevoerd (Van der Peet-Schwering et al., 2011).

De tonsil wordt gezien als port d'entree voor een *S. suis* infectie. Op basis van gegevens uit de literatuur kan de darm als route voor infectie echter niet uitgesloten worden. Om de aanwezigheid van *S. suis* in de darm van de biggen op VIC Sterksel te onderzoeken werden voor de start van het voedingsexperiment vijf biggen met verschijnselen van een *S. suis* infectie en vier gezonde biggen van VIC Sterksel naar het Centraal Veterinair Instituut in Lelystad vervoerd en onderzocht met PCR op aanwezigheid van *S. suis* 1, 2/EF, 7 of 9 in het maagdarmkanaal.

Uit de resultaten bleek dat op VIC Sterksel *S. suis* serotype 1, 2 en 9 voor klinische problemen bij biggen zorgt. Uit resultaten van de PCR testen bleek dat op dit bedrijf *S. suis* voorkomt in het maagdarmkanaal van gezonde biggen en van biggen met een *S. suis* infectie. *S. suis* werd vooral in de dunne darm aangetroffen en minder in de maag, mesenteriale lymfklieren en faeces. Serotype 9 werd het meest frequent aangetoond in de monsters uit het maagdarmkanaal, gevolgd door de serotypes 1, 2^{EF+} en 7. De serotypes 1, 2^{EF+} en 9 waren ook aanwezig op de tonsil van de onderzochte biggen. Bij de *S. suis* geïnfecteerde biggen werd het serotype dat zorgde voor ziekte aangetoond zowel in het maagdarmkanaal als op de tonsil.

De PCR testen voor serotype 1 en 2 op faeces leverden aspecifieke resultaten op. Ook waren er weinig monsters positief. Er is aanvullend onderzoek nodig om de specificiteit van de PCR testen te verhogen.

Geconcludeerd kan worden dat op VIC Sterksel *S. suis* voorkomt in het maagdarmkanaal van biggen met of zonder klinische verschijnselen. Met deze bevinding is de vraag naar aanwezigheid van *S. suis* in de darm bevestigend beantwoord.

1. Inleiding

Streptococcus suis is een bacterie die ziekte en sterfte kan veroorzaken, met name bij gespeende biggen. Van *S. suis* zijn 35 verschillende serotypes beschreven. Niet alle serotypes worden geassocieerd met ziekte en sterfte. Vooral de serotypes 1, 2, 7, 9 en 14 worden het meest geïsoleerd uit zieke biggen. Wereldwijd is serotype 2 het belangrijkste, in een aantal West-Europese landen waaronder Nederland is dat serotype 9.

S. suis infecties kunnen tot veel sterfte leiden en resulteren in een toename van het antibioticagebruik. Uit een enquête onder 200 zeugenhouders bleek dat 50% van het medicijngebruik bij gespeende biggen bestemd is voor de bestrijding van *S. suis* (Van der Peet-Schwering et al., 2008).

De bovenste luchtwegen, inclusief de tonsil worden gezien als de port d'entree voor de *S. suis* bacterie (Madsen et al., 2002). Echter, er zijn een aantal aanwijzingen dat de darm wellicht ook een infectieroute is voor *S. suis*. Devriese et al. (1994) troffen *S. suis* niet alleen aan in de tonsil, maar ook in de darm en in faeces. Su et al. (2008) vergeleken de microflora in maag, jejunum en ileum van biggen voor en na het spenen en merkten dat *S. suis* na het spenen hierin in grote aantallen voorkwam terwijl dat voor het spenen niet het geval was. Swildens et al. (2004) inoculeerden biggen via een canule rechtstreeks in de dunne darm met pathogene *S. suis* serotype 2 stammen. Na het aanbrengen van een stress situatie (de biggen werden rondgereden in een vrachtauto) kon de *S. suis* bacterie geïsoleerd worden uit meerdere organen. *S. suis* komt dus in de darm voor en een infectie via de darm kan niet uitgesloten worden.

In opdracht van het Productschap Vee en Vlees, het Productschap Diervoeder en het ministerie van EL&I wordt onderzocht welke aanpassingen aan het voer, zowel voersamenstelling als voermanagement, bijdragen aan het verminderen van het aantal gespeende biggen met klinische verschijnselen van *S. suis*. Daartoe is op Varkens Innovatie Centrum (VIC) Sterksel een voedingsexperiment met biggen uitgevoerd (Van der Peet-Schwering et al., 2011).

Op VIC Sterksel komen infecties met *S. suis* bij de gespeende biggen regelmatig voor. Uit bacteriologisch onderzoek van organen van zieke biggen gedurende de laatste jaren is gebleken dat vooral serotype 9 de oorzaak is van de infectie.

Mocht de darm een port d'entree zijn voor *S. suis*, dan zou de bacterie daar ook aanwezig dienen te zijn. Om dit te onderzoeken zijn voor de start van het voedingsexperiment vijf zieke biggen met een *S. suis* infectie en vier gezonde biggen van VIC Sterksel naar het Centraal Veterinair Instituut (CVI) in Lelystad vervoerd en onderzocht met PCR op aanwezigheid van *S. suis* 1, 2/EF, 7 of 9 in het maagdarmkanaal. Daarnaast zijn bij 20 gespeende biggen zonder uiterlijke ziekteverschijnselen en zonder antibioticum behandeling en die deelnamen aan het voedingsexperiment (Van der Peet-Schwering et al., 2011) faeces verzameld en eveneens onderzocht met PCR op aanwezigheid van *S. suis* 1, 2/EF, 7 of 9.

2. Materiaal en Methoden

2.1 Selectie biggen

Het onderzoek op aanwezigheid van *S. suis* in het maagdarmkanaal werd uitgevoerd op biggen afkomstig van VIC Sterksel. Gespeende biggen met en zonder klinische verschijnselen van een *S. suis* infectie werden geselecteerd voor het onderzoek. Daartoe werden alle biggen door diervverzorgers twee keer dagelijks ('s ochtends tussen 7.30 uur en 9.30 uur en 's middags tussen 14.30 uur en 16.30 uur) beoordeeld. Er werd daarbij gelet op hersenverschijnselen en kreupelheid, twee klinische symptomen die typisch zijn voor een *S. suis* infectie. Wanneer één van deze symptomen werd waargenomen werd het betreffende diernummer genoteerd en de lichaamstemperatuur gemeten.

Tabel 1

Criteria voor verdenking van biggen op een *Streptococcus suis* infectie op basis van een klinische verschijnselen

Klinische verschijnselen	Score	Symptomen	Verdenking van een <i>S. suis</i> infectie
Hersen-verschijnselen	0	Geen	Nee
	1	Milde afwijkingen, zoals trillen. Zichtbaar na stimulering van big.	Ja
	2	Duidelijke symptomen zoals evenwichtsstoornissen en kopschudden.	Ja
	3	Ernstige symptomen, platliggen en wil op een zijde liggen, snelle oogbewegingen, gestrekte nek.	Ja
Kreupelheid	0	Geen	Nee
	1	Milde kreupelheid die zichtbaar is als big gedwongen wordt te lopen.	Ja, indien lichaamstemp. $\geq 40^{\circ}\text{C}$
	2	Kreupelheid die zichtbaar is in rust. Zwelling van gewricht is zichtbaar. Wel belasting.	Ja, indien lichaamstemp. $\geq 40^{\circ}\text{C}$
	3	Ernstige kreupelheid, big wil niet belasten en wil niet lopen.	Ja
Gedrags-verandering	0	Geen	Nee
	1	Big is sloom en blijft achter in het hok staan.	Ja, indien lichaamstemp. $\geq 40^{\circ}\text{C}$
	2	Big maakt een zieke indruk.	Ja, indien lichaamstemp. $\geq 40^{\circ}\text{C}$
	3	Big is dermate ziek dat het blijft liggen.	Ja
Lichaamstemperatuur	0	Lager dan 40°C	Nee
	1	Hoger of gelijk aan 40°C	Nee

Vervolgens werden de klinische verschijnselen van de big beoordeeld door een dierenarts. Wanneer de big voldeed aan de inclusiecriteria voor een *S. suis* infectie (zie tabel 1) werd de big geëuthanaseerd door een intraveneuze injectie met pentobarbituraat.

Vervolgens werd de big per direct en gekoeld vervoerd naar het CVI in Lelystad voor het onderzoek op *S. suis*. Om ook de aanwezigheid van *S. suis* in de darm te bepalen bij een gezonde big, werd een big geselecteerd uit dezelfde koppel als de zieke big en op dezelfde wijze beoordeeld, geëuthanaseerd en getransporteerd naar het CVI als de zieke big. Om kruiscontaminatie uit te sluiten werden de biggen in aparte boxen vervoerd. De biggen waren individueel herkenbaar en mochten niet behandeld zijn met antibiotica.

2.2 Pathologisch en bacteriologisch onderzoek biggen op *S. suis* infecties

Om een *S. suis* infectie vast te stellen werd bij het CVI sectie uitgevoerd op de biggen. De organen, serosae, gewrichten en het centraal zenuwstelsel van de big werden daartoe macroscopisch onderzocht op pathologische afwijkingen en bacteriologisch op *S. suis* zoals eerder beschreven (Vecht et al., 1992).

2.3 Monstername maagdarmkanaal biggen

Om aanwezigheid van *S. suis* in het maagdarmkanaal te bepalen werden monsters genomen van de maag, dunne darm, mesenteriale lymfklieren en faeces. Van de maag werd de inhoud bemonsterd. Monstername van de dunne darm gebeurde op drie plaatsen: op ongeveer 20 cm afstand van de sluitspier van de maag (duodenum), halverwege de dunne darm (jejunum) en op ongeveer 20 cm van de overgang van de dunne naar de dikke darm (ileum). Segmenten van ongeveer 10 cm lengte werden vrij geprepareerd en voorzichtig leeggedrukt in monsternamepotjes. Na het leegdrukken werden de segmenten in de lengte opengeknipt. Met een objectglaasje werd vervolgens voorzichtig de mucuslaag van de darmwand geschrapt en in monsternamepotjes verzameld. De resterende darmwand van de segmenten werd eveneens in monsternamepotjes verzameld. Faeces monsters werden genomen door het allerlaatste deel van de dikke darm (het rectum) leeg te drukken in een monsternamepotje.

Direct na monstername werden de monsters gehomogeniseerd in phosphate buffered saline (PBS) met een Omni Tissue Homogenizer (Omni International) met mengstaven (Probes). Voor het homogeniseren van maaginhoud, darminhoud, mucuslaag en faeces werd gebruik gemaakt van 'Soft Tissue Omni Tip Homogenizing Probes' en voor het homogeniseren van de darmwand, mesenteriale lymfklieren en tonsillen van 'Hard Tissue Omni Tip Homogenizing Probes'. De laatstgenoemde mengstaven zijn uitgevoerd met zaagtandjes om het weefsel fijn te maken. Om kruiscontaminatie te voorkomen werd voor ieder monster een andere mengstaaf gebruikt. Glycerol werd toegevoegd tot een eindconcentratie van 15% en de monsters werden opgeslagen bij -70 °C.

2.3 Uitvoering *S. suis* PCR testen

De monsters uit het maagdarmkanaal werden alle onderzocht met PCR op de aanwezigheid van *S. suis*. Daarvoor werd 500 µl van het gehomogeniseerde monstermateriaal overnacht geïncubeerd bij 37°C in 5 ml

Todd-Hewitt broth met 0.25% Streptococcus Selective Supplement (Oxoid) en 0.2 µg/ml kristalviolet. Van ieder monster werd vervolgens 50 µl gepipetteerd in de wells van een 96-well Multiscreen™ filterplaat (Millipore, Bedford, MA.) met een 0.65 µm Durapore™ filter. Verwerking van de monsters en DNA isolatie vond plaats zoals eerder beschreven (Wisselink et al., 1999). PCR testen op aanwezigheid van *S. suis* serotypes 1, 2, 7 en 9 en het fenotype EF werden uitgevoerd zoals eerder beschreven (Wisselink et al., 2002).

2.4 Onderzoek faeces op *S. suis*

Om na te gaan of *S. suis* in faeces van klinisch gezonde biggen voorkomt werd faeces verzameld van 20 biggen van VIC Sterksel. Gespeende biggen van 4 tot 5 weken oud, zonder uiterlijke ziekteverschijnselen en zonder antibioticum behandeling, werden geselecteerd uit de groepen biggen die deelnamen aan het *S. suis* voedingsexperiment (Van der Peet-Schwering et al., 2011). Minimaal 10 gram faeces werd uit het rectum van de biggen verzameld. Bij monsternamen werden wegwerp handschoenen gebruikt. Om kruisbesmetting te voorkomen werden bij iedere big schone wegwerp handschoenen aangetrokken.

Faeces monsters werden per direct en gekoeld naar het CVI in Lelystad gebracht. In het laboratorium werd van ieder monster 2 gram afgewogen en toegevoegd aan 20 ml Todd-Hewitt broth met 0.25% Streptococcus Selective Supplement (Oxoid) en 0.2 µg/ml kristalviolet. Het mengsel werd overnacht geïncubeerd bij 37°C. Verwerking van de monsters, DNA isolatie en uitvoering van de PCR testen vond plaats zoals beschreven in paragraaf 2.3.

3. Resultaten

3.1 Pathologisch en bacteriologisch onderzoek biggen op *S. suis*

Tussen 26 oktober 2010 en 14 februari 2011 werden vijf biggen van VIC Sterksel op basis van de klinische symptomen geselecteerd zoals omschreven in Tabel 1. De biggen werden vervoerd naar het CVI in Lelystad voor pathologisch en bacteriologisch onderzoek op *S. suis*. Tegelijkertijd (de eerste keer is dit niet gebeurd) werd een gezonde big geselecteerd uit dezelfde koppel als de zieke big en onderworpen aan hetzelfde onderzoek als de zieke big.

Bij alle vijf zieke biggen werden bij het VIC Sterksel zenuwverschijnselen waargenomen. Pathologisch onderzoek en bacteriologisch onderzoek bevestigden dit beeld. Bij vier van de vijf de biggen was verlies aan structuur van het hersenweefsel zichtbaar, dit was vooral het geval bij de kleine hersenen. Verder werd bij alle vijf biggen een reincultuur van *S. suis* uit de hersenen geïsoleerd. Klinisch waren er geen verschijnselen van gewrichtsontsteking bij deze vijf biggen waarneembaar, pathologisch en/of bacteriologisch werden echter drie van de vijf biggen positief bevonden. Uit het resultaat van het pathologisch en bacteriologisch onderzoek bleek ook dat vier van de vijf zieke biggen afwijkingen hadden aan de serosae, en bij twee van de vijf biggen was dit het geval voor één of meer organen (Tabel 2). Geconcludeerd kan worden dat alle vijf geselecteerde biggen ziek waren als gevolg van een *S. suis* infectie.

Uitslag van de serotypering van de geïsoleerde *S. suis* stammen maakte duidelijk dat de ziekte bij deze vijf varkens werd veroorzaakt door *S. suis* serotype 9 (twee varkens), serotype 2 (twee varkens) en serotype 1 (één varken) (Tabel 1). Op VIC Sterksel zijn er dus tenminste drie *S. suis* serotypes (1, 2 en 9) die ziekte veroorzaken.

Bij de gezonde biggen werden bij drie van de vier biggen geen pathologische en bacteriologische afwijkingen aangetroffen. Bij één big (4691) werden fibrinedraden in de buikholte gezien, het bacteriologisch onderzoek verliep negatief bij deze big. Bij een andere gezonde big (5786) werden ook fibrinedraden gezien in de buikholte, daarnaast had deze big een afwijking aan één gewricht en werd uit een ander gewricht een *S. suis* serotype 1 stam geïsoleerd. Bij één van de vier gezonde biggen was dus sprake van een *S. suis* infectie.

De leeftijd van de biggen varieerde van 31 dagen (ruim vier weken) tot 70 dagen (10 weken). De serotype 1 stammen werden geïsoleerd uit de biggen van 31 dagen oud, de andere serotypes (2 en 9) uit de oudere biggen (Tabel 2).

Tabel 2

Klinisch, pathologisch en bacteriologisch onderzoek van zieke en gezonde biggen van VIC Sterksel op *Streptococcus suis* infecties

Nummer big	Datum onderzoek	Leeftijd (dagen)	Verdenking <i>S. suis</i> infectie	Klinische symptomen			Pathologisch (Path) en bacteriologisch onderzoek (Bact)							
				Zenuwver- schijnselen	Kreupelheid	Gedrags- verandering	CZS		Organen		Serosae		Gewrichten	
							Path	Bact	Path	Bac	Path	Bac	Path	Bac
4293	26-okt-10	40	Ja	+	-	+	+	Ss 9	+	-	+	-	+	-
4691	22-nov-10	65	Nee	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
4441		67	Ja	+	-	+	+	Ss 2	+	Ss 2	+	Ss 2	+	Ss 2
5785	1-dec-10	31	Ja	+	-	+	-	Ss 1	-	-	-	-	-	Ss 1
5786		31	Nee	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	Ss 1
5875	10-dec-10	41	Ja	+	-	+	+	Ss 9	-	-	-	Ss 9	-	Ss 9
5766		43	Nee	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6759	14-feb-11	70	Nee	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6770		70	Ja	+	-	+	+	Ss 2	-	-	+	-	-	-

CZS: Centraal zenuwstelsel: cerebrum, cerebellum, mesencephalon en medulla oblongata

Organen: lever, nier, milt, hart en long

Serosae: buikvlies, borstvlies en pericard

Gewrichten: koot, knie, heup, elleboog en schouder

Ss 1, Ss 2, Ss 9: *Streptococcus suis* serotype 1, 2 en 9

+ = verschijnselen/afwijkingen/*S. suis* aangetoond; - = niet aangetoond

3.2 Onderzoek van monsters maagdarmkanaal met PCR op *S. suis*

PCR testen voor de detectie van *S. suis* serotype 1, 2/EF⁺, 7 en 9 werden uitgevoerd op monsters uit het maagdarmkanaal van de negen biggen. Op basis van de PCR waren alle negen biggen positief voor *S. suis* serotype 1, 2^{EF+}, 7 of 9 in de dunne darm (duodenum, jejunum of ileum), waren drie van de zeven biggen positief in de mesenteriale lymfklieren en waren twee van de negen biggen positief in faecesmonsters (Tabel 3).

In totaal werden op 51 monsters uit het maagdarmkanaal PCR testen uitgevoerd. Het meest frequent was de serotype 9 PCR positief, namelijk op 21 van 51 monsters (41%). De serotype 1 PCR was minder vaak positief (13 van de 51 monsters; 25%). De serotype 2^{EF+} PCR was positief op 6 van de 51 monsters (12%) en de serotype 2^{EF-} PCR op 2 van de 51 monsters (4%). De serotype 7 PCR was het minst vaak positief (2 van de 51 monsters; 4%). Bij zes van de negen biggen werden twee of drie serotypes aangetroffen in de darmmonsters. *S.suis* werd bij 2 van de 9 biggen in de faeces aangetoond (Tabel 3).

Tabel 3

Aanwezigheid van *Streptococcus suis* in het maagdarmkanaal van biggen van VIC Sterksel

Big	Klinisch beeld en pathologie	Bact. onderzoek <i>S. suis</i> serotype	PCR <i>S. suis</i> serotype						
			Tonsil	Maag	Dunne darm ^a			Mes. Lymfklier	Faeces
					Inhoud	Mucus-laag	Darm-wand		
4293	CZS	9	ND	-	9	1 ^b , 7, 9	ND	ND	9
4691	-	-	2 ^{EF+} , 9	1	1	-	-	ND	-
4441	CZS	2	2 ^{EF+} , 9	1, 2 ^{EF+} , 9	2 ^{EF-} , 9	2 ^{EF-}	2 ^{EF+} , 9	2 ^{EF+} , 9	-
5785	CZS	1	1	-	1	1 ^a , 2 ^{EF+} , 9	-	-	-
5786	-	1	1	-	1	1	-	-	1
5875	CZS	9	9	9	9	-	9	9	-
5766	-	-	-	-	1	9	9	9	-
6759	-	-	1, 2 ^{EF+} , 9	1, 9	2 ^{EF+}	1, 9	9	-	-
6770	CZS	2	1, 2 ^{EF-}	1	1, 9	2 ^{EF+} , 7, 9	9	-	-
Aantal PCR testen positief op		Serotype 1	4	4	4	4	0	0	1
		Serotype 2 ^{EF+}	3	1	1	2	1	1	0
		Serotype 7	0	0	0	2	0	0	0
		Serotype 9	4	3	4	5	5	3	1
		Aantal getest	8	9	9	9	8	7	9

^a Monsters uit duodenum, jejunum en ileum werden apart getest in de PCR. Dunne darm werd als positief aangemerkt wanneer één van deze monsters PCR positief was.

^b Positief in de *S. suis* serotype 1 PCR maar met een te klein fragment.

CZS: Centraal Zenuwstelsel

ND: Niet bepaald

Om na te gaan of *S. suis* een voorkeur heeft voor een locatie in de dunne darm werden het aantal positieve PCR testen geteld in het duodenum, jejunum en ileum. Op 26 monsters uit inhoud, mucuslaag en darmwand van duodenum, jejunum en ileum werden PCR testen uitgevoerd voor serotype 1, 2/EF, 7 en 9; totaal dus 104 PCR testen uit duodenum, jejunum en ileum. Uit de resultaten bleek dat 13 (13%) monsters uit het duodenum positief waren, 19 (18%) monsters uit het jejunum en 22 (21%) uit het ileum.

Tonsillen waren ook positief in de PCR op *S. suis*. Zeven van de acht onderzochte biggen bleken op basis van de PCR resultaten drager te zijn op de tonsil van serotype 1, 2^{EF+}, of 9 stammen, bij drie biggen werden twee serotypes met de PCR aangetoond op de tonsil en bij één andere big (6759) drie serotypes (1, 2^{EF+} en 9). Vier biggen waren drager op de tonsil van serotype 9 op basis van de PCR, ook vier biggen op serotype 1, drie biggen op serotype 2^{EF+} en één big op serotype 2^{EF-}. Alle PCR testen op serotype 7 op de tonsil verliepen negatief (Tabel 3).

De uitslagen van de PCR op de monsters uit het maagdarmkanaal en op de tonsilmonsters werden vergeleken met de ziektestatus van de biggen. Uit de resultaten van de PCR testen bleek dat zowel gezonde biggen als zieke biggen met een *S. suis* infectie drager waren van één of meerdere *S. suis* serotypes in het maagdarmkanaal of op de tonsil. Bij de geïnfecteerde *S. suis* biggen werd het serotype dat zorgde voor ziekte ook aangetoond in het maagdarmkanaal en op de tonsil (Tabel 3).

3.3 Onderzoek van faeces met PCR op *S. suis*

PCR testen voor de detectie van *S. suis* serotype 1, 2/EF, 7, 9 en EF-positieve stammen werden uitgevoerd op faecesmonsters van 20 klinisch gezonde biggen van VIC Sterksel. Zeven van de 20 onderzochte biggen bleken positief te zijn in de PCR voor serotype 9. In de serotype 1 en 2/EF PCRs werden in respectievelijk acht en vijf monsters, meerdere, aspecifieke PCR fragmenten; de PCR testen op de overige monsters waren negatief. Alle PCR testen op serotype 7 verliepen negatief (Tabel 4).

Geconcludeerd kan worden dat op basis van PCR uitslagen, serotype 9 in de faeces werd aangetoond, dat serotype 7 stammen afwezig zijn en dat er geen uitspraak gedaan kan worden over de aanwezigheid van serotype 1 en 2/EF in de faeces van de biggen.

Tabel 4

Aanwezigheid van *Streptococcus suis* in de faeces van klinisch gezonde biggen van VIC Sterksel op basis van PCR

Resultaat PCR testen	<i>S. suis</i> PCR testen op faeces biggen			
	1	2/EF	7	9
Negatief	12	15	20	13
Positief	0	0	0	7
Aspecifiek	8	5	0	0
Totaal	20	20	20	20

4. Discussie

In het kader van onderzoek naar de effecten van voersamenstelling en voerstrategie op *S. suis* infecties bij gespeende biggen op VIC Sterksel werden experimenten uitgevoerd naar de aanwezigheid van *S. suis* in het maagdarmkanaal van de biggen.

De resultaten van dit onderzoek tonen aan dat *S. suis* aanwezig is in het maagdarmkanaal van biggen van VIC Sterksel. In de monsters van de maag, dunne darm en faeces van deze biggen werd *S. suis* aangetoond. *S. suis* werd het meest frequent aangetoond in de dunne darm (zowel inhoud, mucus als darmwand) en minder in de maaginhoud en faeces. Zowel bij zieke biggen met een *S. suis* infectie als bij gezonde biggen was *S. suis* aanwezig in de dunne darm. Met deze bevinding is de onderzoeksvraag naar aanwezigheid van *S. suis* in de darm bevestigend beantwoord. Vanuit de literatuur zijn er meerdere aanwijzingen dat *S. suis* voorkomt in de darm (Devriese et al., 1994; Su et al., 2008). De resultaten verkregen in deze studie bevestigen deze bevindingen.

Op monsters uit het ileum werden het meest frequent PCR-positieve resultaten verkregen, 22 van de 104 onderzochte monsters uit inhoud, mucuslaag of darmwand waren positief. Echter, de verschillen met jejunum (19 van de 104) en duodenum (13 van de 104) waren niet groot zodat er geen conclusie getrokken kan worden over een duidelijke voorkeurslocatie voor *S. suis* in de dunne darm. Su et al. (2008) toonden ook de aanwezigheid aan van *S. suis* in het jejunum en ileum van biggen na spenen. Experimenten naar aanwezigheid van *S. suis* in het duodenum werden echter niet uitgevoerd.

PCR positieve resultaten voor *S. suis* serotype 1, 2^{EF+}, 7 of 9 werden ook verkregen op maaginhoud van de onderzochte biggen (5 van de 9). Su et al. (2008) toonden ook *S. suis* aan in de maag.

Uit de klinisch zieke biggen werden de *S. suis* serotypes 1, 2 en 9 geïsoleerd. Uit de PCR resultaten bleek dat deze serotypes ook voorkomen op de tonsil en in het maagdarmkanaal. Het lijkt er dus op dat de resultaten van de PCRs op de tonsillen en het maagdarmkanaal overeenkomen met het bacteriologisch onderzoek van de organen. Deze conclusie dient nog bevestigd te worden omdat binnen de serotypes van *S. suis* meerdere genotypes kunnen voorkomen. In een vervolgonderzoek zullen daarom *S. suis* stammen geïsoleerd moeten worden uit darmmateriaal en uit de tonsillen en vervolgens met genotyperingstechnieken vergeleken worden met de *S. suis* stammen uit de organen van de *S. suis* geïnfecteerde biggen.

De gebruikte PCR testen zijn gevalideerd om *S. suis* aan te tonen op tonsilmonsters van biggen (Wisselink et al., 2002). In dit onderzoek zijn de PCR testen gebruikt op verschillende monsters uit het maagdarmkanaal zonder dat er een validatie heeft plaatsgevonden. Met name van faeces is bekend dat met de DNA isolatie er ook remmende stoffen uit de faeces kunnen worden geïsoleerd die de werking van het DNA polymerase enzym remmen. Dit verklaart wellicht ook de aspecifieke resultaten met de serotype 1 en 2/EF PCR op faeces van de gezonde biggen. Ook zijn er weinig faecesmonsters positief op *S. suis* in de PCR testen. Dat

kan er aan liggen dat er inderdaad weinig *S. suis* in de faeces aanwezig is, het kan ook zijn dat de PCR reacties geremd worden. Er zijn dus aanvullende experimenten nodig om de specificiteit van de PCR testen op faeces te verhogen en te valideren.

Uit de klinisch zieke biggen werden drie verschillende serotypes (1, 2 en 9) geïsoleerd. Op de tonsillen en in de darm werden deze serotypes ook gevonden. Daarnaast werd serotype 7 bij 2 biggen in de darm gevonden. Eerder was ook al gevonden dat meerdere serotypes kunnen zorgen voor *S.suis* infecties op bedrijven en dat meerdere serotypes voorkomen op de tonsillen van biggen (Reams et al., 1996; Wisselink et al., 2002). Het voorkomen van meerdere serotypes tekent de complexiteit van *S. suis* infecties op bedrijven en maakt het lastig om ze te bestrijden. Er zal een generieke aanpak nodig zijn waarbij de aandacht niet naar één serotype uitgaat maar naar alle serotypes die ziekte en sterfte kunnen veroorzaken.

Geconcludeerd kan worden dat *S. suis* voorkomt in het maagdarmkanaal van biggen op VIC Sterksel. Met deze bevinding is de onderzoeksvraag naar aanwezigheid van *S. suis* in de darm bevestigend beantwoord.

Literatuur

Devriese LA, Homme J, Pot B, Haesebrouck F. 1994. Identification and composition of the streptococcal and enterococcal flora of tonsils, intestines and faeces of pigs. J Appl Bacteriol. 77:31-36.

Madsen LW, Bak H, Nielsen B, Jensen HE, Aalbaek B, Riising HJ, 2002, Bacterial colonization and invasion in pigs experimentally exposed to *Streptococcus suis* serotype 2 in aerosol. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 49:211-215.

Reams, R. Y., D. D. Harrington, L. T. Glickman, H. L. Thacker, T. L. Bowersock, 1996, Multiple serotypes and strains of *Streptococcus suis* in naturally infected swine herds. J. Vet. Diagn. Investig. 8:119–121.

Su Y, Yao W, Perez-Gutierrez ON, Smidt H, Zhu WY, 2008, Changes in abundance of *Lactobacillus* spp. and *Streptococcus suis* in the stomach, jejunum and ileum of piglets after weaning. FEMS Microbiol Ecol. 66:546-555.

Swildens, B., Stockhofe-Zurwieden, N., van der Meulen, J., Wisselink, H.J., Nielen, M., Niewold, T.A., 2004, Intestinal translocation of *Streptococcus suis* type 2 EF+ in pigs. Vet Microbiol 103, 29-33.

Van der Peet-Schwering, C.M.C., Binnendijk, G.P., Dirx-Kuijken, N., Raymakers, R. en Lamers, J., 2008, Beheersing van *Streptococcus suis* bij gespeende biggen door managementmaatregelen. Rapport 119, Wageningen UR Livestock Research, Lelystad.

Van der Peet-Schwering, C.M.C., Dirx-Kuijken, N., Binnendijk, G.P., Raymakers, R., 2011, Invloed van kunstmelk en voersamenstelling na spenen op energieopname en *Streptococcus suis* infecties bij biggen. Rapport 529, Wageningen UR Livestock Research, Lelystad.

Vecht, U., Wisselink, H. J., van Dijk, J. E., Smith, H. E., 1992, Virulence of *Streptococcus suis* type 2 strains in newborn germfree pigs depends on phenotype. Infect. Immun. 60, 550-556.

Wisselink, H.J., Joosten, J.J., Smith, H.E., 2002, Multiplex PCR assays for simultaneous detection of six major serotypes and two virulence-associated phenotypes of *Streptococcus suis* in tonsillar specimens from pigs. J Clin Microbiol 40, 2922-2929.

Wisselink, H.J., Reek, F.H., Vecht, U., Stockhofe-Zurwieden, N., Smits, M.A., Smith, H.E., 1999, Detection of virulent strains of *Streptococcus suis* type 2 and highly virulent strains of *Streptococcus suis* type 1 in tonsillar specimens of pigs by PCR. Vet Microbiol 67, 143-157.