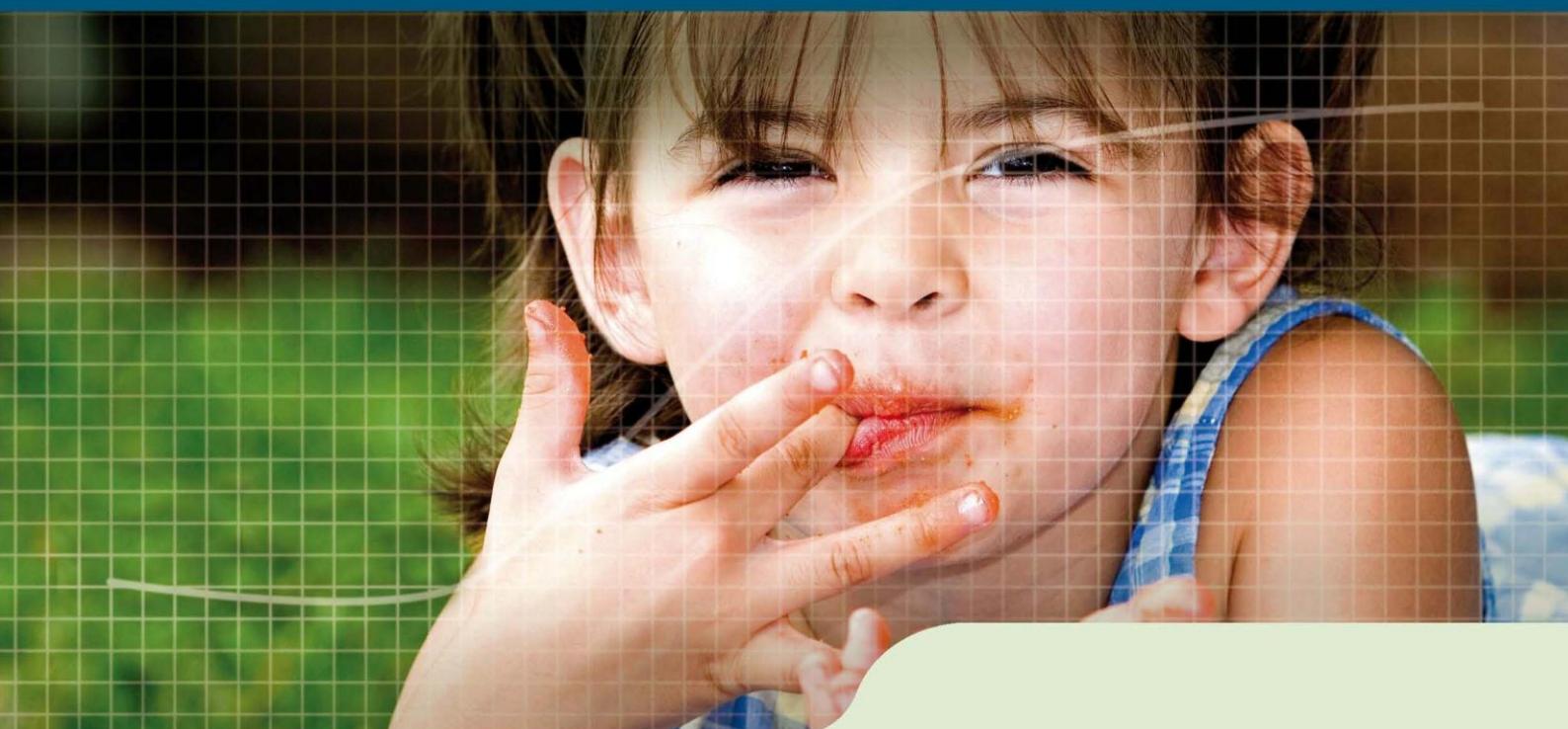


# Wageningen UR Livestock Research

*Partner in livestock innovations*



Rapport 760

Literatuurstudie en *in vitro* onderzoek naar antibacteriële werking van voeradditieven ter vermindering van de *Streptococcus suis* problematiek

Maart 2014



**LIVESTOCK RESEARCH**  
**WAGENINGEN UR**



LIVESTOCK RESEARCH

WAGENINGEN UR

### Colofon

#### Uitgever

Wageningen UR Livestock Research  
Postbus 65, 8200 AB Lelystad  
Telefoon 0320 - 238238  
Fax 0320 - 238050  
E-mail [info.livestockresearch@wur.nl](mailto:info.livestockresearch@wur.nl)  
Internet <http://www.livestockresearch.wur.nl>

#### Redactie

Communication Services

#### Copyright

© Wageningen UR Livestock Research, onderdeel  
van Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek,  
2014

Overname van de inhoud is toegestaan,  
mits met duidelijke bronvermelding.

#### Aansprakelijkheid

Wageningen UR Livestock Research aanvaardt  
geen aansprakelijkheid voor eventuele schade  
voortvloeiend uit het gebruik van de resultaten van  
dit onderzoek of de toepassing van de adviezen.

Wageningen UR Livestock Research en Central  
Veterinary Institute, beiden onderdeel van Stichting  
Dienst Landbouwkundig Onderzoek vormen samen  
met het Departement Dierwetenschappen van  
Wageningen University de Animal Sciences Group  
van Wageningen UR (University & Research  
centre).

Losse nummers zijn te verkrijgen via de website.



De certificering volgens ISO 9001 door DNV  
onderstreept ons kwaliteitsniveau. Op al onze  
onderzoeksoopdrachten zijn de Algemene  
Voorwaarden van de Animal Sciences Group  
van toepassing. Deze zijn gedeponeerd bij de  
Arrondissementsrechtbank Zwolle.

### Abstract

Three feed additives were assayed for their  
antibacterial activity against *Streptococcus suis*.  
All three were able to kill *S. suis* efficiently.

### Keywords

*Streptococcus suis*, cinnamon, lauric acid,  
monolaurate

### Referaat

ISSN 1570 - 8616

### Auteur(s)

H.E. Smith (CVI)  
A. de Greeff (CVI)  
I. Faber (GD)  
C.M.C. van der Peet-Schwering  
M. Kluivers  
L.M.P. Troquet

### Titel

Literatuurstudie en in vitro onderzoek naar  
antibacteriële werking van voeradditieven ter  
vermindering van de *Streptococcus suis*  
problematiek

Rapport 760

### Samenvatting

De antibacteriële werking van drie  
voeradditieven op *Streptococcus suis* is getest  
in *in vitro* onderzoek. Het blijkt dat alle drie de  
geteste voeradditieven *S. suis* kunnen doden.

### Trefwoorden

*Streptococcus suis*, kaneel, laurinezuur,  
monolauraat

Rapport 760

# Literatuurstudie en *in vitro* onderzoek naar antibacteriële werking van voeradditieven ter vermindering van de *Streptococcus suis* problematiek

## Desk study and *in vitro* analysis of antibacterial effects of feed additives to reduce *Streptococcus suis* in the field

H.E. Smith (CVI)

A. de Greeff (CVI)

I. Faber (GD)

C.M.C. van der Peet-Schwering

M. KLuivers

L.M.P. Troquet

Maart 2014



Ministerie van Economische Zaken



**Dit onderzoek is uitgevoerd in opdracht van het Productschap Vee en Vlees en het Ministerie van Economische Zaken binnen de PPS Samenwerkende Varkenshouderijketen projectnummer BO 22.04-001-002.**

## Voorwoord

Het onderzoek “Literatuurstudie en *in vitro* onderzoek naar antibacteriële werking van voeradditieven ter vermindering van de *Streptococcus suis* problematiek” is uitgevoerd in opdracht van het Productschap Vee en Vlees en het Ministerie van Economische Zaken binnen de PPS Samenwerkende Varkenshouderijketen. De auteurs bedanken de opdrachtgevers voor de financiële ondersteuning van het onderzoek.

Het onderzoek is begeleid door een begeleidingscommissie die bestaat uit afgevaardigden van het PVV, ministerie EZ, LTO, NVV en de KNMvD. De auteurs bedanken de leden van de begeleidingscommissie voor hun constructieve en waardevolle inhoudelijke bijdrage aan het onderzoek.

Carola van der Peet-Schwering  
Projectleider



## Samenvatting

In opdracht van het Productschap Vee en Vlees en het ministerie van Economische Zaken is een literatuurstudie uitgevoerd naar voeradditieven waarvan beschreven is dat zij een direct bacteriedodend effect hebben, bij voorkeur tegen *Streptococcus suis*. De top 5 voeradditieven die uit deze studie naar voren kwamen, te weten oregano, knoflook, kaneel, laurinezuur en monolauraat, zijn vervolgens *in vitro* getest op de bacteriedodende werking tegen verschillende *S. suis* stammen van serotype 2 en 9.

De belangrijkste conclusies uit het onderzoek zijn:

- De drie geteste voeradditieven (kaneel, laurinezuur, glycerol monolauraat) hebben alle drie een bacteriedodende werking tegen verschillende *S. suis* isolaten van serotype 2 en 9 *in vitro*.
- De bacteriedodende werking van laurinezuur en GML wordt sterker als beide stoffen gecombineerd worden.
- Knoflook en oregano konden in deze studie door technische problemen (verontreiniging met schimmels en silica-zand als drager) niet getest worden. Uit de literatuurstudie kwamen deze stoffen wel als zeer veelbelovend uit.

Overall conclusie uit het onderzoek is dat de drie geteste voeradditieven *in vitro* *S. suis* af kunnen doden en daarmee interessante kandidaten zijn om in de praktijk te testen. Of dit ook geldt voor knoflook en oregano zou in een vervolg *in vitro* experiment bepaald moeten worden.





## Summary

By order of the Dutch Product Board for Livestock and Meat and the Ministry of Economic Affairs, a desktop study was performed to select feed additives with a described direct antibacterial effect, preferably against *Streptococcus suis*. The 5 most effective feed additives (oregano, garlic, cinnamon, lauric acid and monolaurate) were subsequently tested *in vitro* on their antibacterial effect against different *S. suis* strains of serotype 2 and 9.

The most important conclusions of the experiment are:

- *In vitro* three additives (cinnamon, lauric acid and glycerol monolaurate) were able to efficiently kill various *S. suis* isolates and serotypes.
- A combination of lauric acid and glycerol monolaurate was more effective compared to the individual additives.
- For technical reasons (microbiological contaminations; silica as a carrier) we were unable to test the antibacterial effects of garlic and oregano.

The research showed that the three additives tested in this study were able to efficiently kill *S. suis in vitro*, indicating that these additives could be promising candidates to test *in vivo* in the future. Whether garlic and oregano could be attractive candidates as well, has to be determined *in vitro*.



# Inhoudsopgave

Voorwoord

Samenvatting

Summary

|          |                                                                  |          |
|----------|------------------------------------------------------------------|----------|
| <b>1</b> | <b>Inleiding .....</b>                                           | <b>1</b> |
| <b>2</b> | <b>Materiaal en methode .....</b>                                | <b>2</b> |
| 2.1      | Literatuurstudie .....                                           | 2        |
| 2.2      | Additieven .....                                                 | 2        |
| 2.3      | Streptococcus suis isolaten .....                                | 3        |
| 2.4      | <i>In vitro</i> test bacteriedodende werking voeradditieven..... | 3        |
| <b>3</b> | <b>Resultaten &amp; Discussie .....</b>                          | <b>4</b> |
| 3.1      | Literatuurstudie .....                                           | 4        |
| 3.2      | <i>In vitro</i> onderzoek.....                                   | 5        |
| <b>4</b> | <b>Conclusies .....</b>                                          | <b>7</b> |
|          | <b>Literatuur .....</b>                                          | <b>8</b> |



## 1 Inleiding

Er zijn nog veel vragen rondom de pathogenese van *Streptococcus suis* (*S. suis*) infecties bij varkens. De vraag waarom de ene big wel en de andere niet gekoloniseerd wordt blijft tot op heden onbeantwoord. De infectie omvat een complex proces waarbij de gastheer, bacteriële en omgevingsfactoren een belangrijke rol spelen. De voornaamste beschreven infectieroute is via de tonsillen, maar ook translocatie via de darm is beschreven als een mogelijke route van infectie. Via deze laatste route kunnen mogelijk voedingsmaatregelen en voeradditieven als interventiestrategie ingezet worden. Op dit moment worden in de varkenshouderij voeradditieven veelvuldig ingezet om de *S. suis* problematiek te verminderen. Op sommige bedrijven lijkt het gebruik van voeradditieven een effect te hebben (vermindering van *S. suis* gerelateerde problematiek), op andere bedrijven niet. Vaak ontbreekt een duidelijke onderbouwing over het mogelijk te verwachten effect van deze additieven. Voeeradditieven zouden een *direct* effect kunnen hebben door bacteriën te doden. De directe effectiviteit van verschillende additieven op *S. suis* serotype 2 en 9 is niet eerder *in vitro* onderzocht. Een andere manier waarop voeradditieven kunnen werken is door het ziekmakende vermogen van de bacterie te veranderen. Bijvoorbeeld door de factoren die belangrijk zijn voor dit ziekmakende vermogen minder tot expressie te brengen. Hierbij kan gedacht worden aan adhesiefactoren die zorgen dat de bacterie aan de varkenscellen 'plakt'. Daarnaast zou er ook een *indirect* effect van voeradditieven kunnen zijn. Voeeradditieven kunnen bijvoorbeeld de darmflora veranderen, waardoor *S. suis* minder makkelijk kan koloniseren ("aanslaan") in de darm. Daarnaast kunnen voeradditieven de weerstand van het dier direct of indirect veranderen, waardoor de dieren minder snel ziek worden van *S. suis*.

Het doel van dit onderzoek is tweeledig:

1. Selecteren van de vijf meest veelbelovende voeradditieven wat betreft het verminderen van *S. suis* problematiek.
2. De directe werking van de geselecteerde voeradditieven op *S. suis* *in vitro* onderzoeken.

## 2 Materiaal en methode

### 2.1 Literatuurstudie

Bij het uitvoeren van de literatuurstudie was het uitgangspunt dat de beschreven additieven/producten een direct (bacteriedodend) effect hebben op *S. suis*. Stoffen die middels een indirecte route een positief effect kunnen hebben (bijv. immuun modulerende stoffen of stoffen die de samenstelling van de microbiota kunnen beïnvloeden) zijn buiten beschouwing gelaten. Bij de uiteindelijke selectie van de voeradditieven voor het *in vitro* onderzoek was het een vereiste dat de producten commercieel te verkrijgen zijn en dat ze via het voer of drinkwater toegediend kunnen worden.

Binnen dit onderzoek luidt de definitie van de term “additief” als volgt: een toevoegingsmiddel dat aan biggenvoeders kan worden toegevoegd met als functie om direct effect uit te oefenen op bacteriën.

### 2.2 Additieven

De volgende additieven zijn geselecteerd voor het *in vitro* onderzoek: knoflookpoeder; kaneel (33% freeze dried cinnamon); oregano (50% oregano, drager silica); laurinezuur en glycerol monolauraat (GML90). Omdat uit literatuurgegevens voor *Streptococcus pyogenes* (Batovska, et al., 2009) blijkt dat laurinezuur en glycerol monolauraat in combinatie effectiever zouden zijn dan de afzonderlijke componenten, zijn ook combinaties van deze twee additieven *in vitro* getest. Om de bacteriedodende werking van voeradditieven te testen, moet het additief zelf steriel zijn (anders verstoren deze micro-organismen de test). Daarom zijn alle additieven in eerste instantie opgelost in 100% alcohol en hierin 1 tot 3 uur geïncubeerd om eventueel aanwezige micro-organismen af te doden. Uit het eerste pilot experiment (niet beschreven) bleek dat de werkzame concentraties, waarbij het product een bacteriedodende werking heeft, van de additieven van elkaar verschilden. Daarom verschillen de concentraties van de oplossingen van de additieven van elkaar zoals hieronder beschreven.

#### Knoflook

Knoflook loste in een concentratie van 250 mg ml<sup>-1</sup> niet op in de alcohol, het bleef een suspensie. Daarnaast bleek de incubatie in alcohol niet voldoende om de aanwezige micro-organismen in knoflook af te doden. Het bleek niet mogelijk om een micro-organisme vrije knoflook oplossing te verkrijgen. Omdat de aanwezige micro-organismen in de knoflook sneller zullen groeien dan de *S. suis*, was het niet mogelijk om het knoflookpreparaat te testen in het *in vitro* onderzoek. Daarom is knoflook niet meegenomen in dit onderzoek.

#### Oregano:

Oregano was gekoppeld aan een silica-dager, waardoor in geen enkele vloeistof een oplossing te maken was. Het silica-zand zakte onmiddellijk uit. Hierdoor was het niet mogelijk oregano mee te nemen in de *in vitro* test.

#### Kaneel:

Kaneel loste in een concentratie van 250 mg ml<sup>-1</sup> niet op in de alcohol, het bleef een suspensie. Deze suspensie werd voor de *in vitro* test verder verdund in Todd Hewitt broth (THB) tot 62,5 mg ml<sup>-1</sup> THB. De THB – kaneel bleef een melkachtige suspensie die goed te gebruiken was in de *in vitro* test.

#### Laurinezuur:

Laurinezuur was oplosbaar in alcohol, de concentratie was 51 mg ml<sup>-1</sup>, deze oplossing werd vervolgens verdund in THB tot 12,75 mg ml<sup>-1</sup> voor de *in vitro* test.

#### Glycerol monolauraat (GML):

GML was oplosbaar in alcohol, de concentratie was 51,2 mg ml<sup>-1</sup>, deze oplossing werd verder verdund in THB tot 512 µg ml<sup>-1</sup> voor de *in vitro* test.

#### Combinatie laurinezuur / GML:

Om de combinatie van laurinezuur en GML te testen werden de uitgangsverdunningen van beide stoffen in verschillende verhoudingen met elkaar gemengd:

70% laurinezuur / 30% GML

50% laurinezuur / 50% GML

40% laurinezuur / 60% GML

30% laurinezuur / 70% GML

## 2.3 Streptococcus suis isolaten

Er zijn *S. suis* serotype 2 en 9 isolaten met verschillende eigenschappen gebruikt om de bacteriedodende werking van de additieven te testen. Dit omdat infectie en kolonisatie *in vivo* afhankelijk kan zijn van stamverschillen.

Er zijn drie virulente (MRP en EF positieve) serotype 2 stammen gebruikt (10, P1/7, 3), één avirulente (MRP en EF negatieve) serotype 2 stam (T15) en één zwak virulente (MRP positieve en EF<sup>+</sup> stam) serotype 2 stam (S735).

Voor serotype 9 is de avirulente referentiestam gebruikt (5218), een virulent isolaat (8067), twee stammen die geïsoleerd zijn uit een veldstudie (21903, 21995) en één stam die geïsoleerd is op VIC Sterksel in het kader van de studie 'Effect van geboortegewicht en voeropname voor spenen op het aantal biggen met *Streptococcus suis* verschijnselen' (FF4667).

Alle stammen zijn genetisch gekarakteriseerd (de Greeff, 2011), m.u.v. 21903, 21995 en FF4667.

Alle *S. suis* isolaten werden overnacht gegroeid in 90 ml Todd Hewitt broth (THB). Tien ml van de overnachtcultures werd verdund in 90 ml warme THB en gegroeid tot een OD<sub>600nm</sub> van 0.5. Voor gebruik werden de cultures nogmaals 100 x verdund in THB. Honderd µl van deze cultures werd gebruikt om de bacteriedodende werking van de verschillende additieven te bepalen.

## 2.4 In vitro test bacteriedodende werking voeradditieven

Om de bacteriedodende werking van additieven te bepalen wordt in een *in vitro* getest gekeken bij welke concentratie van het additief géén groei meer optreedt van *S. suis*. Om dit te meten, wordt de oplossing van het voeradditief in THB in 2-voudige stappen verdund. Dit wordt gedaan in een 96-wells microtiter plaat. Aan alle wells werd vervolgens 100 µl *S. suis* culture toegevoegd. De cultures werden overnacht gegroeid bij 37°C. De volgende ochtend werd gekeken in welke concentratie van het voeradditief nog groei van *S. suis* mogelijk was door alle wells uit te platen op een Columbia agar plaat waaraan 6 % paardenbloed was toegevoegd. Deze plaat werd overnacht gegroeid bij 37°C. Hierna werd afgelezen in welke concentratie van de additieven *S. suis* gegroeid had.

De laagste concentratie van het voeradditief waarbij totaal geen groei van *S. suis* meer optreedt, wordt de minimale bacterie dodende concentratie (MBC) genoemd. Dit is een maat voor de bacteriedodende capaciteit van het additief.

De volgende concentraties van de verschillende additieven zijn getest:

Kaneel: 5.000, 2.500, 1.250, 625, 312, 156, 78 en 39 µg ml<sup>-1</sup> in THB

Laurinezuur: 5.120, 2.560, 1.280, 640, 320, 160 en 80 µg ml<sup>-1</sup> in THB

GML: 256, 128, 64, 32, 16, 8 en 4 µg ml<sup>-1</sup> in THB.

Voor ieder *S. suis* isolaat werd een aantal positieve en negatieve controles meegenomen. De positieve controle bestond uit THB als controle op groei van *S. suis* zonder toevoegingen. De negatieve controle bestond uit THB met daarin een antibioticum (Spectinomycine) waar *S. suis* gevoelig voor is, als controle op groeiremming. Verder werd een controle meegenomen van THB met daarin de concentratie alcohol zoals die aanwezig is in de hoogste concentratie voeradditieven (14% alcohol) ten gevolg van de bereidingswijze van de additieven oplossingen om te controleren of *S. suis* daar nog in kon groeien.

### 3 Resultaten & Discussie

#### 3.1 Literatuurstudie

Het verstrekken van zuren via het voer of drinkwater wordt veel toegepast als onderdeel van de bestrijding van (pathogene) bacteriën, waaronder met name *E. coli* en *Salmonella*. De effectiviteit van organische zuren berust op meerdere werkingsmechanismen, waaronder verlaging van de pH in de maag en het bacteriedodend effect van het zuur. Algemeen wordt aangenomen dat organische kortketenvetzuren (KKVZ) met name een antibacteriële werking hebben tegen Gram negatieve bacteriën. Bij Gram positieve bacterie, waaronder de *S. suis*, is er minder antibacterieel effect te verwachten van de organische kortketenvetzuren. Dit verschil is mogelijk toe te schrijven aan het verschil in celwandstructuur tussen beide groepen bacteriën.

In de literatuur worden vetzuren beschreven als actieve (antibacteriële) stoffen (Desbois and Smith, 2010). Met name de middenketenvetzuren laurinezuur en monolauraat lijken direct effect te hebben op gram positieve bacteriën waaronder *Streptococcus* soorten (Kabara et al., 1972; Kabara, 1984; Batovska et al., 2009). Synergie tussen de middenketenvetzuren caprine en lauraat wordt ook beschreven door Batovska et al. (2009). Daarnaast zijn etherische oliën bekende remmers van micro-organismen (Burt, 2004). Cinnamon (kaneel) is wellicht een van de oudst beschreven plantaardige “medicijnen”. Chaudhari et al. (2012) heeft aangetoond dat cinnamon olie de groei remt van *Streptococcus mutans* door directe effecten op de celmembraan van de bacterie. Daarnaast lijkt oregano, met daarin carvacrol en thymol als gesuggereerde werkzame stoffen, bacteriegroei te remmen en/of bacteriën te doden. Het werkingsmechanisme berust op het directe effect van de componenten op de celmembraan van de bacterie: de celmembraan degradeert, waardoor de cel inhoud naar buiten “lekt” (Mellencamp et al., 2011). Knoflook lijkt ook een breed antibacterieel spectrum te bevatten (Ankri and Mirelmann, 1999). Het inzetten van immuun modulerende producten wordt ook genoemd bij de beheersing van *S. suis*. Deze laatstgenoemde kunnen het immuunsysteem beïnvloeden, de samenstelling van de microbiota in de darm veranderen of adhesie voorkomen. Kopersulfaat en zinkoxide dragen ook indirect bij aan het verbeteren van onder andere de microbiota in de darm en de immuunrespons waardoor er mogelijk minder bacteriële darmproblemen gezien worden. Echter, de toegestane hoeveelheid in voer van zowel koper als zink is aan een wettelijk maximum gebonden. Daarom worden koper en zink niet meegenomen in dit onderzoek. Een overzicht van de genoemde stoffen en effecten zijn weergegeven in Tabel 1.

**Tabel 1.** Effectiviteit en werkingsmechanisme van additieven die een direct effect hebben op *S. suis*.

| Product/<br>Werkzame stof       | Direct effect op<br><i>S. suis</i> | Werkingsmechanisme                                                       |
|---------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| Organische zuren                | -                                  | pH verlagen milieu<br>bacteriedodend                                     |
| Vetzuren (MKVZ)                 | +++                                | aantasting permeabiliteit celwand                                        |
| Oregano<br>(carvacrol / thymol) | ++                                 | divers: waaronder antibacterieel (aantasting<br>permeabiliteit celwand?) |
| Knoflook                        | ++                                 | divers, waaronder remt groei bacteriën/<br>bacteriedodend                |
| Kaneel                          | +                                  | divers, waaronder remt groei bacteriën/<br>bacteriedodend                |
| Immuun modulerende<br>stoffen   | -                                  | immuunsysteem, verandering darmflora<br>voorkomen adhesie                |
| Koper en zink                   | ++                                 | remt groei bacteriën                                                     |

Voor het *in vitro* onderzoek zijn de producten/ werkzame stoffen geselecteerd waarvan een direct effect verwacht wordt op *S. suis*. De volgende producten zijn geselecteerd: oregano, laurinezuur, glycerol monolauraat, kaneel en knoflook. Omdat uit literatuurgegevens voor *Streptococcus pyogenes* (Batovska et al., 2009) blijkt dat laurinezuur en glycerol monolauraat in combinatie effectiever zouden zijn dan de afzonderlijke componenten, zijn ook combinaties van deze twee additieven *in vitro* getest.



### 3.2 *In vitro* onderzoek

De resultaten laten zien dat alle geteste stoffen een bacteriedodende werking hebben tegen *S. suis*, maar dat de potentie van de additieven wel verschilt (Tabel 2). Dit blijkt uit het grote verschil in MBC waarden tussen de additieven. Zo werd voor kaneel een veel hogere MBC waarde gevonden ( $1.250 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) dan voor laurinezuur ( $640 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) en GML ( $32 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). Dit geeft aan dat kaneel in de geteste formulering een minder sterke bacteriedodende werking heeft dan de beide andere stoffen, er is meer kaneel nodig voor een bacteriedodend effect. De formulering die hier is getest, bevatte echter geen 100% maar 33% kaneel en daarnaast 33% maltodextrine en 33% tapioca zetmeel. Dit kan de resultaten vertekenen. De MBC waarde van kaneel wordt nu op  $1.250 \mu\text{g ml}^{-1}$  vastgesteld met een additief dat maar voor 33% uit kaneel bestaat. Dat zou kunnen betekenen dat de daadwerkelijk MBC van kaneel op 1/3 van die waarde ligt, rond de  $400 \mu\text{g ml}^{-1}$ . In dat geval heeft kaneel een werking die in dezelfde range ligt als de andere twee additieven.

De MBC waarden waren bij alle additieven gelijk voor alle geteste *S. suis* stammen, zowel van serotype 2 als serotype 9. Alleen voor kaneel werd een verschil in MBC waarde gezien (tussen 2.500 en  $1.250 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) tussen stammen. Twee van de geteste serotype 9 stammen leken wat ongevoeliger voor kaneel en hadden daardoor een hogere MBC waarde.

De MBC waarde in Tabel 2 geeft de minimale concentratie weer die in de big op darmniveau bereikt moet worden voor een bacterie dodend effect. Om deze minimale concentratie op darmniveau te bereiken zal een hogere concentratie in het voer nodig zijn. Hoeveel toegevoegd moet worden aan het voer hangt van meerdere factoren af. Vetzuren zullen over het algemeen de maag passeren en worden opgenomen in de dunne darm. Plantaardige stoffen daarentegen, zijn vaak combinaties van diverse componenten. Indien componenten in de maag al (gedeeltelijk) worden opgenomen zal een hogere concentratie nodig zijn om werkzame concentraties in de darm te bereiken. Etherische oliën worden naar verwachting snel in het lichaam opgenomen. De commerciële doseringen van etherische oliën zijn daarom vaak laag. De antibacteriële effecten (afdeling of groeiremming) van plantaardige stoffen zijn *in vitro* aangetoond. Het is nog niet geheel duidelijk waar het antibacteriële effect van plantaardige stoffen *in vivo* aan toe te schrijven is. Synergetische effecten worden wel beschreven wanneer etherische oliën in combinatie met organische zuren of middenketenvetzuren worden verstrekt.

De hoeveelheid die aan het voer toegevoegd moet worden, zal vastgesteld moeten worden in een dosis respons proef. Voor de start van de dosis respons proeven moet eerst op basis van de literatuur ingeschat worden hoeveel er toegevoegd moet worden aan het voer.

**Tabel 2.** MBC waarden ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) van voeradditieven gemeten op verschillende *S. suis* isolaten.

| <b>MBC (<math>\mu\text{g/ml}</math>) voor <i>S. suis</i> serotype 2 isolaten</b> |             |             |              |              |               |
|----------------------------------------------------------------------------------|-------------|-------------|--------------|--------------|---------------|
|                                                                                  | <b>10</b>   | <b>3</b>    | <b>P1/7</b>  | <b>S735</b>  | <b>T15</b>    |
| Laurinezuur                                                                      | 640         | 640         | 640          | 640          | 640           |
| Glycerol monolauraat                                                             | 32          | 32          | 32           | 32           | 32            |
| Kaneel                                                                           | 1.250       | 1.250       | 1.250        | 1.250        | 1.250         |
| <b>MBC (<math>\mu\text{g/ml}</math>) voor <i>S. suis</i> serotype 9 isolaten</b> |             |             |              |              |               |
|                                                                                  | <b>5218</b> | <b>8067</b> | <b>21995</b> | <b>21903</b> | <b>FF4667</b> |
| Laurinezuur                                                                      | 640         | 640         | 640          | 640          | 640           |
| Glycerol monolauraat                                                             | 32          | 32          | 32           | 32           | 32            |
| Kaneel                                                                           | 2.500       | 2.500       | 1.250        | 1.250        | 1.250         |

Uit de literatuur bleek dat de combinatie van laurinezuur en GML voor *Streptococcus pyogenes* beter werkt dan de afzonderlijke componenten. Daarom is in deze studie ook gekeken naar het bacteriedodende effect van verschillende verhoudingen van laurinezuur en GML op *S. suis* (Tabel 3). Hieruit blijkt dat de combinatie van laurinezuur en GML in verschillende verhoudingen over het algemeen een sterker bacteriedodend effect op de *S. suis* isolaten heeft dan de afzonderlijke stoffen. De MBC waarden van zowel laurinezuur als van GML waren lager als de stoffen in combinatie werden gebruikt dan wanneer ze afzonderlijk werden gebruikt (een lagere MBC waarde betekent dat met minder additief de bacterie reeds gedood wordt).

**Tabel 3.** MBC waarden ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) van verschillende laurinezuur/ glycerol monolauraat verhoudingen voor een geselecteerd aantal *S. suis* isolaten.

|                     | <b>70/30</b> | <b>50/50</b> | <b>40/60</b> | <b>30/70</b> |
|---------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Serotype 2 (10)     | 448/9,5      | 320/16       | 259/19       | 192/22,5     |
| Serotype 2 (T15)    | 448/9,5      | 320/16       | 259/19       | 192/22,5     |
| Serotype 9 (5218)   | 448/9,5      | 640/32       | 512/38       | 384/45       |
| Serotype 9 (FF4667) | 448/9,5      | 320/16       | 259/19       | 192/22,5     |

Voor de 70/30 verhouding van laurinezuur en GML was dit het geval voor alle geteste isolaten (zowel serotype 2 als serotype 9 isolaten). In de andere verhoudingen werd de MBC waarde voor de meeste isolaten ook lager, maar vormde het *S. suis* serotype 9 isolaat 5218 hierop een uitzondering. Voor dit isolaat waren de MBC waarden gelijk of iets hoger voor GML dan in de afzonderlijke test. Het isolaat 5218 is de referentiestam van serotype 9, die lang geleden van de tonsil van een gezonde big is geïsoleerd. Uit genetische typering van deze stam blijkt dat hij ook genetisch anders is dan de serotype 9 stammen die recenter zijn geïsoleerd uit zieke biggen (de Greeff et al, 2011). Dat zou kunnen verklaren waarom deze stam een uitbijter is. Het isolaat dat recent in 2013 geïsoleerd is op VIC Sterksel (FF4667) uit een ziek dier is wel gevoeliger voor de combinatie van laurinezuur en GML in alle verhoudingen. Om er zeker van te zijn dat de getrokken conclusies gelden voor alle serotype 2 en 9 isolaten zouden er meer stammen moeten worden onderzocht.

## 4 Conclusies

- De drie geteste voeradditieven (kaneel, laurinezuur, glycerol monolauraat) hebben alle drie een bacteriedodende werking tegen verschillende *S. suis* isolaten van serotype 2 en 9 *in vitro*.
- De bacteriedodende werking van laurinezuur en GML wordt sterker als beide stoffen gecombineerd worden.
- Knoflook en oregano konden in deze studie door technische problemen (verontreiniging met schimmels en silica-zand als drager) niet getest worden. Uit de literatuurstudie kwamen deze stoffen wel als zeer veelbelovend uit.

Overall conclusie uit het onderzoek is dat de drie geteste voeradditieven *in vitro* *S. suis* af kunnen doden en daarmee interessante kandidaten zijn om in de praktijk te testen. Of dit ook geldt voor knoflook en oregano zou in een vervolg *in vitro* experiment bepaald moeten worden.

## Literatuur

Ankri S, Mirelmann D. (1999) Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes and Infection* 2:125-129.

Batovska DI, Todorova IT, Tsvetkova IV, Najdenski HM. (2009) Antibacterial study of the medium chain fatty acids and their 1-monoglycerides: individual effects and synergistic relationships. *Pol J Microbiol.* 8:43-7.

Burt S. (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. *Int. J of Food Microbiology* 94: 223-253.

Chaudhari LK, Jawale BA, Sharma S, Sharma H, Kumar CD, Kulkarni PA. (2012) Antimicrobial activity of commercially available essential oils against *Streptococcus mutans*. *J Contemp Dent Pract.* 1;13(1):71-4.

De Greeff A, Wisselink HJ, de Bree FM, Schultsz C, Baums CG. (2011) Genetic diversity of *Streptococcus suis* isolates as determined by comparative genome hybridization. *BMC Microbiol* 11: 161.

Desbois AP, Smith VJ. (2010) Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 85: 1629-1642

Kabara JJ, Swieczkowski DM, Conley AJ, Truant JP (1972) Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 2(1):23-8.

Kabara JJ (1984) Inhibition of *Staphylococcus aureus* in a model agar- meat system by monolaurin. *J. Food Safety* 6: 197-201.

Mellencamp MA, Koppien-Fox J, Lamb R, Dvorak R. (2011). Antibacterial and antioxidant activity of oregano essential oil. *SafePork Proceedings*.



Wageningen UR Livestock Research

Edelhertweg 15, 8219 PH Lelystad T 0320 238238 F 0320 238050

E [info.livestockresearch@wur.nl](mailto:info.livestockresearch@wur.nl) | [www.livestockresearch.wur.nl](http://www.livestockresearch.wur.nl)