



Eindresultaten project 'Genotypering van salmonellastammen bij pluimvee met MLVA en PFGE'

Auteur: dierenarts Eva Pierré, DGZ Vlaanderen, met dank aan Dr. Ir. Cécile Boland, CODA.

Inhoud

1. Inleiding	2
2. MLVA van <i>Salmonella</i> Enteritidis op probleem-leghennenbedrijven	3
3. Identieke MLVA-profielen van <i>Salmonella</i> Enteritidis-stammen bij leghennen en humane gevallen	5
4. Extra aandacht voor salmonellabestrijding op gemengde bedrijven pluimvee/varkens	6
5. <i>Salmonella</i> -serotypes bij varkens	8
6. <i>Salmonella</i> Typhimurium bij kalkoenen	9
7. <i>Salmonella</i> Typhimurium bij fokpluimvee	10
8. <i>Salmonella</i> Paratyphi B var Java	11
9. <i>Salmonella</i> Infantis	13
10. Besluit	17

Maatschappelijke zetel
Site Lier
Hagenbroeksesteenweg 167
2500 Lier

Administratief adres
Site Torhout
Industrielaan 29
8820 Torhout

Tel: 078 05 05 23
Fax: 078 05 23 23
helpdesk@dgz.be
www.dgz.be

BTW BE 0409.450.856
KBC 734-3540380-83
IBAN BE14 7343 5403 8083
BIC KRED BEBB



1. Inleiding

Salmonella kan langdurig aanwezig blijven op een pluimveebedrijf. Bij de aanpak van deze besmetting is het noodzakelijk te weten of in opeenvolgende rondes steeds dezelfde salmonellastam circuleert of dat er insleep is van een nieuwe stam. Genotypering van salmonellastammen – dit is het maken van een genetische 'vingerafdruk' - brengt dit in beeld. Zo kan de veehouder gepaste maatregelen nemen om het bedrijf salmonellavrij te krijgen.

Binnen een project, dat liep van 2014 tot 2016 en dat gefinancierd werd door het Sanitair Fonds, voerde het CODA genotypering uit op 189 salmonellastammen. Voor *S. Enteritidis* (93 stammen) en *S. Typhimurium* (31 stammen) gebeurde dit met MLVA of multilocus variable number of tandem repeats analysis. Voor *S. Infantis* (45 stammen) en *S. Paratyphi B var Java* (20 stammen) werd PFGE of pulsed field gel elektroforese gebruikt. De stammen waren afkomstig van analyses uitgevoerd door DGZ, Arsia, Lavetan en het FAVV en werden geselecteerd door DGZ.

Hoe werken MLVA en PFGE?

MLVA telt het aantal tandemherhalingen – dit zijn kop-aan-staart herhalingen - van bepaalde DNA-sequenties op verschillende plaatsen in het DNA van de bacterie. Dit wordt uitgedrukt met een numerieke code - een soort telefoonnummer - dat vergelijking van bacteriestammen mogelijk maakt.

Bij PFGE wordt het DNA van bacteriën door zogenaamde restrictie-enzymen in kleinere delen geknipt. Deze deeltjes worden vervolgens in een gel geplaatst waarin een elektrisch veld wordt gecreëerd. De DNA-deeltjes leggen, afhankelijk van hun grootte, verschillende afstanden af en vormen zo een typerend bandenpatroon. Door deze bandenpatronen te vergelijken, is het mogelijk de verwantschap tussen stammen na te gaan.

PFGE is de gouden standaard maar is arbeidsintensief. Voor de typering van *S. Enteritidis* en *S. Typhimurium* is MLVA meer discriminerend dan PFGE.

Bij PFGE van de stammen *S. Infantis* en *S. Paratyphi B var Java* – kortweg *S. Java* - binnen het project werd één restrictie-enzyme (*Xba*I) gebruikt. De interpretatie van de PFGE-bandenpatronen gebeurde volgens onderstaande criteria:

- 0 banden verschil: zelfde stam;
- 1 tot 3 banden verschil: nauw verwante stammen;
- meer dan 3 banden verschil: verschillende stammen.



2. MLVA van *Salmonella* Enteritidis op probleem- leghennenbedrijven

Binnen dit project werd een leghennenbedrijf als probleembedrijf beschouwd als eenzelfde stal in twee opeenvolgende rondes positief was voor *S. Enteritidis* in de periode 2010-2015. Zo werden vier leghennenbedrijven (6 stallen) als probleembedrijf aangeduid. Op deze bedrijven werden in totaal 36 *S. Enteritidis*-stammen geïsoleerd uit stalen genomen volgens het nationale salmonellabestrijdingsplan. Het CODA voerde MLVA uit op al deze stammen (Tabel 1).

Op bedrijf 1, 2 en 3 bleek dezelfde stam in de stal aanwezig in opeenvolgende rondes en dit ondanks reiniging en ontsmetting tussen de rondes.

Op bedrijf 4 circuleerden tijdens de eerste ronde twee verschillende *S. Enteritidis*-stammen. Eén van deze stammen werd in stal 1 ook teruggevonden bij de swabcontrole tijdens de leegstand. Dit wijst op onvoldoende reiniging en ontsmetting. Toch slaagde dit bedrijf er in om de stallen na deze ronde vrij te krijgen van deze stam. De daaropvolgende ronde was echter opnieuw positief voor *S. Enteritidis* maar met een MLVA-profiel verschillend van deze van de eerste ronde. Dit wijst op insleep van nieuwe stammen.



Tabel 1: MLVA-profielen van 36 *S. Enteritidis*-stammen van vier leghennenbedrijven met minstens één stal die twee opeenvolgende rondes positief was voor *S. Enteritidis*. SENTER7, SENTER5, SENTER6, SENTER4 en SE3 zijn de gebruikte markers.

Bedrijf	Stal	Ronde	Leeftijd (weken)	S. Enteritidis MLVA-profiel					
				SE3	SE4	SE6	SE5	SE7	
1	1	1	76	3	10	5	4	1	
			39	3	10	5	4	1	
		2	72	3	10	5	4	1	
2	1	1	75	3	10	5	4	1	
			24	3	10	5	4	1	
		2	26	3	10	5	4	1	
			39	3	11	5	4	1	
			86	3	10	5	4	1	
			93	3	10	5	4	1	
			100	3	10	5	4	1	
3	1	1	110	3	9	5	4	1	
			Bevestigingsonderzoek	3	9	5	4	1	
		2	24	3	9	5	4	1	
			Bevestigingsonderzoek	3	9	5	4	1	
			Bevestigingsonderzoek	3	9	5	4	1	
4	1	1	69	3	9	5	4	1	
			84	2	10	7	3	2	
			95	2	10	7	3	2	
		Leegstand	2	10	7	3	2		
		2	35	3	11	5	4	1	
			54	3	11	5	4	1	
			1	69	2	10	7	3	2
				84	2	10	7	3	2
				95	2	10	7	3	2
		2	24	3	12	5	4	1	
	35		3	11	5	4	1		
	39		3	11	5	4	1		
	54		3	11	5	4	1		
	84		3	11	5	4	1		
	3		1	69	2	10	7	3	2
		84		3	9	5	4	1	
		95		2	10	7	3	2	
		2	35	3	11	5	4	1	
			39	3	11	5	4	1	
			54	3	11	5	4	1	
91			2	10	7	3	2		
1+2+3	1	91	2	10	7	3	2		



3. Identieke MLVA-profielen van *Salmonella* Enteritidis-stammen bij leghennen en humane gevallen

Genotypering kan nagaan of *S. Enteritidis*-stammen geïsoleerd uit humane gevallen identiek zijn aan de stammen gevonden op leghennenbedrijven.

Volgens data van het Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid (WIV) konden 1.498 *S. Enteritidis*-stammen - geïsoleerd bij mensen in de periode 2007-2012 - opgedeeld worden in 172 verschillende MLVA-profielen (Bertrand et al., 2015).

Binnen het project werden 93 *S. Enteritidis*-stammen van 34 Belgische leghennenbedrijven (41 stallen) geselecteerd. 36 van deze stammen waren van vier leghennenbedrijven (6 stallen) die als probleembedrijf beschouwd konden worden in de periode 2010-2015 (zie hoofdstuk 2). De overige 57 stammen kwamen van 30 leghennenbedrijven (35 stallen) die eenmalig positief waren voor *S. Enteritidis* of die positief waren in niet-openvolgende rondes (stalen genomen in de periode 2014-2015).

Het CODA voerde MLVA uit op al deze pluimveestammen en kon deze opdelen in 14 verschillende MLVA-profielen. Bij vergelijking van deze profielen met die van de humane gevallen bleken acht van de negen meest voorkomende MLVA-profielen bij mensen ook gevonden te worden bij leghennen (Tabel 2). Er dient opgemerkt te worden dat de periodes waarin de stammen geïsoleerd werden bij mensen en bij leghennen niet volledig gelijk is.

Tabel 2: De 93 *S. Enteritidis*-stammen van 34 Belgische leghennenbedrijven hebben 14 verschillende MLVA-profielen. De vetgedrukte profielen zijn deze die ook bij humane besmettingen het vaakst worden teruggevonden. SENTER7, SENTER5, SENTER6, SENTER4 en SE3 zijn de gebruikte markers.

S. Enteritidis MLVA-profiel					Aantal stammen
SE3	SE4	SE5	SE6	SE7	
2	10	7	3	2	24
3	11	5	4	1	19
3	10	5	4	1	17
3	9	5	4	1	10
2	11	7	3	2	7
3	9	4	4	1	4
3	12	5	4	1	3
3	11	1	4	1	2
3	11	5	5	1	2
2	10	8	3	2	1
2	10	8	5	2	1
3	10	5	3	1	1
3	11	5	3	1	1
3	15	5	4	1	1
Totaal					93



4. Extra aandacht voor salmonellabestrijding op gemengde bedrijven pluimvee/varkens

S. Typhimurium, inclusief de monofasische variant (*S. O_{1,4,[5],12:i:-}*), is één van de meest voorkomende *Salmonella*-serotypes bij zowel pluimvee als varkens. Er werd reeds lang vermoed dat op een gemengd bedrijf met zowel pluimvee als varkens kruisbesmetting tussen beide diersoorten mogelijk is, maar daarover is in de wetenschappelijke literatuur weinig informatie te vinden.

Daarom gingen we op 7 gemengde bedrijven met *S. Typhimurium*-positief pluimvee na of dezelfde salmonellastam ook aanwezig was bij de varkens gehuisvest op hetzelfde bedrijf. Dit gebeurde door bij de varkens 6 keer 2 paar overschoentjes te nemen en dit telkens zo snel mogelijk nadat het positief resultaat bij de kippen bekend werd. De staalname bij de varkens - uitgevoerd in 2014 en 2015 - werd herhaald tot er *S. Typhimurium* in de stalen werd aangetoond, met een maximum van 3 staalnames.

Op 4 bedrijven werd *S. Typhimurium* gevonden bij de varkens. Zowel de *S. Typhimurium*-stammen gevonden bij het pluimvee (10 stammen) als deze gevonden bij de varkens (7 stammen) werden getypeerd met MLVA. Er werden 7 verschillende MLVA-profielen gevonden bij pluimvee en 4 bij varkens (Tabel 3).

Op bedrijf 2 en bedrijf 5 werd een identiek MLVA-profiel gevonden bij pluimvee en varkens. Dit wijst mogelijk op een kruisbesmetting tussen beide diersoorten.

De stam van bedrijf 2 werd ook gevonden op bedrijf 1. Deze bedrijven lagen op een apart adres maar werden verzorgd door dezelfde persoon. Dit kan een verklaring zijn van verspreiding van de stam tussen beide bedrijven.

Bedrijven met een identieke stam bij pluimvee en varkens dienen te focussen op een verbetering van de interne bioveiligheid. Dit betekent een strikte scheiding tussen beide diersoorten met per diersoort aparte kledij en schoeisel en apart materiaal (gereedschap, emmers, ladders enz.).

Op bedrijf 3 en 4 waren de MLVA-profielen van de *S. Typhimurium*-stammen verschillend zowel binnen de stalen genomen bij de kippen als tussen de stalen van kippen en varkens. Op bedrijf 4 verschilt het MLVA-profiel van één van de *S. Typhimurium*-stammen van de kippen echter slechts met één cijfer van deze van de varkens. Er moet rekening mee gehouden worden dat de tijdspanne tussen deze stalen twee jaar bedraagt. Voor dit bedrijf werd namelijk ook MLVA uitgevoerd op een *S. Typhimurium*-stam geïsoleerd bij de kippen in 2013. Het minimale verschil tussen beide profielen kan het gevolg zijn van een natuurlijke mutatie die de salmonellakiem ondergaat in de loop van de tijd. Mogelijks ging het oorspronkelijk dus toch om dezelfde stam die licht wijzigde na verloop van tijd en is ook op dit bedrijf sprake van kruisbesmetting tussen pluimvee en varkens.

Op bedrijf 5 en 6 werd slechts één staalname bij de varkens uitgevoerd. Op bedrijf 5 waren alle overschoentjes bij de varkens negatief. Op bedrijf 6 waren 3 stalen positief voor een ander serotype dan *S. Typhimurium* en werd daarom geen MLVA uitgevoerd.

Bij humane *S. Typhimurium*-stammen is de variatie in MLVA-profielen veel groter dan bij humane *S. Enteritidis*-stammen (Wuyts et al., 2013). Voor *S. Typhimurium* is er ook veel



minder overeenkomst tussen humane en dierlijke stammen in vergelijking met *S. Enteritidis* (hoofdstuk 3).

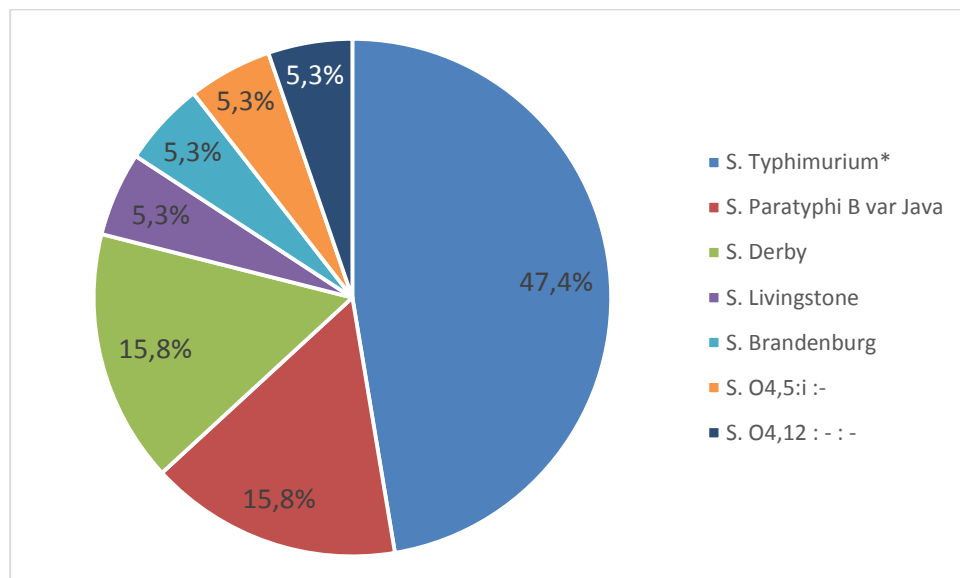
Tabel 3: MLVA-profielen van 17 *S. Typhimurium* stammen geïsoleerd bij pluimvee en varkens op gemengde bedrijven. 'NA' betekent 'niet aanwezig'. De vetgedrukte profielen zijn deze die ook bij humane besmettingen het vaakst worden teruggevonden. STTR9, STTR5, STTR6, STTR10 en STTR3 zijn de gebruikte markers.

Bedrijf	Diersoort	Resultaat serotypering	MLVA-profiel				
			STTR9	STTR5	STTR6	STTR10	STTR3
1	Varkens	S. O4,5,12:i:-	3	8	9	NA	211
	Pluimvee	S. Typhimurium O5+	3	15	13	NA	311
2	Pluimvee	S. Typhimurium O5+	3	15	13	NA	311
	Varkens	S. Typhimurium O5+	3	15	13	NA	311
3	Pluimvee	S. Typhimurium O5+	4	10	11	9	211
	Pluimvee	S. O4,12 :i :-	3	12	14	NA	211
	Varkens	S. O4,5:i :-	3	13	11	NA	211
4	Pluimvee	S. Typhimurium O5+	3	14	12	NA	311
	Pluimvee	S. Typhimurium O5+	4	9	10	9	211
	Varkens	S. Typhimurium O5+	3	14	13	NA	311
5	Pluimvee	S. O4,12:i :-	3	13	11	NA	211
	Pluimvee	S. O4,12:i :-	3	13	11	NA	211
	Pluimvee	S. O4,12:i:-	3	13	11	NA	211
	Pluimvee	S. Typhimurium O5-	3	13	10	NA	211
	Varkens	S. O4,12:i :-	3	13	11	NA	211
	Varkens	S. O4,12:i :-	3	13	11	NA	211
	Varkens	S. O4,12:i :-	3	13	11	NA	211

5. Salmonella-serotypes bij varkens

Binnen dit project werden 42 stalen (overschoentjes) genomen bij varkens op vijf gemengde bedrijven. Daarvan was liefst 45% (19 stalen) positief voor salmonella.

S. Typhimurium was het meest voorkomend serotype en werd op elk varkensbedrijf geïsoleerd (Figuur 1). Opvallend is dat bij de varkens ook vaak *S. Paratyphi B var Java* geïsoleerd werd, een serotype dat regelmatig voorkomt bij pluimvee. Voor dit serotype werd binnen dit project niet bepaald of het om identieke stammen ging tussen pluimvee en varkens. Toch is ook dit een reden om extra aandacht te besteden aan het voorkomen van versleping tussen beide diersoorten, zeker bij fokpluimvee waar *S. Paratyphi B var Java* een wettelijk bestreden serotype is.



Figuur 1: Verdeling van salmonella-serotypes geïsoleerd uit overschoentjes genomen bij varkens op bedrijven met zowel varkens als pluimvee (19 stalen).

*: 4 stalen positief voor *S. Typhimurium* en 5 stalen positief voor monofasische *S. Typhimurium*.



6. *Salmonella* Typhimurium bij kalkoenen

Binnen het project werd MLVA uitgevoerd op vier *S. Typhimurium*-stammen geïsoleerd bij kalkoenen op vier bedrijven tijdens een uitgangscontrole in de periode 2014 - 2015. Elke toom bleek positief voor een ander MLVA-profiel van *S. Typhimurium*. Er was geen overeenkomst tussen de MLVA-profielen van de *S. Typhimurium*-stammen van vleeskalkoenen en vleeskippen.

Tabel 4: MLVA-profielen van vier *S. Typhimurium*-stammen geïsoleerd bij vleeskalkoenen op uitgangscontrole in de periode 2014-2015.

Serotype	STTR9	STTR5	STTR6	STTR10	STTR3
<i>S. Typhimurium</i> O5-	3	13	9	NA	211
<i>S. O4,5,12</i> :i :-	3	10	10	NA	211
<i>S. Typhimurium</i> O5-	3	12	10	NA	211
<i>S. Typhimurium</i> O5+	4	7	19	27	311



7. *Salmonella* Typhimurium bij fokpluimvee

Er werd MLVA uitgevoerd op 8 *S. Typhimurium*-stammen geïsoleerd bij fokpluimvee in 2014. De stammen kwamen van 5 stallen van 5 bedrijven en werden geïsoleerd uit stalen zoals opgelegd door het nationaal Salmonellabestrijdingsprogramma en per bedrijf genomen tijdens dezelfde ronde. MLVA toonde 6 verschillende profielen aan. Elk bedrijf had een verschillend profiel. Op één bedrijf circuleerden 2 verschillende stammen tijdens dezelfde ronde.

Tabel 5: MLVA-profielen van 8 *S. Typhimurium*-stammen geïsoleerd uit stalen genomen in 2014 bij fokpluimvee zoals opgelegd door het nationaal Salmonellabestrijdingsprogramma. Op bedrijf 1 waren tijdens één staalnamemoment beide paar overschoentjes positief voor *S. Typhimurium*. Op bedrijf 4 werden ook MLVA uitgevoerd op stalen van het bevestigingsonderzoek. Op bedrijf 5 werd MLVA uitgevoerd op stalen genomen tijdens de leegstand. 'NA' betekent 'niet aanwezig'.

Bedrijf	Resultaat serotypering	STTR9	STTR5	STTR6	STTR10	STTR3
1	S. O4,12 :i :-	3	14	12	NA	211
	S. O4,12 :i :-	3	14	12	NA	211
2	S. Typhimurium O5+	3	13	6	12	311
3	S. Typhimurium O5+	3	14	6	12	311
4	S. Typhimurium O5+	3	18	12	NA	311
	S. Typhimurium O5+	3	11	9	NA	211
	S. Typhimurium O5+	3	18	12	NA	311
5	S. Typhimurium O5+	2	12	23	9	212

8. *Salmonella* Paratyphi B var Java

Het CODA analyseerde 20 stammen van *S. Paratyphi* B var Java (kortweg *S. Java*) met pulsed field gelelektroforese (PFGE) met één restrictie-enzyme (XbaI). De stammen werden geïsoleerd op 12 vleeskippenbedrijven uit stalen genomen voor de uitgangscontrole (periode januari 2014 – februari 2015). Eén van deze bedrijven had ook varkens die voor dit project bemonsterd werden (zie hoofdstuk 4). Eén *S. Java*-stam van deze varkens werd ook getypeerd met PFGE.

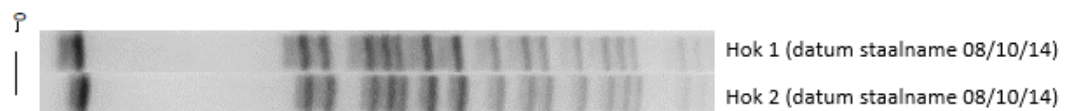
***Salmonella* Java: vergelijking binnen bedrijven**

Van 6 van de 12 vleeskippenbedrijven werd meer dan één stam geanalyseerd waardoor het mogelijk was om het PFGE-profiel binnen elk bedrijf te vergelijken (intra-bedrijf).

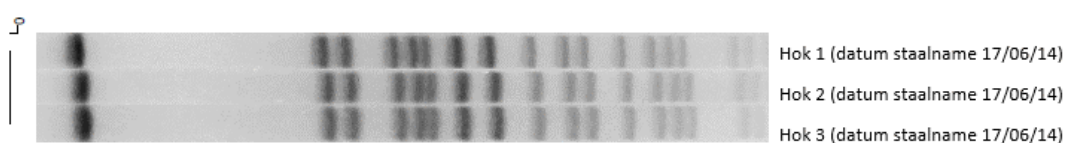
Op vijf bedrijven (bedrijf 1, 2, 5, 8 en 9) was een stam met identiek PFGE-profiel aanwezig tijdens dezelfde ronde of in opeenvolgende rondes (Figuur 2 tot Figuur 6).

Bedrijf 8 was een gemengd vleeskippen/varkensbedrijf. Het profiel van de *S. Java*-stam gevonden bij de varkens was identiek aan dat van de *S. Java*-stammen gevonden bij de vleeskippen wat wijst op kruisbesmetting tussen beide diersoorten.

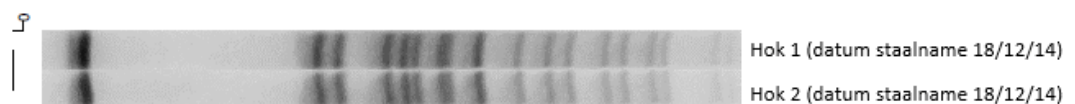
Op één bedrijf (bedrijf 11, Figuur 7) waren de stammen nauw verwant. Omdat de periode tussen beide staalnames relatief kort is, kunnen deze als aparte stammen beschouwd worden.



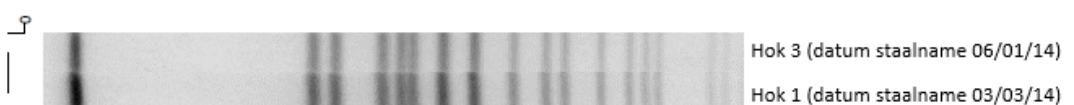
Figuur 2: Identieke PFGE-profielen van 2 *S. Java*-stammen van bedrijf 1 (provincie Antwerpen).



Figuur 3: Identieke PFGE-profielen van 3 *S. Java*-stammen van bedrijf 2 (provincie Antwerpen).



Figuur 4: Identieke PFGE-profielen van 2 *S. Java*-stammen van bedrijf 5 (provincie West-Vlaanderen).



Figuur 5: Identieke PFGE-profielen van 2 *S. Java*-stammen van bedrijf 8 (provincie Oost-Vlaanderen).



Figuur 6: Identieke PFGE-profielen van 2 *S. Java*-stammen van bedrijf 9 (provincie Oost-Vlaanderen).

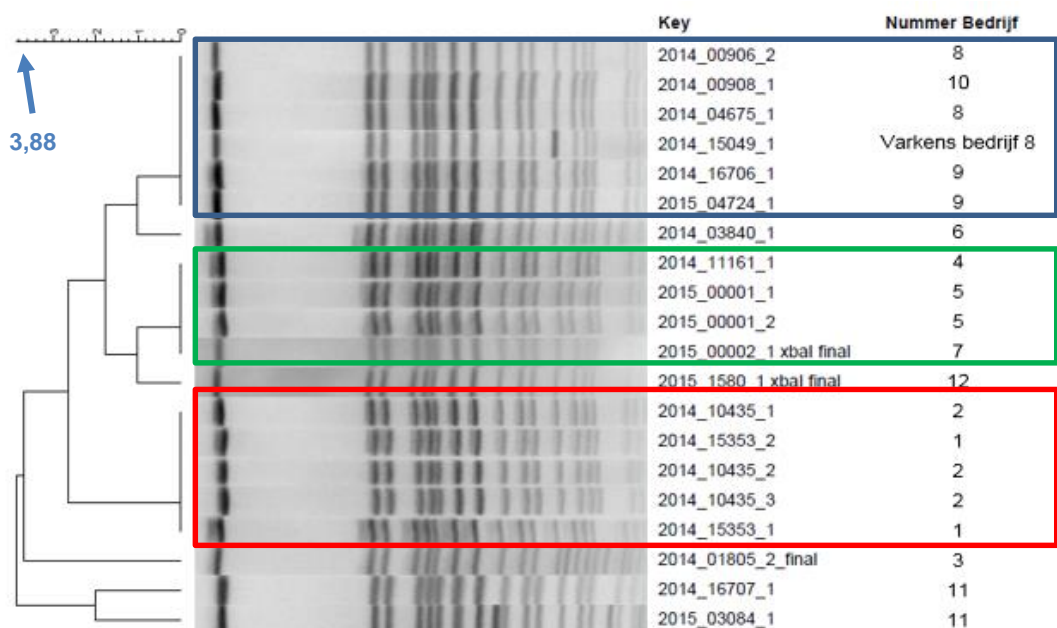


Figuur 7: PFGE-profielen van 2 *S. Java*-stammen van bedrijf 11 (provincie Luik). De profielen tonen 2 banden verschil en worden als nauw verwant beschouwd.

Salmonella Java: vergelijking tussen bedrijven

Uit clusteranalyse van de PFGE-gels (BioNumerics v6.6) bleek er tussen de 20 *S. Java* isolaten een verschil van maximaal 3,88 banden te zijn (Figuur 8). Dit betekent dat deze 20 isolaten verwant zijn, gebaseerd op de restrictie met XbaI.

Sommige identieke stammen werden geïsoleerd op verschillende bedrijven. Zo was in de periode januari 2014 – februari 2015 eenzelfde stam aanwezig op bedrijven 8, 9 (beide in provincie Oost-Vlaanderen) en 10 (provincie Henegouwen) (blauwe kader in figuur 8). Op bedrijf 4 (provincie Vlaams-Brabant), 5 (Provincie West-Vlaanderen) en 7 (provincie Oost-Vlaanderen) was een identieke stam aanwezig tussen juli en december 2014 (groene kader in figuur 8). Op bedrijf 1 en 2 (beide in provincie Antwerpen) was een identieke stam aanwezig tussen juni en oktober 2014 (rode kader in figuur 8).



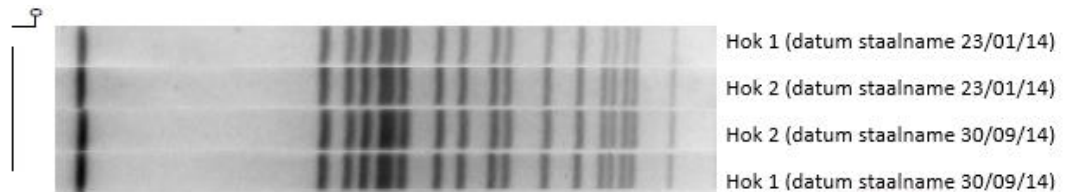
Figuur 8: PFGE-profielen en clustering van 20 stammen van *S. Java*, geknipt met restrictie-enzyme XbaI.

9. *Salmonella* Infantis

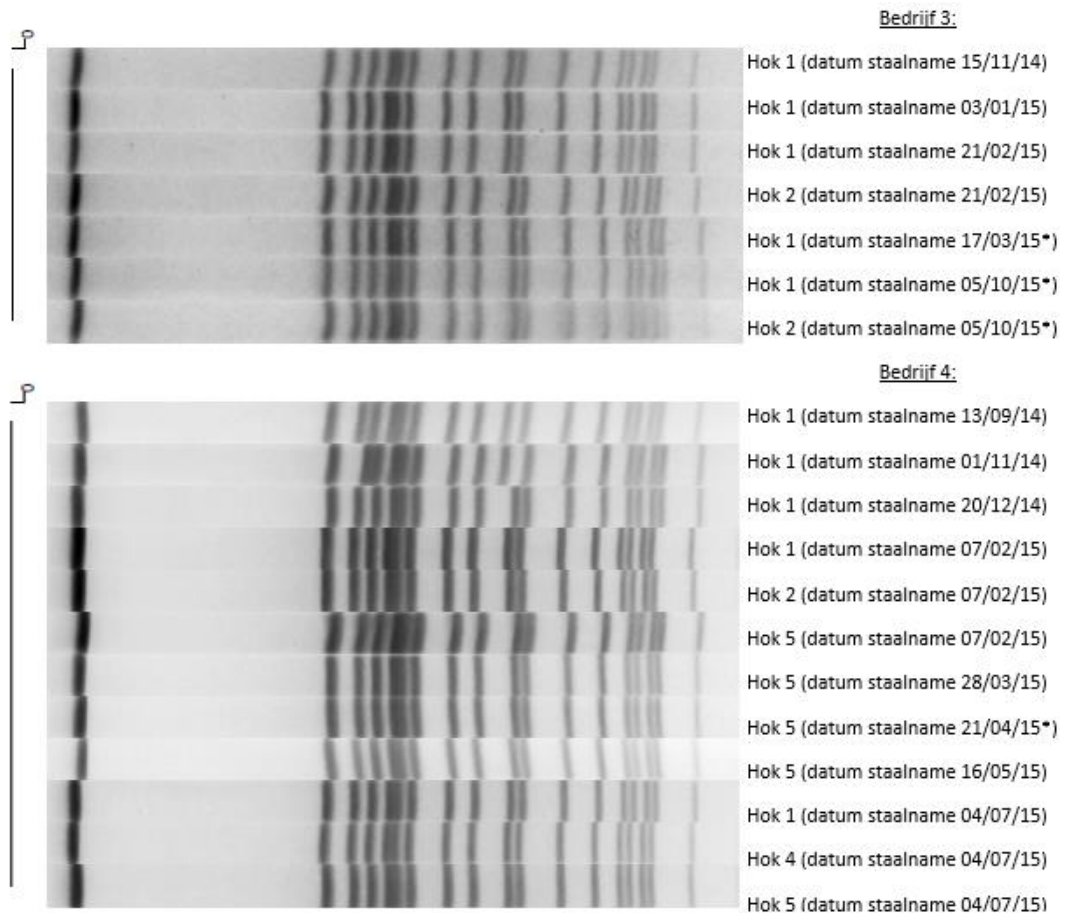
Het CODA analyseerde 45 stammen van *S. Infantis* met pulsed field gelelektroforese (PFGE) met één restrictie-enzyme (XbaI). De stammen werden geïsoleerd op 18 pluimveebedrijven (10 vleeskippenbedrijven, 6 leghennenbedrijven en 2 fokpluimveebedrijven). De nummering van de bedrijven staat los van de nummering van de *S. Java*-bedrijven in hoofdstuk 7. Alle *S. Infantis*-stammen werden geïsoleerd uit stalen genomen in een periode van maximum 23 maanden (periode januari 2014 – november 2015).

***Salmonella* Infantis op vleeskippenbedrijven: vergelijking binnen bedrijven**

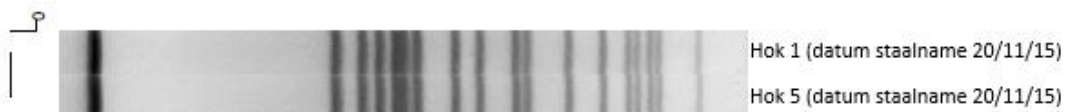
Op 5 van de 10 vleeskippenbedrijven (bedrijf 1, 3, 4, 8 en 16) werden per bedrijf minstens twee *S. Infantis*-stammen getypeerd. Zo was een vergelijking van de profielen binnen de bedrijven mogelijk.



Figuur 9: Identieke PFGE-profielen van 4 *S. Infantis*-stammen van bedrijf 1 (provincie Antwerpen) van stalen genomen voor uitgangscntrole bij vleeskippen. Dit toont aan dat dezelfde stam aanwezig was tijdens niet-opvolgende rondes in beide stallen van dit bedrijf.



Figuur 10: Identieke PFGE-profielen van 19 *S. Infantis*-stammen van bedrijf 3 (1% band matching tolerance en tolerance change) en bedrijf 4 (2% band matching tolerance en tolerance change) van stalen genomen voor uitgangscontrolle of tijdens de leegstand (aangeduid met *) bij vleeskippen. Beide bedrijven (provincie Antwerpen) zijn van dezelfde verantwoordelijke en liggen in dezelfde gemeente. Dit toont aan dat dezelfde stam aanwezig was tijdens meerdere rondes op beide bedrijven.



Figuur 11: Identieke PFGE-profielen van 2 *S. Infantis*-stammen van bedrijf 8 (provincie Oost-Vlaanderen) van stalen genomen voor uitgangscontrolle bij vleeskippen. Dit toont aan dat dezelfde stam aanwezig was tijdens dezelfde ronde in twee stallen van dit bedrijf.



Figuur 12: Identieke PFGE-profielen van 2 *S. Infantis*-stammen van bedrijf 16 (provincie Namen) van stalen genomen voor uitgangscontrolle bij vleeskippen. Dit toont aan dat dezelfde stam aanwezig was tijdens twee opeenvolgende rondes in één stal van dit bedrijf.

Salmonella Infantis op leghennenbedrijven: vergelijking binnen bedrijven

Op 2 van de 6 leghennenbedrijven (bedrijf 5 en 6) werden per bedrijf minstens twee *S. Infantis*-stammen getypeerd. Zo was vergelijking van de profielen binnen deze bedrijven mogelijk.

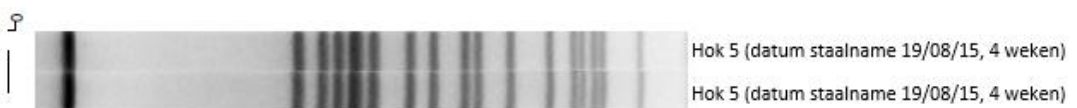


Figuur 13: Twee nauw verwante (1 band verschil) *S. Infantis*-stammen van bedrijf 5 (provincie Vlaams-Brabant) van stalen genomen tijdens 2 opeenvolgende rondes bij leghennen. Omdat de periode tussen beide staalnames relatief kort is, kunnen deze als aparte stammen beschouwd worden.

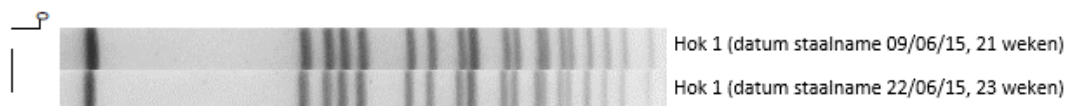


Figuur 14: Identieke PFGE-profielen van 3 *S. Infantis*-stammen van bedrijf 6 (provincie West-Vlaanderen) van stalen genomen bij leghennen. Van de bovenste twee profielen is het hoknummer van de stalen niet gekend.

Salmonella Infantis op fokpluimveebedrijven: vergelijking binnen bedrijven



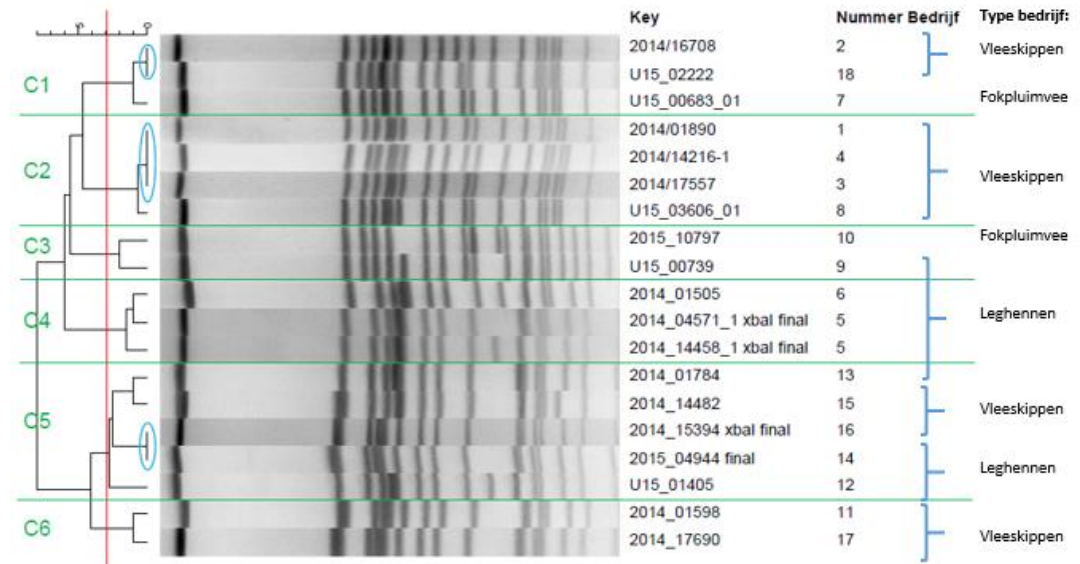
Figuur 15: Identieke PFGE-profielen van 2 *S. Infantis*-stammen van bedrijf 7 (provincie West-Vlaanderen) van stalen genomen bij fokpluimvee. Op dit bedrijf was tijdens hetzelfde staalnamemoment zowel het staal van de 2 paar overschoentjes als dat van de 3 paar overschoentjes positief voor *S. Infantis*.



Figuur 16: Identieke PFGE-profielen van 2 *S. Infantis*-stammen van bedrijf 10 (provincie Henegouwen) van stalen genomen bij fokpluimvee.

Salmonella Infantis: vergelijking tussen bedrijven

Om de profielen van de *S. Infantis*-stammen tussen de bedrijven te vergelijken, werd per bedrijf één isolaat geselecteerd (met uitzondering van bedrijf 5 waar beide isolaten werden geselecteerd).



Figuur 17: Clustering van 19 *S. Infantis*-profielen (PFGE, geknipt met XbaI, matching tolerance en tolerance change van 1%). De rode lijn wijst op een verschil van 3 banden. C1 tot C6 vertegenwoordigen de verschillende clusters met meer dan 3 banden verschil.

De vergelijking tussen de bedrijven van de *S. Infantis*-isolaten (Figuur 17) onderscheidt 6 verschillende clusters, dit zijn isolaten met meer dan 3 banden verschil. Er circuleren dus minstens 6 verschillende stammen op de 18 onderzochte bedrijven. Binnen de clusters C1, C2 en C5 vertoonden sommige isolaten geen band verschil (zie blauwe cirkels in Figuur 17).



10. Besluit

Er circuleren *S. Enteritidis*-stammen en *S. Typhimurium*-stammen met verschillende MLVA-profielen bij het Belgische pluimvee.

Genotypering met MLVA en PFGE kan bijdragen om na te gaan of op een bedrijf dezelfde stam persisteert of dat er insleep is van een nieuwe stam. Zo kunnen gepaste maatregelen genomen worden om de salmonellabesmetting efficiënt aan te pakken. Grondige reiniging en ontsmetting tussen rondes verhindert dat salmonella aanwezig blijft op het bedrijf. Optimaliseren van de externe bioveiligheid is nodig om insleep van nieuwe stammen te voorkomen.

Volgens PFGE met één restrictie-enzyme (XbaI) waren de *S. Java*-stammen van 12 vleeskippenbedrijven verwant. Sommige identieke stammen werden geïsoleerd in verschillende bedrijven, dit was ook het geval voor *S. Infantis*.

Het project toont aan dat er *S. Typhimurium*- en *S. Java*-stammen met identiek MLVA-profiel circuleren bij pluimvee en varkens op hetzelfde bedrijf. Deze bedrijven dienen te zorgen voor een strikte scheiding tussen beide diersoorten. Belangrijke aandachtspunten bij het voorkomen van kruisbesmetting zijn:

- Gebruik apart schoeisel. Niet enkel per diersoort maar ook per stal.
- Gebruik aparte overals. Te vaak nog wordt vergeten dat salmonella niet enkel aanwezig is in mest (aan de schoenen) maar ook in stof (op overal)! Op de meeste bedrijven is wel aparte kledij voorzien voor gebruik in de varkens- en de pluimveestallen maar in geval van meerdere stallen per diersoort is het belangrijk ook per stal aparte kledij te dragen.
- Handen wassen. Meestal wast een bezoeker enkel de handen na afloop van het stalbezoek. Handen wassen dient echter ook telkens te gebeuren vooraleer men de stal betreedt.
- Bovenstaande punten zijn niet enkel van toepassing voor externe bezoekers. Ook de veehouder zelf moet deze regels strikt volgen.

Contactgegevens

Met uw vragen over Salmonella en bioveiligheid kan u terecht bij DGZ op tel. 078 05 05 23 of e-mail helpdesk@dgz.be.

Referenties:

- Bertrand S, De Lamine de Bex G, Wildemaue C, Lunguya O, Phoba MF, Ley B, et al. (2015) Multi Locus Variable-Number Tandem Repeat (MLVA) Typing Tools Improved the Surveillance of Salmonella Enteritidis: A 6 Years Retrospective Study. *PLoS ONE* 10(2): e0117950. doi:10.1371/journal.pone.0117950
- Wuyts V, Mattheus W, De Lamine de Bex G, Wildemaue C, Roosens NHC, et al. (2013) MLVA as a Tool for Public Health Surveillance of Human Salmonella Typhimurium: Prospective Study in Belgium and Evaluation of MLVA Loci Stability. *PLoS ONE* 8(12): e84055. doi:10.1371/journal.pone.0084055