

# **Volksgezondheidsrisico's in de paarden-houderij: prevalentiestudie naar een aantal potentieel relevante zoönosen bij paarden in Nederland**

Auteurs: dr. C. van Maanen, ing. M. Bloemer en dr.ir. I. Santman-Berends

Projectleider: dr. C. van Maanen

Eindverantwoordelijke: drs. Ing. E. Schiphorst MBA

Datum: november 2014

In opdracht van Ministerie van Economische Zaken

Eindrapport van project 1016010

*Niets uit deze rapportage mag gekopieerd of vermenigvuldigd worden zonder toestemming van GD*



Inhoud

1.	<b>SAMENVATTING</b> .....	3
2.	<b>INLEIDING</b> .....	6
3.	<b>MATERIAAL EN METHODEN</b> .....	7
4.	<b>RESULTATEN</b> .....	10
5.	<b>DISCUSSIE</b> .....	28
6.	<b>CONCLUSIE EN AANBEVELINGEN</b> .....	31
7.	<b>DANKWOORD</b> .....	32
8.	<b>LITERATUUR</b> .....	33
9.	<b>BIJLAGEN</b> .....	38

## 1. Samenvatting

In Nederland is op grote schaal intensief contact tussen mensen en paarden. Er was tot op heden geen informatie beschikbaar over mogelijke risico's die dit intensieve contact met zich meebrengt. Uit eerder onderzoek is daarentegen wel bekend dat een aantal zoönosen mogelijk kan voorkomen in de paardenpopulatie. Daarom is in opdracht van het ministerie van Economische Zaken, onderzoek uitgevoerd naar de mate van voorkomen van vijf mogelijk zoönotische agentia bij paarden. Daarnaast is geïnventariseerd of er risicofactoren bestaan die geassocieerd zijn met het voorkomen van deze agentia.

De vijf agentia die zijn bestudeerd in het kader van dit onderzoek waren: *Salmonella* sp., *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, *Clostridium difficile* en *Rhodococcus equi*. Eerst is een voorstudie uitgevoerd waarbij relevante informatie over deze pathogenen zoals symptomen, epidemiologie, overdracht naar mensen, eventuele antibiotica resistentie en risicofactoren in kaart zijn gebracht. Vervolgens zijn 24 Nederlandse dierenartsenpraktijken (DAPs) gevraagd om fecesmonsters te verzamelen. Hierbij zijn twee DAP's per provincie geselecteerd. Deze monsters zijn in het laboratorium van de GD getest op het voorkomen van de geselecteerde pathogenen, waarbij het onderzoek naar *Clostridium difficile* werd uitbesteed aan het Centraal Veterinair Instituut in Lelystad. Onderscheid is gemaakt tussen vier subpopulaties dieren, namelijk paarden met diarree, paarden zonder diarree, veulens met diarree en veulens zonder diarree. Deze laatste categorie werd alleen onderzocht op aanwezigheid van virulente *Rhodococcus equi*. De monsters van paarden en veulens met diarree zijn op *Salmonella* spp., *Clostridium difficile*, *Cryptosporidium* spp. en *Giardia duodenalis* getest en de monsters van paarden zonder diarree alleen op *Salmonella* sp., *Cryptosporidium* spp. en *Giardia duodenalis*.

De DAP's werd gevraagd zeven monsters per subpopulatie te nemen verdeeld over vier verschillende bedrijfstypen namelijk *instructie-, sport- en trainingslocatie* (1ST locatie)/pensionstal, kinder-/zorgboerderij, manege en fokkerijbedrijf. Daarbij werd tevens gevraagd om minstens één monster per subpopulatie te nemen van een kinder-/zorgboerderij. Op de achterkant van de inzendformulieren werden enkele vragen gesteld met betrekking tot het type paard en het stal- en weidemanagement om een eerste indicatie te verkrijgen van mogelijke factoren die geassocieerd zijn met het voorkomen van de verschillende agentia.

De belangrijkste resultaten staan hierna opgesomd.

### *Salmonella* spp.

De waargenomen prevalentie van *Salmonella* spp. was 3,6% (95% BI:1,5-7,3%). Na verder typeren van de salmonella positieve isolaten, werden *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium* en – in één monster – monofasische *Salmonella Typhimurium* aangetoond. De laatstgenoemde bacterie was resistent voor de meeste onderzochte antibiotica of combinaties van antibiotica. Door de lage prevalentie was het niet mogelijk om factoren te bestuderen die mogelijk met het voorkomen van *Salmonella* sp. geassocieerd waren.

### *Cryptosporidium* spp.

In 66 van de 193 onderzochte monsters werden *Cryptosporidium* spp. aangetoond in minimaal één van de twee uitgevoerde testen. Gecorrigeerd voor het feit dat mestmonsters van paarden binnen een bedrijf meer op elkaar lijken dan mestmonsters van paarden afkomstig van verschillende bedrijven was de prevalentie 34,0 (95% BI: 27,6-41,2%). In 17,9% (95% BI: 13,6-23,3%) van de monsters werden *Cryptosporidium* spp. in beide testen aangetoond. In een eerste selectie van monsters die positief waren in beide testen (n=32) werd door het RIVM geen *C. parvum* of *C. hominis* aangetroffen, wel scoorden alle monsters positief in een generieke *Cryptosporidium* spp. real-time PCR. Daarnaast werd in één monster *C. cuniculi* aangetroffen. Sequencing van de PCR producten door het RIVM leverde echter geen *Cryptosporidium* specifieke sequenties op. Er werden met name sequenties van schimmels gevonden, mogelijk zijn de betreffende primers niet specifiek genoeg.

Indien alleen monsters die positief waren in beide testen als positief beschouwd werden, bleek in de risicofactor analyse dat het beperkt bijvoeren van veulens en paarden in de wei beschermend werkte (*odds ratio* 0,22; 95% BI: 0,07-0,69) ten opzichte van het niet bijvoeren bij weidegang. Indien alle positieve testuitslagen als positief beschouwd werden bleek langdurige (> 7 dagen) diarree een 2,4 keer hoger risico (95% BI: 1,1-5,3) op te leveren voor het positief testen op *Cryptosporidium* spp. ten opzichte van geen diarree.

#### *Giardia duodenalis*

In 1% (95% BI: 0-3,7%) van de mestmonsters werd *Giardia duodenalis* aangetoond. Door de lage prevalentie was het ook bij *Giardia duodenalis* niet mogelijk hier een risicofactorenanalyse op uit te voeren.

#### *Clostridium difficile*

De waargenomen prevalentie van *Clostridium difficile* was 32,1% (95% BI: 22,2-43,4%), waarbij ongeveer 10% (n=8) toxinogene *Clostridium difficile*. Bij de toxinogene isolaten werd ribotype 078 het vaakst aangetoond (n=5). Dit ribotype is ook bij mensen van klinische relevantie en is in opkomst. In eerder onderzoek werd dit ribotype voornamelijk bij varkens aangetoond. Bij de non-toxinogene isolaten werd ribotype 009 het vaakst aangetoond (n=16). Paarden en veulens die op stal worden gehouden en paarden en veulens die worden bijgevoerd in de wei, hadden een lagere kans om positief te testen op *Clostridium difficile* in vergelijking met paarden die in de wei lopen en niet worden bijgevoerd.

#### *Rhodococcus equi*

De waargenomen prevalentie van *Rhodococcus equi* in fecesmonsters van gezonde veulens was 60,0% (95% BI: 45,8-73,4%). In 40,4% (95% BI: 27,0-54,9%) van de onderzochte monsters werd virulente (virulence associated protein A = VapA positieve) *Rhodococcus equi* aangetoond. De *Rhodococcus equi* isolaten bleken grotendeels gevoelig voor rifampicine en erythromycine, echter grotendeels resistent voor tilmicosine. Tilmicosine zou een goede indicator zijn voor kruisresistentie tegen azithromycine en clarithromycine. De laatstgenoemde antibiotica worden in combinatie met rifampicine in het formularium paard aanbevolen (als derde keus) voor de behandeling van veulens met rhodococcose. Daarom zijn er aanvullend specifieke MIC bepalingen voor azithromycine en clarithromycine uitgevoerd om de aangetoonde resistentie al dan niet te bevestigen. Hieruit bleek dat alle virulente *Rhodococcus equi* isolaten gevoelig waren voor azithromycine en clarithromycine.

Uit de risicofactoren analyse bleek dat oudere veulens een 1,3 (95% BI: 1,1-2,2) keer hoger risico hadden om geïnfecteerd te zijn met *Rhodococcus equi* in vergelijking met hele jonge veulens.

Tabel 1. Positieve uitslagen en prevalenties pathogenen.

	Monsters (n)	Positief (n)	Prevalentie	95% betrouwbaarheidsinterval
<i>Salmonella</i> spp.	193	7	3,6%	1,5-7,3%
<i>Cryptosporidium</i> spp. (beide testen positief)	193	33	17,9%	13,6-23,3%*
<i>Cryptosporidium</i> spp. (1 of 2 testen positief)	193	66	34,0%	27,6-41,2%*
<i>Giardia duodenalis</i>	193	2	1,0%	0-3,7%
<i>Clostridium difficile</i>	77**	26	32,1%	22,2-43,4%
<i>Rhodococcus equi</i> (VapA positief)	52***	21	40,4%	27,0-54,9%

\*: Gecorrigeerd voor bedrijfseffecten

\*\* : Alleen monsters van paarden met diarree en veulens met diarree onderzocht

\*\*\*: Alleen monsters van veulens zonder diarree onderzocht

### Aanbevelingen

Aanbevolen wordt om eventueel vervolgonderzoek te richten op het nader typeren van de bij paarden voorkomende *Cryptosporidium* spp. en afhankelijk van de typeringsresultaten een uitgebreidere en meer geformaliseerde risicofactoren analyse met een hoger onderscheidend vermogen uit te voeren. In eerste instantie zouden hiervoor de in dit onderzoek opgeslagen monsters gebruikt kunnen worden, waarbij in samenwerking met het RIVM de oocysten uit de mest opgezuiverd zouden moeten worden, waarna PCR en sequencing op de opgezuiverde oocysten uitgevoerd zou moeten worden.

Tevens wordt aanbevolen om vervolgonderzoek uit te voeren naar de prevalentie en risicofactoren voor (toxinogene) *Clostridium difficile* bij het paard. Daarbij moeten naast ribotypering aanvullende moleculaire typeringsmethoden worden uitgevoerd om de humane relevantie beter te kunnen duiden.

Voor *Rhodococcus equi* blijken alle isolaten in dit onderzoek gevoelig te zijn voor de meest aangewezen antibiotica (azithromycine en clarithromycine). Het is nog niet duidelijk of contact met paarden een risico vormt voor een besmetting met deze bacterie. *Rhodococcus equi* lijkt overigens wereldwijd geen primaire zoönose te zijn, want deze bacterie leidt slechts incidenteel tot ernstige problemen bij immungecompromitteerde mensen.

Eventueel kan de prevalentie van *Salmonella* spp., en meer specifiek het voorkomen van monofasische *Salmonella Typhimurium* binnen bepaalde sectoren van de paardenhouderij - beter onderbouwd worden door herhaalde monsternamen van nader te definiëren aantallen veulens en paarden.

Tenslotte wordt aanbevolen om bij vervolgonderzoek meer DAP's te selecteren en/of de monsternamen door projectmedewerkers uit te laten voeren en de periode van het onderzoek zo nodig te verlengen.

## 2. Inleiding

Paarden zijn reeds lang gedomesticeerd en worden, als waardevol gebruiksdier voor mensen, zelden als oorzaak van infecties gezien. Echter, het contact tussen mens en paard is erg intensief. De paardensport is erg populair en bij de verzorging van paarden worden zelden hygiënische voorzorgsmaatregelen in acht genomen. Of dit contact risico's met zich meebrengt voor de volksgezondheid is niet bekend en daarom wilde het ministerie van Economische Zaken hier meer inzicht in krijgen.

Het EFSA rapport uit 2006 (EFSA Journal 2006 – 94 Community summary report trends zoonoses) geeft de meest uitgebreide opsomming van diersoort specifieke prevalenties en voorkomende zoönosen over heel Europa. Van recentere datum is het rapport Emerging Zoonosen (2010) dat de lange lijst agentia verder prioriteert en vooral de situatie in Nederland schetst. Ook is vrij recent een rapport verschenen van Wageningen UR Livestock Research (Rapport 547 Bedrijfsgebonden dierziekten op schapen-, geiten- en paardenbedrijven) waarin de belangrijkste aandoeningen binnen de genoemde sectoren geïnventariseerd en geprioriteerd werden. Echter, in Nederland waren er specifiek voor paarden nog geen cijfers bekend over de prevalentie van mogelijke zoönosen. In overleg met de opdrachtgever zijn een aantal mogelijke zoönosen bij paarden geïdentificeerd die op dit moment mogelijk relevant zouden kunnen zijn voor de volksgezondheid in Nederland. MRSA (vrij recente onderzoeksgegevens onder Nederlandse paarden beschikbaar) en schimmelinfecties werden na overleg met de financier niet meegenomen in dit onderzoek.

Het doel van dit onderzoek was om de prevalentie in Nederland voor vijf pathogenen bij paarden te bepalen in verschillende subpopulaties (veulens met diarree, paarden met diarree, veulens zonder diarree, paarden zonder diarree) en, waar relevant, de gevoeligheid voor antibiotica te bepalen. De onderzochte pathogenen in het kader van dit onderzoek zijn: *Salmonella* spp., *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, *Clostridium difficile* en virulente (VapA positieve) *Rhodococcus equi*. Daarnaast is een eerste inventarisatie gedaan naar risicofactoren die mogelijk geassocieerd waren met het voorkomen van de verschillende pathogenen.

## 3. Materiaal en Methoden

### 3.1 Deelnemende dierenartsenpraktijken, bemonsteringsmaterialen en instructies

Per provincie werden twee dierenartsenpraktijken (DAP's) geselecteerd (totaal 24 praktijken, zie Bijlage 10) op basis van eerdere ervaringen met onderzoeken voor de GD en hun gerichtheid op paarden. De DAP's werden geïnformeerd over de doelstellingen van dit project en gevraagd om ieder 28 fecesmonsters te nemen. Deze 28 monsters dienden genomen te worden van vier verschillende groepen paarden: 1) paarden met diarree, 2) paarden zonder diarree, 3) veulens met diarree en 4) veulens zonder diarree. Daarnaast werden de monsters afgenomen op vier bedrijfstypen: fokkerijbedrijf, zorg-/kinderboerderij, manege en IST locatie/pensionstal. Voor de monsters van veulens zonder diarree - bestemd voor het *Rhodococcus equi* onderzoek - werden alleen monsters van fokkerijbedrijven genomen. De DAP's is gevraagd ten minste één monster per subpopulatie op een zorg-/kinderboerderij te nemen. De overige monsters konden ad random worden genomen om zodoende recht te doen aan de proportie bedrijfstypen in het praktijkgebied van de betreffende DAP. De richtlijn hierbij was maximaal twee monsters per bedrijfstype, per subpopulatie. Dit om een zo breed mogelijk beeld van de prevalentie te krijgen zonder te veel invloed van binnen bedrijfsclustering. Voor *Rhodococcus equi* was de richtlijn maximaal vier monsters per bedrijf. De DAP's werden hiervoor zorgvuldig geïnstrueerd aan de hand van een bemonsteringsschema (Bijlage 3) en een begeleidende brief (Bijlage 4).

### 3.2. Monstername

De dierenartsen hebben de fecesmonsters op verschillende manieren genomen. De manier van monstername was onder andere afhankelijk van de algehele toestand van het dier. Een rectaal monster was te verkrijgen bij merries die opgevoeld werden ten bate van de vruchtbaarheidsbegeleiding of bij paarden die rectaal onderzocht werden op darmproblemen. Wanneer rectale bemonstering niet opportuun was (bij b.v. een jong veulen) mocht volstaan worden met het nemen van een fecesmonster van een verse hoop in bijvoorbeeld de stal. Bij elk genomen monster werd door de dierenarts een aantal vragen beantwoord die op de achterzijde van het, voor dit project ontwikkelde, inzendformulier stonden beschreven (bijlagen 5-7).

### 3.3. Testmethoden

#### 3.3.1. *Salmonella* spp.

De aanwezigheid van *Salmonella* spp. is onderzocht bij paarden met diarree, paarden zonder diarree en veulens met diarree. Na binnenkomst werden de overwegend verse fecesmonsters onderzocht met behulp van ophoping door middel van de ISO 6579 Annex D methode met bevestiging door de MALDI-TOF en typering. Daarnaast is op de monsters die positief testten voor *Salmonella* spp. een antibiogram uitgevoerd op basis van MIC bepaling.

#### 3.3.2. *Giardia duodenalis* en *Cryptosporidium* spp.

Direct na aankomst van de fecesmonsters bij GD werden deze getest op *Giardia duodenalis* en *Cryptosporidium* spp. De monsters werden voorbereid met een licht fixerend transportmedium genaamd SAF, waarna de ImmunoCard STAT sneltest (Meridian) werd gebruikt voor het aantonen van zowel *Giardia duodenalis* als *Cryptosporidium* spp. Naast de ImmunoCardSTAT test werd tevens de BioX sneltest gebruikt voor het aantonen van *Cryptosporidium* spp. Monsters die positief waren in beide sneltesten werden door het RIVM (onderzoeksgroep dr. Joke van der Giessen) in eerste instantie met *Cryptosporidium parvum* en *Cryptosporidium hominis* specifieke PCR's onderzocht en in tweede instantie met een real-time PCR die generiek zou moeten zijn voor *Cryptosporidium* spp.

### 3.3.3. *Clostridium difficile*

De aanwezigheid van toxinogene *Clostridium difficile* kan direct bepaald worden door het aantonen van toxinen in de feces, maar deze methode is (veel) minder gevoelig dan kweek en biedt ook geen mogelijkheden voor nadere subtypering. Daarom werd in dit project gekozen voor een selectieve kweekmethode. Aangezien de kweek van deze bacterie complex is en de nodige expertise vereist werd dit uitbesteed aan het CVI in Lelystad. Voor het onderzoek naar *Clostridium difficile* werden de ingezonden mestmonsters van paarden en veulens met diarree, ingevroren bij -20 °C. Deze monsters werden vervolgens gemiddeld drie weken na aankomst, in partijen van 20 stuks, bevroren getransporteerd naar het CVI te Lelystad. De kweek werd uitgevoerd zoals beschreven in het onderzoek van Koene et al. (2011), zie ook Bijlage 8. De identiteit van verdachte kolonies werd bevestigd door een combinatie van testen (agglutinatie, MALDI-TOF en PCR). Bevestigde isolaten werden vervolgens doorgestuurd naar het LUMC (onderzoeksgroep dr. Ed Kuijper) voor bepaling van de toxinegenen A en B en de binaire toxinegenen, waarbij tevens ribotypering werd uitgevoerd. Mogelijk zal een beperkt aantal isolaten ook nog onderzocht worden middels multiple-locus variable number tandem repeat analysis (MLVA) voor nadere moleculaire subtypering en kan de antibioticum gevoeligheid nog worden vastgesteld.

### 3.3.4. *Rhodococcus equi*

Fecesmonsters van veulens zonder diarree tussen de 6 tot 8 weken oud werden opgeslagen bij een temperatuur van -70 graden Celsius. Vervolgens werden de monsters in batches parallel onderzocht op twee selectieve media (NANAT / mCAZ-NB) (Bijlage 9). De monsters werden in verdunningen van 1:10, 1:100 en 1:1000 uitgeplaat, zodat semi-kwantitatieve gegevens verkregen konden worden. Verdachte kolonies werden bevestigd door middel van typering met de MALDI-TOF. In de gevallen waarin de MALDI-TOF geen duidelijke identificatie gaf, maar de kolonies wel morfologisch verdacht waren, werd een CAMP test ingezet ter identificatie. Per positief monster werden meerdere *Rhodococcus equi* isolaten met een real-time PCR onderzocht op de aanwezigheid van het VapA gen. Ook werd door middel van een antibiogram (MIC methode) de gevoeligheid van de bacteriën voor relevante antibiotica bepaald.

## 3.4. Enquête

Om te bepalen of er mogelijke associaties waren tussen het voorkomen van de onderzochte bacteriën in de mest en managementfactoren, is gevraagd om bij elke afname van mest een korte enquête af te nemen bij de eigenaar van het paard. In deze enquête werden 24 vragen gesteld over het al dan niet toepassen van verschillende managementfactoren op het bedrijf. Deze factoren gaven een indicatie van:

- Het weidemanagement op de bedrijven waar de paarden gehuisvest staan
- Of de paarden weidegang krijgen (ja in lente en zomer, ja het hele jaar, nee) en de duur van de weidegang
- Of de paarden in de wei worden bijgevoerd (nee, ja kleine hoeveelheid, ja onbeperkt, ja anders)
- De locatie van het bedrijf (Noord-, Zuid- of Midden-Nederland)
- Subpopulatie: veulens (<1 jaar) of volwassen paarden (=>1 jaar)
- Bedrijfstype (IST locatie/ pensionstal, manege, fokkerij, kinderboerderij)
- Leeftijd (<1 jaar, =>1-<5 jaar, =>5-10 jaar, => 10 jaar)
- Diarree verschijnselen (matig, ernstig)
- Of er vaker dieren met diarree gezien zijn op het bedrijf in de periode tussen januari en het moment van monstername (voorjaar/zomer)
- Of het paard nog andere klinische symptomen heeft dan diarree
- Welk type water de paarden in de wei en/of op stal aangeboden krijgen (oppervlaktewater, bronwater, leidingwater)
- De bezoekers (aantal in het kader van activiteiten en/ of beroepsmatig)
- Het type ruwvoer dat de paarden gevoerd krijgen (hooi, kuilgras, beide, anders)
- Hoe vaak er per week uitgemest wordt
- Het type huisvesting in de wei en/of op stal (individueel, in groepen van twee, in grotere groepen)
- De aanwezigheid van andere landbouwhuisdieren (schapen, geiten, koeien, varkens, pluimvee, kalveren, overig).



### 3.5. Statistische methoden

De steekproefgrootte voor de prevalentiestudie werd berekend met behulp van WinEpiScope. Voor dit onderzoek was het streven om 139 monsters per subpopulatie te testen. Hierbij werd aangenomen dat de geschatte prevalentie 10% zou zijn en werd een precisie en nauwkeurigheid van respectievelijk 5% en 95% aangenomen bij een populatie van 500.000 paarden in Nederland.

De vragenlijsten werden ingevoerd in het programma NETQ. Vervolgens werden de gegevens geëxporteerd naar het programma SAS. Voor het vóórkomen van *Cryptosporidium* spp., *Clostridium difficile* en *Rhodococcus equi* waren voldoende monsters genomen en waren er voldoende positieve resultaten aanwezig. Hierdoor was het mogelijk om voor deze drie agentia een risicofactor analyse uit te voeren waarbij gekeken werd naar het al dan niet vóórkomen van de betreffende pathogeen in relatie tot de in de enquête gevraagde managementfactoren.

Omdat het vóórkomen van de pathogenen binomiaal verdeeld was (de pathogeen werd wel of niet gevonden) konden logistische regressiemodellen gebruikt worden waarbij het wel of niet aangetoond zijn van de pathogeen meegenomen werd als afhankelijke variabele. Vervolgens werden in de univariabele logistische regressie analyses de één-op-één associaties tussen de verschillende potentiële risicofactoren/maatregelen en het wel of niet aangetoond zijn van de pathogenen in de mest onderzocht. Variabelen die een  $P$ -waarde  $<0,3$  (Wald test) hadden zijn vervolgens beschreven en meegenomen in de multivariabele analyse.

In de multivariabele analyse zijn al deze factoren samen in een model opgenomen. Vervolgens is door middel van een *backward stepwise* selectie en eliminatie methode, telkens de variabele met de hoogste  $P$ -waarde uit het model verwijderd en toegevoegd totdat alle overgebleven variabelen een  $P$ -waarde  $<0,1$  (Wald test) hadden. Er is besloten om de grens bij 0,10 te leggen in verband met de relatief lage aantallen observaties die in de analyses meegenomen konden worden. Bij het uitvoeren van de multivariabele analyse werd rekening gehouden met mogelijke confounders door de verandering in de modelschattingen te monitoren (confounding werd aanwezig geacht als de verandering in de puntschatting van de *odds* ratio van een variabele meer dan 25% verandert of als er een verandering van  $>0,1$  is bij *odds* ratio's tussen de -0,4 en 0,4). Indien er confounding geconstateerd werd, werd de confounder in het model gehouden en werd de eerstvolgende variabele met de hoogste/laagste  $P$ -waarde verwijderd/toegevoegd. Door middel van de pearson chi  $X^2$  toets is gemonitord of er indicaties waren dat het gebruikte model niet bij de data paste. De hoeveelheid verklaarde variatie door het uiteindelijke model is weergegeven met de pseudo  $R^2$ .

## 4. Resultaten

### 4.1 Inzendingen

Het streven van 139 fecesmonsters per subpopulatie is niet gehaald. In totaal zijn 246 monsters binnengekomen en zijn 243 monsters geanalyseerd. Door de kleinere aantallen zijn de betrouwbaarheidsintervallen om de gevonden prevalenties wat ruimer. In totaal zijn de volgende hoeveelheden monsters binnengekomen per subpopulatie:

Paarden met diarree:	56	23%
Paarden zonder diarree:	112	46%
Veulens met diarree:	27	11%
Veulens zonder diarree:	51	21%
<b>Totaal:</b>	<b>246</b>	<b>100%</b>

### 4.2 Positieve uitslagen en waargenomen prevalenties

In Tabel 1 zijn de aantallen monsters, de aantallen positieve uitslagen per pathogeen, de waargenomen prevalentie en de betrouwbaarheidsintervallen weergegeven, waarbij voor *Cryptosporidium* spp. de prevalentie berekend is volgens een conservatief criterium (alleen positief indien in beide testen positief) en volgens een ruimer criterium (positief indien in beide of een van beide testen positief).

Tabel 1. Positieve uitslagen en prevalenties pathogenen.

	Monsters (n)	Positief (n)	Prevalentie	95% betrouwbaarheidsinterval
<i>Salmonella</i> spp.	193	7	3,6%	1,5-7,3%
<i>Cryptosporidium</i> spp. (beide testen positief)	193	33	17,9%	13,6-23,3%*
<i>Cryptosporidium</i> spp. (1 of 2 testen positief)	193	66	34,0%	27,6-41,2%*
<i>Giardia duodenalis</i>	193	2	1,0%	0-3,7%
<i>Clostridium difficile</i>	77**	26	32,1%	22,2-43,4%
<i>Rhodococcus equi</i> (VapA positief)	52***	21	40,4%	27,0-54,9%

\*: Gecorrigeerd voor bedrijfseffecten

\*\* : Alleen monsters van paarden met diarree en veulens met diarree onderzocht

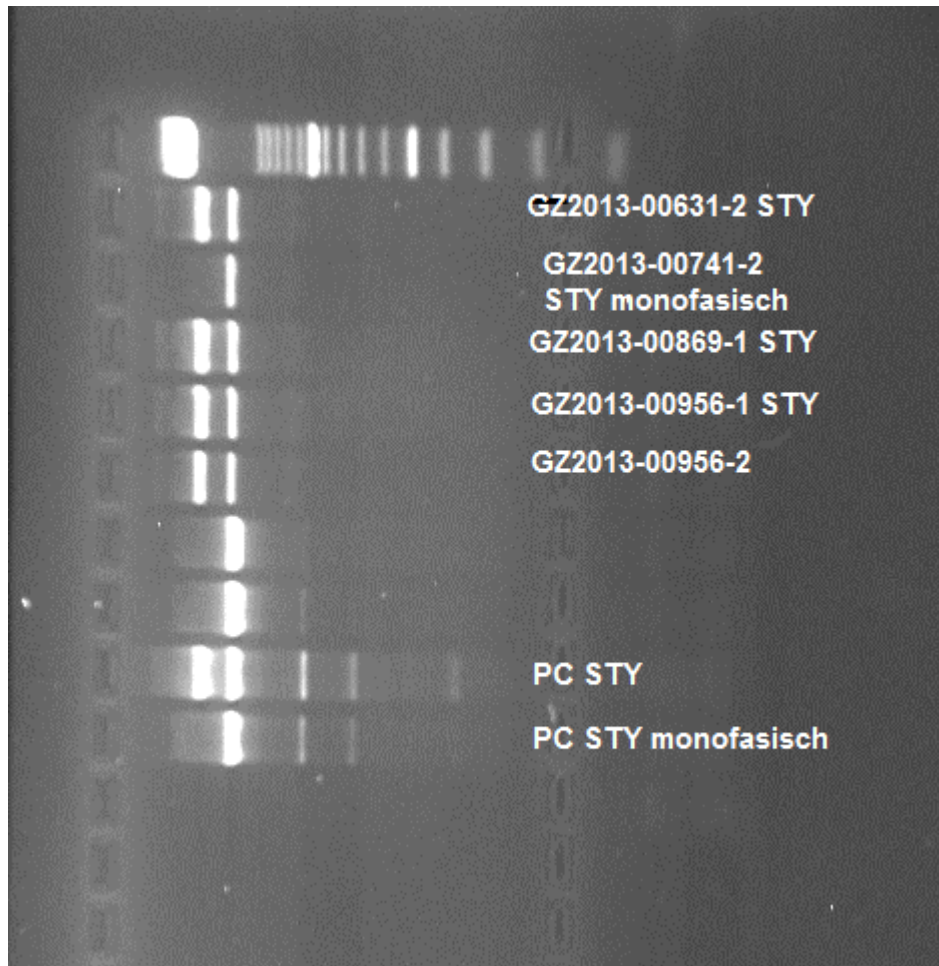
\*\*\*: Alleen monsters van veulens zonder diarree onderzocht

### 4.3. *Salmonella* spp.

#### 4.3.1. Prevalentie

Uit 7 van de 193 onderzochte fecesmonsters (3.6%; 95% BI: 1.5-7.3%) werden *Salmonella* spp. gekweekt. De typering leverde de volgende resultaten op: 2x *Salmonella* Enteritidis, 4x *Salmonella* Typhimurium en 1x *salmonella* species groep B. Het salmonella groep B isolaat werd voor nadere typering naar het RIVM gestuurd en werd getypeerd als een monofasische *Salmonella* Typhimurium. Over de diersoorten heen is een toegenomen aandacht voor monofasische *Salmonella* Typhimurium stammen in verband met resistentie problematiek (multiresistent fenotype volgens MARAN 2012). Daarom is binnen GD ook een PCR geoptimaliseerd en gevalideerd voor het differentiëren van bifasische ("gewone") en monofasische *Salmonella*

*Typhimurium* stammen die aan het einde van dit project beschikbaar kwam. De resultaten hiervan worden weergegeven in onderstaande foto. De resultaten van deze PCR waren overeenkomstig de typering zoals uitgevoerd door het RIVM. Alleen isolaat GZ2013-00741-1 bleek een monofasische *Salmonella Typhimurium* te zijn. Tevens werden alle salmonella isolaten (n=7) nogmaals getest in een generieke real-time PCR voor *Salmonella* spp. met een voor alle isolaten duidelijk positief resultaat.



Figuur 1. Conventionele PCR voor de differentiatie van bifasische en monofasische *Salmonella typhimurium* stammen.

#### 4.3.2. Antibioticumgevoeligheid

Alle in dit project verzamelde salmonella isolaten zijn door middel van een antibiogram (MIC bepaling) onderzocht op gevoeligheid voor relevante antibiotica (Tabel 2). Beide *Salmonella Enteritidis* isolaten waren gevoelig voor de meeste antibiotica (intermediair voor florfenicol, ongevoelig voor colistine, tiamulin, tilmic/tildipirosine/gami/tulathromycine en tylosine/erytromine). De *Salmonella Typhimurium* isolaten (n=4) waren ook gevoelig voor de meeste antibiotica (deels intermediair voor colistine (n=2), allemaal intermediair voor spectinomycine, deels ongevoelig voor sulfonamiden (n=2), allemaal ongevoelig voor tiamulin, tilmic/tildipirosine/gami/tulathromycine en tylosine/erytromine). Het monofasische *Salmonella Typhimurium* isolaat was ongevoelig voor 11 van de 20 onderzochte antibiotica/antibiotica combinaties (Tabel 4), waaronder voor een aantal antibiotica die voor paarden met een salmonella besmetting gebruikt worden zoals ampicilline, tetracycline en neomycine (Duijkeren van et al. 2011; Kuil van der, 2008).

Tabel 2. Antibioogram Salmonella Enteritidis.

Antibiotica	Gevoelig (n)	Intermediair (n)	Ongevoelig (n)
Amoxicilline-clavulaanzuur	2		
Ampicilline/amoxicilline	2		
Apramycine	2		
4e generatie cefalosporines	2		
Cefotaxim	2		
Colistine			2
Enro-/cipro-/dano-/di-/marbofloxacin	2		
Florfenicol		2	
Fluméquine/oxolinezuur	2		
Gentamicine/paromomycine	2		
Neomycine/framecetine/kanamycine	2		
Spectinomycine	2		
Sulfonamiden	1		1
(Chloor)Tetra-/oxytetra-/doxycycline	2		
Tiamulin			2
Tilmic/tildipirosine/gami/tulathromycine			2
Streptomycine/dihydrostreptomycine	2		
Trimethoprim	2		
Trimethoprim-sulfonamiden	2		
Tylosine/erythromycine			2

Tabel 3. Antibioogram Salmonella Typhimurium.

Antibiotica	Gevoelig (n)	Intermediair (n)	Ongevoelig (n)
Amoxicilline-clavulaanzuur	4		
Ampicilline/amoxicilline	4		
Apramycine	4		
4e generatie cefalosporines	4		
Cefotaxim	4		
Colistine	4		
Enro-/cipro-/dano-/di-/marbofloxacin	4		
Florfenicol	2	2	
Fluméquine/oxolinezuur	4		
Gentamicine/paromomycine	4		
Neomycine/framecytine/kanamycine	4		
Spectinomycine		4	
Sulfonamiden	2		2
(Chloor)Tetra-/oxytetra-/doxycycline	4		
Tiamulin			4
Tilmic/tildipirosine/gami/tulathromycine			4
Streptomycine/dihydrostreptomycine	4		
Trimethoprim	4		
Trimethoprim-sulfonamiden	4		
Tylosine/erythromycine			4

Tabel 4. Salmonella species groep B (monofasische Salmonella Typhimurium)

Antibiotica	Gevoelig (n)	Intermediair (n)	Ongevoelig (n)
Amoxicilline-clavulaanzuur			1
Ampicilline/amoxicilline			1
Apramycine	1		
4e generatie cefalosporines	1		
Cefotaxim	1		
Colistine	1		
Enro-/cipro-/dano-/di-/marbofloxacin	1		
Florfenicol			1
Fluméquine/oxolinezuur	1		
Gentamicine/paromomycine	1		
Neomycine/framecetine/kanamycine			1
Spectinomycine			1
Sulfonamiden			1
(Chloor)Tetra-/oxytetra-/doxycycline			1
Tiamulin			1
Tilmic/tildipirosine/gami/tulathromycine			1
Streptomycine/dihydrostreptomycine			1
Trimethoprim	1		
Trimethoprim-sulfonamiden	1		
Tylosine/erythromycine			1

#### 4.3.3. Risicofactor analyse

De prevalentie van salmonella infecties was met zeven positieven van de 193 monsters dusdanig laag dat hier geen risicofactor analyse op gedaan kon worden. Naar aanleiding van de ingevulde vragenlijsten vielen de volgende punten op: van de zeven positieve uitslagen hadden vijf dieren geen diarree en slechts twee dieren matige diarree, het ging hier om een veulen en een vierjarig paard dat al drie jaar matige diarree had (afkomstig van verschillende bedrijven). Dit vierjarige paard had nog andere symptomen dan diarree namelijk sloomheid, een doffe vacht en een achterstand in groei. Bij beide dieren met diarree hadden nog twee andere paarden op het bedrijf diarree. In Tabel 5 zijn verdere relevante gegevens weergegeven. De twee *Salmonella Enteritidis* positieve monsters zijn afkomstig van hetzelfde bedrijf, evenals de twee *Salmonella Typhimurium* positieve monsters.

Tabel 5: Overzicht relevante gegevens *Salmonella* spp.

Provincie	Bedrijfstype	Bedrijfsnr.	Leeftijd	Diarree	Type	Huisvesting weide
Limburg	Fokkerij	1	2 jaar	nee	<i>S. typhimurium</i>	In groepen
Zeeland	Manege	2	15 jaar	nee	<i>S. species groep B</i>	In groepen
Noord- Brabant	IST locatie/ pensionstal	3	4 jaar	ja, matig	<i>S. typhimurium</i>	In groepen
Overijssel	Fokkerij	4	4 jaar	nee	<i>S. enteritidis</i>	Individueel
Overijssel	Fokkerij	4	4 weken	ja, matig	<i>S. enteritidis</i>	In groepen
Limburg	Fokkerij	5	5 jaar	nee	<i>S. typhimurium</i>	In groepen
Limburg	Fokkerij	5	16 jaar	nee	<i>S. typhimurium</i>	In groepen

#### 4.4. *Cryptosporidium* spp.

##### 4.4.1. Prevalentie

Voor dit onderzoek zijn 193 mestmonsters van paarden afkomstig van 153 verschillende bedrijven onderzocht op het voorkomen van *Cryptosporidium* spp. Indien mestmonsters waarbij in minimaal één van de twee testen *Cryptosporidium* spp. werden aangetoond als positief worden beschouwd, waren 66 van de 193 geteste monsters positief. Gecorrigeerd voor het feit dat mestmonsters van paarden binnen bedrijven meer gelijkenis hadden dan mestmonsters van paarden tussen bedrijven was de gevonden prevalentie 34,0% (95% BI: 27,6-41,2%). In totaal scoorden 33 van de 193 onderzochte monsters positief in beide testen, terwijl respectievelijk 8 en 25 monsters alleen positief testten in de ImmunoCard Statt Test en de BioX teststrips. Gecorrigeerd voor het feit dat er op een aantal bedrijven mest van meer dan één dier was aangeboden voor onderzoek was de prevalentie van *Cryptosporidium* spp. in de onderzochte populatie paarden 17,9% (95% BI: 13,6-23,3%), indien gebaseerd op een positieve uitslag in beide testen.

Omdat duidelijke verschillen tussen beide testen aanwezig waren is in Tabel 14 een overzicht gegeven van de verschillende prevalenties wanneer één van beide of wanneer beide testen gebruikt zouden zijn.

Tabel 6. Waargenomen prevalenties voor *Cryptosporidium* spp. voor verschillende testen/test combinaties

Test	Prevalentie
Beide testen positief	17,9% (95% BI: 13,6-23,3%)
ImmunoCard Stat alleen positief	21,2% (95% BI: 15,7-27,7%)
BioX alleen positief	30,1% (95% BI: 23,7-37,1%)
Prevalentie alle positieve uitslagen	34,0% (95% BI: 27,6-41,2%)

In Bijlage 11 is de lijst te vinden met daarin het aantal ingestuurde monsters per provincie. Hierin staat ook een overzicht met het aantal monsters per bedrijfstype.

##### 4.4.2. Risicofactor analyse

In de univariabele analyses bleken zes factoren met een  $P$ -waarde < 0.3 geassocieerd met het vóórkomen van *Cryptosporidium* spp. in de mest (indien monsters positief scoorden in beide testen). Deze staan beschreven in Tabel 7.

Tabel 7. Beschrijvende resultaten van de risicofactoren die in de univariabele logistische regressie op basis van 193 mestmonsters met een P-waarde < 0,3 (Wald test) geassocieerd waren met het voorkomen van *Cryptosporidium* spp. in mest van paarden en veulens op basis van het resultaat van twee testen. Hierbij werd gecorrigeerd voor het feit dat paarden van hetzelfde bedrijf meer op elkaar leken dan paarden van verschillende bedrijven.

Variabele	Aantal	Aantal cryptosporidium aangetoond	% cryptosporidium aangetoond	P- waarde (Wald)
<b>Hoeveel bezoekers zijn er de afgelopen week op het bedrijf geweest met betrekking tot activiteiten?</b>				
Geen	15	2	13	
1-5	81	14	17	
5-10	24	2	8	0,23
10-20	26	3	12	
>20	30	9	30	
Missend	17	3		
<b>Zijn er schapen op het bedrijf aanwezig?</b>				
Nee	163	30	18	0,28
Ja	30	3	10	
<b>Welk type water krijgt het paard voornamelijk indien het in de wei staat?</b>				
Oppervlaktewater	51	5	10	0,29
Leidingwater	78	14	18	
Bronwater	24	2	8	
Niet van toepassing	30	7	23	
Missend	10	5		
<b>Heeft het bemonsterde paard diarree?</b>				
Ja	81	17	21	0,24
Nee	112	16	14	
<b>Worden de paarden in de wei bijgevoerd?</b>				
Nee	41	10	24	
Ja, kleine hoeveelheden	61	4	7	0,09
Ja, onbeperkt	45	8	18	
Ja, overig	44	9	20	
Missend	2	2		
<b>Welk type ruwvoer voert u het paard hoofdzakelijk bij?</b>				
Droog hooi	52	7	13	
Kuilgras	86	14	16	
Menging van beide	40	5	13	0,11
Overig	5	3	60	
Missend	10	4		



In de multivariabele analyse bleef maar één variabele over. Het model paste niet heel goed bij de data waardoor de resultaten met de nodige voorzichtigheid geïnterpreteerd dienen te worden.

Tabel 8. Resultaten van de multivariabele logistische regressie op basis van de resultaten van 193 mestmonsters van paarden. De resultaten geven de kans op het voorkomen van cryptosporidium weer.

Variabele	% Cryptosporidium aangetoond	Odds ratio	95% betrouwbaar- heidsinterval	P- waarde (Wald)
<b>Worden de paarden in de wei bijgevoerd?</b>				
Nee	24	Referentie		
Ja, kleine hoeveelheden	7	0,22	0,07-0,69	0,009
Ja, onbeperkt	18	0,67	0,26-1,70	0,40
Ja, overig	20	0,80	0,30-2,13	0,65

In de univariabele analyses bleken acht factoren met een  $P$ -waarde  $< 0,3$  geassocieerd met het vóórkomen van cryptosporidium in de mest op basis van het resultaat van minimaal één test. Deze staan beschreven in Tabel 9.

Tabel 9. Beschrijvende resultaten van de risicofactoren die in de univariabele logistische regressie op basis van 193 mestmonsters met een  $P$ -waarde  $< 0,3$  (Wald test) geassocieerd waren met het voorkomen van cryptosporidium in paardenmest op basis van het resultaat van minimaal één test. Hierbij werd gecorrigeerd voor het feit dat paarden van hetzelfde bedrijf meer op elkaar leken dan paarden van verschillende bedrijven.

Variabele	Aantal	Aantal cryptosporidium aangetoond	% cryptosporidium aangetoond	P-waarde (Wald)
<b>Tot welke subpopulatie behoort het paard?</b>				
Paard met diarree	55	24	44	
Paarden zonder diarree	112	33	29	0,20
Veulens met diarree	26	9	35	
<b>In welke provincie is het monster genomen (gecategoriseerd in Noord, Midden en Zuid)</b>				
Noord	45	11	24	
Midden	68	24	35	0,26
Zuid	80	31	39	
<b>Heeft het paard diarree en zo ja, hoe lang?</b>				
Ja, < 7 dagen	43	12	28	
Ja, $\geq 7$ dagen	34	17	50	0,07
Nee	112	33	29	
Missend	4	4		

**Heeft het paard nog andere symptomen dan diarree?**

Nee	43	21	49	
Ja	35	10	29	0,07
Missend	115	35	30	

**Voert u ruwvoer bij op de wei?**

Nee	41	18	44	
Ja, kleine hoeveelheden	61	17	28	
Ja, onbepikt	45	18	40	0,20
Ja, overig	15	3	20	
Missend	31	20	68	

**Welk type water krijgt het paard op de wei?**

Oppervlaktewater	52	12	23	
Leidingwater	83	34	41	
Bronwater	24	6	25	0,15
n.v.t.	13	4	31	
Missend	21	10	48	

**Hoeveel beroepsmatige bezoekers zijn deze week op het bedrijf geweest?**

Geen	35	12	34	
1-5	114	43	38	
5-10	15	4	27	0,24
>10	17	2	12	
Missend	12	5	42	

**Hoeveel bezoekers zijn deze week op het bedrijf geweest om activiteiten uit te voeren?**

Geen	15	2	13	
1-5	81	27	33	
5-10	24	6	25	0,15
10-20	26	9	35	
>20	30	15	50	
Missend	17	7	41	

In de multivariabele analyse bleef maar één variabele over. Het model paste wederom niet heel goed bij de data waardoor de resultaten met de nodige voorzichtigheid geïnterpreteerd dienen te worden.

Tabel 10. Resultaten van de multivariabele logistische regressie op basis van de resultaten van 189 mestmonsters van paarden. De resultaten geven de kans op het voorkomen van cryptosporidium weer.

Variabele	% Cryptosporidium aangetoond	Odds ratio	95% betrouwbaar- heidsinterval	P- waarde (Wald)
<b>Heeft het paard diarree en zo ja, hoe lang?</b>				
Nee	29	Referentie		
Ja, <7 dagen	28	0,93	0,42-2,02	0,19
Ja, >=7 dagen	50	2,39	1,09-5,25	0,02

#### 4.5. *Giardia duodenalis*

Bij slechts twee van de 193 paarden (1%) werd de parasiet *Giardia duodenalis* (ook wel *Giardia lamblia* of *Giardia intestinalis* genoemd) aangetoond met behulp van een sneltest (lateral flow device, Meridian). Dit betrof een paard van tien jaar oud zonder diarree en een veulen van drie weken oud met matige diarree uit de provincies Limburg en Gelderland, afkomstig van respectievelijk een IST locatie/pensionstal en een fokkerijbedrijf. Bij beide dieren werd ook *Cryptosporidium* spp. aangetoond. Gegevens over waterversprekking bij het veulen waren onbekend, het paard kreeg leidingwater. Omdat de prevalentie zo laag was kon geen risicofactor analyse gedaan worden.

#### 4.6. *Clostridium difficile*

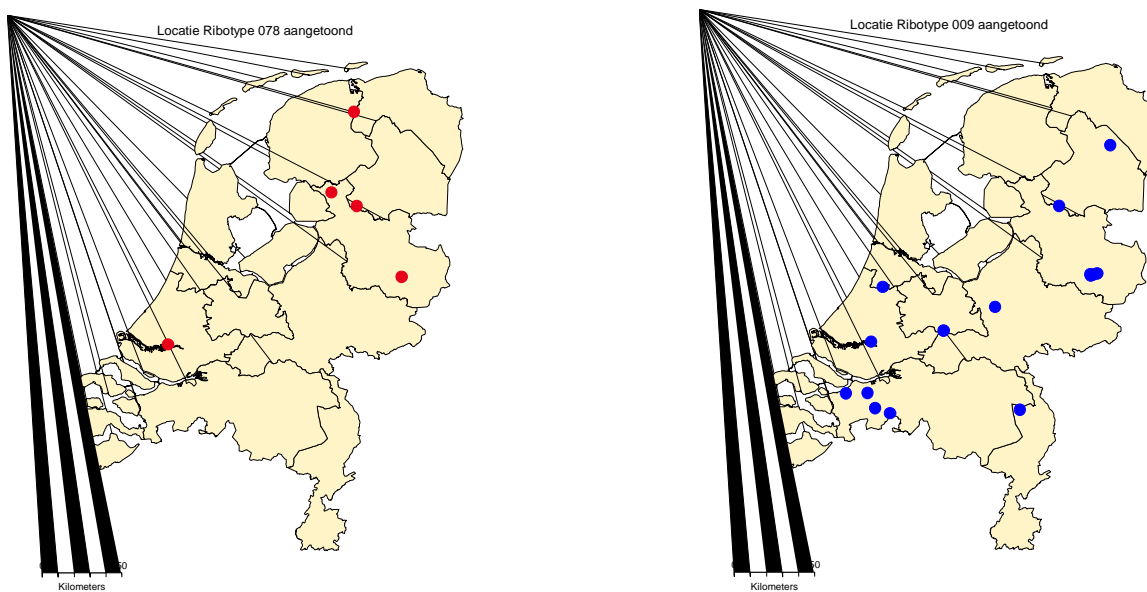
##### 4.6.1. Prevalentie

In totaal zijn 81 monsters opgestuurd naar het CVI te Lelystad om daar getest te worden middels kweek op *Clostridium difficile*. Hierbij waren 79 monsters afkomstig van veulens met diarree of paarden met diarree. Op verzoek van een praktijk zijn twee monsters van een paard zonder diarree getest op *Clostridium difficile*, waarvan één met een positieve uitslag. Deze merrie had zelf nooit diarree gehad, maar enkele van haar veulens overleden een aantal dagen na geboorte aan heftige bloederige diarree. Uit 29 van de 81 monsters werd *Clostridium difficile* gekweekt, waarvan er door het LUMC in Leiden 26 (32,1%; 95% BI: 22,2-43,4%) als zodanig bevestigd werden. Van deze 26 monsters bevatten acht isolaten (30,7%) een of meer toxine-genen (9,9% van de onderzochte monsters; 95% BI: 4,4-18,5%). Voor de toxinogene *Clostridium difficile* isolaten werden drie verschillende ribotypes gevonden (001, 033 en 078), voor de non-toxinogene *Clostridium difficile* isolaten werden twee verschillende ribotypes gevonden (009 en 098). De geografische spreiding van de dominant aanwezige ribotypes 009 en 078 wordt in Figuur 2 weergegeven.

Tabel 11. Resultaten LUMC voor de aanwezigheid van het GluD gen (identificatie Clostridium difficile), de toxine A en B genen, de binaire toxine genen en het ribotype.

Naam	Inzendnummer	Dier	GluD	Ribo	Tox A	Tox B	CdtA	CdtB	P of V	Leeftijd
3	GZ2013-00450-001	Paard	+	78	+	+	+	+	Paard	1 jaar
116	GZ2013 00742 001	Paard	+	9	-	-	-	-	Veulen	1 jaar
25	GZ2013-00528-001	Paard	+	78	+	+	+	+	Paard	4 jaar
60	GZ2013 00641 001	Paard	+	33	+	-	+	+	Paard	1 jaar
73	GZ2013 00660 001	Paard	+	33	+	-	+	+	Paard	12 jaar
75	GZ2013 00671 001	Paard	+	9	-	-	-	-	Veulen	1 week
89	GZ2013 00697 001	Paard	+	9	-	-	-	-	Paard	3 jaar
98	GZ2013 00714 001	Paard	+	98	-	-	-	-	Paard	9 jaar
99	GZ2013 00718 001	Paard	+	78	+	+	+	+	Paard	10 jaar
117-1	GZ2013 00743 001	Paard	+	78	+	+	+	+	Paard	11 jaar
124	GZ2013 00748 001	Paard	+	9	-	-	-	-	Paard	20 jaar
125	GZ2013 00749 001	Paard	+	9	-	-	-	-	Veulen	5 weken
126	GZ2013 00750 001	Paard	+	1	+	+	-	-	Veulen	1 week
132	Geen sticker op pot	Paard	+	9	-	-	-	-	Paard	8 jaar
140	GZ2013 00788 001	Paard	+	9	-	-	-	-	Veulen	1 week
150	GZ2013 00816 001	Paard	+	9	-	-	-	-	Veulen	10 weken
159	GZ2013 00824 002	Paard	+	9	-	-	-	-	Paard	13 jaar
163	GZ2013 00824 004	Paard	+	78	+	+	+	+	Veulen	4 weken
164	GZ2013 00824 006	Paard	+	9	-	-	-	-	Veulen	4 weken
165	GZ2013 00825 001	Paard	+	9	-	-	-	-	Paard	9 jaar
176	GZ2013 00861 001	Paard	+	9	-	-	-	-	Paard	3 jaar
177	GZ2013 00869 001	Paard	+	9	-	-	-	-	Paard	4 jaar
184	GZ2013 00890 002	Paard	+	9	-	-	-	-	Paard	3 jaar
185	GZ2013 00890 003	Paard	+	9	-	-	-	-	Veulen	4 weken
188	GZ2013 00909 001	Paard	+	?	-	-	-	-	Paard	8 jaar
197	GZ2013 00918 001	Paard	+	9	-	-	-	-	Veulen	4 weken

Figuur 2. Geografische spreiding in Nederland van Clostridium difficile ribotypes 078 en 009 bij paarden en veulens met diarree



#### 4.6.2. Risicofactor analyse

In totaal waren van de 81 monsters die zijn getest op het voorkomen van *Clostridium difficile*, enquête gegevens beschikbaar van 79 paarden en veulens. Hiervan hadden 77 dieren diarreeverschijnselen (54 volwassen paarden en 23 veulens) en twee paarden niet. Diarree was het selectiecriterium om monsters te onderzoeken op het voorkomen van *Clostridium difficile* en daarom zijn de twee paarden zonder diarreeverschijnselen niet meegenomen in de analyses.

In de univariabele analyses bleken acht factoren met een  $P$ -waarde  $< 0.3$  geassocieerd met het vóórkomen van *Clostridium difficile* bacteriën in de mest. Deze staan beschreven in Tabel 12.

Tabel 12. Beschrijvende resultaten van de risicofactoren die in de univariabele logistische regressie op basis van 77 mestmonsters met een P-waarde < 0,3 (Wald test) geassocieerd waren met het voorkomen van *Clostridium difficile* in paardenmest.

Variabele	Aantal	Aantal Clostridium aangetoond	% Clostridium aangetoond	P-waarde (Wald)
<b>Hoe worden de paarden hoofdzakelijk gehuisvest in de stal?</b>				
Individueel	48	20	42	0,18
Met meerdere dieren	16	3	19	
Onbekend	13	3	23	
<b>Hoe worden de paarden hoofdzakelijk gehuisvest in de wei?</b>				
Individueel	38	14	37	0,26
In koppels van 2 dieren	15	3	20	
In groepen	38	14	37	
Niet van toepassing/ onbekend	13	3	23	
<b>Hoeveel bezoekers zijn er de afgelopen week op het bedrijf geweest met betrekking tot activiteiten?</b>				
0-2	36	16	44	0,13
>2	31	9	29	
Onbekend/ niet van toepassing	10	1	10	
<b>Van wat voor type bedrijf is het paard afkomstig?</b>				
Fokkerij	32	13	41	0,11
Lst/ pensionstal	33	8	24	
Kinder-/zorgboerderij	6	1	20	
Manege	5	4	80	
<b>Welk type ruwvoer krijgt het paard bijgevoerd?</b>				
Hooi	20	4	20	0,16
Kuilgras	34	10	29	
Beide	17	9	53	
Onbekend of overig	6	3	50	
<b>Worden de paarden in de wei bijgevoerd?</b>				
Nee	16	10	63	0,05
Ja beperkte hoeveelheid voor de nacht	21	4	19	
Ja, onbeperkt	20	7	35	
Niet van toepassing of onbekend	20	5	25	
<b>Is het monster van een paard of van een veulen genomen?</b>				
Paard met diarree	54	15	28	0,09
Veulen met diarree	23	11	48	
<b>Zijn er schapen op het bedrijf aanwezig waar het paard is gehuisvest?</b>				
Ja	8	1	13	0,21
Nee	69	25	36	

In het multivariabele model bleven uiteindelijk twee variabelen over waarvan een variabele een overall  $P$ -waarde  $<0.10$  had en een variabele een  $P$ -waarde van 0,13, maar ook een confounder bleek te zijn. Het uiteindelijke model verklaarde 11% van de variatie in het al dan niet voorkomen van *Clostridium difficile* in paardenmest ( $R^2 = 0,11$ ). Er waren daarnaast geen indicaties dat het model niet goed bij de data zou passen op basis van de pearson chi  $X^2$  toets ( $P$ -waarde=0,53).

De vraag of het dier met diarreeverschijnselen een volwassen paard of een veulen was, was een confounder ten opzichte van de variabele of de paarden in de wei bijgevoerd werden. Dit betekent dat de schattingen van deze variabele te extreem veranderden indien de vraag over de groep waartoe het bemonsterde paard met diarree behoorde verwijderd werd. Daarom is deze variabele in het uiteindelijke model gelaten. Daarnaast bleef er één factor over die geassocieerd was met het voorkomen van *Clostridium difficile* in de mest (Tabel 13).

Bij paarden en veulens met diarree die óf bijgevoerd worden, óf niet in de wei gehouden worden (grootste deel van de categorie niet van toepassing of onbekend), werd vijf keer minder vaak *Clostridium difficile* in de mest aangetoond dan bij paarden die in de wei in de wei stonden maar niet werden bijgevoerd (OR=0,2: 95% BI: 0,04-0,7 en OR=0,2: 95% BI: 0,05-0,8, respectievelijk). Ook bij paarden die onbeperkt werden bijgevoerd, was een lagere kans om *Clostridium difficile* in de mest aan te tonen in vergelijking met paarden in de wei die niet worden bijgevoerd. Echter, dit verschil was niet significant (Tabel 13).

Tabel 13. Resultaten van de multivariabele logistische regressie op basis van de resultaten van 77 mestmonsters van paarden met diarree. De resultaten geven de kans op het voorkomen van *Clostridium difficile* weer.

Variabele	% Clostridium aangetoond	Odds ratio	95% betrouwbaar- heidsinterval	P-waarde (Wald)
<b>Worden de paarden in de wei bijgevoerd?</b>				
Nee	63	Referentie		
Ja beperkte hoeveelheid voor de nacht	19	0,2	0,04-0,7	0,02
Ja, onbeperkt	35	0,4	0,1-1,6	0,20
Niet van toepassing of onbekend	25	0,2	0,05-0,8	0,03
<b>Is het monster van een paard of van een veulen genomen?</b>				
Paarden met diarree	28	Referentie		
Veulens met diarree	48	2,3	0,7-7,2	0,13

#### 4.7. *Rhodococcus equi*

##### 4.7.1. Prevalentie

In totaal werden fecesmonsters van 52 veulens zonder diarree getest op de aanwezigheid van *Rhodococcus equi* bacteriën door middel van semi-kwantitatieve kweek op twee verschillende selectieve media. Hiervan waren 31 monsters (60,0%; 95% BI: 45,8-73,4%) positief op *Rhodococcus equi*. Van elk positief monster werden meerdere kolonies getest op het virulentie gen VapA, waarbij 21 van de 31 monsters positief bleken te zijn voor deze virulentiefactor. Daarmee was 40,4% (95% BI: 27,0-54,9%) van het totaal aantal monsters positief voor virulente *Rhodococcus equi* stammen. Deze 21 fecesmonsters werden tevens direct getest in een real-time VapA PCR, waarbij ongeveer de helft (10/21) monsters positief scoorde. Alle PCR positieve monsters bevatten meer dan 10.000 cfu/gram feces volgens aflezing op één of beide selectieve media. Dit geeft aan dat de gekozen kweekmethode duidelijk gevoeliger is dan directe detectie van VapA positieve *Rhodococcus equi* in feces door middel van real-time PCR.

##### 4.7.2. Antibioticum gevoeligheid

Tevens werd van elke VapA positieve *Rhodococcus equi* een antibiogram door middel van MIC bepaling ingezet. De resultaten zijn weergegeven in Tabel 14. Hierbij werd voor de meeste isolaten resistentie tegen tilmicosin (behorend tot de macroliden) gevonden. In verband met eventuele kruisresistentie tegen clarithromycine en azithromycine -ongeveer de enige antibiotica zijn die in combinatie met rifampicine gebruikt worden voor de behandeling van veulens met rhodococcose – werd in maart 2014 alsnog met behulp van de E-test de gevoeligheid voor clarithromycine en azithromycine bepaald voor de in dit onderzoek geïsoleerde virulente *Rhodococcus equi* stammen. Alle stammen bleken gevoelig te zijn voor deze antibiotica.



Tabel 14. Gevoeligheidspatronen voor *Rhodococcus equi* isolaten gekweekt uit fecesmonsters van veulens (n=21).

	Amoxicillin/Clavulan acid	Ampicillin	Cefepim	Ceftiofur	Clindamycin	Enrofloxacin	Erythromycin	Florfenicol	Neomycin	Oxaciline	Penicillin G	Sulfamethoxazol	Trimethoprim/ Sulfamethoxazol	Tetracyclin	Tilmicosin	Rifampicine
Sample #	AMC	AMP	CEP	CET	CLI	ENR	ERY	FLL	NEO	OXA	PEN	SMO	T/S	TET	TILM	RIF
REQ 1	S	S	S	I	R	R	S	I	S	R	R	R	S	S	R	S
REQ 2	S	S	S	I	R	I	I	R	S	S	R	R	S	S	R	S
REQ 3	S	S	S	I	R	I	I	R	S	R	R	R	S	S	R	S
REQ 4	S	S	S	I	R	I	S	I	S	R	I	R	S	S	R	S
REQ 5	S	S	S	I	R	I	I	R	S	R	R	R	S	S	R	S
REQ 6	S	S	S	S	R	I	S	R	S	S	R	S	S	S	I	S
REQ 7	S	S	S	I	R	I	S	R	S	R	R	S	S	S	R	S
REQ 8	S	S	S	R	R	S	I	I	S	R	R	S	S	S	R	S
REQ 9	S	S	S	I	R	S	S	R	S	R	I	R	S	I	R	S
REQ 10	S	S	I	R	R	I	I	R	S	R	R	R	S	S	R	S
REQ 11	S	S	S	S	I	I	S	R	S	S	R	S	S	S	I	S
REQ 12	S	S	S	I	R	S	S	R	S	R	I	S	S	S	R	S
REQ 13	S	S	S	I	R	I	S	R	S	R	R	S	S	S	R	S
REQ 14	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	I	R	S	I	R	S
REQ 15	S	S	S	I	R	I	S	R	S	R	R	S	S	S	R	S
REQ 16	S	S	R	I	R	S	I	R	S	R	R	R	S	I	R	S
REQ 17	S	S	S	S	I	S	S	I	S	S	I	S	S	S	R	S
REQ 18	S	S	S	S	I	S	S	R	S	S	I	S	S	S	I	S
REQ 19	S	S	I	I	I	I	S	R	S	S	I	S	S	S	R	S
REQ 20	S	S	S	I	R	I	S	R	S	S	R	S	S	S	R	S
REQ 21	S	S	S	I	R	I	S	R	S	S	R	S	S	S	R	S

R=resistent; I=intermediar; S=gevoelig

#### 4.7.3. Risicofactor analyse

In deze risicofactor analyses is gekeken naar de associatie tussen 1) het voorkomen van *Rhodococcus equi* en management factoren en 2) het voorkomen van het VapA gen en managementfactoren.

In deze analyses zijn zeven potentiële risicofactoren meegenomen namelijk, de locatie van het bedrijf waarop het veulen gehuisvest stond, de leeftijd van het veulen ten tijde van de monsternamen, of het veulen al eens antibiotica toegediend had gekregen, of het veulen verschijnselen van longontsteking had gehad, of het veulen in de wei kwam en of het veulen in contact kwam met bezoekers (al dan niet voor beroepsmatige activiteiten).

In de univariabele analyses waarbij naar de associatie tussen de meegenomen managementfactoren en het al dan niet aangetoond zijn van de *Rhodococcus equi* bacterie gekeken werd, had maar één variabele een  $P$ -waarde  $< 0,3$ . Dit was de factor regio. In mestmonsters afkomstig van paarden vanuit het zuiden van Nederland werd de *Rhodococcus equi* bacterie significant vaker aangetoond (OR=7,0; 95% BI: 1,7-28,3) dan in monsters vanuit het midden van Nederland. Ook in mestmonsters afkomstig van paarden die in het noorden van Nederland gehuisvest staan werd vaker *Rhodococcus equi* aangetoond dan in mestmonsters vanuit Midden-Nederland. Echter, dit verschil was net niet significant ( $p$ -waarde=0,09) (Tabel 15).

Tabel 15. Beschrijvende resultaten van de risicofactoren die in de univariabele logistische regressie op basis van 52 monsters met een  $P$ -waarde  $< 0,3$  (Wald test) geassocieerd waren met het voorkomen van *Rhodococcus equi* in mest van veulens.

Variabele	Aantal	Aantal <i>Rhodococcus equi</i> aangetoond	Odds ratio	95% betrouwbaar- heidsinterval	P-waarde (Wald)
<b>Regio</b>					
<b>Midden</b>	22	8 (36%)	Referentie		
<b>Noord</b>	10	7 (70%)	4,0	0,8-20,4	0,09
<b>Zuid</b>	20	16 (80%)	7,0	1,7-28,3	0,01

Wanneer er werd gekeken naar het al dan niet voorkomen van het VapA gen in mestmonsters van veulens, waren er in de univariabele analyses twee variabelen met een  $P$ -waarde  $< 0,3$  geassocieerd met het voorkomen van het VapA gen. Dit waren het aantal bezoekers en de leeftijd van het veulen ten tijde van de bemonstering (Tabel 16). De variabele regio werd bij deze analyses niet terug gevonden ( $P$ -waarde 0,48).

Tabel 16. Beschrijvende resultaten van de risicofactoren die in de univariabele logistische regressie op basis van 52 monsters met een P-waarde < 0,3 (Wald test) geassocieerd waren met het voorkomen van het VapA gen in mest van veulens.

Variabele	Aantal	Aantal VapA + R. equi aangetoond	% VapA+ R. equi aangetoond	P-waarde (Wald)
<b>Hoeveel bezoekers zijn er de afgelopen week op het bedrijf geweest met betrekking tot activiteiten?</b>				
0-3	21	6	29	0,24
>3	24	11	46	
Missend	7	4		
	Aantal monsters	Gemiddelde	Minimum- maximum	P-waarde
<b>Wat is de leeftijd in weken van het bemonsterde veulen?</b>				
Aangetoond	19	6,6	4-10	0,03
Niet aangetoond	33	5,4	2-8	

Bij het uitvoeren van het multivariabele model bleef alleen de factor leeftijd over. De kans op het ontwikkelen van een infectie met het VapA gen neemt significant toe met elke week dat het veulen ouder wordt. Per week toename in leeftijd was een OR van 1,6 keer meer kans (95% BI: 1,1-2,3) dat het VapA gen aangetoond werd in de mest (Tabel 17).

Tabel 17. Beschrijvende resultaten van de risicofactor die in de multivariabele logistische regressie op basis van 52 mestmonsters significant geassocieerd was met het voorkomen van het VapA gen in mest van veulens.

Variabele	Gemiddelde leeftijd		Odds ratio	95% betrouwbaar- heidsinterval	P-waarde (Wald)
	VapA niet aangetoond	VapA aangetoond			
<b>Leeftijd veulen in weken</b>	5,4	6,6	1,6	1,1-2,2	0,03

## 5. Discussie

Het doel van dit onderzoek was de prevalentie van vijf mogelijk zoönotische agentia bij paarden in Nederland in kaart te brengen en daarmee basale gegevens te verschaffen voor het beter kunnen inschatten van eventuele risico's voor de volksgezondheid. Tevens werd, indien relevant, de antibioticumgevoeligheid vastgesteld. Daarnaast is gepoogd een eerste indicatie te krijgen van risicofactoren die mogelijk geassocieerd zijn met de onderzochte zoönotische agentia door middel van het meesturen van een korte vragenlijst. De ingestuurde vragenlijsten waren echter niet altijd volledig ingevuld, met name de vraag of er nog andere landbouwhuisdieren aanwezig waren op het bedrijf werd slecht beantwoord. Hierdoor kon deze vraag niet meegenomen worden in de analyse van de risicofactoren.

### 5.1. *Salmonella* spp.

Van Duijkeren et al. (1995) meldt dat voor het aantonen van *Salmonella* spp. bij slechts één monster per paard 44% van de daadwerkelijke salmonella besmette dieren aangetoond wordt, dit vanwege de intermitterende uitscheiding van de bacterie. Bij vijf monsters wordt al 97% aangetoond en dit geeft dus een beter beeld van de werkelijke prevalentie in Nederland. De gevonden prevalentie van 3,6% zou dus 44% van het werkelijke aantal besmette dieren bevatten, omgerekend zou de werkelijke prevalentie dus rond de 9% kunnen liggen. Van Duijkeren meldt tevens dat salmonella getest moet worden uit verse mest, om de betrouwbaarheid van het bacteriologisch onderzoek te waarborgen. Desondanks werd er uit twee monsters van vier dagen oud *Salmonella Typhimurium* gekweekt. Tevens zijn enkele monsters van drie en twee dagen oud positief getest voor *Salmonella Typhimurium*. Dit zou betekenen dat *Salmonella Typhimurium* mogelijk langer aantoonbaar is in feces. Globaal de helft van de monsters is direct op de dag van monsternamen verzonden naar GD, een kwart van de monsters werd de volgende dag verzonden en de rest werd enkele dagen later verzonden. De daadwerkelijke prevalentie zou dus nog iets hoger kunnen liggen, wanneer alle monsters direct ingezonden waren. Een monsterstrategie waarbij op drie achtereenvolgende dagen mest verzameld wordt en vervolgens gepoold getest wordt is te overwegen.

### 5.2. *Cryptosporidium* spp.

Voor het aantonen van *Cryptosporidium* spp. in dit onderzoek zijn twee sneltesten gebruikt, namelijk de ImmunoCard STAT test en de BioX test. De prevalentie was bij de BioX test 30,7% en bij de ImmunoCard STAT test 21,3%. Beide testen zijn niet primair voor het paard ontwikkeld en gevalideerd. De ImmunoCard STAT test is gemaakt en gevalideerd voor humane feces, de BioX test is gevalideerd voor feces van kalveren en biggen. Het testprincipe is voor beide testen echter diersoort onafhankelijk en BioX geeft ook expliciet aan dat de test voor andere diersoorten gebruikt kan worden. Mogelijk is de BioX test in paardenfeces gevoeliger dan de ImmunoCard STAT test, maar het is ook mogelijk dat de BioX test minder specifiek is, dus meer fout-positieve uitslagen genereert. Om hier meer inzicht in te krijgen werd het RIVM gevraagd om alle monsters met een positieve testuitslag te confirmeren met een PCR. In eerste instantie werden door het RIVM alleen de monsters getest die positief waren in beide testen (n=32). Deze monsters scoorden op één na allemaal negatief in specifieke PCR's voor *Cryptosporidium parvum* en *Cryptosporidium hominis*. Het enige positieve *Cryptosporidium hominis* monster bleek bij nadere analyse *Cryptosporidium cuniculis* te zijn. *Cryptosporidium cuniculis* heeft overigens wel zoönotisch potentieel (Hadfield et al., 2012). Vervolgens werden deze monsters onderzocht en allemaal positief bevonden met een generieke real-time PCR voor het aantonen van alle *Cryptosporidium* spp. (Hadfield et al., 2012). Sequentie analyse wees echter uit dat er geen *Cryptosporidium* spp. specifieke amplicons gevormd waren, waardoor er twijfels bestaan aan de specificiteit van deze real-time PCR.

Uit de resultaten van dit project was op basis van positieve resultaten in beide sneltesten de prevalentie van *Cryptosporidium parvum* in de subpopulatie paarden met diarree 22%, in de subpopulatie paarden zonder diarree 14% en de subpopulatie veulens met diarree 19%. Smith et al. (2010) vonden een vergelijkbare prevalentie (tussen de 20% en 25%) voor *Cryptosporidium* spp in de paardenpopulatie, maar er werden slechts twaalf fecesmonsters van paarden onderzocht, waarvan er één *Cryptosporidium parvum* bleek te zijn. Mair et al. (2009) en Veronesi et al. (2010) beschreven

dat cryptosporidiose vaker voorkomt bij veulens dan bij paarden, dit vanwege het nog niet volledig ontwikkelde immuunsysteem. Dit komt in ons onderzoek niet duidelijk naar voren, al lijkt er wel een relatie aanwezig te zijn met (langdurige) diarree.

In uitgebreid onderzoek in de UK (Elwin et al., 2012) over de periode 2000 – 2008 bleek 51.4% en 44% van de humane *Cryptosporidium* infecties toe te schrijven te zijn aan respectievelijk *Cryptosporidium hominis* en *Cryptosporidium parvum*; daarnaast kwamen menginfecties voor. Slechts 1.1% was toe te schrijven aan andere cryptosporidia, waarbij als risicofactoren een oudere leeftijd, immuundeficiëntie, reizen naar het buitenland en contact met katten naar voren kwamen. In onderzoek naar zoönotische relaties van humane cryptosporidiose gevallen werd met name *Cryptosporidium parvum* gevonden bij kalveren en lammeren (Smith et al., 2010, Chalmers et al., 2012). Quilez et al. (2008) vonden bij schapen- en geitenlammeren met cryptosporidiose in alle gevallen *Cryptosporidium parvum*.

Aangezien in een subset van monsters die positief scoorden in beide sneltesten geen *Cryptosporidium hominis* en/of *Cryptosporidium parvum* werd aangetoond en in slechts één monster *Cryptosporidium cuniculus* lijkt het zoönotisch potentieel voornamelijk laag. Vervolgens werden deze monsters onderzocht en allemaal positief bevonden met een generieke real-time PCR voor het aantonen van alle *Cryptosporidium* spp. (Hadfield et al., 2012). Sequentie analyse wees echter uit dat er geen *Cryptosporidium* spp. specifieke amplicons gevormd waren, waardoor er twijfels bestaan aan de specificiteit van deze real-time PCR. Om hier meer licht op te werpen zouden oocysten opgezuiverd moeten worden uit de betreffende fecesmonsters of uit nieuwe verse fecesmonsters. Uit deze oocysten zou dan DNA geëxtraheerd moeten worden, waarna PCR, sequencing en phylogenetische analyse meer inzicht zouden moeten geven in de soorten en prevalentie van de *Cryptosporidium* spp. in de Nederlandse paardenhouderij.

### 5.3. *Giardia duodenalis*

De in dit onderzoek gevonden prevalentie van *Giardia duodenalis* is met 1% zeer laag. Zoals al eerder aangegeven is de ImmunoCard Stat test niet gevalideerd voor paardenfeces, en is van origine gemaakt voor humane feces. De sensitiviteit en de specificiteit zijn dan ook niet voor paardenfeces bekend. De test is echter wel eerst uitgeprobeerd door spiking van positief controle materiaal in paardenfeces en was goed afleesbaar. Mogelijk heeft de test niet alle *Giardia* positieve monsters gedetecteerd en ligt de prevalentie wat hoger dan 1%, maar er lijkt voornamelijk sprake van een laag risico en nader onderzoek lijkt niet geïndiceerd. Bovendien is het nog maar de vraag of bij positieve paarden de zoönotisch relevante groepen A en B voorkomen.

### 5.4. *Clostridium difficile*

In onderzoek van Koene et al. (2011) werden 135 fecesmonsters van paarden onderzocht op de aanwezigheid van *Clostridium difficile*. Hierbij werden bij twee van de 135 paarden type 078 aangetoond en werd type 027 niet aangetroffen in de onderzochte monsters (n=839) afkomstig van landbouwhuisdieren en gezelschapsdieren. In ons onderzoek werd bij 32% van de onderzochte monsters (n=81) *Clostridium difficile* aangetoond, waarbij 10% van de onderzochte monsters ook toxine-genen bezat. In totaal werden vijf verschillende ribotypen gevonden, waarvan drie toxinogeen en twee niet toxinogeen. Het dominante toxinogene ribotype was 078 (n=5); nadere typering met MLVA is echter gewenst om meer te kunnen zeggen over de verwantschap met humane 078 stammen. In het onderzoek van Koene et al. (2011) vormden beide equine 078 isolaten een apart clonal complex. Koene et al. (2011) rapporteerden ook één kalver isolaat met het 033 ribotype, dat negatief bleek te zijn voor het toxine B gen (het enige isolaat in deze studie met een A+B-profiel, de overige toxinogene *Clostridium difficile* isolaten waren allemaal positief voor beide toxinen). Interessant genoeg werd in de huidige studie ook twee maal bij paarden op verschillende bedrijven *Clostridium difficile* ribotype 033 aangetoond met hetzelfde A+B-profiel.

Bij paarden en veulens met diarree die in de wei werden bijgevoerd, óf niet in de wei gehouden werden, werd vijf keer minder vaak *Clostridium difficile* in de mest aangetoond dan bij paarden die in de wei stonden maar niet werden bijgevoerd. Mogelijk leidt een rantsoen bestaande uit uitsluitend weidegras of begrazing van kale weiden met opname van

sporen tot een andere samenstelling van de bacterieflora in de darm, waarin *Clostridium difficile* zich beter kan handhaven.

#### 5.5. *Rhodococcus equi*

Aangezien alleen fokkerijbedrijven zijn onderzocht in het kader van dit project kunnen geen uitspraken worden gedaan over het voorkomen van de *Rhodococcus equi* bacterie op bijvoorbeeld kinderboerderijen. Voor virulente *Rhodococcus equi* werd met gevoelige selectieve kweekmethoden, overgenomen uit Australië, een prevalentie van 40% gevonden in de feces van gezonde 6 – 12 weken oude veulens. De gebruikte kweekmethoden bleken in combinatie duidelijk gevoeliger te zijn dan directe real-time PCR op feces; slechts de helft van de kweekpositieve monsters kon direct geconfirmeerd worden. Ook werd een relatie met leeftijd aangetoond, waarbij de kans op uitscheiding duidelijk toenam bij een oudere leeftijd van de veulens. Op probleembedrijven lijkt de infectiedruk zich vaak op te bouwen wat resulteert in klinische problemen in zomer en nazomer. Risicofactoren zijn daarbij bijvoorbeeld overbevolking, stoffige paddocks en kale weides, waardoor inademing van stof besmet met relevante hoeveelheden virulente *Rhodococcus equi* waarschijnlijker wordt. De in dit onderzoek waargenomen resistentie voor tilmicosin (behorend tot de macroliden) bleek gelukkig niet to kruisresistentie tegen clarithromycine en azithromycine te leiden. Deze antibiotica worden in combinatie met rifampicine gebruikt voor de behandeling van veulens met rhodococrose. De soms moeizame en langdurige behandeling heeft niet zozeer te maken met de gevoeligheid van *Rhodococcus equi* voor de desbetreffende antibiotica, maar met de vorming van granulomen en abscessen waarin de antibiotica niet gemakkelijk doordringen en in werkzame concentratie de bacterien bereiken.

## 6. Conclusie en aanbevelingen

Uit deze prevalentiestudie kunnen de volgende conclusies worden getrokken:

- De waargenomen prevalentie van *Salmonella* spp. is 3,6% (95% BI: 1,5-7,3%), maar ligt vanwege de intermitterende uitscheiding en de niet altijd vers onderzochte mest vermoedelijk hoger. Alle geïsoleerde *Salmonella* spp. zijn humaan ook relevant. Een monofasische *Salmonella Typhimurium* stam bleek resistent te zijn voor de meeste onderzochte antibiotica.
- De waargenomen prevalentie van *Cryptosporidium* spp. is relatief hoog: 34,4% (95% BI: 27,6-41,2%) op basis van alle positieve testresultaten en 17,9% (95% BI: 13,6-23,3%) indien beide testen positief scoren. Hierbij lijkt het op basis van PCR resultaten niet te gaan om de belangrijkste humaan pathogene cryptosporidia: *Cryptosporidium hominis* en *Cryptosporidium parvum*.
- De waargenomen prevalentie van *Giardia duodenalis* in de Nederlandse paardenhouderij is met 1% (95% BI: 0-3,7%) zeer laag.
- De waargenomen prevalentie van *Clostridium difficile* is in dit onderzoek 32,1% (95% BI: 22,2-43,4%) en voor toxinogene isolaten 9,9% (95% BI: 4,4-18,5%). Ribotype 078 was daarbij dominant aanwezig (vijf keer). Dit is ook een humaan relevant ribotype. Aanvullende analyse met moleculaire technieken zoals MLVA moeten nog uitwijzen hoe nauw de verwantschap is tussen deze paardenisolaten en humane isolaten.
- De waargenomen prevalentie van *Rhodococcus equi* is 60% (95% BI: 45,8-73,4) en voor virulente (VapA positieve) *Rhodococcus equi* 40% (95% BI: 27,0-54,9%). Het betreft hier echter een betrekkelijk klein aantal monsters, dus de geschatte prevalentie is omgeven door een relatief groot betrouwbaarheidsinterval.

### Aanbevelingen:

- In samenwerking met het RIVM oocysten proberen op te zuiveren uit alle monsters die in één van beide of in beide testen positief scoorden voor *Cryptosporidium* spp. En DNA extracten uit opgezuiverde oocysten onderzoeken met de generieke *Cryptosporidium* spp. real-time PCR volgens Hadfield et al. (2011), amplicons sequencen en genotyperen.
- Meer uitgebreid onderzoek doen naar de prevalentie en mogelijk zoönotische relevantie van *Clostridium difficile* in de Nederlandse paardenhouderij. Indien mogelijk dit combineren met onderzoek op humane feces afkomstig van medewerkers op bedrijven waar paarden bemonsterd worden. Benadering kan cross-sectional of case-control zijn (op paardenbedrijven waar een toxinogene *Clostridium difficile* bij paarden of veulens is aangetoond feces van bezoekers en/of medewerkers ook onderzoeken naast eventueel een controle groep). Verdere moleculaire typering kan dan uitwijzen of het om hetzelfde type gaat.
- Indien een meer nauwkeurige prevalentie-schatting voor *Salmonella* wenselijk is, de monsternamen hiervoor uitbreiden en herhaalde monsternamen bij dezelfde dieren opnemen in het protocol. Tevens meer DAPs in het onderzoek betrekken dan wel monsternamen door projectmedewerkers laten uitvoeren.
- Gericht onderzoek naar de prevalentie en antibioticum resistentie van monofasische *Salmonella Typhimurium* in de Nederlandse paardenhouderij uitvoeren.

## 7. Dankwoord

Op deze plaats willen we graag dr. Joke van der Giessen, RIVM, dr. Miriam Koene, CVI en dr. Ed Kuijper (LUMC) hartelijk danken voor de goede samenwerking en de analyses en adviezen in het kader van het prevalentieonderzoek naar *Cryptosporidium* spp. en *Clostridium difficile* in de Nederlandse paardenhouderij. Refke Peerboom wordt hartelijk bedankt voor het deskundig opzetten en uitvoeren van selectieve kweekmethoden en confirmatiemethoden voor het aantonen van *Rhodococcus equi*. Het Ministerie van Economische Zaken wordt hartelijk bedankt voor de financiering van het onderzoek en de constructieve samenwerking.



## 8. Literatuur

1. Anonymus, 2007. Studiewijzer ziekteleer 2. Kerncurriculum 2008-2009. pp. 1-10
2. Arroyo, L.G., J. Scott Weese, H.R., Staempfli, 2008. Experimental *Clostridium difficile* enterocolitis in foals. *Journal of veterinary internal medicine*, volume 18, issue 5. P. 734-738
3. Baverud, V., A. Franklin, A. Gunnarsson et al. 2010. *Clostridium difficile* associated with acute colitis in mares when their foals are treated with erythromycin and rifampicin for *Rhodococcus equi* pneumonia. *Equine Veterinary journal* 30:6, 482-488.
4. Beelitz, P., Göbel, E., Gothe, R. [Spectrum of species and incidence of endoparasites in foals and their mother mares from breeding farms with and without anthelmintic prophylaxis in upper Bavaria]. *Tierarztl Prax.* 1996 Feb;24(1):48-54.
5. Bertrand, S.S., 2008. Salmonella en Shigella stammen gerapporteerd tijdens 2008 in België. *Bacteriologie*, september 2009. P. 1-45 Biokar Diagnostics, 2010. TSI agar. Biokar Diagnostics, Allone. P. 1-5.
6. Breek, T.O., A. Knuistingh Neven, J.A.H. Eekhof. 2005. Giardiasis. *Huisarts en wetenschap.* 48 (7). P. 368-369.
7. Buckley, T., E. Mcmanamon, S. Standbridge, 2007. Resistance studies of erythromycin and rifampin for *Rhodococcus equi* over a 10-year period. *Irish veterinary journal*, volume 60, nr. 12. P. 728-731.
8. Burton AJ, Nydam DV, Dearen TK, Mitchell K, Bowman DD, Xiao L., 2010. The prevalence of *Cryptosporidium*, and identification of the *Cryptosporidium* horse genotype in foals in New York State. *Vet Parasitol.* 174(1-2):139-44.
9. Busscher JF, van Duijkeren E, Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan MM., 2006. The prevalence of methicillin-resistant staphylococci in healthy horses in the Netherlands. *Vet Microbiol.* 113(1-2):131-6.
10. Caccio, S.M., U. Ryan, 2008. Molecular epidemiology of giardiasis. *Molecular biochemical microbiology*, volume 160, issue 2. P. 75-80
11. Catry B, Van Duijkeren E, Pomba MC, Greko C, Moreno MA, Pyörälä S, Ruzauskas M, Sanders P, Threlfall EJ, Ungemach F, Törneke K, Munoz-Madero C, Torren-Edo J, 2010. Scientific Advisory Group on Antimicrobials (SAGAM). Reflection paper on MRSA in food-producing and companion animals: epidemiology and control options for human and animal health. *Epidemiol Infect.* 138(5):626-44.
12. Chalmers RM, Smith RP, Hadfield SJ, Elwin K, Giles M. Zoonotic linkage and variation in *Cryptosporidium parvum* from patients in the United Kingdom. *Parasitol Res.* 2011 May;108(5):1321-5.
13. Chung TH, Park GB, Lim CY, Park HM, Choi GC, Youn HY, Chae JS, Hwang CY., 2010. A rapid molecular method for diagnosing epidemic dermatophytosis in a racehorse facility. *Equine Vet J.* 42(1):73-8.
14. Cohen ND, Carter CN, Scott HM, Chaffin MK, Smith JL, Grimm MB, Kuskie KR, Takai S, Martens RJ, 2008. Association of soil concentrations of *Rhodococcus equi* and incidence of pneumonia attributable to *Rhodococcus equi* in foals on farms in central Kentucky. *Am J Vet Res.* 69(3):385-95.
15. Cohen ND, O'Connor MS, Chaffin MK, Martens RJ, 2005. Farm characteristics and management practices associated with development of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. *J Am Vet Med Assoc.* 226(3):404-13.
16. Coleman SU, Klei TR, French DD, Chapman MR, Corstvet RE, 1989. Prevalence of *Cryptosporidium* sp in equids in Louisiana. *Am J Vet Res.* 50(4):575-7..
17. Donaldson MT, Palmer JE, 1999. Prevalence of *Clostridium perfringens* enterotoxin and *Clostridium difficile* toxin A in feces of horses with diarrhea and colic. *J Am Vet Med Assoc.* 215(3):358-61. .
18. Duijkeren van E., C. Flemming, M.M. Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan et al. 1995. Trimethoprim/sulfonamide combinations in relation to equine salmonellosis. Chapter 11: Diagnosing salmonellosis in horses culturing of multiple versus single faecal samples P.190-199 Elinkwijk B.V. Utrecht.
19. Duijkeren van E., H.F. Egberink, D.J. Houwers et al. 2009. Microbiologische laboratoriumdiagnostiek bij hond, kat en paard. *Diergeneeskundig Memorandum*, 56<sup>e</sup> jaargang, nr.2. P. 1-84.
20. Duijkeren van E., J.M. Ensink, J. Herten van, et al. 2011. *Formularium paard*. Eerste druk september 2011, KNMVD, Houten.

21. Duijkeren van E., M.M. Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan, 1993. Salmonellosis in the horse: a review. Tijdschrift voor diergeneeskunde 118; P. 472-477.
22. Duijkeren van E., W.J.B. Wannet, M.E.O.C. Heck et al, 2002. Sero types, phage types and antibiotic susceptibilities of Salmonella strains isolated from horses in The Netherlands from 1993 to 2000. Veterinary Microbiology 86:3; 203-212.
23. Eastwood, K., P. Else, A. Charlett et al. 2009. Clostridium difficile toxin detection assays, a real-time PCR assay for C. difficile tcdB, and a glutamate dehydrogenase detection assay to cytotoxin testing and cytotoxigenic culture methods. Journal of clinical microbiology 47:10, 3211-3217.
24. Elwin K, Hadfield SJ, Robinson G, Chalmers RM, 2012. The epidemiology of sporadic human infections with unusual cryptosporidia detected during routine typing in England and Wales, 2000-2008. Epidemiol Infect. 140(4):673-83.
25. Epe C, Coati N, Schnieder T, 2004. [Results of parasitological examinations of faecal samples from horses, ruminants, pigs, dogs, cats, hedgehogs and rabbits between 1998 and 2002]. Dtsch Tierarztl Wochenschr. 111(6):243-7. .
26. Faubert, G. 2000. Immune Response to *Giardia duodenalis*. Clin. Microbiol. Rev. 143;1: 35-54
27. Frederick J, Giguère S, Sanchez LC., 2009. Infectious agents detected in the feces of diarrheic foals: a retrospective study of 233 cases (2003-2008). J Vet Intern Med. 23(6):1254-60.
28. Gerding, D.N., S. Johnson, L.R. Peterson, 2005. Clostridium difficile associated diarrhea and colitis. Infection Control and Hospital Epidemiology, Volume 16, No 8. P. 459-477
29. Giguère S, Lee E, Williams E, Cohen ND, Chaffin MK, Halbert N, Martens RJ, Franklin RP, Clark CC, Slovis NM, 2010. Determination of the prevalence of antimicrobial resistance to macrolide antimicrobials or rifampin in Rhodococcus equi isolates and treatment outcome in foals infected with antimicrobial-resistant isolates of R. equi. J Am Vet Med Assoc. 237(1):74-81. .
30. Giguere, S., M.K. Hondalus, J.A. Yager et al. 1999. Role of the 85-Kilobase Plasmid and Plasmid-Encoded Virulence-Associated Protein A in Intracellular Survival and Virulence of Rhodococcus equi. Infection and immunity. Vol. 67, Issue 7. P. 3548-3557.
31. Hadfield SJ, Robinson G, Elwin K, Chalmers RM, 2011. Detection and differentiation of Cryptosporidium spp. in human clinical samples by use of real-time PCR. J Clin Microbiol. 49(3):918-24.
32. Hadfield SJ, Chalmers RM, 2012. Detection and characterization of Cryptosporidium cuniculus by real-time PCR. Parasitol Res. 111(3):1385-90.
33. Hansen, F., K.E.P. Olsen, 2009. Clostridium difficile: A potentially foodborne zoonose? *Significance in humans, animals and food*. NMKL technical report No. 3. 2009. P. 1-9.
34. Hondalus, M.K., 1997. Rhodococcus equi: Pathogenesis and Virulence. Proceedings of the Annual Convention of the AAEP. Vol . 43, P. 71-78
35. Johnson, E., E.R. Atwill, M.E. Filkins, 1997. The prevalence of shedding of Cryptosporidium and Giardia Spp. Based on a single fecal sample collection from each of 91 horses used for backcountry recreation. J Vet Diagn Invest 9, 56. P. 56-60.
36. Kedlaya, I., M.B. Ing, S.S. Wong, 2001. Rhodococcus equi Infections in Immunocompetent Hosts: Case Report and Review. Clinical infectious diseases , Vol. 32 P. 39-47.
37. Kerst, J.M., J. van der Lelie, E.J. Kuijper, 2001. Diarree door een toxine van Clostridium difficile bij hematologisch patiënten. Nederlands tijdschrift geneeskunde 2001;145 P. 37-40
38. Koene, M.G.J., D. Mevius, J.A. Wagenaar et al. 2011. Clostridium difficile in Dutch animals: their presence, characteristics and similarities with human isolates. Clinical Microbiology and Infection 18 (8): 778-784.
39. Laan TT, Butler CM, Daha TJ, van Doorn DC, van Duijkeren E, Goehring LS, Houwers DJ, van Maanen C, Picavet T, Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan MM, 2008. [Horse Advisory Committee III--infectious complications--respiration]. Tijdschr Diergeneeskd. 133(1): 20-5.

40. Lennon, J.J. 1997. Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry. University of Washington, Seattle.
41. Linder, R. 1997. *Rhodococcus equi* and *arcanobacterium haemolyticum*: two “coryneform” bacteria increasingly recognized as agents of human infection. *Emerging infectious diseases*, vol. 3, nr. 2. P. 145-153
42. Mainar-Jaime, R.C., S. Andrés, J.P. Vico et al. 2012. Sensitivity of the ISO 6579: standard method for detection of *Salmonella* spp. on mesenteric lymph nodes from slaughter pigs. *J.Clinic. Microbiology*, Volume 51, issue 1. P. 89-94.
43. Mair, T.S., N.D. Cohen, G.R. Pearson, 2009. Cryptosporidiosis. *Bell Equine Veterinary Clinic*, 2009; P. 347-353
44. Makrai L, Dénes B, Hajtós I, Fodor L, Varga J, 2008. Serotypes of *Rhodococcus equi* isolated from horses, immunocompromised human patients and soil in Hungary. *Acta Vet Hung.* 56(3):271-9.
45. Mank, T.G. 2008. *Giardia* en giardiasis. *Tijdschrift voor infectieziekten* 3 (6): 222-229
46. Monis, P.T., R.C.A., Thompson, 2003. *Cryptosporidium* and *Giardia*-zoonoses: fact or fiction? *Infection, genetics and evolution*, volume 3, issue 4. P. 233-244.
47. Muscatello G, Anderson GA, Gilkerson JR, Browning GF, 2006. Associations between the ecology of virulent *Rhodococcus equi* and the epidemiology of *R. equi* pneumonia on Australian thoroughbred farms. *Appl Environ Microbiol.* 72(9):6152-60.
48. Muscatello G, Gerbaud S, Kennedy C, Gilkerson JR, Buckley T, Klay M, Leadon DP, Browning GF, 2006. Comparison of concentrations of *Rhodococcus equi* and virulent *R. equi* in air of stables and paddocks on horse breeding farms in a temperate climate. *Equine Vet J.* 38(3):263-5.
49. Muscatello G, Gilkerson JR, Browning GF, 2007. Comparison of two selective media for the recovery, isolation, enumeration and differentiation of *Rhodococcus equi*. *Vet Microbiol.* 119(2-4):324-9.
50. Muscatello G, Gilkerson JR, Browning GF, 2009. Detection of virulent *Rhodococcus equi* in exhaled air samples from naturally infected foals. *J Clin Microbiol.* 47(3):734-7.
51. Muscatello G., 2011. *Rhodococcus equi* pneumonia in the foal part 1: Pathogenesis and epidemiology. *The veterinary journal* 192. P. 20-26.
52. Picavet T, Butler CM, Daha TJ, van Doorn DC, van Duijkeren E, Goehring LS, Houwers DJ, Laan TT, van Maanen C, Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan MM., 2008. [Horse Advisory Committee III--infectious complications--digestion (part 1)]. *Tijdschr Diergeneeskd.* 133(3):110-4.
53. Picavet T, Butler CM, Daha TJ, van Doorn DC, van Duijkeren E, Goehring LS, Houwers DJ, Laan TT, van Maanen C, Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan MM, 2008. [Horse Advisory Committee III--Infectious complications--digestion (part II)]. *Tijdschr Diergeneeskd.* 133(5):190-5.
54. Pichner R, Sander A, Steinrück H, Gareis M, 2005. [Occurrence of *Salmonella* spp. and shigatoxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in horse faeces and horse meat products]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 118(7-8):321-5.
55. Prins, J.M., P. Speelman, 1989. Stand van zaken: *Salmonella*-dragers. *Ned. Tijdschrift Geneeskunde* 133, 2160-4.
56. Pusterla N, Wilson WD, Mapes S, Leutenegger CM, 2007. Diagnostic evaluation of real-time PCR in the detection of *Rhodococcus equi* in faeces and nasopharyngeal swabs from foals with pneumonia. *Vet Rec.* 161(8):272-5.
57. Quílez J, Torres E, Chalmers RM, Hadfield SJ, Del Cacho E, Sánchez-Acedo C, 2008. *Cryptosporidium* genotypes and subtypes in lambs and goat kids in Spain. *Appl Environ Microbiol.* 74(19):6026-31.
58. Santin, M., J.A. Cortés Vecino, R. Fayer, 2013. A large scale molecular study of *Giardia duodenalis* in horses from Colombia. *Veterinary Parasitology*, available online 21 February 2013, in press, corrected proof.
59. Savidge, T.C., W.H. Pan, P. Newman et al. 2003. *Clostridium difficile* toxin B is an inflammatory enterotoxin in human intestine. *Gastroenterology* 2003; aug; 125 (2)P. 13-20
60. Scott Weese, J., J.D. Baird, C. Poppe et al. 2001. Emergence of *Salmonella* Typhimurium definitive type 104 (DT104) as an important cause of salmonellosis in horses in Ontario. *Can Vet J.* 42: 788-792.
61. Sellon, D.C., M.T. Long, E.G. Davis et al. 2007. *Equine infectious diseases*. Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri

62. Smith RP, Chalmers RM, Mueller-Doblies D, Clifton-Hadley FA, Elwin K, Watkins J, Paiba GA, Hadfield SJ, Giles M, 2010. Investigation of farms linked to human patients with cryptosporidiosis in England and Wales. *Prev Vet Med.* 94(1-2):9-17.
63. Spigaglia P, Barbanti F, Mastrantonio P, 2011. European Study Group on Clostridium difficile (ESGCD). Multidrug resistance in European Clostridium difficile clinical isolates. *J Antimicrob Chemother.* 66(10):2227-34.
64. SRP, 2011. Agenda infectieuze ziekten paard. November 2011. P. 1- 29
65. Traub R, Wade S, Read C, Thompson A, Mohammed H, 2005. Molecular characterization of potentially zoonotic isolates of Giardia duodenalis in horses. *Vet Parasitol.* 130(3-4):317-21.
66. Traub-Dargatz JL, Garber LP, Fedorka-Cray PJ, Ladely S, Ferris KE, 2000. Fecal shedding of Salmonella spp by horses in the United States during 1998 and 1999 and detection of Salmonella spp in grain and concentrate sources on equine operations. *J Am Vet Med Assoc.* 217(2): 226-30.
67. Valgaeren, B. 2008. Bio veiligheid en sanitaire maatregelen in een paardenkliniek. Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent, 2008-2009
68. Veronesi F, Passamonti F, Cacciò S, Diaferia M, Piergili Fioretti D, 2010. Epidemiological survey on equine cryptosporidium and giardia infections in Italy and molecular characterization of isolates. *Zoonoses Public Health* 57(7-8):510-7.
69. Xiao L, Herd RP, 1994. Epidemiology of equine Cryptosporidium and Giardia infections. *Equine Vet J.* 26(1):14-7.
70. Xiao, L., Y. Feng, 2008. Zoonotic cryptosporidiosis. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* Volume 52, issue 3. P. 309-323
71. Zar, F.A., S.R. Bakkanagari, K.M.L.S.T. Moorthi et al. 2007. A comparison of Vancomycin and Metronidazole for the treatment of Clostridium difficile associated diarrhea, stratified by disease severity. *Clin infect. Dis.* 45 (3): 302-307.
72. Zheng, L., S.F. Keller, D.M. Lyerly et al. 2004. Comparison of Screening Tests for Detection of Clostridium difficile in Fecal Specimens. Techlab, ASM 2004. New Orleans, LA
73. Zoeteman, B.C.J., 2010. Introductie in het milieu van Rhodococcus equi vaccinstam. Cogem Advies, Bilthoven

**Internetlijst:**

1. Aberra, F.N., J. Katz, C.A. Gronczewski 2013. Clostridium difficile colitis. URL: <http://emedicine.medscape.com/article/186458-overview> Geraadpleegd op: 06-03-2013
2. Meridian Bioscience, 2013. ImmunoCard Stat! Crypto/Giardia. URL: <http://www.meridianbioscience.com/diagnostic-products/cryptosporidium-and-giardia/immunocard-stat/immunocard-stat-crypto-and-giardia.aspx> Geraadpleegd op: 27-02-2013
3. Wetten.overheid, 2010. Besluit Protocollen hygiënevoorschriften pluimveehouderij 1999. URL: [http://wetten.overheid.nl/BWBR0010848/BijlageVI/geldigheidsdatum\\_02-12-2010](http://wetten.overheid.nl/BWBR0010848/BijlageVI/geldigheidsdatum_02-12-2010) Geraadpleegd op: 05-03-2013
4. Ates, L. 2006. De ontwikkeling van een moleculaire fingerprintmethode voor Giardia duodenalis. URL: <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:HuwZitBR0EcJ:hbo-kennisbank.uvt.nl/cgi/hu/show.cgi%3Ffid%3D4702+&cd=10&hl=nl&ct=clnk&gl=nl> Geraadpleegd op: 19-02-2013
5. CDC, 2012. Clostridium difficile infection. URL: [http://www.cdc.gov/HAI/organisms/cdiff/Cdiff\\_infect.html](http://www.cdc.gov/HAI/organisms/cdiff/Cdiff_infect.html) Geraadpleegd op: 13-02-2013
6. LUMC, z.j. Clostridium difficile. URL: <https://www.lumc.nl/con/2010/81125070355221/90305041220344/111222002251344/> Geraadpleegd op: 13-03-2013
7. RIVM, z.j. Salmonellose. URL: [http://www.rivm.nl/Onderwerpen/Ziekten\\_Aandoeningen/S/Salmonellose/Verspreiding\\_en\\_frequentie](http://www.rivm.nl/Onderwerpen/Ziekten_Aandoeningen/S/Salmonellose/Verspreiding_en_frequentie) Geraadpleegd op: 06-03-2013
8. RIVM, 2011. LCI-richtlijn Cryptosporidiose. URL: [http://www.rivm.nl/Bibliotheek/Professioneel\\_Praktisch/Richtlijnen/Infectieziekten/LCI\\_richtlijnen/LCI\\_richtlijn\\_Cryptosporidiose](http://www.rivm.nl/Bibliotheek/Professioneel_Praktisch/Richtlijnen/Infectieziekten/LCI_richtlijnen/LCI_richtlijn_Cryptosporidiose) Geraadpleegd op: 05-03-2013
9. Universiteit Utrecht, 2013. Overdracht van de bacterie C. difficile van varkens op mensen. URL: <http://www.uu.nl/faculty/veterinarymedicine/NL/Actueel/agenda/Pages/Overdracht-C-difficile-varkens-mensen.aspx> Geraadpleegd op: 20-02-2013
10. Vlees, z.j. Dossier Salmonella. URL: <http://www.vlees.nl/dossiers/voedselveiligheid/salmonella/vraag-antwoord/> Geraadpleegd op: 05-03-2013

## 9. Bijlagen

### Bijlage 1. Achtergrondinformatie over de in deze studie onderzochte pathogenen.

#### **Salmonella species**

Salmonella bacteriën zijn Gram-negatieve, facultatief anaërobe bacteriën, die behoren tot de familie *Enterobacteriaceae*. Veel verschillende serotypes zijn in staat het paard te infecteren, maar de serotypes uit serogroep B (vooral *S. typhimurium*) komen het meest voor. Er zijn veel symptoomloze dragers die salmonella uitscheiden, maar de actuele prevalentie van salmonella uitscheiding in de algemene paardenpopulatie in Nederland is onbekend. Uitscheiders vormen een mogelijke besmettingsbron voor gevoelige paarden. Risicofactoren zijn onder meer: hoge omgevingstemperatuur, stress, transport, antibioticum toediening, gastro-intestinale chirurgie, algemene anesthesie, bestaande maag- en darmziekten, veranderingen in het dieet en immunosuppressie. Feceskweek met behulp van ophopingstechnieken is de meest gebruikte manier om salmonella aan te tonen. Vanwege intermitterende uitscheiding is de diagnostische sensitiviteit echter niet hoog. De meest gevoelige en snelle test om salmonella op te sporen is volgens de literatuur een PCR op feces. Uit onderzoek van het VMDC bleek de sensitiviteit van PCR direct op mest echter absoluut niet beter, maar juist minder te zijn dan die van de kweek. Alleen PCR van een voorophopingsmedium gaf gelijke resultaten als de kweek (dr. E. van Duijkeren). Salmonellose is in principe een zoönose, hoewel transmissies van paard naar mens zeldzaam zijn. Toch dient de nodige zorgvuldigheid in acht te worden genomen. Bij de behandeling van zieke dieren moeten de verzorgers aparte kledij, handschoenen en overschoenen dragen en apart gereedschap gebruiken. Iedereen die in aanraking geweest is met deze patiënten, dient daarna de handen grondig te reinigen en te ontsmetten. Subklinische uitscheiding bij volwassen paarden is over het algemeen op een zeer laag niveau. Voor een prevalentieonderzoek onder gezonde volwassen paarden zouden dus grote aantallen monsters getest moeten worden om vervolgens waarschijnlijk een zeer lage prevalentie vast te stellen. Concentreren op veulens met diarree (eventueel ook op volwassen paarden met diarree) lijkt zinvoller in het kader van prevalentieonderzoek.

#### ***Cryptosporidium spp.***

Besmetting met *C. parvum* vindt gewoonlijk plaats door het oraal binnenkrijgen van rijpe oöcysten. Infectie met *Cryptosporidium parvum* veroorzaakt acute diarree die in principe zelflimiterend is. De diarree kan variëren van zeer intens en waterdun tot matig en intermitterend en gaat vaak gepaard met darmkrampen. Bij *C. parvum* zijn runderen, in het bijzonder jonge kalveren, samen met de mens de primaire gastheer, maar ook hier zijn infecties bij verscheidene andere zoogdiersoorten bekend. *Cryptosporidium* infecties kunnen worden opgelopen via de fecaal-orale route: via direct contact tussen mens en dier, directe overdracht van mens op mens, maar ook indirect door fecaal besmet drinkwater, oppervlaktewater en zwembadwater of via besmet voedsel. *C. parvum* infecties worden geassocieerd met fysiek contact met boerderijdieren. Er bestaat nog veel onduidelijkheid over de mate waarin *C. parvum* van mens tot mens wordt overgedragen. Sommige genetische subtypes van *C. parvum* lijken toch strikt mensgebonden te zijn, terwijl andere een zoönotische oorsprong lijken te hebben.

Deze parasiet tast bij paarden het distale deel van de dunne darm aan en kan ook voorkomen bij veel andere diersoorten en de mens. Deze parasiet is namelijk niet zeer gastheerspecifiek. Bij immunocompetente veulens gaat het in het algemeen om een milde, zichzelf limiterende diarree, die één tot acht dagen kan duren. Oudere veulens kunnen chronische, intermitterende diarree vertonen, die enkele maanden kan aanhouden. De oöcysten van de parasiet zijn met de in de parasitologie algemeen gebruikte kleurmethode niet makkelijk te vinden in de mest. Daarom dient dit onderzoek specifiek vermeld te worden op de aanvraag. Voor het aantonen van *Cryptosporidium parvum* zijn ook sneltesten op de markt die goed blijken te werken, in ieder geval bij neonatale diarree bij kalveren. Bij een negatieve bevinding is het verstandig het fecesonderzoek driemaal te herhalen, omdat er sprake is van fluctuaties in de uitscheiding en kleine hoeveelheden makkelijk worden gemist. Voor *cryptosporidium* infecties bij paarden werden in diverse landen sterk wisselende prevalenties gevonden (zie Bijlage 2). Dat hangt enerzijds af van de gebruikte methodes en anderzijds van de

populaties (veulens versus paarden, met diarree versus zonder diarree). De meest risicovolle groep qua uitscheiding zijn veulens met diarree. Sowieso is de uitscheiding met name bij veulens en niet bij volwassen paarden.

### ***Giardia duodenalis***

Jaarlijks worden ongeveer 500.000 nieuwe infecties bij de Wereldgezondheidsorganisatie (WHO) gemeld. In Nederland ligt de prevalentie van *G. duodenalis* bij patiënten die met klachten van chronische diarree hun huisarts consulteren, tussen de 8 en 12%. Bij personen zonder klachten is in Nederland een prevalentie van 5% gevonden. Besmetting vindt plaats door het consumeren van fecaal besmet voedsel of water. Ook directe besmetting tussen mensen lijkt een belangrijke rol te kunnen spelen, vooral op scholen en kinderdagverblijven, waar kinderen van lage leeftijden dicht op elkaar zitten. Er zijn meerdere gevallen bekend van grootschalige uitbraken van *G. duodenalis*, die zijn toegeschreven aan besmette watervoorzieningen, zowel waterzuiveringsinstallaties als recreatieve watervoorzieningen. Om deze reden worden in Nederland waterzuiveringsinstallaties zorgvuldig gecontroleerd op het risico dat *G. duodenalis* verspreid zou kunnen worden. Ook kleinschaligere uitbraken door besmet voedsel zijn beschreven. Menginfecties met de verschillende genotypen van *G. duodenalis* komen naar schatting bij 8% van de menselijke patiënten voor. Deze gevallen worden meestal geassocieerd met patiënten die zijn blootgesteld aan vervuilde waterbronnen, of andere bijzondere epidemiologische situaties.

*G. duodenalis* komt, behalve bij de mens, ook wereldwijd voor bij diverse diersoorten. Dit zijn voor een groot deel dieren die in nauw contact staan met de mens. Voorbeelden hiervan zijn huisdieren, zoals honden en katten en verschillende soorten vee zoals runderen, schapen en paarden. Het feit dat *G. duodenalis* zowel voorkomt in de mens als in de bovengenoemde dieren, maakt dat rekening moet worden gehouden met de mogelijkheid dat *G. duodenalis* een zoönotische parasiet kan zijn. Sluitend bewijs voor deze hypothese ontbreekt tot nu toe echter nog. Bij paarden worden in diverse landen verschillende prevalenties gevonden (zie Bijlage 2). Dit hangt enerzijds af van de gebruikte methodes en anderzijds van de populaties (veulens versus paarden, met diarree versus zonder diarree). De meest risicovolle groep qua uitscheiding zijn veulens met diarree. Sowieso vindt de uitscheiding met name door veulens en veel minder door volwassen paarden plaats. Genotypering van positieve monsters is van belang om de zoönotische relevantie beter in te kunnen schatten.

### ***Clostridium difficile***

*Clostridium difficile*, een Gram positieve, spore-vormende, anaerobe staafvormige bacterie, is de belangrijkste oorzaak van antibiotica-geassocieerde diarree, meestal in het ziekenhuis opgelopen. De gevormde sporen zijn zeer resistent tegen hitte, chemische stoffen en uitdroging waardoor de bacterie lang in de omgeving kan overleven en zich kan verspreiden. Vooral bij patiënten die in een zorginstelling verblijven en antibiotica gebruiken, kan de bacterie in het maag-darmkanaal uitgroeien en klachten geven: antibiotica-geassocieerde diarree. Op dit moment zijn er meer dan 300 verschillende PCR ribotypen bekend, elk met specifieke microbiologische en epidemiologische eigenschappen. Sinds het verschijnen van het hypervirulente PCR ribotype 027 is het aantal patiënten met CDI (*C. difficile* infectie) dramatisch gestegen. Niet alleen het aantal patiënten is gestegen, maar ook de ernst van de symptomen en de complicaties van de ziekte, zoals pseudomembraneuze colitis. In de laatste jaren hebben steeds meer landen uitbraken in ziekenhuizen en andere zorginstellingen van het PCR ribotype 027. Recent is een ander hypervirulent PCR ribotype verschenen in Nederland en andere Europese landen. In tegenstelling tot type 027 wordt dit type 078 relatief vaak buiten het ziekenhuis opgelopen. Het is bovendien veruit het meest voorkomende type in vee, zoals varkens en koeien. Dit suggereert een mogelijke zoönotische agens. Ook lijkt de resistentie-problematiek van *Clostridium difficile* toe te nemen in Europa (Spigaglia et al., 2011).

*Clostridium difficile* wordt soms gekweekt uit mest van paarden met antibiotica geassocieerde diarree en colitis. Deze bacteriën worden eigenlijk zelden gekweekt uit mest van gezonde volwassen paarden, noch uit feces van paarden met enteritis die niet met antibiotica werden behandeld, maar mogelijk wel uit feces van gezonde veulens. Op bedrijven kan de



infectiedruk toenemen door de uitscheiding van sporen door zieke veulens en de kans dat andere veulens dan besmet raken, is vrij groot. De mortaliteit kan soms oplopen tot 50 procent.

Diagnose vindt plaats via anaërobe cultuur op speciale platen. Het kweken van *C. difficile* vereist speciale –kort houdbare-media. Toxines van *C. difficile* (A en B) kunnen eventueel worden aangetoond met – in beperkte mate voor het paard gevalideerde - commercieel verkrijgbare testkits. De toxinegenen kunnen met behulp van PCR worden aangetoond, maar het is niet bekend of het aantonen van die genen correspondeert met toxineproductie in paarden. GD heeft recent real-time PCR protocollen geïmplementeerd voor het aantonen van de toxine A en B genen van *Clostridium difficile*. In het kader van dit onderzoek zullen alleen de subpopulaties veulens met diarree en paarden met diarree onderzocht worden op toxinevormende *Clostridium difficile*.

### **Schimmelinfecties**

Prevalentie-onderzoek naar schimmelinfecties bij paarden lijkt weinig zinvol. Volgens prof. dr. M. Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan en Drs. H. van Gils wordt het door dierenartsen momenteel weinig meer in de praktijk gezien en is het risico daarmee laag. Onderzoek van subklinisch besmette paarden wordt niet zinvol geacht, het zou echt moeten gaan om paarden met van schimmelinfecties verdachte laesies. Dat vraagt uiteraard om heel ander monstermateriaal dan voor onderzoek naar de eerdergenoemde pathogenen en bovendien zijn paarden al vaak met antischimmel middelen behandeld door eigenaren voordat de dierenarts erbij betrokken wordt. Het is dus moeilijk om op tijd te zijn en het vraagt bovendien om zorgvuldige monsternamen (reiniging met alcohol, haren uit de randen van de lesies) en speciale kweekmethoden. Daarom wordt geadviseerd om onderzoek naar de prevalentie van schimmelinfecties bij paarden niet uit te voeren.

### **Rhodococcus equi**

De bacterie *Rhodococcus equi* is een pathogene, niet-sporenvormende Gram-positieve coccobacillus die wereldwijd, met uitzondering van Antarctica, in de bodem voorkomt. De bacterie wordt ook aangetroffen in zout en zoet water. De bacterie is in staat heftige infecties te veroorzaken bij veulens. De ziekte wordt gekenmerkt door chronische longontsteking en darmonsteking en een hoge sterfte onder veulens van één tot vier maanden oud. Hoewel *R. equi* ook in andere zoogdieren, zoals varkens, katten en honden, wordt aangetroffen zijn dergelijke infecties ongewoon. *R. equi* wordt voor deze dieren als een opportunistische ziekteverwekker beschouwd. Het inhaleren van stofdeeltjes besmet met *R. equi*, vormt, naast opname van grond en mest bij het grazen, de voornaamste bron van besmetting. Op stoeterijen en boerderijen waar paarden worden gehouden, wordt de bacterie in zowel bodem als mest in aanzienlijke aantallen aangetroffen. Hoewel de bacterie wijdverspreid is binnen de paardenpopulatie openbaart de ziekte zich zeer beperkt. Slechts op een relatief klein aantal stoeterijen en boerderijen is de ziekte endemisch of komt de ziekte sporadisch voor. De belangrijkste reden hiervoor is de aanwezigheid van virulente stammen in combinatie met, voor de bacterie, gunstige milieuomstandigheden. Infecties komen vaker voor in gebieden met hoge temperaturen gedurende de zomermaanden, met zanderige bodems en veel stof. Het maagdarmkanaal speelt een belangrijke rol bij de verspreiding van de bacterie in het milieu, maar orale opname leidt over het algemeen niet tot hematogene verspreiding en pneumonie tenzij het gaat om zeer grote hoeveelheden bacteriën. Het is mogelijk om met speciale selectieve platen (NANAT en modified CAZ-NB) *R. equi* te kweken uit feces. Op de standaard media voor bacteriologisch routineonderzoek wordt *R. equi* tussen de andere darmbacteriën niet terug gevonden. Ook bij gezonde paarden kan *R. equi* in de feces voorkomen, omdat het een bodembacterie is. Ook is het mogelijk *R. equi* in feces aan te tonen met behulp van directe PCR. Recent onderzoek heeft aangetoond dat de bacterie met name in tracheaalspoelsels, neusswabs en feces met PCR kon worden aangetoond. *Rhodococcus equi* komt vaak bedrijfsgebonden voor, waarbij de maximale uitscheiding gevonden wordt bij veulens van 6 weken oud (IXth Congress on Equine Infectious Diseases, Kentucky 2012). Aerosolmonsters, grondmonsters, faecesmonsters en/of neusswabs/tracheaalspoelingen van (klinisch verdachte) veulens kunnen, afhankelijk van de vraagstelling, zinvol zijn.



Stammen van *R. equi* worden onderscheiden in drie virulentieniveaus: volvirulent, middelmatig virulent en avirulent. Volvirulente *R. equi* stammen worden gekenmerkt door de aanwezigheid van een plasmide van 80 tot 90 kb met een gen coderend voor een 15 tot 17-kDa virulentie-geassocieerd eiwit (VapA) dat zich aan de oppervlakte van de bacterie bevindt. Virulente *R. equi* stammen zijn aangetroffen in de longen en darmen van zieke veulens en in de bodems en mest van bedrijven waar de ziekte endemisch is. Middelmatig virulente stammen worden gekenmerkt door een plasmide van 79 tot 100 kb en een 20-kDa virulentie-geassocieerd eiwit (VapB). Middelmatig virulente stammen zijn aangetroffen in de lymfe van varkens. In avirulente stammen worden bovengenoemd plasmiden en eiwitten niet aangetroffen. Deze laatste stammen komen algemeen voor in de bodem.

Het aantal humane infecties met *R. equi*, is zeer beperkt. De eerste humane infectie met *R. equi* werd in 1967 gerapporteerd en tot 1983 bleef, wereldwijd, het totale aantal infecties van *R. equi* beperkt tot dertien ziektegevallen. Na 1983 werd een relatief sterke toename gevonden, meer dan 100 ziektegevallen werden er gerapporteerd tot 2003. Deze toename wordt toegeschreven aan het toenemende aantal AIDS-patiënten, patiënten die een orgaantransplantatie ondergaan en ontwikkelingen in de kankerbestrijding. De meerderheid van de patiënten geïnfecteerd met *R. equi* heeft een immunodeficiëntie.

*Rhodococcus equi* wordt ook genoemd in relatie tot antibiotica resistentie en dan gaat het dus met name om het langdurig gebruik van derdegeneratie middelen. In Leidraad III – Infectieuze aandoeningen – respiratie (TvD 2008) worden de volgende behandelingsmogelijkheden genoemd: erythromycine 25 mg/kg 2dd p.o./rifampicine 5 mg/kg 2dd p.o. of 10 mg/kg 1dd p.o. Behandelingsduur in het algemeen vier tot negen weken. Daarnaast azithromycine 10mg/kg 1dd p.o./rifampicine, of clarithromycine 7.5 mg/kg 2dd p.o./rifampicine. De effectiviteit van tulathromycine 2.5 mg/kg i.m. eenmaal per zeven dagen, staat nog ter discussie, maar lijkt veelbelovend. Verder is het nog onduidelijk of tulathromycine met rifampicine gecombineerd moet worden.

In het Formularium paard staat onder behandeling van *Rhodococcus equi* infecties het volgende vermeld: "Gezien het intracellulaire karakter van de bacterie en de vorming van pyogranulomateuze ontstekingsprocessen valt, ondanks de goede *in vitro* gevoeligheid van *Rhodococcus equi* voor de meeste antibiotica, de werkzaamheid *in vivo* tegen. *In vivo* werkzame antibiotica (combinaties):

Eerste keus: –

Tweede keus: –

Derde keus: azithromycine (p.o.) of clarithromycine (p.o.) gecombineerd met rifampicine (p.o)

**Cave:** Azithromycine en clarithromycine zijn breed spectrum macroliden. Dit zijn humane preparaten die vanwege hun potentie en gunstige farmacokinetische eigenschappen ook in de humane gezondheidszorg van groot belang zijn en terughoudend worden voorgeschreven. Veterinair dient men deze middelen uitsluitend op strikte indicatie toe te passen. Gezien de risico's van deze therapie voor zowel merrie als veulen en het feit dat het hier om derde keuze antibiotica gaat, is de diagnostiek voor het instellen van deze therapie essentieel."

### **Multiresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA)**

In Nederland is in de afgelopen jaren al diverse malen onderzoek gedaan aan MRSA bij paarden. Conclusie was toen dat MRSA alleen bij gehospitaliseerde paarden werd gevonden, maar niet bij gezonde/symptoomloze paarden. Aangezien in 2008 de laatste prevalentiestudie in Nederland werd uitgevoerd lijkt het nu niet zinvol om MRSA in deze studie weer te betrekken.

**Bijlage 2. Inventarisatie van een aantal prevalentiestudies voor in dit kader relevante pathogenen.**

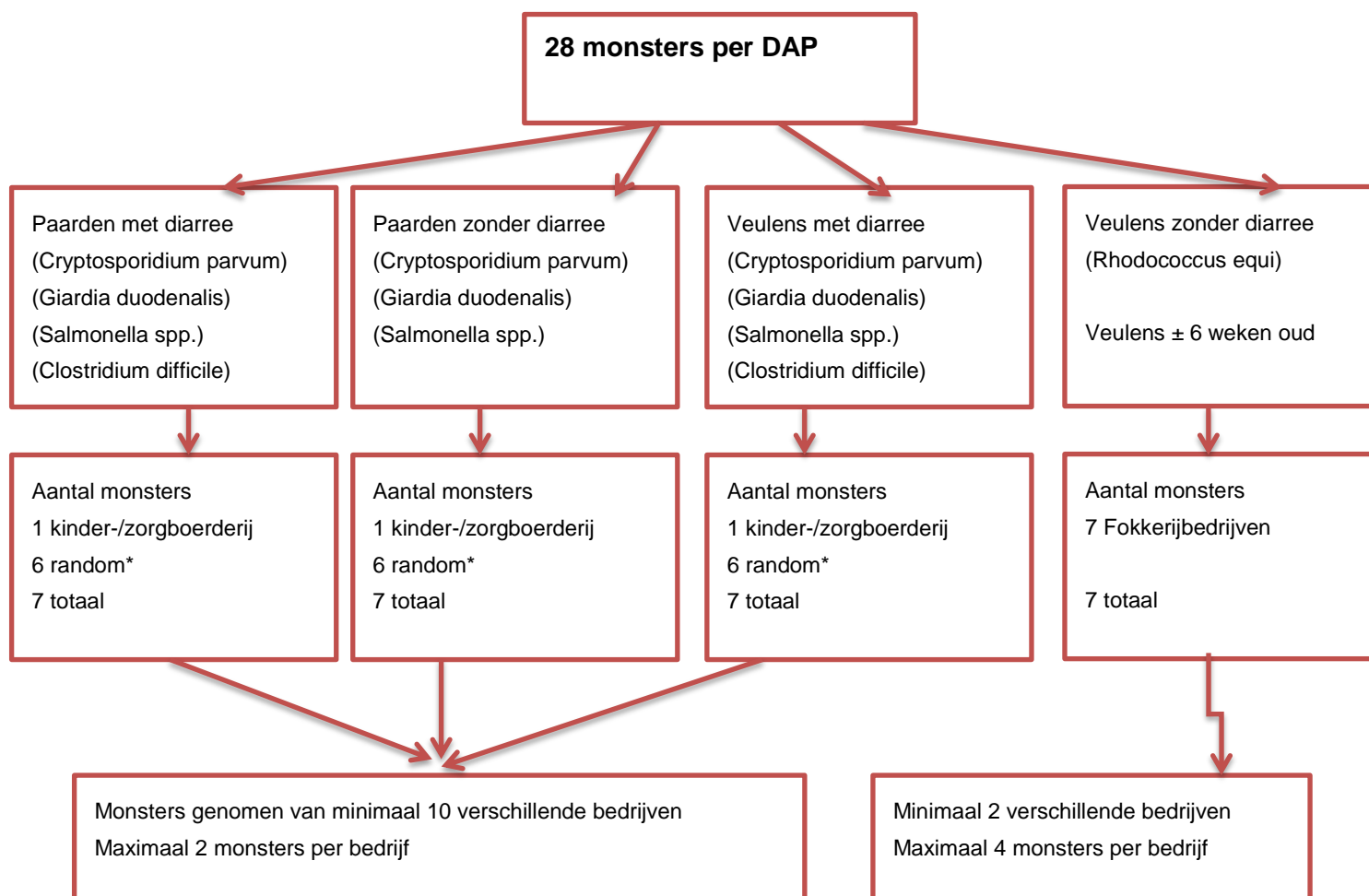
Study design	Country	Period	Age category	Clinical signs	n	Pathogens	Prevalence	OR	Reference
Case control	UK	1991-1994	Foals	Diarrhoea	365	<i>Cl. perfringens</i>	57%	3.0	Netherwood et al. 1996
				None	124	<i>Cl. Perfringens</i>	27%	16.0	
				Diarrhoea	365	Rotavirus	24%		
				None	124	Rotavirus	2%		
				Diarrhoea	365	<i>Cryptosporidium</i> spp.	20%	3.3	
				None	124	<i>Cryptosporidium</i> spp.	7%		
				Diarrhoea	365	<i>Salmonella</i> spp.	2%	n.r.	
				None	124	<i>Salmonella</i> spp.	1%		
Diarrhoea	365	<i>Strongyloides westeri</i>	5%	8.9					
None	124	<i>Strongyloides westeri</i>	0%						
Cross-sectional	USA	1998	Horses	None	8417	<i>Salmonella</i> spp.	0.8% (SE 0.5)	n.r.	Traub-Dargatz et al. 2000
Cross-sectional	USA	2009	Foals	None	175	<i>Cryptosporidium</i> spp.	7.4%	n.r.	Burton et al. 2010
			Dams	None	174		1.7%		
Genotyping study	USA	2004	Horses	None	10	<i>Giardia duodenalis</i> , assemblage AI and All	n.r.	n.r.	Traub et al. 2005
Cross-sectional	Canada	1997	Horses	None	35	<i>Giardia duodenalis</i> <i>Cryptosporidium</i> spp.	20% 17%	n.r.	Olson et al. 1997
Cross-sectional	USA	2000	Horses/mules	None	305 305	<i>Giardia duodenalis</i> <i>Cryptosporidium</i> spp.	4.6% <2.3%	n.r.	Atwill et al. 2000
Cross-sectional	USA	1994	Foals	None	66	giardia/cryptosporidium	17-35%/15-31%		Xiao and Herd 1994
			Weanlings	None	39	giardia/cryptosporidium	??/2.5%		
			Yearlings	None	46	giardia/cryptosporidium	??/nil%		
			Mares	None	71	giardia/cryptosporidium	??/nil%		
Clinical study	USA	2003-2008	Foals	Diarrhoea	233	Rotavirus <i>Clostridium perfringens</i> <i>Salmonella</i> spp. <i>Clostridium difficile</i>	20% 18% 12% 5%	13 16 2.6	Frederick et al. 2009 C. perfringens: OR for foals < 1 month. Rotavirus/Salmonella: OR for foals > 1 month



Cross-sectional	Italy	2007	Foals 0-2 weeks Foals 2-4 weeks Foals 4-8 weeks Foals > 8 weeks Broodmares	None None None None None	30 30 30 30 30	giardia/cryptosporidium giardia/cryptosporidium giardia/cryptosporidium giardia/cryptosporidium giardia/cryptosporidium	6.7%/nil% 16.7%/10% 10%/3.3% 26.6%/23% 6.7%/3.3%		Veronesi et al. 2010
Clinical study	Italy	2007	Foals 2-8 weeks	Diarrhoea	21	giardia/cryptosporidium	23.8%/19%		Veronesi et al. 2010
Cross-sectional	Poland	1998	Horses	None	106	gryptosporidium	9.4%		Majewska et al. 1999
Longitudinal	Germany	1995	Foals	None	37	giardia/cryptosporidium	5.4%/2.7%		Beelitz et al. 1996
Cross-sectional	Germany	2004	Horses	None	400	salmonella	Nil%		Pichner et al. 2005
Cross-sectional	USA	1999	Horses	None	>1000	salmonella	0.8%		Traub-Dargatz et al. 2000
Case-control	USA	1999	Horses	Diarrhoea Controls	57 57	<i>Cl. Perfringens/Cl. difficile</i> <i>Cl. Perfringens/Cl. difficile</i>	16%/14% Nil%/Nil%		Donaldson and Palmer 1999
Case-control	UK/Ireland	1987-1989	Foals Foals	Diarrhoea Controls	326 77	Rotavirus	37% in diarrhoeic foals		Browning et al. 1991
Cross-sectional	Netherlands	2010	Foals 7-28 days		34	giardia/cryptosporidium	11.7%/Nil%		Looijen, studenten referaat
Cross-sectional	USA	1993-1994	Recreational horses 4-24 Y	None	91	giardia/cryptosporidium	Nil/Nil implies <3.2%/<3.2%		Johnson et al. 1997
Targeted	Netherlands	2008	Hospitalised horses	Diverse	259	MRSA	9.3%		Van Duijkeren et al. 2009
Cross-sectional	Netherlands	2004	Horses 1-30 Y	None	200	MRSA MRS ( MecA+ CNS)	Nil% 22.5%		Busscher et al. 2006
Cross-sectional	Netherlands	2010	Horses	None	102	MRSA	Nil%		Jonquiere et al. 2010

Pathogeen	Veulens met diarrhee	Veulens zonder diarrhee	Paarden met diarrhee	Paarden zonder diarrhee	Range
<i>Cryptosporidium</i> spp	20%	7%		17%	
	19%	7.4%		1.7%	
		15-31%		<2.3%	
		0-23%		0%	
		2.7%		9.4%	
		0%		<3.2%	
Range	19-20%	0-31%		0-9.4%	
<i>Giardia</i> spp	24%	17-35%		20%	
		6.7-26.6%		4.6%	
		5.4%		0%	
		11.7%		<3.2%	
Range	24%	5.4-26.6%		0-20%	
salmonella	2%	1%		0.8%	
	12%			0%	
Range	2-12%	1%		0-0.8%	
<i>Clostridium difficile</i>	5%		14%	0%	
Range	5%		14%	0%	
<i>Clostridium perfringens</i>	18%	7.4%	16%	0%	
	57%	27%		1.7%	
Range	18-57%	7.4-27%	16%	0-1.7%	
MRSA			Hospitalised horses	No symptoms	
			9.3%	0%	
				0%	

**Bijlage 3. Schema monsternamen DAP's.**



\* De bedrijfstypen manege, IST locatie of pensionstal en fokkerij mogen ad random gekozen worden. Indien mogelijk een evenredige verdeling over de bedrijfstypen aanhouden.

#### Bijlage 4. Brief aan deelnemende praktijken.

Betreft: Project 1016010 gastro-intestinale pathogenen paard

Geachte collega('s),

Vorige week bent u per mail en/of telefonisch benaderd voor wat betreft het project gastro-intestinale pathogenen paard dat bij de GD uitgevoerd gaat worden. We zijn blij dat u hebt aangegeven hieraan uw medewerking te willen verlenen.

De prevalentie van de pathogenen *Rhodococcus equi*, *Salmonella spp.*, *Clostridium difficile*, *Cryptosporidium parvum* en *Giardia duodenalis* in de Nederlandse paardenpopulatie is onbekend. Aangezien deze micro-organismen mogelijk ook van belang zijn voor de volksgezondheid willen we door middel van dit project meer inzicht krijgen in de prevalentie van deze pathogenen onder verschillende subpopulaties en sectoren van de paardenhouderij.

Ook worden de *Rhodococcus equi*, *Salmonella spp.* en *Clostridium difficile* isolaten getest op hun gevoeligheid voor relevante antibiotica panels, dit in verband met de maatschappelijk doelstelling reductie antibioticagebruik in de dierhouderij en de wens bepaalde antibiotica te reserveren voor humaan gebruik.

Voor het project worden in totaal ongeveer 640 mestmonsters verzameld. Onderscheid wordt gemaakt tussen paarden met diarree, paarden zonder diarree, veulens met diarree en - alleen voor *Rhodococcus equi* - veulens zonder diarree. Ook wordt onderscheid gemaakt tussen de bedrijfstypen manege, kinder-zorgboerderij, IST locatie/pensionstal en fokkerij. Een overzicht van de onderzoeksopzet is in de bijlage te vinden. In het kader van dit project ontvangt u een vergoeding van €10,- per ingezonden mestmonster. Dit bedrag wordt na het binnenkrijgen van alle monsters aan u overgemaakt. De laboratoriumbepalingen worden uiteraard op rekening van het project uitgevoerd.

Het aantal monsters dat u wordt gevraagd te nemen in het kader van Gastro-intestinale Pathogenen is 21, waarvan 7 monsters van paarden met diarree, 7 van paarden zonder diarree en 7 van veulens van 2 – 8 weken leeftijd met diarree. Van elke subpopulatie wordt u gevraagd zo mogelijk minstens 1 hiervan op een kinder-/zorgboerderij af te nemen.

In bijgaand pakket vindt u alle benodigdheden voor het nemen van mestmonsters. Hierin zit een grotere pot voor de salmonella test. Hier graag 10 gram feces in verzamelen (ongeveer tot het streepje). Tevens zit er een kleinere pot in, deze graag minimaal half vol retourneren. Dus voor het gastro-intestinale pathogenen onderzoek twee potjes per veulen met diarree of paard met of zonder diarree insturen. A.u.b. maximaal twee monsters op hetzelfde bedrijf nemen en zowel inzendformulier als enquête invullen. Het afnemen van de enquête duurt slechts 5 – 10 minuten, maar is van groot belang om meer inzicht te krijgen in mogelijke risicofactoren.

Het aantal monsters dat u wordt gevraagd te nemen in het kader van het *Rhodococcus equi* prevalentie onderzoek is ook 7, te nemen bij gezonde veulens van 6 – 8 weken oud. Hiervoor graag alleen een kleine pot minimaal halfvol retourneren en gebruik maken van het aparte inzendformulier + enquête voor *Rhodococcus equi*. A.u.b. maximaal vier monsters per bedrijf, minimaal twee bedrijven bemonsteren. Dit hoeven dus geen bedrijven te zijn met eerdere verdenkingen van *Rhodococcus equi* infecties!

Monsters bij voorkeur rectaal verzamelen tijdens reguliere visites, bijvoorbeeld voor gezonde paarden in het kader van fertiliteitsonderzoek. Diarree monsters liefst zelf verzamelen eventueel door de defecatie op te wekken met toucheren/oppervlakkig exploreren. Als dit op dat moment niet lukt of niet acceptabel is eventueel de hulp van de eigenaar vragen. Zo nodig mogen voor veulens en paarden zonder diarree ook de bovenste vijgen van “nog dampende” mest benut worden.

Martine Bloemer voert bij GD in het kader van dit project haar afstudeeropdracht voor de HBO studie Dier & Veehouderij uit en zal u zo nodig benaderen met reminders, nieuwe materialen en inzendformulieren et cetera. Vanaf september dit jaar kunt u feedback over de resultaten van het onderzoek verwachten na goedkeuring van de opdrachtgever.

U krijgt niet automatisch uitslagen van de ingezonden monsters omdat de monsters voor een aantal testen eerst verzameld worden en in grotere series getest en omdat de relevantie van een individuele uitslag bij gezonde paarden en veulens vooralsnog niet duidelijk is (dit project beoogt daar meer inzicht in te krijgen). Voor paarden en veulens met diarree kunnen we u eventueel per mail salmonella, cryptosporidium en giardia positieve uitslagen doorgeven.

Mocht u nog vragen hebben over de opzet van het onderzoek dan kunt u contact opnemen met Martine Bloemer ([M.Bloemer@gddeventer.com](mailto:M.Bloemer@gddeventer.com)/06-53106499) en/of Kees van Maanen ([c.v.maanen@gddeventer.com](mailto:c.v.maanen@gddeventer.com)/ 06-51170171)

Alvast hartelijk dank voor uw medewerking en vriendelijke groeten,


Kees van Maanen

Martine Bloemer

## Bijlage 5. Inzendformulieren.

## INZENDFORMULIER MONSTERS PAARD

### Gastrointestinale Pathogenen Project Paard 1016010

Aantal monsters:	Autorisatie	Ontvangst sticker:	Inzendnummer:
Faeces 	Datum	Deze ruimte niet beschrijven	Deze ruimte niet beschrijven
			In te vullen door GD
<b>Formulier zo VOLLEDIG mogelijk invullen.</b> Eigenaar/houder: _____ Adres: _____ Postcode + Plaats: _____ Klantcode bij DAP: _____ Dierenarts/praktijk: _____ Dierenarts: _____ Plaats: _____			UBN: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> Rel Nr: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> NR: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Inzender is	<input type="checkbox"/> Eigenaar/Houder <input type="checkbox"/> Dierenarts		
Rekening naar	<input checked="" type="checkbox"/> GD		
Materiaal	<input checked="" type="checkbox"/> Faeces		
Uitslag naar:	<input checked="" type="checkbox"/> Kees van Maanen (1062908) <input checked="" type="checkbox"/> Martine Bloemer (4627230) <b>GEEN UITSLAG NAAR DE VEEHOUDER OF DIERENARTS</b>		
Datum monstername:	<input type="text"/> - <input type="text"/> - <input type="text"/>	Datum verzonden:	<input type="text"/> - <input type="text"/> - <input type="text"/>
Monster nr.	Naam paard	Chipnummer	Geboortedatum
01	-----	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> - <input type="text"/> - <input type="text"/>
02	-----	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> - <input type="text"/> - <input type="text"/>
03	-----	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> - <input type="text"/> - <input type="text"/>
04	-----	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> - <input type="text"/> - <input type="text"/>
05	-----	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> - <input type="text"/> - <input type="text"/>
Reden Inzending		Aanvullende informatie	
<input checked="" type="checkbox"/> GD Project 1016010		Diarree: Ja / Nee *  * Doorhalen wat niet van toepassing is.	
Gewenst onderzoek			
<input checked="" type="checkbox"/> Salmonella P488 + ABG 2e mestmonster t.a.v. R&D (Martine Bloemer)			
Opdrachtgever			
Naam: _____ Handtekening: _____ Datum: _____			

Van toepassing zijn de algemene voorwaarden van GD, gedeponeerd bij de K.v.K. nr. 08017836

26 03 2013

8366496989



# INZENDFORMULIER MONSTERS PAARD

## Rhodococcus Equi Project Paard 1016010

<b>Aantal monsters:</b>	<b>Autorisatie</b>	<b>Ontvangst sticker:</b>	<b>Inzendnummer:</b>
Faeces 	Datum  Paraaf	Deze ruimte niet beschrijven	Deze ruimte niet beschrijven
<b>Formulier zo VOLLEDIG mogelijk invullen.</b> Eigenaar/houder: _____ Adres: _____ Postcode + Plaats: _____ Klantcode bij DAP: _____			UBN: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> Rel Nr: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Dierenarts/praktijk: _____ Dierenarts: _____ Plaats: _____			NR: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Inzender is	<input type="checkbox"/> Eigenaar/Houder <input type="checkbox"/> Dierenarts		
Rekening naar	<input checked="" type="checkbox"/> GD		
Materiaal	<input checked="" type="checkbox"/> Faeces		
Uitslag naar:	<input checked="" type="checkbox"/> Kees van Maanen (1062908) <input checked="" type="checkbox"/> Martine Bloemer (4627230)		<b>GEEN UITSLAG NAAR DE VEEHOUDER OF DIERENARTS</b>
Datum monsternam:	<input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/>	Datum verzonden:	<input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/>
Monster nr.	Naam paard	Chipnummer	Geboortedatum
01	-----	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
02	-----	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
03	-----	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
04	-----	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
05	-----	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Reden Inzending		Aanvullende Informatie	
<input checked="" type="checkbox"/> GD Project 1016010		Diarree: Ja / Nee *	
<b>Gewenst onderzoek</b> Mestmonster t.a.v. Refke Peerboom		* Doorhalen wat niet van toepassing is.	
<b>Opdrachtgever</b>			
Naam: _____ Handtekening: _____ Datum: _____			

Van toepassing zijn de algemene voorwaarden van GD, gedeponeerd bij de K.v.K. nr. 060117830

26 03 2013

**1838204725**

**Bijlage 6. Vragenlijst project gastro-intestinale pathogenen paard.**

1. Onder welk bedrijfstype valt het bedrijf?

manege,  IST locatie/pensionstal,  fokkerij,  kinder-/zorgboerderij

2. Wat is de leeftijd van het paard waarvan het monster is genomen (vanaf de januari telling)? Indien het een veulen betreft, wat is de leeftijd in weken?

\_\_\_\_ jaar (paard) \_\_\_\_ weken (veulen)

3a. Heeft het paard diarree?

ja, matig,  ja, ernstig  nee

3b. Hoe lang heeft het paard al diarree? \_\_\_\_ dagen

3c. Is het paard behandeld voor diarree?

ja, \_\_\_\_\_ middel,  nee

3d. Zijn er vaker paarden met diarree gezien op het bedrijf, vanaf januari 2013 tot heden?

ja, \_\_\_\_ aantal paarden,  nee

3e. Heeft het paard nog andere symptomen dan diarree?

nee,  ja, namelijk \_\_\_\_\_

4a. Lopen uw paarden regelmatig op de weide?

nee,  ja, in de lente en de zomer,  ja, het hele jaar

4b. Indien ja in de lente en zomer, van wanneer tot wanneer worden ze geweid?

Op weide \_\_\_\_\_ maand, Op stal \_\_\_\_\_ maand

4c. Hoeveel uren lopen de paarden gemiddeld per dag in de wei? \_\_\_\_ uur

4d. Indien in de wei, worden de paarden bijgevoerd met ruwvoer?

nee,  ja, kleine hoeveelheid voor de nacht,  ja, onbeperkt,  ja, overig \_\_\_\_\_

5. Welk type water krijgt het paard voornamelijk?

In de wei:  oppervlaktewater,  leidingwater,  bronwater,  n.v.t.,  anders, namelijk \_\_\_\_\_

Op stal:  oppervlaktewater,  leidingwater,  bronwater,  n.v.t.,  anders, namelijk \_\_\_\_\_

6. Hoeveel mensen zijn er afgelopen week in aanraking gekomen met de paarden (uitgezonderd uzelf)

\_\_\_\_ aantal beroepsmatig (hoefsmid, KI, dierenarts, voerleverancier, zadelpasser e.d.)

\_\_\_\_ aantal m.b.t. activiteiten op het bedrijf (rijden, verzorgen, voeren, mesten e.d.)

7. Welk type ruwvoer voert u het paard hoofdzakelijk bij?  droog hooi,  kuilgras,  menging van beide,  overig, namelijk \_\_\_\_\_

8. Hoe vaak mest u de stallen uit? \_\_\_\_ x per week

z.o.z.

9. Hoe worden de paarden hoofdzakelijk gehuisvest?

In de wei:  individueel,  in vaste koppels van twee paarden,  in groepen,  n.v.t.

Op stal:  individueel,  in vaste koppels van twee paarden,  in groepen,  n.v.t.

## 10. Worden nog andere landbouwhuisdieren op het bedrijf gehouden?

Dier	Aanwezig Ja, aantal	Contact met paarden mogelijk
Kippen	<input type="radio"/>	Ja/Nee
Koeien	<input type="radio"/>	Ja/Nee
Varkens	<input type="radio"/>	Ja/Nee
Geiten	<input type="radio"/>	Ja/Nee
Schapen	<input type="radio"/>	Ja/Nee
Vleeskalveren	<input type="radio"/>	Ja/Nee
Overig	<input type="radio"/>	Ja/Nee

**Bijlage 7. Vragenlijst *Rhodococcus equi* prevalentie onderzoek bij gezonde veulens.**

1. Wat is de leeftijd in weken van het veulen waarvan het monster genomen is?

\_\_\_\_\_ weken

2. Is het veulen in deze weken behandeld met antibiotica? Zo ja, welk middel?

nee,  ja naam middel \_\_\_\_\_

3. Hebt u de in de afgelopen twee jaar veulens gehad met longontsteking?

nee,  ja

3. Lopen de veulens regelmatig buiten?

nee,  ja, in de weide,  ja in de paddock,  ja overig namelijk \_\_\_\_\_

4. Hoeveel mensen zijn er afgelopen week in aanraking gekomen met de paarden (uitgezonderd uzelf)

\_\_\_\_\_ aantal beroepsmatig (hoefsmid, KI, dierenarts, voerleverancier, zadelpasser e.d.)

\_\_\_\_\_ aantal m.b.t. activiteiten op het bedrijf (rijden, verzorgen, voeren, mesten e.d.)

5. Worden nog andere landbouwhuisdieren op het bedrijf gehouden?

Dier	Aanwezig Ja, aantal	Contact met paarden mogelijk
Kippen	<input type="radio"/> _____	Ja/Nee
Koeien	<input type="radio"/> _____	Ja/Nee
Varkens	<input type="radio"/> _____	Ja/Nee
Geiten	<input type="radio"/> _____	Ja/Nee
Schape	<input type="radio"/> _____	Ja/Nee
Vleeskalveren	<input type="radio"/> _____	Ja/Nee
Overig	<input type="radio"/> _____	Ja/Nee

## Bijlage 8. Specificatie *Clostridium difficile* test

Protocol voor isolatie van *Clostridium difficile* uit faeces van paarden

Ophopen:

- **CDMN broth:** 1 gram monster brengen in 9 ml BHI met 1 g/l taurocholaat en CDMN suppl 179602 van Oxoid (moxalactam norfloxacin).

Na 4 en 11 dagen incubatie (anaeroob, 37°C) wordt het ophopingsmedium, na alcoholshock, afgeënt op de volgende (selectieve) media:

- **Brazier:** Brazier's *Clostridium difficile* Selective medium, modified (Oxoid PB5191A): C. diff Agar Base met cefoxitin (8 mg/l), D-cycloserine (250mg/l), egg yolk emulsion, cholic acid, p-hydroxyphenylacetic acid en lysed horse blood.
- **Clos:** *Clostridium difficile* selective medium (Oxoid PB5054A): C. diff Agar Base met cefoxitin (4 mg/l), D-cycloserine (250mg/l) en paardenbloed.
- **HIS:** schapenbloedagar

Platen worden anaeroob geïncubeerd en een aantal keren beoordeeld.

Verdachte isolaten (1 per plaat, tenzij duidelijk verschillende koloniemorfologie) worden opgeslagen bij -80°C. Isolaten worden bevestigd als *C. difficile* d.m.v. Glu-D pcr (in-house PCR van het LUMC) en/of Maldi-tof.

**Bijlage 9. Specificatie *Rhodococcus equi* kweek.**

Plating out faecal/gastrointestinal/soil samples for the quantitative assessment of *Rhodococcus equi*

- Weigh out 1 gram (or 1 ml if liquid sample) of gastrointestinal material/faeces/soil into a 10 ml tube.
- Add 9 ml of 1xPBS to each sample of GI/faecal/soil contents. (Can use unbuffered 0.9% NaCl if no PBS). This gives  $10^1$  dilution.
- Ingredients for PBS
  - 8 grams NaCl
  - 0.2 grams KCl
  - 1.44 grams  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
  - 0.24 grams  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- add to 800 ml  $\text{H}_2\text{O}$  and adjust pH to 7.4 with HCl, then add to 1 litre.
- Vortex each sample for 30-60 seconds so thoroughly mixed.
- Pipette 100  $\mu\text{l}$  of above prepared GIT/faecal/soil  $10^1$  solution (10ml volume) onto plate with NANAT media and spread the volume out over the plate.
- Repeat the process for mCAZ-NB plates. This represents  $10^3$  onto the plate.
- Each colony will represent  $\sim 1 \times 10^3$  bacteria per gram GIT contents for the 100  $\mu\text{l}$  volume.
- Samples are plated as 10 fold serial dilutions onto each of the selective media used (NANAT / mCAZ-NB) as follows:
  - take a 1000  $\mu\text{l}$  (1ml) volume aliquot from the original  $10^1$  dilution (10ml volume) after vortexing and transfer to separate tube
  - take 100  $\mu\text{l}$  out of this 1ml tube and add to 900  $\mu\text{l}$  PBS or saline in a new tube
  - continue serially diluting by taking 100  $\mu\text{l}$  from each dilution and adding to 900  $\mu\text{l}$  saline in a new tube.
  - vortex each sample before pipetting out 100  $\mu\text{l}$  onto plates =  $10^4 / 10^5 / 10^6$  etc (usually down to  $10^6$  ).
- For  $10^2$ ; pipette 100  $\mu\text{l}$  from this 1ml tube onto plate after vortexing =  $10^2$
- Spread inoculum evenly over plate.
- Incubate at 37°C for 48 hrs.
- Store resulting plates in a cool room for no more than 1 month before blotting. Ensure the plates are sealed to prevent dehydration ( i.e. cover with clean cling wrap).

**Bijlage 10. Meewerkende DAP's**

<b>DAP</b>	<b>Provincie</b>	<b>Plaats</b>
DAP Zuidwest Drenthe	Drenthe	Meppel
DAP AA en Hunze	Drenthe	Schoonlo
DAP Flevoland	Flevoland	Zeewolde
DKL Emmeloord	Flevoland	Emmeloord
DAP Dokkum	Friesland	Dokkum
DKL Wolvega	Friesland	Oldeholtpade
De Graafschap dierenartsen	Gelderland	Vorden
DK de Vijfsprong	Gelderland	Wekerom
DKL Winsum	Groningen	Winsum
DAP Ysselsteyn	Limburg	Ysselsteyn
DAP Horst	Limburg	Horst
Paardenpraktijk West-Brabant	N-Brabant	Roosendaal
DAP Moergestel	N-Brabant	Moergestel
Veterinair Centrum Holland Noord	N-Holland	Slootdorp
DAP Kennemerland	N-Holland	Bergen
DKL Enterbrook	Overijssel	Enter
DAP De watermolen	Overijssel	Haaksbergen
Ambulante kliniek paard	Utrecht	Utrecht
DAP Krommerijnstreek	Utrecht	Schalkwijk
DGC de Vallei	Utrecht	Woudenberg
DK Ridderkerk	Z-Holland	Ridderkerk
DKL IJzendijke	Zeeland	IJzendijke
Karelse en van Dijk	Zeeland	Heinkenszand

**Bijlage 11. Overzicht aantal monsters per provincie en bedrijfstype.**

Manege	16
Fokkerij	132
IST locatie/ pensionstal	69
Kinder-/ zorgboerderij	26

<b>Noord-Holland</b>	21
<b>Overijssel</b>	22
<b>Limburg</b>	36
<b>Gelderland</b>	29
<b>Zuid-Holland</b>	23
<b>Noord-Brabant</b>	22
<b>Zeeland</b>	20
<b>Flevoland</b>	19
<b>Utrecht</b>	24
<b>Friesland</b>	33
<b>Groningen</b>	2
<b>Drenthe</b>	1