

Klauwbaden en Mortellaro: wat is de werkzaamheid van actieve stoffen tegen *Treponema*?

Auteurs: Sandra Debevere en Evi Canniere (Inagro)

Digitale dermatitis (DD of Mortellaro in de volksmond) veroorzaakt in heel wat melkveebedrijven kreupelheid bij rundvee. Om deze aandoening onder controle te houden, worden vaak klauwbaden met een ontsmettingsproduct ingezet. De werkzaamheid van de actieve stoffen in deze producten specifiek tegen *Treponema*'s is echter niet altijd bewezen. Dit is geen vereiste in de biocidewetgeving. In het ClawCare project werd aan de hand van in vitro studies nagegaan welke actieve stoffen veelbelovend zijn om de groei van *Treponema* bacteriën, gevonden in DD letsels, effectief tegen te gaan.

Klauwbaden om DD op het bedrijf te voorkomen



Figuur 1. Digitale dermatitis letsel ter hoogte van de klauwen.

Digitale dermatitis is een wereldwijd gekend probleem op rundveebedrijven die gekenmerkt wordt door infectie van de klauwhuid. Specifiek bij melkvee veroorzaakt deze aandoening kreupelheid, gedaalde melkproductie en verhoogde kans op afvoer wat leidt tot grote economische verliezen in de sector. De oorzaak van deze polymicrobiële infectieziekte is nog niet geheel ontrafeld, maar bacteriën die consequent teruggevonden worden in de letsels zijn *Treponema* species. Mest is ook een belangrijk reservoir waardoor de aandoening moeilijk te elimineren is en weinig bedrijven niet te maken hebben met DD.

In heel wat bedrijven worden groepsbehandelingen uitgevoerd door middel van klauwbaden om DD onder controle te houden. Aan deze klauwbaden worden één of meerdere reinigende en/of ontsmettende producten toegevoegd. In België mogen wettelijk enkel producten gebruikt worden die zich bevinden op de biocidelijst en behoren tot de groep PT3 (biociden voor veterinaire hygiëne doeleinden) met gebruiksdoel ontsmetting van de klauwen. Via de website van Biocide.be kan je de lijst van toegelaten biociden terugvinden (website: zie QR-code in Figuur 1). Via geavanceerd zoeken kan je meer specifiek zoeken op bepaalde producten en eigenschappen. Om op deze lijst te komen, moet de werkzaamheid van biociden echter enkel aangetoond worden tegen bepaalde bacteriesoorten, namelijk *P. hauseri* of *P. vulgaris*, *E. harae*, *P. aeruginosa* en *S. aureus*. Voor klauwbadproducten moet de werkzaamheid tegen *Treponema* dus niet aangetoond worden, alhoewel dit een belangrijke bacterie is t.h.v. DD letsels.



Figuur 2. Website Biocide.be

Momenteel wordt nog vaak kopersulfaat en formaline gebruikt omwille van de efficiëntie en lage kostprijs. Echter, kopersulfaat is niet meer toegelaten wegens de negatieve impact op het milieu en formaline is toegelaten, maar is toxisch en kankerverwekkend voor dier en mens. De doeltreffendheid en stabiliteit van andere producten is vaak niet voldoende bewezen, in het bijzonder wanneer het product in contact komt met mest. Melkveehouders zijn dus op zoek naar effectieve, betaalbare, milieuvriendelijke en veilige alternatieven voor het gebruik in klauwbaden.

Binnen het VLAIO-project ClawCare werd een in vitro studie uitgevoerd om alternatieve actieve stoffen te vinden die de groei van *Treponema* bacteriën kon tegengaan, ook in aanwezigheid van mest. Actieve stoffen die vaak gebruikt worden in commerciële producten werden hierbij ook getest.

Algemene proefopzet

Via een uitgebreide literatuurstudie en inbreng van experts, werd een inventarisatie uitgevoerd van actieve stoffen die mogelijk effectief zijn om *Treponema* af te doden. Hierbij werden actieve stoffen opgenomen die reeds vaak in commerciële klauwbadproducten terug te vinden zijn, maar ook andere stoffen met antibacterieel potentieel.

Na het bepalen van relevante concentraties (onder andere o.b.v. gangbaar gebruikte concentraties, minimale pH om huidbeschadiging te voorkomen,...), werden deze actieve stoffen in het labo geïncubeerd met *Treponema* bacteriën, zowel in af- als aanwezigheid van mest. Voor deze studie werd gekozen voor *Treponema bryantii*, een soort die voorkomt t.h.v. de pens, omdat soorten die voorkomen ter hoogte van de klauwen niet opgekweekt konden worden in het labo. Op verschillende tijdstippen werden metingen uitgevoerd om de groei van de bacterie op te volgen. Dit gebeurde door middel van optische dichtheidsmetingen (OD-metingen). Dit is een techniek die op basis van lichtbreking de bacteriegroei kan bepalen. Formaline werd als positieve controle meegenomen in de studie.

Niet alle actieve stoffen waren geschikt om OD metingen uit te voeren omwille van de troebelheid van het staal. Daarom werd een tweede studie opgezet waarbij qPCR werd uitgevoerd. Hierbij werd op verschillende tijdstippen het DNA van de bacterie geëxtraheerd om zo de groei te bepalen. Op basis van de eerste studie werden ook enkele interessante combinaties van actieve stoffen uitgetest. Kopersulfaat werd als positieve controle meegenomen in de studie.

Resultaten en discussie

Eerste studie

In Tabel 1 is een overzicht terug te vinden van actieve stoffen en hun concentratie die in vitro getest werd. In afwezigheid van mest is duidelijk te zien dat de controlebehandeling, formaline, duidelijk werkt. Bovendien had mest geen invloed op deze werking. Natrium omadine vertoonde ook een goede werkzaamheid zowel zonder als met mest. Daarnaast zijn zuren ook werkzaam als deze niet te laag gedoseerd zijn. Mest daarentegen zorgt ervoor dat de minimumconcentratie wat hoger is om effectief te zijn in vergelijking met de wanneer geen mest aanwezig is. Glutaaraldehyde vertoonde een trend tot effectiviteit en mest zou hierop geen negatief effect hebben. Propyleenglycol, natriumbicarbonaat en thymol lijken minder goede producten te zijn omdat ze niet werkzaam zijn met mest.

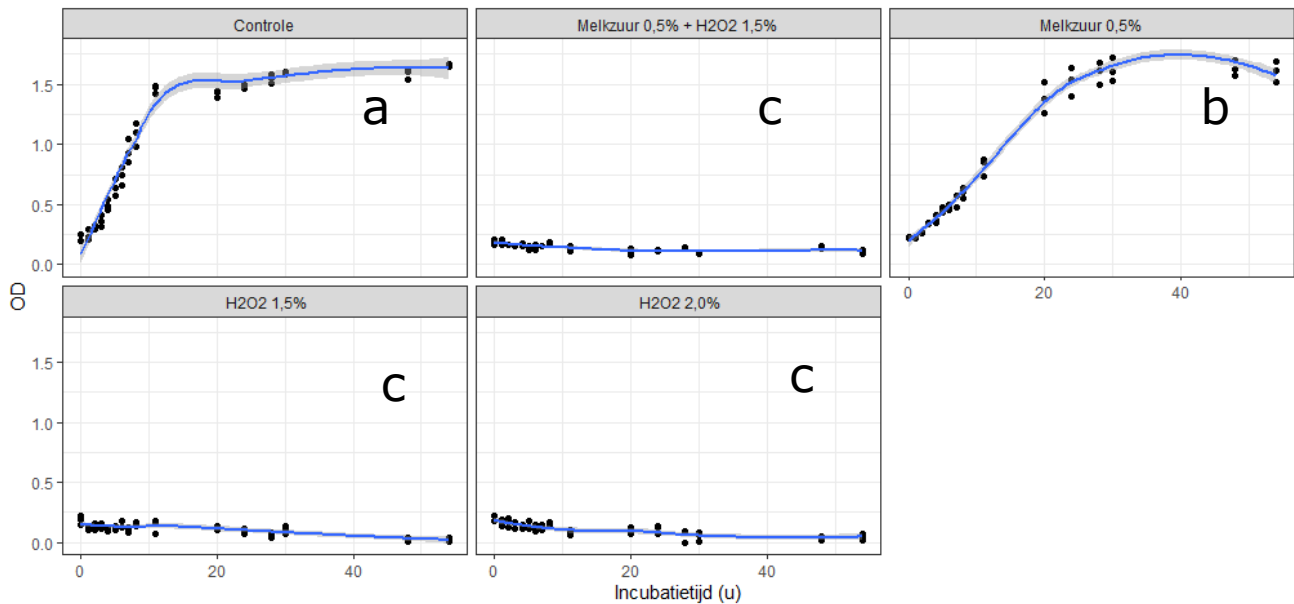
Tabel 1. Overzicht van de effectiviteit van producten in verschillende concentraties op *Treponema* bacteriën en de invloed van mest.

Product	Concentratie	Effectief	Trend tot effectief	Niet effectief	Indien effectief	
					Geen invloed mest	Invloed mest
Formaline	3%	X			X	
	5%	X			X	
Glutaaraldehyde	3,5%		X		X	
	5%		X		X	
Azijnzuur	0,05%			X		
	0,5%	X				X
	2%		X		X	
Citroenzuur	0,005%			X		
	0,5%	X				X
	2%	X			X	
Melkzuur	0,005%			X		
	0,5%	X			X	
	1,5%	X			X	
Perazijnzuur	0,005%	X				X
	0,5%	X				X
	1%	X			X	
Thymol	0,2%		X			X
Natrium omadine	0,12%	X			X	
	2,5%	X			X	
Propyleenglycol	2,5%	X				X
	25%	X				X
Natrium-bicarbonaat	2,5%	X				X

Tweede studie

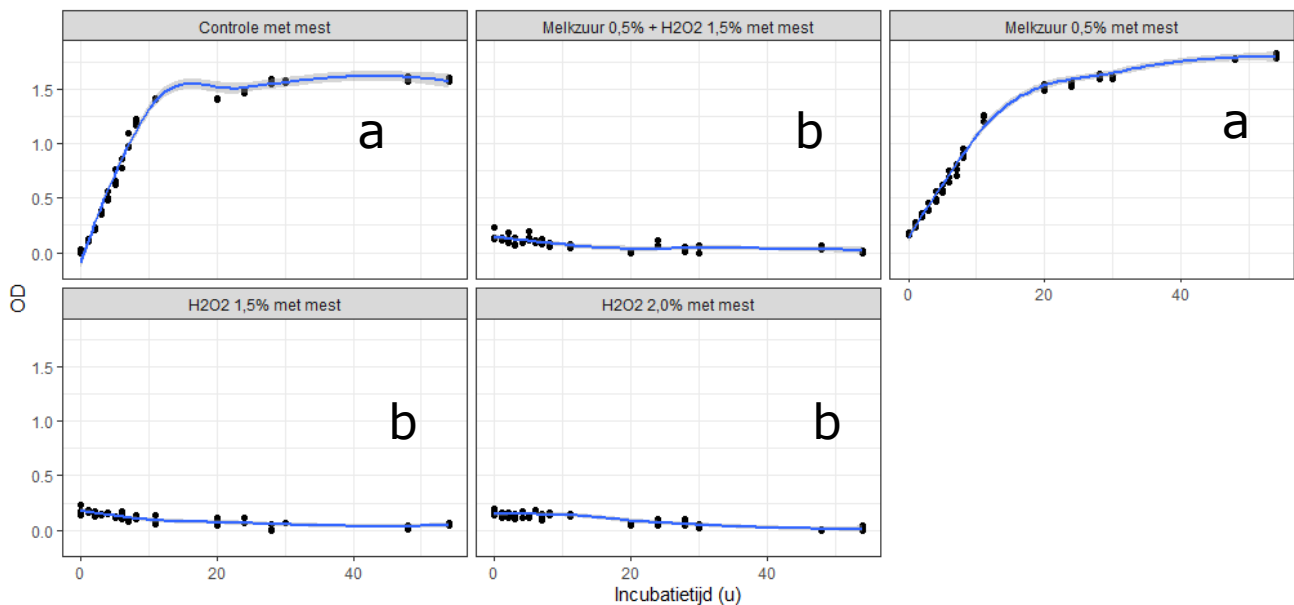
In deze studie werden enerzijds interessante combinaties uitgevoerd op basis van resultaten uit de eerste studie en op basis van input van experts. Daarnaast werd ook nog een gestabiliseerde vorm van waterstofperoxide (H₂O₂) ingesloten. Het interessante aan dit product is dat de stabilisatie niet op basis van metaalverbindingen berust, maar op een alternatieve manier waardoor dit product niet schadelijk is voor het milieu. In deze studie werd ook een quaternaire ammoniumverbinding (QAV), didecyldimethylammoniumchloride, getest met opvolging van de groei via qPCR omdat deze in de eerste studie niet kon opgevolgd worden via OD-metingen. Hierbij werd kopersulfaat als positieve controle meegenomen.

In Figuur 1 is een mooie groei van de bacterie zonder toevoeging van een actieve stof (controle) te zien op basis van OD-metingen. Wanneer melkzuur aan 0,5% toegediend werd, zie je dat de groei in het begin een stuk afgeremd werd. Wanneer H₂O₂ 1,5% toegevoegd werd, is de groei volledig gestopt. Ook wanneer H₂O₂ alleen toegediend werd aan 2% of 1,5% was er geen groei meer. Gestabiliseerd waterstofperoxide lijkt dus wel een veelbelovend product te zijn.



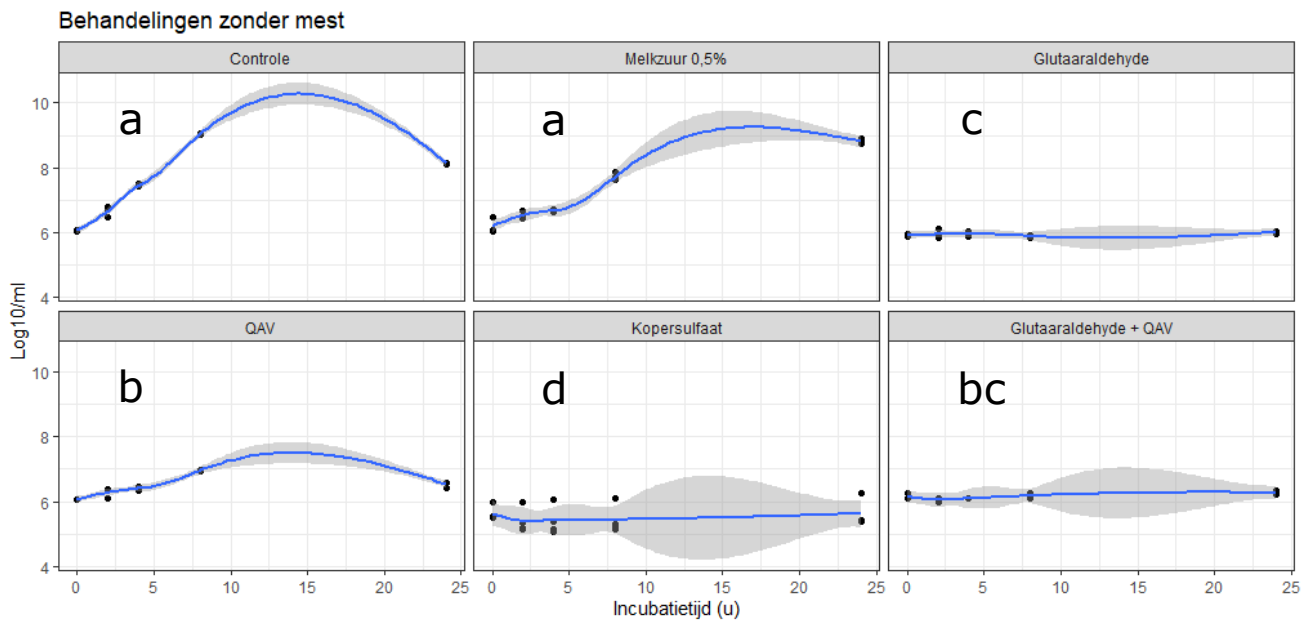
Figuur 3. Groei van de *Treponema* bacterie in combinatie met actieve substanties. De groei is significant verschillend bij actieve stoffen met een verschillende letter.

In Figuur 2 zijn dezelfde behandelingen weergegeven, maar in combinatie met mest. Ook hier werkte gestabiliseerd waterstofperoxide heel goed.

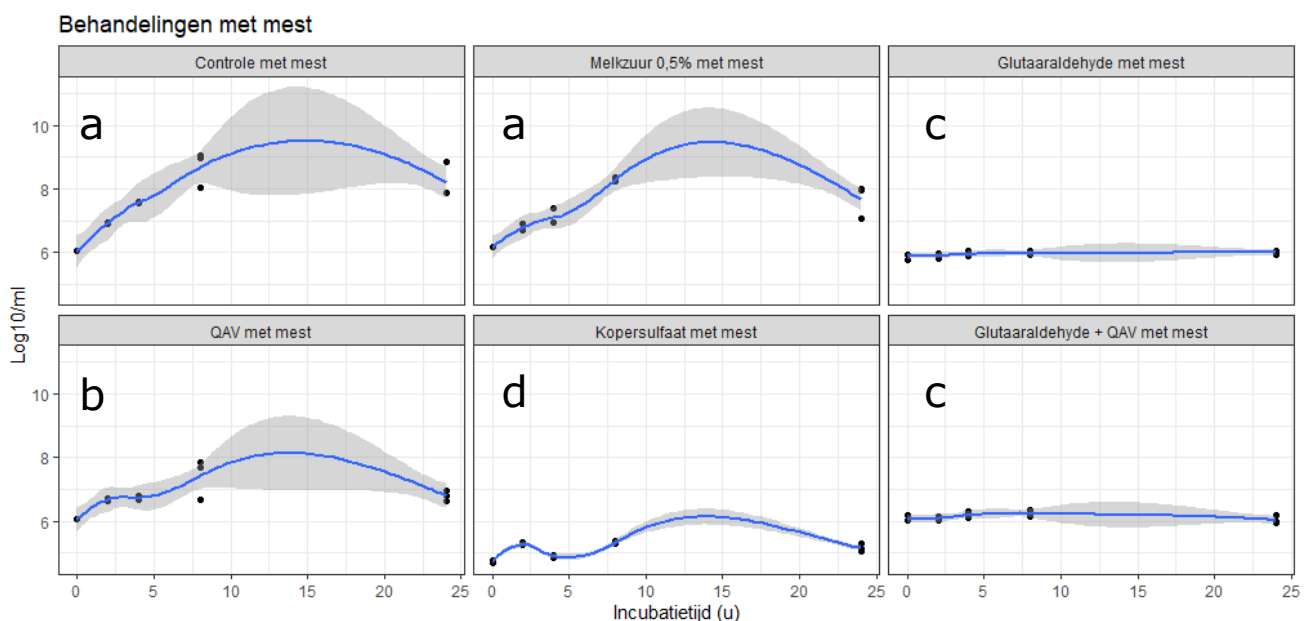


Figuur 4. Groei van de *Treponema* bacterie in combinatie met actieve substanties en mest. De groei is significant verschillend bij actieve stoffen met een verschillende letter.

In Figuur 3 is de groei van de *Treponema* bacterie te zien die bepaald werd op basis van qPCR. De positieve controle, kopersulfaat, vertoonde een volledige groeistop. Wanneer QAV toegevoegd werd aan *Treponema* was er slechts een minimale groei waar te nemen. Glutaaraldehyde, al of niet in combinatie met QAV, vertoonde bovendien een volledige groeistop van *Treponema*, net als gestabiliseerd H₂O₂. Deze 2 geteste actieve stoffen (glutaaraldehyde en QAV) zijn ook vaak terug te vinden in commerciële producten. Op basis van de resultaten in deze studie, lijkt dit een verantwoorde keuze. Op Figuur 4 is te zien dat de werking van de geteste producten niet beïnvloed werd in aanwezigheid van mest.



Figuur 5. Opvolging van de groei van *Treponema* in combinatie met actieve stoffen. De groei is significant verschillend bij actieve stoffen met een verschillende letter.



Figuur 6. Opvolging van de groei van *Treponema bryantii* in combinatie met actieve stoffen en mest. De groei is significant verschillend bij actieve stoffen met een verschillende letter.

Conclusie

De actieve stoffen QAV al of niet in combinatie met glutaaraldehyde, die vaak gebruikt wordt in commerciële klauwbadproducten, vertonen in onze in vitro studie een goeie werking om de groei van *Treponema* tegen te gaan. Daarnaast is er een veelbelovende nieuwe vorm van gestabiliseerde waterstofperoxide die de groei van *Treponema* ook volledig kan stoppen. Deze nieuwe formulatie is milieuvriendelijk. Bijkomend onderzoek naar de werkzaamheid in praktijkomstandigheden, toxiciteit en fysische en chemische eigenschappen is echter nog noodzakelijk.

Dit artikel werd geschreven in het kader van het VLAIO-LA traject Clawcare. Het project wordt uitgevoerd door HoGent, Hooibeeckhoeve, ILVO, Inagro en UGent en wordt gesteund door het Vlaams Agentschap Innoveren en Ondernemen. Vlaanderen is Ondernemen. Stefanie Lodens voerde deze studie ook uit in het kader van haar bachelorproef.

CLAWCARE

