



PPS-rapportage

N.B. De 1H4F PPS TKI-AF 12067 bestond sinds aanvang uit 4 deelprojecten:

1H4F- ESBL voedsel attributieve risico's (ESBLat)

1H4F- DOT (Diagnostiek, Onderzoek en Toepassing)

1H4F- DOT uiergezondheid

1H4F- Bestrijding Toxoplasma in de keten.

De projecten DOT en Bestrijding Toxoplasma zijn eind 2016 beëindigd en hebben als zodanig gerapporteerd. Het project 1H4F-ESBLat is eind 2017 beëindigd. De huidige rapportage bevat een rapportage van 1H4F- ESBLat en 1H4F DOT uiergezondheid. 1H4F DOT uiergezondheid zal eind 2018 beëindigd worden, waarna een integrale eindrapportage opgesteld zal worden.

Algemene gegevens

PPS-nummer	AF-12067
Titel	1Health4Food deelproject: ESBL voedsel attributieve risico's (ESBLAT)
Thema	Agrifood
Uitvoerende kennisinstelling(en)	WBVR, UU/IRAS, UU/I&I, UMCU, GD
Projectleider onderzoek (naam en emailadres)	Prof. Dr. D. Mevius (WBVR), Prof. Dr. D. Heederik (UU-IRAS)
Penvoerder PPS (namens private partij)	Dit was bij de start Ben Delleart namens PVE, daarna Toon van Hoof/J. van der Ven
Contactpersoon overheid	M. de Bode, A. Bouma
Werkelijke startdatum	Volgens de Consortium Agreement: Effective start date: 1 januari 2013. 23 april werden de productschapsgelden middels een brief toegezegd. De werkelijke startdatum was 1 mei 2013.
Werkelijke einddatum	Volgens CA: 31 december 2017

Goedkeuring penvoerder / consortium

De penvoerder heeft namens het consortium de eindrapportage	<input checked="" type="checkbox"/> V goedgekeurd <input type="checkbox"/> niet goedgekeurd
Evt. opmerkingen over de eindrapportage:	<p>Feedback ontvangen vanuit de adviesgroep.</p> <p>De Adviesgroep dringt voor de afrondende fase van het project vooral aan op effectieve communicatie naar een breed publiek, bijv. via een publiekssamenvatting, een dag voor boeren, etc. Wijs daarbij vooral op de consequenties van de bevindingen, met name ten aanzien van de bijdrage van de veehouderijsectoren aan de problematiek. Besteed daarbij veel aandacht aan de interpretatie van de resultaten en de eindconclusies. Die vinden we tot nu toe te weinig tot uiting komen in de rapportage.</p> <p>De Advies- en Stuurgroep zien het eindrapport graag in conceptvorm.</p>

	<p>Reactie coördinatoren ESBLAT</p> <p>Het project wordt afgerond met een slotsymposium in de Jaarbeurs in Utrecht op 9 februari a.s. dat gericht is op een breed publiek. Het eindrapport wordt daar aangeboden aan de opdrachtgevers in de persoon van Jeanette van de Ven (ZTLO) en Christianne Brusckke (LNV). Er is toegezegd dat de coördinatoren graag bereid zijn om ESBLAT toe te lichten voor veehouders.</p> <p>Het conceptrapport wordt ter informatie gestuurd naar de stuur en adviesgroep</p>
--	---

Mutaties ten opzicht van het oorspronkelijke projectplan en follow-up	
Zijn er wijzigingen geweest in het consortium / de projectpartners? Zo ja, benoem deze.	NVT
Zijn er inhoudelijke wijzigingen geweest in het project?	NVT
Is er sprake van een octrooi-aanvraag (evt. first filing) vanuit deze PPS?	
Is er sprake van spin-offs (contract-onderzoek dat voortkomt uit dit project, aanvullende subsidies die zijn verkregen of spin-off bedrijvigheid)	NVT
Binnen hoeveel jaar zullen de private partijen resultaten uit dit project gaan gebruiken in de praktijk?	Dat gebeurt al.
In hoeverre heeft het project bijgedragen aan de ontwikkeling van de betrokken kennisinstelling(en)? (bijv. wetenschappelijk track record, nieuwe technologie, nieuwe samenwerkingen)	De samenwerking binnen het medische, veterinaire en milieudomein is erg belangrijk geweest. Dit omdat de conclusies door alle partijen worden gedragen. Kennisontwikkeling over attributiemodelleren van overdraagbare genen zoals ESBLs (maar ook CPE) is erg belangrijk.
Krijgt het project een vervolg in de vorm van een nieuw project of een nieuwe samenwerking? Zo ja, geef een toelichting.	<p>De attributie-analyse wordt in 2018 afgerond op basis van de ESBLAT-database. Dat is erg belangrijk omdat dan ook de internationale wetenschappelijke wereld geïnformeerd wordt over onze op wetenschappelijke basis gebaseerde conclusie dat de mens de meest belangrijke bron is.</p> <p>In internationaal verband start in 2018 het EJP-OneHealth Cofund project gecoördineerd door WBVR e RIVM. Dit is een zeer groot project waarbinnen met internationale partners aan attributieanalyse van overdraagbare resistentie gewerkt zal worden.</p>

Resultaten

Wat is er aan de hand?

ESBLs zijn door bacteriën geproduceerde enzymen die antibiotica die tot de beta-lactam groep behoren inactiveren. De Extended Spectrum Beta-Lactamasen waar de afkorting voor staat, inactiveren de penicillines, ampicilline, amoxicilline en ook alle cefalosporines, allen beta-lactams. Dit zijn voor mens en dier zeer belangrijke antibiotica. Bacteriën die ESBLs produceren zijn resistent en dus niet effectief met deze middelen te behandelen.

Er zijn een veel soorten ESBLs bekend en die behoren tot een toenemend aantal groepen, waarvan de naam altijd uit een code bestaat, met een nummer erachter. De meest voorkomende ESBLs behoren de groepen TEM, SHV en CTX-M. Een veel voorkomende variant op de ESBLs is de CMY-groep (behorend tot de plasmid overdraagbare AmpC-klasse). Het nummer zegt iets over de genetische variant binnen een groep. Veel voorkomend zijn CTX-M-1, 9, 14, 15 etc., TEM-1, 2, 20, 52 etc., SHV-2, 12 etc. en CMY-2.

ESBLs komen sinds ongeveer 2000 in toenemende mate bij mens en dier voor. Bij de mens wordt dat grotendeels veroorzaakt door een wereldwijde (pandemische) verspreiding van CTX-M-genen (vooral CTX-M-15) die tussen bacteriën worden overgedragen via plasmiden (zie de volgende paragraaf "hoe worden ESBLs verspreid"). In landbouwhuisdieren worden veelal andere ESBL-varianten gezien, waarbij CTX-M-1, TEM-52, CMY-2, SHV-12, CTX-M-14, SHV-2, in volgorde van mate van voorkomen, kunnen worden genoemd. Deze ESBLs worden in alle diersoorten gevonden in de mest zonder dat deze er last van hebben. Daarnaast is vooral pluimveevlees in hoge mate besmet. Vlees van andere diersoorten is veel minder vaak besmet. De typische "mensen-ESBL", CTX-M-15, komt ook voor bij landbouwhuisdieren, maar dat is slechts incidenteel het geval.

Recent onderzoek van UMCU, WBVR, RIVM en VUMC heeft aangetoond dat er een genetische relatie bestaat tussen een deel van de ESBLs die klinische infectie veroorzaken bij mensen en die van pluimvee en pluimveevlees. Echter, uit kippen(vlees) geïsoleerde ESBLs worden ook in andere diersoorten en het milieu gevonden, wat suggereert dat er ook andere reservoirs voor verspreiding naar de mens kunnen zijn, waaronder ook de mens zelf (NETHMAP/MARAN-2017). Ook is niet duidelijk of en in hoeverre andere overdrachtsroutes dan vlees (b.v. plantaardige producten, het milieu, of direct contact) bijdragen aan blootstelling van de mens. Ook het relatieve belang van ESBLs uit dierreservoirs ten opzichte van de mens als reservoir (inclusief circulatie in ziekenhuizen en besmetting tijdens buitenlandse reizen) is onbekend. Afhankelijk van het detailniveau waarop naar genetische verwantschap wordt gekeken, is voor de *E. coli* bacterie geschat dat 10-30% van de ESBLs uit klinische isolaten uit de veehouderij (vooral kip) afkomstig kan zijn. Het is niet uit te sluiten dat deze relatie aan variatie in regio, tijd en bron onderhevig is.

Wat doet het project daaraan?

ESBLAT had als doel om de bijdrage van dierlijke reservoirs aan het optreden van ESBL dragerschap bij de mens in kaart te brengen. Om dit te kunnen doen is informatie verzameld over het vóórkomen van ESBLs bij de mens en verschillende landbouwhuisdieren zoals koeien, kippen en varkens, maar ook huisdieren. Daarnaast is onderzocht in hoeverre de mogelijke transmissieroutes vanuit deze reservoirs naar de mens, zoals dierlijke producten (bijvoorbeeld vlees) en het milieu (bijvoorbeeld oppervlaktewater) bijdragen aan de blootstelling van mensen in de algemene bevolking. Hiervoor moest informatie worden verkregen over de soorten ESBLs, de mate van voorkomen (aantallen positieve monsters en personen of dieren per reservoir die drager zijn) en over de aantallen ESBL-producerende bacteriën per reservoir. Deze doelstellingen zijn beantwoord door epidemiologische analyse van de verzamelde gegevens, het uitvoeren van kwantitatieve microbiologische risicoanalyses (QMRAs) en een aanzet tot attributiemodellering.

Wat levert het project op?

ESBLs komen in alle onderzochte reservoirs voor en daarmee heeft de ESBL-problematiek een echt "One-health" karakter. De mens zelf lijkt voorsnog de belangrijkste bron van ESBLs die bij patiënten infecties veroorzaken. De dierhouderij draagt daaraan maar in beperkte mate bij. Er zijn geen aanwijzingen dat consumenten van vlees, het zwemmen in oppervlaktewater of het wonen naast veehouderijen leidt tot een verhoogde kans op dragerschap in de algemene bevolking.

Effectieve infectiecontrole en antibiotic stewardship in de gezondheidszorg en de diergeneeskunde blijven van belang om verspreiding van ESBLs te voorkomen. Het onderzoek binnen het ESBLAT-consortium betrof een unieke samenwerking van experts uit het humane, veterinaire en milieu domein, welke noodzakelijk is om humane blootstellings- en gezondheidsrisico's die kunnen optreden als gevolg van deze "One-health" problematiek te kunnen onderzoeken en kwantificeren. Deze samenwerking heeft geleid tot belangrijke nieuwe inzichten in het voorkomen en de verspreiding van ESBLs. Desondanks zijn er nog onzekerheden rond de ESBL-epidemiologie en deze betreffen met name de transmissie vanuit verschillende reservoirs via verschillende routes naar de mens. De problematiek is zeer dynamisch van aard en vergt daarom continue aandacht in alle domeinen. Hoewel de directe bijdrage vanuit de voedselketen en het oppervlaktewater op dit moment gering lijkt, zijn het wel zeer grote reservoirs die altijd een bron van blootstelling en verspreiding kunnen zijn. Surveillance van ESBLs in de verschillende reservoirs is daarom cruciaal om veranderingen in de dynamiek tijdig te herkennen. Om de resterende onzekerheden in de dynamiek te verkleinen is er behoefte aan aanvullende (longitudinale) studies in een aantal reservoirs, teneinde betere input voor verder te ontwikkelen attributie en transmissiemodellen te genereren.

Wat is het effect hiervan?

Dat het stigma dat dierlijke productie een belangrijke bijdrage levert aan ESBLs bij mensen onjuist is. De mogelijke conclusie dat er dus geen maatregelen nodig zijn is onjuist. Alles komt overal voor en alle reservoirs dragen aan andere reservoirs bij. De veehouderij en de voedselketen is een erg groot reservoir van waaruit continu blootstelling van mensen plaatsvindt. Ondank de beperkte directe bijdrage aan infecties bij mensen blijft dit ongewenst en continue aandacht behoeven. Vooral restrictief antibioticumgebruik, goede hygiëne en infectiecontrole moeten daarbij blijvende aandacht houden.

Aantal opgeleverde producten in 2017			
Wetenschappelijke artikelen	Rapporten	Artikelen in vakbladen	Inleidingen/ workshops
Zie bijgevoegde lijst			

Bijlage: Titels van de producten of een link naar de producten op een openbare website

Publicaties

Eindrapport: ESBL-attributieanalyse (<http://www.1health4food.nl/esblat>)

Peer reviewed

1. Dorado-García A, Smid JH, van Pelt W, Bonten MJM, Fluit AC, van den Bunt G, Wagenaar JA, Hordijk J, Dierikx CM, Veldman KT, de Koeijer A, Dohmen W, Schmitt, H, Liakopoulos A, Pacholewicz E, Lam TJGM, Velthuis AG, Heuvelink A, Gonggrijp MA, van Duijkeren E, van Hoek

- AHAM, de Roda Husman AM, Blaak H, Havelaar AH, Mevius DJ, Heederik DJJ. Molecular relatedness of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from humans, animals, food and the environment: a pooled analysis. *J Antimicrob Chemother.* 2017 Nov 18.
2. Dohmen W, VAN Gompel L, Schmitt H, Liakopoulos A, Heres L, Urlings BA, Mevius D, Bonten MJM, Heederik DJJ. ESBL carriage in pig slaughterhouse workers is associated with occupational exposure. *Epidemiol Infect.* 2017 Jul;145(10):2003-2010.
 3. Dohmen W, Dorado-García A, Bonten MJ, Wagenaar JA, Mevius D, Heederik DJ. Risk factors for ESBL-producing *Escherichia coli* on pig farms: A longitudinal study in the context of reduced use of antimicrobials. *PLoS One.* 2017 Mar 21;12(3):e0174094.
 4. Evers EG, Pielaat A, Smid JH, van Duijkeren E, Vennemann FB, Wijnands LM, Chardon JE. Comparative Exposure Assessment of ESBL-Producing *Escherichia coli* through Meat Consumption. *PLoS One.* 2017 Jan 5;12(1):e0169589.
 5. van den Bunt G, Liakopoulos A, Mevius DJ, Geurts Y, Fluit AC, Bonten MJ, Mughini-Gras L, van Pelt W. ESBL/AmpC-producing Enterobacteriaceae in households with children of preschool age: prevalence, risk factors and co-carriage. *J Antimicrob Chemother.* 2017 Feb;72(2):589-595. doi: 10.1093/jac/dkw443. Epub 2016 Oct 26.
 6. Liakopoulos A, Mevius D, Ceccarelli D. A Review of SHV Extended-Spectrum β -Lactamases: Neglected Yet Ubiquitous. *Front Microbiol.* 2016 Sep 5;7:1374.
 7. Koningstein M, Leenen MA, Mughini-Gras L, Scholts RM, van Huisstede-Vlaanderen KW, Enserink R, Zuidema R, Kooistra-Smid MA, Veldman K, Mevius D, van Pelt W. Prevalence and Risk Factors for Colonization With Extended-Spectrum Cephalosporin-Resistant *Escherichia coli* in Children Attending Daycare Centers: A Cohort Study in the Netherlands. *J Pediatric Infect Dis Soc.* 2015 Dec;4(4):e93-9.
 8. Pacholewicz E, Liakopoulos A, Swart A, Gortemaker B, Dierikx C, Havelaar A, Schmitt H. Reduction of extended-spectrum- β -lactamase- and AmpC- β -lactamase-producing *Escherichia coli* through processing in two broiler chicken slaughterhouses. *Int J Food Microbiol.* 2015 Dec 23;215:57-63.
 9. Baede VO, Broens EM, Spaninks MP, Timmerman AJ, Graveland H, Wagenaar JA, Duim B, Hordijk J. Raw pet food as a risk factor for shedding of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in household cats. *PlosOne.* 2017 Nov 2;12(11):e0187239. Doi:10.1371/journal.pone.0187239

Promovendi

1. A. Dorado Garcia. Epidemiology of antimicrobial resistance and the effect of interventions in food-producing animals, 28-06-2016. Promoter: D. Heederik (IRAS), J. Wagenaar (I&I)
2. A. Liakopoulos. Living together in a world of extended-spectrum cephalosporin resistance: molecular snapshots of a complex epidemiology. 30-11-2017. Promoter: D. Mevius (WBVR)
3. W. Dohmen. Risk factors for ESBLs in pig production. Promoter D. Heederik (IRAS), M. Bonten (UMCU)
4. G. van den Bunt. Risk factors for ESBLs in humans. Promoter M. Bonten (UMCU)



Algemene gegevens	
PPS-nummer	AF-12067
Titel	1H4F – Deelproject Diagnostiekontwikkeling en toepassing voor het optimaliseren van uiergezondheid
Topsector en innovatiethema	
Projectleider (onderzoek)	Fimme Jan van der Wal (WBVR), Annet Velthuis (GD)
PPS-coördinator (namens private partij)	Stuurgroep 1H4F
Contactpersoon overheid	Marc de Bode
Status (lopend of afgerond)	Lopend
Type onderzoek (F, T of V)	F, T, en V
Werkelijke startdatum	WBVR 1 juni 2014, GD 1 april 2014
Werkelijke einddatum	31 mei 2018*
Organisatie- / bestuursstructuur	Per partner is er een projectleider. Ieder kwartaal wordt de voortgang besproken i.a.v. de projectleiders, de AiO, de promotoren, en de op dat moment relevante project-medewerkers.
Begeleidingsstructuur (klankbordcie., etc.)	Er wordt verantwoording afgelegd aan de 1H4F-stuurgroep, en er is regelmatig overleg met een projectstuurgroep die bestaat uit afgevaardigden van diverse stakeholders: Margo Meijerink (LTO), Mona van Spijk (NZO), Celia Steegmann (EZ), Hanneke van Wichen (NZO).
Korte omschrijving inhoud (max. 4 regels)	Dit project beoogt rationele en optimale keuzes voor de behandeling van (sub)klinische mastitis mogelijk te maken, door het ontwikkelen en evalueren van diagnostische tools die veehouder en dierenarts kunnen helpen bij uiergezondheidsmanagement.

Link naar samenvatting op Kennis Online: <https://www.wur.nl/nl/project/Diagnostiek-ontwikkeling-en-toepassing-voor-het-optimaliseren-van-uergezondheid-1H4F-DOT-uer-2.htm>

Planning en voortgang (indien er wijzigingen zijn t.o.v. het projectplan s.v.p. toelichten)

Loopt de PPS volgens planning?

Evaluatie bestaande testen:

1. De evaluatie van de bestaande testen in het lab is afgerond met het indienen van een publicatie bij het tijdschrift Preventive Veterinary Medicine begin december 2017. De publicatie is momenteel onder review.

2. De evaluatie van twee bestaande testen in het veld loopt. Aan de veldstudie doen 10 veehouders mee. De eerste zes bedrijven hebben de evaluatie van de eerste test afgerond en zijn omgeschakeld naar de evaluatie van de tweede test.

Het aantal milde en matige mastitis gevallen blijft achter bij wat we verwacht hadden. We verwachten nu zo'n 160 gevallen te verzamelen tot en met 31 mei 2018 i.p.v. de beoogde 240. Om het aantal te vergroten hebben we besloten om vier extra bedrijven te includeren. Deze worden op dit moment benaderd. Door het vergroten van het aantal bedrijven verwachten we in totaal 200 klinische mastitisgevallen. Het aantal bedrijven is gebaseerd op de logistieke ruimte die beschikbaar is in het project.

Meerdere deelnemers van de veldstudie geven aan ook geïnteresseerd te zijn in de testen bij koeien met subklinische mastitis (hoog celgetal). Daarom zullen per bedrijf 12 gevallen van subklinische mastitis worden meegenomen. Om dit niet door het onderzoek van de klinische mastitisgevallen te laten lopen, worden op basis van de Melk Productie Registratie (MPR) uitslag in mei (en evt. juni, afhankelijk van het aantal koeien) alle koeien met subklinische mastitis gescreend met de Californian Mastitis Test (CMT) om kwartieren met hoog celgetal te vinden. Per CMT positieve koe wordt maximaal één kwartier (die met de sterkste CMT omslag) meegenomen in de proef (en eventueel behandeld). Deze koeien worden verdeeld over drie groepen: Test 1 (Minnesota), Test 2 (Chromagar) en controle. Voor de controle geldt hetzelfde als bij klinische mastitis: de boer doet wat hij anders ook doet.

Bij dit onderzoek van hoog celgetal dieren zullen mogelijk ook enkele gevallen van klinische mastitis gevonden worden, die dan alsnog bij de klinische mastitis meegenomen kunnen worden.

Naar verwachting zullen 168 gevallen van subklinische mastitis geïnccludeerd worden, per groep 56 koeien. In totaal zijn bij deze benadering dus 368 gevallen te verwachten (200 klinische mastitis en 168 hoog celgetal), die onderverdeeld kunnen worden in drie groepen:

- *Mastitis graad 0*
Hoog celgetal op laatste MPR → CMT positief, geen vlokken
- *Mastitis graad 1*
1) Vlokken, of 2) hoog celgetal laatste MPR → extra controle → vlokken
- *Mastitis graad 2*

1) Melk- en uierveranderingen (of 2) hoog celgetal laatste MPR → extra controle → melk- en uierveranderingen)

Mastitis graad 3 (ernstige symptomen) wordt niet meegenomen.

Testontwikkeling:

In de loop van het project zijn er testen, met als doel detectie van mastitis-gerelateerde bacteriën, ontwikkeld en geëvalueerd.

1. Er is een set van zeven testen ontwikkeld voor de detectie van bacteriën volgens het principe van loop-mediated isothermal amplification (LAMP) van bacterieel DNA. Het betreft vijf LAMP-testen voor bacteriën die worden aangetroffen in ~50% van de mastitisgevallen, en twee LAMPs voor detectie van penicillineresistentiegenen.

Zoals beschreven in het vorige verslag, zijn zes LAMPs geëvalueerd met melkmonsters uit het routine bacteriologisch onderzoek (BO) van GD. Dit is gedaan met een PCR-apparaat waarbij resultaten real-time worden uitgelezen. Deze methode is geschikt voor toepassing in een lab. De vier best presterende LAMPs zijn ook onderzocht d.m.v. een eindpuntsbepaling in een contaminatie-vrije cassette. Deze methode gaat meer richting on-site diagnostiek.

De LAMPs voor *E. coli*, *S. aureus* en streptokokken komen goed overeen met BO, ongeacht de wijze van uitlezen (real-time of eindpunt). De LAMP voor *K. pneumoniae* stemt overeen met BO mits er met een aangepaste drempelwaarde wordt gewerkt; bij lange reactietijden is een te groot aantal monsters vals-positief (in vergelijking met BO). Een test ontworpen voor de verwante soort *K. oxytoca* lijkt niet relevant; er zitten geen positieve monsters in de geteste set.

Detectie van penicillineresistentie middels LAMP komt niet goed overeen met BO; hier kunnen verschillende redenen voor zijn, maar er is geen ruimte in het project dit in detail te onderzoeken.

Voor deelname aan de veldstudie wordt gekozen voor het testen van de vier best presterende LAMPs, i.e. voor *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, en streptokokken, met gebruikmaking van real-time uitlezing. Dit laatste maakt aanpassing van de drempelwaarde mogelijk (zie hierboven), en is aanzienlijk goedkoper dan de eindpuntsbepaling in cassettes. Afhankelijk van het resterende budget (nu nog niet bekend, zie hieronder) kan nog gekozen worden tussen het inzetten van een real-time PCR-apparaat of van een portable apparaat, dat eventueel geschikt is voor gebruik op een DAP.

2. In een andere lijn van onderzoek is een laterale flow immunoassay (LFIA) ontwikkeld voor de detectie van *S. aureus* in melk. Een LFIA is vergelijkbaar met de bekende zwangerschapstest, en is in uitvoering één van meest eenvoudige vormen van on-site diagnostiek.

	<p>Uit de hierboven beschreven set melkmonsters is een subset samengesteld met monsters die in BO voor <i>S. aureus</i> positief of negatief zijn. Deze subset is getest met de LFIA in de vorm zoals die beschikbaar was in december 2017, i.e. een procedure waarin verdunde melk getest wordt in een prototype LFIA, m.a.w. een versie die nog niet bestaat uit één samengestelde unit. De resultaten laten zien dat de LFIA in minder dan de helft van de (zwaarbesmette) monsters <i>S. aureus</i> aantoonde. Met de projectstuurgroep zal besproken worden of het zin heeft de <i>S. aureus</i> LFIA in de 2018 veldstudie te testen.</p>
Zijn er wijzigingen in het consortium/de projectpartners?	n.v.t.
* Is er sprake van vertraging en/of uitgestelde opleverdatum?	<p>Zoals aangegeven in de vorige rapportage over de eerste helft van 2017, is verlenging van het project nodig om het afronden van de werkzaamheden mogelijk te maken, waarbij de einddatum voor GD, WBVR én AiO gelijk worden getrokken. Daartoe heeft de penvoerder (WBVR) een budget-neutrale verlenging tot eind 2018 aangevraagd. Alle partijen gaan hiermee akkoord (ZuivelNL, Vereffeningorganisatie PBO, EZ), maar pas als de door WBVR aangevraagd NAPRO (32k€) is goedgekeurd, is de verlenging een feit.</p>

Highlights: geef een korte beschrijving van de belangrijkste resultaten

Het eerste doel van het project is om een aantal geselecteerde bestaande diagnostische on-farm testen te evalueren op het vermogen om mastitis-bacteriën in melk aan te tonen. Deze bestaande testen worden in Nederland niet toegepast op het melkveebedrijf, waarschijnlijk omdat melkveehouders niet bekend zijn met deze mogelijkheid. De uitslag van een on-farm test kan veehouders en dierenartsen helpen een betere beslissing te nemen of een melkkoe met een milde of matige uierontsteking baat heeft bij een gerichte inzet van behandelingen. Vijf bestaande testen zijn geëvalueerd door de uitslag te vergelijken met de uitslag van bacteriologisch onderzoek. Op basis van de resultaten is een keuze gemaakt welke twee testen worden geëvalueerd in een veldstudie. De keuze is gebaseerd op vier criteria: betrouwbaarheid (sensitiviteit, specificiteit), gebruiksgemak, time-to-result, en prijs. Deze criteria zijn door veehouders in een eerder uitgevoerde behoeftebepaling aangegeven als belangrijk. Aangezien de veehouders met name de betrouwbaarheid van een test belangrijk vonden, is hier extra gewicht aan gegeven. Tijdens de veldstudie wordt de bruikbaarheid van de twee testen in de praktijk geëvalueerd voor het ondersteunen van de behandelbeslissing in geval van milde of matige uierontsteking tijdens lactatie. Veehouders zetten zelf op hun bedrijf de geselecteerde testen in. Het resultaat wordt na 24 uur door de veehouder afgelezen, op basis waarvan de koeien worden behandeld.

Een tweede doel is het ontwikkelen van nieuwe testen die gebruikt kunnen worden op het melkveebedrijf of op de praktijk van een dierenarts (zogenaamde on-site diagnostiek). Er zijn relatief eenvoudige testen ontworpen voor het aantonen van bacteriën in melk op grond van de aanwezigheid van DNA. Deze testen zijn geëvalueerd m.b.v. melkmonsters waarvoor een uitslag van bacteriologisch onderzoek bekend is. Een deel van deze testen geeft resultaten die goed overeenkomen met het bacteriologisch onderzoek, en zullen in 2018 blind worden getest met monsters uit een lopende veldstudie. Daarnaast is er een prototype ontwikkeld van een heel eenvoudige test voor de detectie van één bacteriesoort direct in melk, in uitvoering vergelijkbaar

met een zwangerschapstest. Een eerste evaluatie laat echter zien dat de test niet erg gevoelig is, en mogelijk minder geschikt is voor vervolgonderzoek in de veldstudie.

Maatschappelijke toepassing: geef een korte beschrijving van de maatschappelijke bruikbaarheid/opbrengst

Het is de verantwoordelijkheid van melkveehouders en dierenartsen om goede zorg aan zieke dieren te verlenen. Om de ontwikkeling van antibioticumresistentie zo veel mogelijk te beperken, is en blijft het verantwoord toepassen van antibiotica een punt van aandacht. Met behulp van snelle, bij voorkeur on-site, diagnostiek, kan in de dierhouderij snel en verantwoord een keuze worden gemaakt of er antibiotica moeten worden ingezet, en zo ja, welke. Hierdoor kunnen antibiotica gericht worden ingezet en wordt onnodig gebruik zo veel mogelijk voorkomen. Adequate snelle (on-site) testen voor mastitis, die een indicatie geven over de bij een ontsteking betrokken pathogeen en de desbetreffende antibioticumgevoeligheid, ontbreken in de Nederlandse melkveehouderij in het spectrum van diagnostische testen. Dit project beoogt de bewerkstelling van een systematiek voor een optimale en rationele keuze van de behandeling van klinische mastitis door de ontwikkeling van nieuwe diagnostiek en de evaluatie van zowel nieuwe als bestaande mastitis-diagnostiek, onder veldomstandigheden. De diverse diagnostische tools kunnen uiteindelijk worden ingezet bij de behandeling van klinische mastitis, subklinische mastitis tijdens de lactatie, en mogelijk bij het kiezen van een droogzetstrategie.

Knelpunten: geef een korte beschrijving van de eventuele inhoudelijke knelpunten

Bestaande testen - knelpunten:

Doordat bedrijven verschillende aantallen milde en matige mastitis gevallen hebben, zal een bedrijfseffect de evaluatie van de genezing beïnvloeden. Voor de evaluatie van de testen voor on-farm gebruik (vergelijking resultaat on-farm test met BO) zal het effect niet groot zijn.

Omdat het aantal klinische mastitisgevallen achter blijft bij het verwachte aantal, is er besloten om vier extra bedrijven te includeren; deze worden op dit moment benaderd. Meerdere deelnemers van de veldstudie geven aan ook geïnteresseerd te zijn in de testen bij koeien met subklinische mastitis, dus ook subklinische mastitisgevallen zullen worden meegenomen (cross sectional, op één moment in de tijd). Het effect is dat het aantal deelnemende gevallen in de veldstudie vergroot wordt. Wel zijn de twee vormen van mastitis verschillend voor de veehouder voor wat betreft de behandeling, het management, enz. Deze twee stromen zullen dan ook, naast dat ze samen bekeken worden (beide zijn een ontsteking van de uier), ook los van elkaar geanalyseerd worden.

Nieuwe testen – knelpunten:

Omdat de detectie van penicilline-resistentie niet overeenkomt met BO, is het niet realistisch om de desbetreffende LAMPs (voor blaZ en mecA) mee te laten lopen in de veldstudie. Er kunnen verschillende redenen voor deze discrepantie zijn (wel/niet expressie van genen, mengpopulaties, verschil in systematiek tussen de methodes), maar er was geen ruimte om dit in detail te onderzoeken. Het laat in ieder geval zien dat detectie van resistentiegenen complicaties oplevert. Afgezien daarvan: voor *brede* detectie van resistentiegenen zou voor ieder relevant antibioticum een uitgebreide set LAMPs nodig zijn om alle specifieke resistentiegenen te kunnen detecteren, wat een ontwerp nog complexer maakt. Het doel van het project is om antibioticumgebruik te verminderen door een goed identificatie van de betrokken pathogenen; detectie van 50% van de pathogenen middels LAMP is dan al een stap in de goede richting.

V.w.b. het real-time uitlezen van LAMPs met monsters uit de veldstudie zijn er twee levensvatbare opties, nl. met een PCR-apparaat (96 simultane reacties) of met een portable

apparaat (16 reacties). Het portable apparaat is meer geschikt voor een DAP dan een real-time PCR machine. De uiteindelijke keuze zal van het resterende budget afhangen (=aangevraagde NAPRO WBVR minus eventuele budgetoverschrijding bij WBVR in 2017).

Omdat er in het project geen ruimte/budget was voor het uittesten van on-site methodes voor DNA-isolatie voorafgaand aan de LAMP-reacties, is er voor de testen nog steeds een 'normale' commercieel verkrijgbare DNA-isolatie nodig, waarvoor minimaal een eenvoudig laboratorium onmisbaar is. Deze isolaties en de LAMPS zijn waarschijnlijk wel uit te voeren op een DAP.

Aan het begin van het project is voor *S. aureus* als 'pilot' gekozen omdat daar veel verschillende antilichamen voor beschikbaar zijn, voor de andere pathogenen is dat niet zo. De test is opgezet naar analogie van een LFIA voor *S. aureus* uit de literatuur. De ontwikkelde LFIA is een prototype dat nog niet bestaat uit één samengestelde unit, waarvoor een verdund melkmonster zonder voorbereiding gemengd wordt met antilichamen die aan een kleurstof gebonden zijn, waarna de eigenlijke LFIA-test in dit mengsel wordt gezet. Complexen van bacteriën en antilichamen vloeien vervolgens via capillaire werking de test in. Pogingen om voorbereidingen te vinden die signaal-verhogend werken, waren slecht reproduceerbaar. De LFIA voor *S. aureus* voldoet niet aan de verwachtingen, en gebruik ervan voor detectie van *S. aureus* in monsters uit de veldstudie wordt nog overwogen. Om een dergelijke test tot een succes te maken, zou een nieuwe screening van meerdere antilichamen noodzakelijk zijn, en is meer inzicht nodig in de mogelijkheden van voorbereidingen van melk om zo storende componenten te remmen en de juiste antigenen zichtbaar te maken, wellicht i.s.m. een partij met optimale expertise van LFIAs, bijv. een commerciële partij met ontwikkeling en productie van LFIAs als core business.

Reactie op feedback n.a.v. de eerste halfjaarrapportage over 2017

Feedback m.b.t. vorig verslag:

Goed verslag. Helaas is er vertraging opgetreden in de veldproeven. Hierbij lijkt er te weinig nagedacht over de verwerking van de data. De Adviesgroep gaat ervan uit dat deze vertraging ingelopen wordt en de verwachtingen alsnog worden waargemaakt. De Adviesgroep beveelt aan om meer resultaten via artikelen te communiceren. Wat zullen de artikelen van de AIO worden? Daarnaast bevelen we aan om na te denken over het vervolgtraject en de commercialisering van de gebruikte technieken.

Reactie projectgroep:

1 Vertraging veldstudie / verwerken data

Zoals genoemd worden maatregelen genomen om het aantal monsters te vergroten binnen de veldstudie, om zo de verwachtingen inderdaad waar te maken. De vertraging zal vanzelfsprekend worden ingelopen.

Wat betreft het verwerken van de data: de aantallen zijn veel kleiner dan bij de labevaluatie.

Qua invoeren van de data lijkt geen probleem te ontstaan. Verder komen de monsters gedurende de looptijd van de veldstudie binnen. Hierdoor kunnen de scripten voor de analyses in een eerder stadium geschreven zijn dan dat de veldstudie is afgerond. Hier wordt op dit moment al aan gewerkt. Onder andere worden de resultaten zoals de veehouders ze hebben afgelezen van de testen vergeleken met de uitslag van BO. Daarnaast worden alle monsters waarbij veehouders testen hebben ingezet ook in het lab ingezet om een eventueel on-farm effect te onderzoeken. Op 2 en 3 weken na het ontstaan van mastitis worden melkmonsters genomen om zo het herstel van de koeien te onderzoeken - hierbij worden de koeien die op basis van een test zijn behandeld vergeleken met de koeien die behandeld zijn zoals de veehouder gewend is te doen. Voor dit laatste punt worden ook de celgetallen van de koeien op de daarop volgende MPR uitslagen vergeleken.

2 Meer artikelen / artikelen AiO

In 2017 zijn de volgende twee stukken geschreven:

- Hoofdstuk over mastitiskiagnostiek op het melkveebedrijf in het Handboek Uiergezondheid Rund van Theo Lam en Sarne de Vliegheer ISBN 978-90-822321-2-7.
 - Artikel in Dier en Arts over mastitis diagnostiek op het melkveebedrijf
- In 2018 zullen meerdere artikelen geschreven worden:
- Bayesiaanse analyse bestaande testen (hierbij wordt ervan uitgegaan dat BO niet perfect is)
 - Medeauteur artikel gebruik on-farm test Petrifilm voor het maken van droogzetbeslissingen
- Met behulp van monsters veldstudie:
- Ontwikkeling en evaluatie LAMP (gedeeld eerste auteurschap)
 - Gebruik on-farm testen voor behandelbeslissingen bij mastitis

3 Commercialisering

Wanneer tijdens en na de veldstudie duidelijk wordt hoe alle testen functioneren, zal worden nagedacht over commercialisering (zelf ontwikkelde testen) of het aanmoedigen van een nieuwe systematiek (bestaande testen).

Aantal opgeleverde producten in 2017					
Wetenschappelijke artikelen	Rapporten	Artikelen in vakbladen	Inleidingen/workshops/invited lectures	Aangevraagde octrooien /first filings	Spin-offs
1 (under review)	0	1	0	0	0

Verwacht u het komende jaar een octrooiaanvraag?	JA / NEE
--	----------

Bijlage: Titels van de producten of een link naar de producten op een openbare website

Wetenschappelijke artikelen

Karien Griffioen, Annet G.J. Velthuis, Lotte A. Lagerwerf, Annet E. Heuvelink, Theo J.G.M. Lam. Laboratory evaluation of four commercial culture-based mastitis systems to detect mastitis-causing bacteria. Submitted to Preventive Veterinary Medicine, december 2017.

Artikelen in vakbladen

K. Griffioen in samenwerking met Dutch Mastitis Diagnostic Consortium. Mastitiskiagnostiek op het melkveebedrijf. Dier en Arts. December 2017. p.354-359

Posters/presentaties

De bedoeling was een workshop te geven bij het congres Gezonde Melkveehouderij in november 2017 en januari 2018. Helaas is dit congres niet doorgegaan.

Geef evt. toelichting op:

- Afwijking opgeleverde producten:

Zie opmerkingen hierboven.

- Reden van nog niet plaatsen van product op openbare website:

De beide rapporten werden vooralsnog deels als vertrouwelijk beschouwd. De projectgroep zal overleggen met de projectstuurgroep en de 1H4F-stuurgroep of en wanneer plaatsing op de 1H4F website gewenst is. Het eerste rapport is deels beschikbaar als wetenschappelijke publicatie ([Griffioen et al., J Dairy Sci 2016](#)), het tweede rapport is grotendeels gepubliceerd in Dier en Arts, zie hierboven.