



## PPS-jaarrapportage tweede helft van 2018

partijen.

### Goedkeuring penvoerder / consortium

De jaarrapportage dient te worden besproken met de penvoerder/het consortium. De TKI's nemen graag kennis van evt. opmerkingen over de jaarrapportage.

|   |  |
|---|--|
| De penvoerder heeft namens het consortium de jaarrapportage | <input checked="" type="checkbox"/> goedgekeurd<br><input type="checkbox"/> niet goedgekeurd |
|---|--|

|  |  |
|--|--|
| Evt. opmerkingen over de jaarrapportage: |  |
|--|--|

### Algemene gegevens

|   |  |
|---|--|
| PPS-nummer                                  | AF-12067   |
| Titel                                       | 1H4F - 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)                 | Afgerond   |
| Type onderzoek (F, T of V)                  | F, T, en V   |
| Werkelijke startdatum                       | WBVR 1 juni 2014, GD 1 april 2014  |
| Werkelijke einddatum                        | 31 december 2018   |
| Organisatie- / bestuursstructuur            | Per partner is er een projectleider. Ieder kwartaal wordt de voortgang besproken door de projectleiders, de AIO, de promotoren, en de op dat moment betrokken medewerkers.   |
| Begeleidingsstructuur (klankbordcie., etc.) | Er wordt verantwoording afgelegd aan de 1H4F-stuurgroep, en er is regelmatig overleg met de projectstuurgroep en agendaleden, met afgevaardigden van diverse stakeholders, nl. Margo Meijerink (LTO), Hanneke van Wichen (NZO), Mona van Spijk (NZO), Bart van den Assum (EZ). |
| Korte omschrijving inhoud (max. 4 regels)   | Het doel is om rationele en optimale keuzes voor de behandeling van (sub)klinische mastitis mogelijk te maken, door evaluatie van bestaande en ontwikkeling van nieuwe diagnostische tools, die veehouder en dierenarts kunnen helpen bij het uiergezondheidsmanagement.       |

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

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| Loopt de PPS volgens planning? |  |
|--------------------------------|--|

Algemeen

|   |   |
|---|---|
|   | <p>Het project is budgetneutraal verlengd tot eind 2018 voor het afronden van het veldonderzoek (zie 'vertraging opleverdatum' hieronder), hetgeen resulteerde in een budgetoverschrijding. Daarnaast is de aanstelling voor de AIO in 2019 verlengd om analyses en verslaglegging af te kunnen ronden. Beide kwesties zijn met extra budget van ZuivelNL opgelost.</p> <p><u>Veldstudie met bestaande testen:</u></p> <p>De veldstudie waarin twee bestaande testen zijn ingezet door 15 veehouders, is afgerond. De verzamelde melkmonsters zijn ook gebruikt voor de evaluatie van de ontwikkelde LAMP-testen. Zie de 'highlights' voor resultaten en conclusies; details van het onderzoek staan in de eindrapportage.</p> <p><u>Ontwikkeling nieuwe testen:</u></p> <p><i>Immunoassays</i></p> <p>Tijdens het project is een prototype ontwikkeld van een lateral flow immunoassay (LFIA) voor de detectie van <i>S. aureus</i>. De assay is in melk getest met 50 melkmonsters met uitslagen uit bacteriologische onderzoek (BO). De test werkt, maar is niet erg gevoelig en nog niet in een uitvoering die on-site gebruik toestaat. I.o.m. de projectstuurgroep is indertijd besloten om in deze PPS geen energie meer te steken in de ontwikkeling van een LFIA. Er zullen nog aanzienlijke inspanningen nodig zijn om een set LFIAs te ontwikkelen voor de detectie van mastitispathogenen in melk. Gedetailleerde aanbevelingen hiervoor staan in de eindrapportage.</p> <p><i>Isotherme amplificatie</i></p> <p>Er zijn meerdere LAMP (loop-mediated isothermal amplification) testen ontwikkeld. Vier hiervan (voor <i>E. coli</i>, <i>S. aureus</i>, <i>K. pneumoniae</i>, en streptokokken) zijn blind getest met melkmonsters uit de veldstudie. De testen komen goed overeen met BO, maar voor <i>K. pneumoniae</i> er is wel een aangepaste cutoff nodig om het aantal vals-positieven laag te houden; de finale analyse van deze data vindt in 2019 plaats. Binnen de PPS was het niet mogelijk de ontwerpen helemaal uit te ontwikkelen tot gebruiksklare testen; zo is er vooraf nog een vrij bewerkelijke DNA-isolatie nodig. Om LAMP geschikt te maken voor on-site gebruik (on-farm en/of op de praktijk van een dierenarts), zal verder gekeken moeten worden naar de DNA-extractie, een goedkope methode voor het uitlezen, en, omdat elke test maar één type bacterie kan aantonen, een praktische manier om meerdere testen parallel uit te voeren. Aanbevelingen hiervoor (en voor het beperkt geteste RPA) staan in de eindrapportage.</p> |
| Zijn er wijzigingen in het consortium/de projectpartners? | Nee   |

|   |  |
|---|--|
| Is er sprake van vertraging en/of uitgestelde opleverdatum? | Het project is budgetneutraal verlengd tot eind 2018 om het afronden van de veldstudie en de evaluatie van LAMP-assays met melkmonsters uit de veldstudie mogelijk te maken. Buiten het project om is er financiering gevonden (zelfde financier: ZuivelNL) om de budgetoverschrijding uit 2018 te ondervangen en om de AIO in 2019 zaken af te kunnen laten ronden, zoals data-analyses en het vastleggen van resultaten in wetenschappelijke manuscripten. |
|---|--|

|  |
|--|
| <p><b>Highlights: geef een korte beschrijving van de belangrijkste resultaten</b> (deze beschrijving wordt als publieke samenvatting op de websites van de TKI's/topsectoren geplaatst)</p>  |
| <p>Het eerste doel van het project was om een aantal geselecteerde bestaande diagnostische on-farm testen te evalueren op het vermogen om mastitis-gerelateerde bacteriën in melk aan te tonen door middel van kweek op het melkveebedrijf zelf. Deze bestaande testen worden in Nederland niet toegepast, waarschijnlijk omdat melkveehouders niet bekend zijn met deze mogelijkheid en de testen in Nederland zeer beperkt leverbaar zijn. 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. Eerder zijn vijf bestaande testen geëvalueerd door de uitslag te vergelijken met de uitslag van bacteriologisch onderzoek (BO). Aan de hand van deze resultaten zijn twee testen in een veldstudie geëvalueerd. Deze veldstudie liep door tot in de tweede helft van 2018, de analyses zijn in december afgerond. De belangrijkste conclusies van de veldstudie zijn dat de behandelbeslissingen die veehouders nemen bij het gebruik van on-farm testen beter overeenkomen met het behandeladvies volgens BO, dan wanneer de testen niet worden gebruikt. Deze on-farm testen kunnen dus goed worden gebruikt om de behandeling te onderbouwen. Verder blijkt dat het gebruik van de test CHROMagar leidt tot een verlaging van antibioticumgebruik t.o.v. de controlegroep. Binnen de antibioticumbehandelingen blijft de verdeling eerste en tweede keus middelen gelijk. De klinische genezing van de kwartieren is beter bij deze koeien, de algehele en bacteriologische genezing van de kwartieren is slechter dan in de controlegroep. Verder blijkt ook dat het gebruik van de test Minnesota leidt tot een optimalisatie van antibioticumgebruik omdat meer eerste keus middelen worden gebruikt dan in de controlegroep. Ook hier is de klinische genezing van de kwartieren beter dan van de kwartieren in de controlegroep, zonder positief effect op de algehele genezing. De bacteriologische genezing ligt wel dicht bij de bacteriologische genezing van de kwartieren in de controlegroep. Op de langere termijn lijkt het koecelgetal lager te zijn dan van koeien in beide andere groepen.</p> <p>Concluderend kan gezegd worden dat de behoefte die veehouders hebben aan on-farm testen vervuld kan worden door de geëvalueerde bestaande on-farm testen en dat dergelijke testen geschikt lijken voor gebruik op Nederlandse melkveebedrijven. Hiervoor zal samenwerking met een (distribuerende) partij gezocht moeten worden, aangezien het nu voor de individuele veehouder lastig is aan dergelijke on-farm testen te komen.</p> <p>Een tweede doel van het project was het ontwikkelen van nieuwe testen die gebruikt kunnen worden op het melkveebedrijf of op de praktijk van een dierenarts (zgn. on-site diagnostiek). In het project zijn isotherme amplificaties (LAMP) ontworpen voor het aantonen van bacteriën in melk op grond van de aanwezigheid van DNA. In de afgelopen periode zijn de vier testen voor <i>E. coli</i>, <i>S. aureus</i>, <i>K. pneumoniae</i>, en streptokokken, blind getest met melkmonsters verzameld in de veldstudie die in 2018 is uitgevoerd. De testen komen goed overeen met BO, maar de testen zijn nog niet uitontwikkeld tot een gebruiksklaar ontwerp. Om LAMP geschikt te maken voor on-site gebruik zal verder gekeken moeten worden naar de DNA-extractie, een economische manier</p> |

van uitlezen van testen, en een praktische manier om meerdere testen tegelijkertijd te kunnen doen.

Tijdens het project is ook een eerste versie ontwikkeld van een eenvoudige test voor de directe (immuno)detectie van *S. aureus* in melk. Deze test werkt, maar is niet gevoelig genoeg. Er is aanvullend onderzoek nodig om een set LFIA's te ontwikkelen die geschikt zijn om in melk meerdere pathogenen te kunnen aantonen; hiervoor zijn in de laatste periode van het project een aantal aanbevelingen op papier gezet.

**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 diagnostiek, bij voorkeur testen die on-site kunnen worden uitgevoerd, kan in de dierhouderij snel en verantwoord een onderbouwde keuze worden gemaakt of, en welke, antibiotica er kunnen worden ingezet. Hierdoor kunnen antibiotica gerichter 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 optimale en rationele keuzes van de behandeling van klinische mastitis door de ontwikkeling van nieuwe diagnostiek en de evaluatie van zowel nieuwe als bestaande mastitiskiagnostiek onder veldomstandigheden. Op termijn kunnen dergelijke diagnostische testen 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**

- Geen knelpunten.
- Reactie op feedback n.a.v. de eerste halfjaarrapportage over 2018:

Feedback m.b.t. vorig verslag:

De respons op onze vorige feedback wordt zeer gewaardeerd. Het verslag is nogal summier en kan wat concreter, met name kan het meer resultaten en conclusies van het onderzoek in het laatste half jaar geven. Wat is de conclusie van de evaluatie van bestaande testen? Wat is de conclusie t.a.v. de LAMP testen met praktijkmonsters? Welke factoren bepalen het succes van deze testen? De voortgang van het veldonderzoek is wat vertraagd doordat er minder mastitis voorkomt. Hoe wordt de hierdoor ontstane budgetoverschrijding opgelost?

Reactie projectgroep:

1) Het experimentele werk voor het evalueren van LAMP-testen met veldmonsters is pas in november afgerond. Een voorlopige conclusie staat in deze rapportage, een uitgebreid relaas staat in de eindrapportage, en de finale uitwerking van de gegevens en het schrijven van een publicatie zal in 2019 plaatsvinden.

2) Voor zowel de bestaande testen als voor de zelf ontwikkelde testen (en pilots) is in de eindrapportage uitgebreid beschreven wat er nodig is voor succes. Voor de bestaande testen is dat vnl. het opzetten van een samenwerking met een (distribuerende) partij. Voor de ontwikkelde nieuwe testen is dat in geval van de isotherme amplificatie LAMP het vinden en testen van i) een minder bewerkelijke methode om DNA uit melk te extraheren (N.B. een extractieloze methode voor een andere pathogeen i.c.m. RPA werkt al goed), ii) een goedkope manier om de testen uit te lezen, en iii) een praktische manier om meerdere LAMPs naast elkaar uit te voeren - immers,

er is voor elke pathogeen een aparte reactie nodig. Voor de immunoassays is het aan te bevelen om zelf antilichamen te ontwikkelen voor de gewenste pathogenen (omdat er voor veel pathogenen niets te koop is en eigen beheer het vermarkten eenvoudiger maakt), en/of een goede screening uit te voeren van commerciële antilichamen die specifiek gericht zijn tegen Gram-positieve of Gram-negatieve bacteriën. Daarnaast is het verstandig een deel van het ontwikkelen van de assays met de eigen/geïdentificeerde antilichamen uit te besteden bij een ervaren commerciële partij. Hiervoor is wél een flink budget nodig.

3) Problemen met aantallen zijn opgelost zoals beschreven in de rapportage. Er zijn naast mastitis gevallen ook een cohort subklinische mastitis gevallen. Het effect van het gebruik van sneltesten op de genezing bij mastitis of subklinische mastitis is met deze aantallen niet goed te toetsen. De andere statistieken (overeenkomsten tussen testuitslagen) zijn wel goed te berekenen. Hiervoor zijn de beschikbare aantallen voldoende.

4) De budgetoverschrijding is middels extra budget van ZuivelNL opgevangen.

**Aantal opgeleverde producten in 2018** (geef in een bijlage de titels en/of omschrijving van de producten of een link naar de producten op openbare websites)

| Wetenschappelijke artikelen (*) | Rapporten | Artikelen in vakbladen | Inleidingen/workshops/invited lectures | Aangevraagde octrooien /first filings | Spin-offs (**) |
|---------------------------------|-----------|------------------------|--|---------------------------------------|----------------|
| 1                               | 1         | 3                      | 2                                      | 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. Agreement between four commercial diagnostic tests and routine bacteriological culture of milk to determine the udder infection status of dairy cows. *Prev Vet Med* 2018 (157):162-173. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.07.003>

#### Artikelen in vakbladen, posters/presentaties

- Zoektocht naar mastitisverwekker krijgt vorm. Boerderij, sept. 2018. <https://www.boerderij.nl/Rundveehouderij/Achtergrond/2018/9/Zoektocht-naar-mastitisverwekker-krijgt-vorm-335844E/>.
- GD positief over on-farm-testen. *Veeteelt*, dec. 2018. <http://veeteelt.nl/gezondheid/nieuws/gd-positief-over-farm-testen>.
- Uiergezondheid interessante themadag. Boer&Zo, dec. 2018.
- Themadag 'Doelgericht (be)handelen bij uiergezondheidsproblemen', okt. 2018.
  - lezing: 'Uiergezondheid uit de problemen: welke testen zijn er en wat kan je er mee?', Karien Griffioen;
  - workshop: 'Van test naar doen: opzoek naar de veroorzaker in het lab en op de boerderij', Karien Griffioen en Kristy Kornegoor.
  - <https://library.wur.nl/WebQuery/edepot/464030>
- Symposium Droogstand op Maat, 20 december 2018; lezing 'Diagnostiek Ontwikkeling Uiergezondheid', Annet Velthuis & Karien Griffioen.

<https://www.wur.nl/nl/Onderzoek-Resultaten/Leerstoelgroepen/Dierwetenschappen/Adaptatiefysiologie/Droogstand-op-Maat-2/Symposium-Droogstand.htm>

Geef evt. toelichting op:

- Afwijking opgeleverde producten

n.v.t.

- Reden van nog niet plaatsen van product op openbare website

n.v.t.