



**PPS-jaarrapportage 2018 – Q3/Q4**

**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"/> V goedgekeurd <input type="checkbox"/> niet goedgekeurd
Evt. opmerkingen over de jaarrapportage:	<p>Onderstaande antwoorden op de commentaren van de stuurgroep zijn ook direct na ontvangst van de commentaren gedeeld met de stuurgroep. Voor de volledigheid worden ze hier nogmaals weergegeven:</p> <p>Het verslag gaat met name in op resultaten die in het verleden zijn behaald, maar in dit laatste halfjaar is er weinig praktisch werk verricht door personele wisselingen.  <i>Dit is niet helemaal juist. Er is in 2018 een derde dierproef uitgevoerd. De resultaten van de analyses waren ten tijde van het verslag nog niet bekend, maar het experiment was al wel volledig uitgevoerd. Dit is een belangrijke mijlpaal binnen het project.</i></p> <p>Wat zijn hiervan de budgettaire consequenties en gevolgen voor het eindresultaat van het project? De Adviesgroep verwacht veel van de op te zetten diagnostische test, maar het werk aan deze diagnostische test lijkt nu juist vertraagd (evenals aan de publicatie van de sequentiegegevens).  <i>Het klopt dat het opzetten van de diagnostische test vertraging heeft opgelopen. Het is echter de verwachting dat deze vertraging in de tweede helft van 2018 volledig zal worden ingelopen. Het project zal dus uiteindelijk geen vertraging oplopen, de werkzaamheden zijn alleen meer geconcentreerd in de laatste twee kwartalen van het jaar.</i></p> <p>Er wordt gesproken over problemen met de validatie van deze test (nl. geen controle). Graag hierop toelichting: De moleculaire verschillen tussen virulente en niet virulente stammen waren toch duidelijk? Dan zou validatie van een diagnostische test om onderscheid te maken tussen virulente en niet-virulente stammen geen problemen moeten geven.</p>

	<p><i>De genetische verschillen tussen de virulente en de dragerschap stammen van Streptococcus suis zijn glashelder. Er is echter geen bestaande test om de nieuwe qPCR mee te valideren. Bij het valideren van een nieuwe test worden de resultaten vergeleken met een bestaande test. Op dit moment is er geen test beschikbaar om virulente van niet-virulente serotype 9 te onderscheiden. Dit kan vrijwel alleen door een dierexperiment te doen, wat niet haalbaar is voor test validatie. Dat is het probleem met de controle waar over gesproken wordt in het verslag. We eindigen vrij snel in een cirkelredenering, waarbij we door sequenzen verschil in de populatie laten zien en deze verschillen met qPCR bevestigen. Het consortium probeert gezamenlijk deze cirkel te doorbreken door de nieuwe test zo slim mogelijk te valideren.</i></p> <p>Een van deelnemende partners heeft het ontwikkelde diermodel ingezet bij de eigen onderzoekslijnen. Dat is een goede ontwikkeling. De Adviesgroep zou graag de resultaten daarvan ook teruggekoppeld zien.</p> <p><i>Dit is niet mogelijk. De partner heeft de test toegepast op zijn eigen competitieve vraagstukken. Wij kunnen deze resultaten niet in dit pre-competitieve project presenteren zonder het vertrouwen van de partner te schaden. Door aan te geven dat het diermodel inmiddels commercieel wordt ingezet, wil het consortium graag illustreren dat de resultaten zinvol zijn voor de deelnemende partners en daadwerkelijk hun weg vinden in hun bedrijfsvoering. Openbaring van de resultaten is hiervoor niet noodzakelijk.</i></p> <p>De relatie met het BIT MAP project komt niet naar voren.</p> <p><i>Het project BITMAP heeft in deze fase meer baat bij dit project dan andersom. Zo kan de ontwikkelde diagnostische test worden toegepast in het BITMAP project. De kennis van BITMAP is te zeer gericht op de praktijk situatie om van invloed te zijn op de ontwikkeling van een diermodel, of de ontwikkeling van een diagnostische test. Uiteindelijk zullen beide projecten wel bijdragen aan meer inzicht in de problematiek rond Streptococcus suis infecties, waardoor er hopelijk nieuwe oplossingen gegenereerd kunnen worden.</i></p>
--	---

<b>Algemene gegevens</b>	
PPS-nummer	AF-15227
Titel	Integrale aanpak <i>Streptococcus suis</i>
Topsector en innovatiethema	Agro Food
Projectleider (onderzoek)	Astrid de Greeff
PPS-coördinator (namens private partij)	Yvonne Verbeek (Dopharma)
Contactpersoon overheid	Marc de Bode (Min. LNV)
Status (lopend of afgerond)	Lopend
Type onderzoek (F, T of V)	F, T, V
Werkelijke startdatum	1 januari 2016
Werkelijke einddatum	31 december 2019

Organisatie- / bestuursstructuur	PPS wordt gecoördineerd door DLO partner; ~4 maal per jaar vergadert de PPS met vertegenwoordigers van alle partners over de voortgang.
Begeleidingsstructuur (klankbordcie., etc.)	Er is geen klankbordgroep; de lijnen worden uitgezet door het consortium; de advies- en stuurgroep van 1H4F beoordeelt de voortgang en inhoud.
Korte omschrijving inhoud (max. 4 regels)	Dit project heeft de ambitie om een substantiële bijdrage te leveren aan de verdere ontwikkeling van een duurzame en gezonde varkenshouderij in Nederland én de Nederlandse concurrentiepositie in een mondiale markt te versterken. Om dit te bereiken focust het project op (1) de verbetering van diagnostiek voor detectie van serotype 9 stammen die frequent ziekte veroorzaken (inclusief moleculaire analyse van verschillen tussen stammen) en (2) de ontwikkeling van infectiemodellen voor <i>S. suis</i> serotype 9 stammen om de effectiviteit van interventies te kunnen testen en eventueel nieuwe interventies te ontwikkelen.

<b>Planning en voortgang (indien er wijzigingen zijn t.o.v. het projectplan svp toelichten)</b>	
Loopt de PPS volgens planning?	Ja
Zijn er wijzigingen in het consortium/de projectpartners?	Nee
Is er sprake van vertraging en/of uitgestelde opleverdatum?	Nee

<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><i>Achtergrond</i></p> <p>Binnen de Publiek Private Samenwerking 'Integrale aanpak <i>Streptococcus suis</i>' worden mogelijkheden gezocht om de problemen rond <i>S. suis</i> infecties in de varkenshouderij op te lossen. Hiertoe worden twee oplossingsrichtingen onderzocht.</p> <p>Allereerst wordt een diermodel ontwikkeld zodat maatregelen tegen <i>S. suis</i> infecties op effectiviteit getest kunnen worden. Bij aanvang van dit project waren er verschillende diermodellen beschikbaar voor <i>S. suis</i> serotype 2. Voor <i>S. suis</i> serotype 9, het serotype dat in Nederland op dit moment de meeste infecties veroorzaakt, was geen enkel diermodel beschikbaar. De verschillende deelnemende industriële partners ontwikkelen verschillende soorten interventies tegen <i>S. suis</i> infecties variërend van vaccins tot voerinterventies. Zij geven aan dat er grote behoefte bestaat aan een diermodel om de effectiviteit van deze maatregelen te testen.</p> <p>Daarnaast wordt er binnen dit project gekeken naar genetische verschillen binnen de populatie serotype 9 stammen. Bij aanvang van het project waren er aanwijzingen beschikbaar dat er verschillen in virulentie bestaan binnen de serotype 9 populatie. Wanneer dit het geval is, kan de bestrijding en preventie specifiek gericht worden op virulente stammen.</p> <p><i>Resultaten diermodel S. suis serotype 9</i></p> <p>Binnen het project was ruimte voor drie experimentele infecties met serotype 9, die alle drie als in kind bijdrage van de verschillende partners zijn uitgevoerd. De verschillende partners hebben verschillende belangen en stellen ook andere eisen aan het diermodel. MSD zoekt met name een diermodel dat klinische verschijnselen geeft na infectie. SFR en Dopharma willen vooral een model dat kolonisatie van de darm veroorzaakt zodat het effect van orale interventies getest kan worden. Om aan deze eisen te kunnen voldoen is in alle experimenten gebruik gemaakt van een mucosale infectieroute.</p> <p>Bij het eerste experiment uitgevoerd door de GD in High Health dieren, traden duidelijke ziekteverschijnselen op na mucosale inoculatie (intranasaal gecombineerd met oraal). Door de beperkte groepsgrootte konden geen harde conclusies getrokken worden.</p>

Het tweede dierexperiment dat is uitgevoerd door SFR in reguliere biggen uit de praktijk werd een duidelijke en consistente kolonisatie van de biggen gevonden na mucosale inoculatie, maar geen ziekteverschijnselen. Voor onderzoek aan voerinterventies is dit model uitstekend geschikt. Het effect van voerinterventies op kolonisatie van *S. suis* serotype 9 op de tonsil en in de darm kan uitstekend bestudeerd worden. Een van de deelnemende partners heeft dit model inmiddels ingezet in zijn eigen onderzoekslijnen.

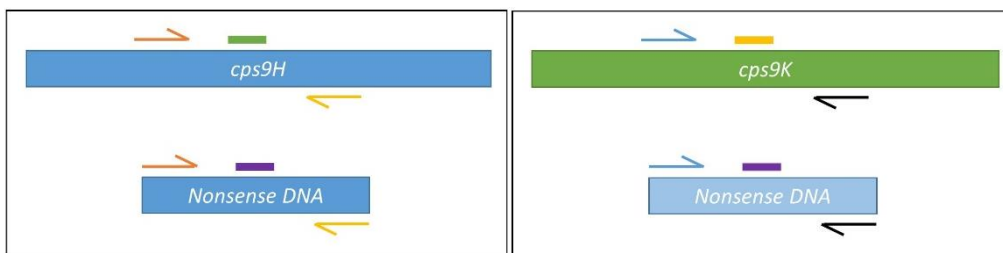
Het doel van het derde dierexperiment uitgevoerd door MSD en de GD was om een reproduceerbare kolonisatie van de tonsil en de darm te combineren met klinische verschijnselen. Om dit te bereiken zijn High Health biggen mucosaal geïnfecteerd door intra-tracheale infectie te combineren met orale infectie. Deze route is gekozen op basis van ervaring van een van de deelnemende partners. De resultaten laten zien dat klinische verschijnselen van een *S. suis* infectie werden opgewekt en dat bij de dieren met klinische verschijnselen *S. suis* in het bloed aanwezig was. Ook was *S. suis* type 9 kort na infectie in relatief hoge aantallen in de tonsillen aanwezig. Een duidelijke relatie tussen klinische verschijnselen en de toegediende dosis werd niet gevonden. Door middel van whole genome sequencing werd bevestigd dat de terug geïsoleerde stam gelijk was aan de stam gebruikt om te inoculeren. Uit twee aangetaste organen werden echter andere organismen terug geïsoleerd: een *Streptococcus hyointestinalis* en een andere *Streptococcus suis*.

**Conclusie:** Het ontwikkelen van een diermodel voor serotype 9 binnen de PPS is hiermee afgerond. Op basis van de verkregen resultaten zijn er twee mogelijkheden om interventies gericht tegen *S. suis* serotype 9 te onderzoeken. Door orale en intranasale inoculatie te combineren, wordt een goed model verkregen voor kolonisatie van de darm. Afhankelijk van de achtergrond van de biggen (high health versus reguliere praktijk) kunnen beperkte klinische verschijnselen verwacht worden. Door orale en intratracheale inoculatie te combineren, wordt een invasiever model verkregen waarin ziekteverschijnselen ten gevolge van *S. suis* verwacht worden. De resultaten van alle dierproeven zullen gezamenlijk worden gepubliceerd in een wetenschappelijke publicatie.

#### Resultaten genetische analyse *S. suis* serotype 9

Uit de resultaten van de genetische analyse van de serotype 9 isolaten die is uitgevoerd binnen deze PPS, is gebleken dat de virulente serotype 9 isolaten en de dragerschap serotype 9 isolaten onderscheiden kunnen worden. Op basis van de gevonden verschillen is een PCR ontwikkeld die alleen de virulente *S. suis* serotype 9 isolaten aantoonst. Deze PCR is experimenteel ontwikkeld bij het AMC. De verdere uitwerking en validatie van de PCR wordt uitgevoerd door WBVR.

**Opzet PCR:** Er is voorgewezen om een kwantitatieve PCR inclusief interne positieve controle te ontwikkelen. Voor detectie van serotype 9 bestaat een dergelijke PCR al, deze is gebaseerd op het *cps9H* gen. Er zijn specifieke primers ontwikkeld om *cps9H* te detecteren. Dezelfde primers zijn gebruikt voor de interne positieve controle. Tussen de primers van de IPC is een stuk nonsense DNA geplaatst. De lengte van de PCR producten van *cps9H* en de IPC zijn gelijk. De probes maken het onderscheid, die hebben verschillende labels (FAM en VIC). De PCR voor *cps9K* is op dezelfde manier opgezet met de primers die het AMC heeft ontworpen (zie Figuur 1). In deze fase wordt het DNA geïsoleerd met behulp van kolommen, zonder ondersteuning van een robot.



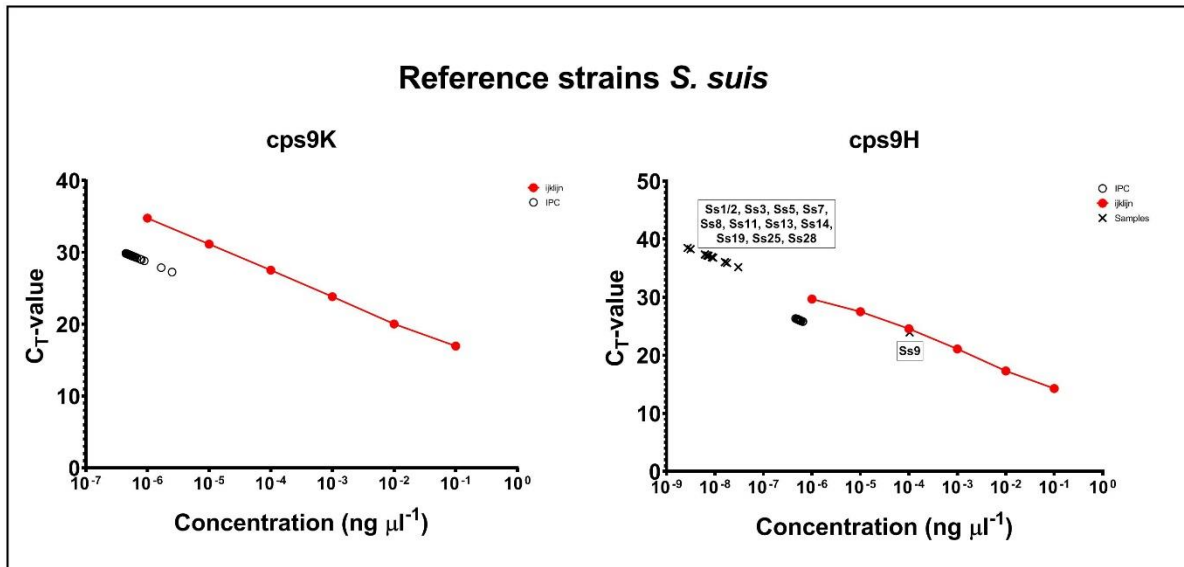
Figuur 1. Opzet van de PCR. Het linkerpaneel laat de bestaande PCR om serotype 9 te detecteren zien. De primers waarmee de IPC wordt gedetecteerd zijn gelijk aan de *cps9H* primers. Alleen de probe is anders. De PCR waarmee virulente serotype 9 stammen worden gedetecteerd staat rechts weergegeven en heeft dezelfde opzet.

**Validatie PCR:** Voor de validatie van de PCR is begonnen met het screenen van de stammen die binnen de PPS gesequenced zijn. Er zijn 34 dragerschap stammen en 44 invasieve stammen gePCRd. Alle 78 stammen zijn positief in de *cps9H* PCR, wat bevestigt dat het allemaal serotype 9 stammen zijn. Van de invasieve stammen worden er 43/44 gedetecteerd met de *cps9K* virulentie PCR. Het is nog niet duidelijk waarom 1 stam afwijkt. Van de dragerschap stammen zijn 4/34 stammen positief in de *cps9K* PCR. Uit de CGH analyse en de sequentie analyse op deze stammen is al gebleken dat deze stammen weliswaar van tonsillen zijn geïsoleerd, maar wel degelijk tot de virulente, invasieve isolaten behoren. De PCR detecteert deze stammen dus correct positief in de *cps9K* PCR (zie Tabel 1).

Tabel 1. Overzicht van de PCR resultaten op de gesequencede *S. suis* serotype 9 isolaten. De getallen geven het aantal positieve isolaten ten opzichte van het totaal aantal geteste isolaten aan.

PCR	Dragerschap	Invasief
<i>cps9H</i>	34/34	44/44
<i>cps9K</i>	4/34	43/44

De volgende stap in de validatie bestond uit het testen van de referentiestammen van de verschillende *S. suis* serotypes, om te bepalen of de *cps9K* PCR specifiek is voor serotype 9. Van de 35 referentiestammen, geven er 12 een positief signaal in de *cps9H* PCR; 11 stammen geven een signaal bij een  $C_T$  boven de 35, 1 stam geeft een signaal bij  $C_T$  23.9. Deze laatste stam is de referentiestam voor serotype 9. Uit deze data blijkt dat een signaal groter dan  $C_T$  aspecifiek is. In de virulentie *cps9K* PCR is geen enkele referentiestam positief, ook de serotype 9 referentiestam niet. Hoewel de virulentie van deze referentiestam onbekend is, is de stam binnen de populatie serotype 9 stammen. De stam lijkt op basis van MLST niet op de populatie virulente serotype 9 isolaten. Het lijkt dan ook zeer waarschijnlijk dat deze stam niet virulent is en terecht negatief is in de *cps9K* PCR (zie Figuur 2).



Figuur 2. Representatie van de resultaten van de PCRs op *cps9H* en *cps9K* op de referentiestammen van *S. suis*. De rode lijn geeft de ijklijn van de PCR aan. De open cirkels geven de IPC weer. De zwarte kruisjes zijn de geteste referentie stammen. In de rechter figuur is te zien dat de serotype 9 stam bij een lage  $C_T$  signaal geeft, terwijl de andere serotypes bij een hoge  $C_T$  positief worden.

Vervolgens is een set stammen die Dopharma als in kind bijdrage heeft ingebracht gescreend met de PCRs. Deze set bevat *S. suis* stammen van zowel serotype 9, als van andere serotypes. Daarnaast bevat de set andere pathogenen die in varkens voorkomen, zowel streptokokken als andere organismen. Deze screening introduceert andere serotype 9 stammen dan degene waarop de PCR assay is gebaseerd. De resultaten (weergegeven in Tabel 2) laten zien 36/40 serotype 9 stammen positief zijn in de *cps9H* PCR. Nader onderzoek is nodig om vast te stellen waarom 4/40 serotype 9 stammen negatief zijn in deze PCR. Van deze 40 stammen zijn er 3 positief in de virulentie *cps9K* PCR. Er moet ook nog nader onderzocht worden of 17/40 stammen mogelijk niet virulent zijn.

Tabel 2. PCR resultaten van *cps9H* en *cps9K* op een stammenset ( $n = 154$ ) die verschillende *S. suis* serotypes en andere organismen bevat. De resultaten geven het aantal positieve stammen ten opzichte van het aantal geteste stammen weer. Tussen haakjes staat de  $C_T$  waarde waarbij het signaal opkomt.

Species	<i>cps9H</i>	<i>cps9K</i>
<i>Streptococcus suis</i> serotype 9	36/40 (21.9 – 27.6)	23/40

<i>Streptococcus suis</i> serotype 1	<b>2/8</b> (39.1 – 39.7)	<b>0/8</b>
<i>Streptococcus suis</i> serotype 2	<b>1/10</b> (38.5)	<b>0/10</b>
<i>Streptococcus suis</i> serotype 3	<b>0/4</b>	<b>1/4</b> (38.3)
<i>Streptococcus suis</i> serotype 4	<b>0/10</b>	<b>0/10</b>
<i>Streptococcus suis</i> serotype 5	<b>2/4</b> (38.0 – 38.3)	<b>1/4</b> (37.0)
<i>Streptococcus suis</i> serotype 6	<b>1/4</b> (36.8)	<b>0/4</b>
<i>Streptococcus suis</i> serotype 7	<b>4/10</b> (36.2 – 39.3)	<b>1/10</b> (38.7)
<i>Streptococcus suis</i> serotype 8	<b>2/4</b> (37.0 – 39.0)	<b>2/4</b> (38.3 – 39.5)
<i>Streptococcus suis</i> non-typeable	<b>5/20</b> (24.9 – 38.7)	<b>3/20</b> (23.7 – 38.6)
Other species: streptococci	<b>3/18</b> (37.0 – 38.1)	<b>1/18</b> (37.7)
Other species: non-streptococci	<b>5/22</b> (36.09 – 39.3)	<b>1/22</b> (37.6)

Uit de tabel blijkt verder dat er meerdere stammen positief zijn in zowel de *cps9H* als de *cps9K* PCR. Dit geldt zowel voor *S. suis* als voor andere organismen. Echter, evenals bij de referentiestammen komen alle signalen op bij een hoge  $C_T$  boven de 35. Er is 1 uitzondering op deze regel. Dit betreft één van de niet typeerbare stammen die met hoge  $C_T$  waarden (24.9 & 23.7) positief is in beide PCRs. Hieruit blijkt dat deze stam waarschijnlijk niet reageert in de serum agglutinatie test, maar wel een virulente serotype 9 stam is. Voor andere signalen wordt dezelfde conclusie getrokken als voor de referentiestammen: Signalen boven  $C_T$  35 zijn niet betrouwbaar.

**Conclusie:** De resultaten van de *cps9K* PCR zijn veelbelovend. Er is verder analyse en validatie nodig voordat de PCR in de praktijk kan worden ingezet, maar de eerste resultaten geven aan dat de PCR bruikbare resultaten oplevert, en een goede specificiteit heeft.

**Vervolg:** In het komende jaar zullen de volgende stappen gezet worden:

- DNA isolatie met behulp van robots om de procedure verder te automatiseren.
- Eventueel kan de stammen collectie waarmee gevalideerd wordt, worden uitgebreid met meer stammen / organismen.
- Achtergrond signaal verbeteren.
- Validatie van de PCR op klinische monsters. Tot nu toe zijn de PCRs op rein gekweekte bacteriën uitgevoerd. Voor toepassing in de praktijk is het wenselijk als de PCR ook op klinische materialen (tonsil swabs, feces) kan worden gebruikt.
- Uitbreiden van de PCR op speekselmonsters om toepasbaarheid in de praktijk te vergroten. Hiervoor kan gebruik worden gemaakt van monsters uit het EU project 'PIGSs' en monsters uit de PPS 'BITMAP'. Daarnaast heeft de GD monsters die hiervoor gebruikt kunnen worden.

Wanneer dit traject succesvol verloopt, kunnen de resultaten vervolgens gepubliceerd worden en gepresenteerd op congressen.

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

*S. suis* is een groot probleem voor de varkenshouderij en zorgt voor een ernstige aantasting van de gezondheid en het welzijn van jonge dieren. *S. suis* infecties zijn daarnaast verantwoordelijk voor grote economische schade. In Nederland wordt de schade geschat op €12 miljoen/jaar. Daarnaast is ziekte door *S. suis* infecties een van de meest voorkomende redenen voor antibioticumgebruik in varkens. *S. suis* serotype 2 kan ook ernstige infecties bij mensen veroorzaken; in delen van Zuidoost Azië is *S. suis* de meest voorkomende bacteriële oorzaak van humane hersenvliesontsteking. In West-Europa worden met name mensen die beroepsmatig in contact komen met varkens of varkensproducten incidenteel ziek ten gevolge van een *S. suis* infectie. De focus ligt in dit project op serotype 9 stammen, omdat deze op dit moment het meest worden geïsoleerd uit zieke dieren in de praktijk in Nederland, waaruit blijkt dat deze stammen het grootste probleem in Nederland vormen (evenals in de ons omringende landen).

De resultaten van dit project dragen bij aan (1) verbetering van dierwelzijn en diergezondheid en daarmee gepaard gaand, een verminderd antibioticumgebruik; (2) verbeterde maatschappelijke acceptatie van varkenshouderij door een verminderd antibioticum gebruik en (3) vermindering van economische schade voor varkensbedrijven.

**Knelpunten: geef een korte beschrijving van de eventuele inhoudelijke knelpunten**

Niet van toepassing.

**Aantal opgeleverde producten in 2014** (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 (**)
---------------------------------	-----------	------------------------	--	---------------------------------------	----------------

**Wetenschappelijke publicaties:**

- In 2019 wordt een publicatie voorzien waarin de virulentie-studie wordt gecombineerd met de sequentiedata (deze publicatie is vertraagd doordat de AIO een baan buiten de wetenschap heeft geaccepteerd). Titel: 'Clonal expansion of a virulent *Streptococcus suis* serotype 9 lineage distinguishable from carriage subpopulations'.
- Op het International Pig Veterinary Society congress (IPVS) die in juni 2018 in Chongqing – China werd georganiseerd, is een poster gepresenteerd over de resultaten van deze PPS met als titel: '*Streptococcus suis* serotype 9 isolates can be divided in different pathotypes'.
- Op de International Symposium on Digestive Physiology of Pigs (DPP) die in augustus 2018 in Brisbane wordt georganiseerd, wordt een poster gepresenteerd over de resultaten van deze PPS met als titel: 'The development of a *Streptococcus suis* serotype 9 challenge model in weaned piglets'
- Op het European Symposium on Porcine Health Management dat in juni 2018 werd georganiseerd in Barcelona (Spanje), werd een poster gepresenteerd over de resultaten van deze PPS met als titel: 'Mucosal infection with clinical *Streptococcus suis* serotype 9 strain isolate can induce severe disease'.
- In 2019 wordt een publicatie voorzien waarin het diermodel voor serotype 9 wordt beschreven. De eerste auteur zal Xiaonan Guan van SFR zijn, alle andere deelnemers publiceren mee.

(\*) Ter herinnering: in geval van financiering met TKI-toeslag dienen de TKI's in publicaties genoemd te worden als financier. In het geval van publicaties in tijdschriften met een zeer hoge impactfactor worden de TKI's graag vooraf op de hoogte gesteld.

(\*\*) Hiermee wordt bedoeld: contractonderzoek dat voortkomt uit dit project, aanvullende subsidies die zijn verkregen en spin-off bedrijvigheid.

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

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

Geef evt. toelichting op:

- Afwijking opgeleverde producten
- Reden van nog niet plaatsen van product op openbare website