



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	☒ goedgekeurd ☐ niet goedgekeurd
Evt. opmerkingen over de jaarrapportage:	

Algemene gegevens

PPS-nummer	AF15227
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.

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

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

Highlights: geef een korte beschrijving van de belangrijkste resultaten (deze beschrijving wordt als publieke samenvatting op de websites van de TKI's/topsectoren geplaatst)

Abstract

Streptococcus suis is een zoönotische bacterie die verantwoordelijk is voor veel ziekte in de varkenshouderij, en daarmee een grote aantasting in gezondheid en welzijn van biggen veroorzaakt. Zieke biggen ontwikkelen ernstige infecties als hersenvliesontsteking, gewrichtsontsteking en bloedvergiftiging. Er bestaan vele serotypes van *S. suis*, maar in Nederland wordt ziekte voornamelijk veroorzaakt door serotypes 9, 2, 7 en 14. Wereldwijd veroorzaakt serotype 2 het grootste aantal infecties in zowel varkens als mensen. De meeste literatuur en beschikbare onderzoeksmethoden zijn daarom gebaseerd op serotype 2 infecties. In Nederland en de ons omringende landen veroorzaakt serotype 9 echter het grootste aantal infecties in de varkenshouderij. Deze PPS had daarom tot **doel** om onderzoeksmethoden specifiek voor serotype 9 te ontwikkelen die de deelnemende partners kunnen gebruiken om interventies te testen.

Er is een **diermodel** ontwikkeld waarmee biggen mucosaal geïnfecteerd worden met serotype 9. Door verschillende toedieningsroutes te gebruiken, kan de ernst van de infectie gestuurd worden. Wanneer een intranasale inoculatie route wordt gecombineerd met orale toediening wordt kolonisatie van de darm en de tonsil bereikt, zonder veel klinische verschijnselen. Dit model is zeer geschikt om het effect van op kolonisatie door streptokokken te testen. Wanneer de biggen intratracheaal worden geïnfecteerd, wordt ook kolonisatie gevonden, maar daarnaast ontwikkelt ongeveer de helft van de biggen klinische verschijnselen die passen bij een streptokokken infectie. Dit model is geschikt om vaccins te testen.

Binnen het project is ook een **diagnostische test** (qPCR) ontwikkeld die alleen virulente *S. suis* serotype 9 stammen detecteert. Om tot deze test te komen, zijn ongeveer 100 *S. suis* stammen gesequenced. De helft van deze stammen was geïsoleerd uit zieke dieren, de andere helft was afkomstig van gezonde biggen (dragerschap). In dit project is aangetoond dat de dragerschap isolaten genetisch te onderscheiden zijn van de klinische isolaten en minder virulent zijn. Op basis van de genomsequenties is vervolgens een regio geselecteerd die specifiek is voor de klinische isolaten. Op basis van deze regio is vervolgens een diagnostische PCR ontwikkeld en gevalideerd.

De partners binnen de PPS zijn zeer tevreden met de ontwikkelde onderzoeksmethoden en willen deze graag toepassen in hun eigen onderzoeksveld. Het project levert drie **publicaties** op: een publicatie over het diermodel, een publicatie over de diagnostische test en een publicatie over de genomsequenties van *S. suis*.

Inleiding

Streptococcus suis is een bacterie die verantwoordelijk is voor veel ziekte in de varkenshouderij, en daarmee een grote aantasting in gezondheid en welzijn van biggen veroorzaakt. Zieke biggen ontwikkelen ernstige infecties als hersenvliesontsteking, gewrichtsontsteking en bloedvergiftiging. Hoewel de exacte kosten ten gevolge van *S. suis* niet bekend zijn, wordt de schade in Nederland geschat op €12 miljoen per jaar. *S. suis* is een zoönose, het kan ook ziekte veroorzaken bij mensen. In westerse landen is dit voornamelijk een beroepsmatige aandoening die voorkomt bij mensen die intensief contact met (besmette) varkens of varkensvlees hebben zoals slagers, dierenartsen, jagers en boeren. In Zuidoost Azië is *S. suis* in sommige landen echter de belangrijkste veroorzaker van bacteriële hersenvliesontsteking bij mensen. Er is geen commercieel vaccin beschikbaar dat breed beschermt tegen *S. suis* infecties. Hierdoor is *S. suis* een van de belangrijkste oorzaken van antibioticumgebruik in de varkenshouderij. Wanneer er oplossingen voor *S. suis* infecties gevonden worden, leidt dit tot een verbetering van diergezondheid en dierwelzijn, een reductie van het aantal humane *S. suis* patiënten en uiteindelijk tot een reductie in het antibioticumgebruik.

Er zijn veel verschillende serotypes van *S. suis* bekend die verschillen in virulentie tussen de serotypes, maar ook binnen de serotypes. Wereldwijd veroorzaakt serotype 2 het meeste ziekte bij varkens en mensen. De belangrijkste ziekteverwekker die bij zieke of gestorven biggen in Nederland wordt geïsoleerd, is *S. suis* serotype 9. Dit project richt zich alleen op serotype 9 infecties en heeft ten doel om kennis en instrumentarium te ontwikkelen waarmee de streptokokken serotype 9 problematiek in de varkenshouderij integraal kan worden aangepakt door het deelnemend bedrijfsleven. Hiertoe zijn twee oplossingsrichtingen onderzocht: allereerst is een diermodel specifiek voor *S. suis* serotype 9 infecties ontwikkeld zodat maatregelen tegen *S. suis* infecties op effectiviteit getest kunnen worden. Daarnaast is op basis van genetische informatie van serotype 9 isolaten een diagnostische test ontwikkeld die specifiek de virulente serotype 9 stammen aantoonst.

Diermodel

Bij aanvang van dit project waren er verschillende diermodellen beschikbaar voor *S. suis* serotype 2. De verschillende deelnemende industriële partners ontwikkelen verschillende soorten interventies tegen *S. suis* 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. 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.

Op basis van de experimenten zijn twee mucosale infectiemodellen voor *S. suis* serotype 9 ontwikkeld: een kolonisatiemodel en een invasief model. Voor het kolonisatiemodel worden biggen intranasaal geïnfecteerd met behulp van een airbrush die een fijne nevel toedient en oraal geïnfecteerd door een *S. suis* cultuur te drinken. Dit model leidt tot stabiele kolonisatie van de darm en de tonsil, de biggen ontwikkelen echter geen klinische verschijnselen. Dit model is zeer geschikt om het effect van maatregelen om kolonisatie te voorkomen of reduceren te testen. In het invasieve model worden biggen intratracheaal geïnfecteerd. In dit model ontwikkelt ongeveer de helft van de dieren klinische verschijnselen. Dit model is zeer geschikt om vaccins te testen.

Naast het opzetten van het model kan ook een aantal conclusies getrokken worden. De genetische achtergrond

van dieren en het houderijsysteem is bepalend voor de uitkomst. Zo zijn dieren van een bedrijf waar regelmatig *S. suis* ziekte voorkomt minder gevoelig voor de infectie, waarschijnlijk door de aanwezigheid van veel (maternale) antilichamen. Voersamenstelling kan een grote invloed hebben op de gevoeligheid voor infectie, met name een voerwissel maakt de dieren gevoeliger.

Whole genome sequencing

In praktijk blijkt dat vrijwel alle varkensbedrijven in Nederland positief zijn voor dragerschap van *S. suis* serotype 9 in de populatie. Uit (beperkte) epidemiologische resultaten blijkt dat er geen verschil is in prevalentie van kolonisatie tussen bedrijven met streptokokkenproblemen (ziekte) en bedrijven zonder streptokokkenproblemen. Dit zou er op kunnen wijzen dat er binnen serotype 9 stammen verschillen in virulentie bestaan zoals dat al bekend is voor serotype 2. Dit is in 2011 onderzocht door twee collecties serotype 9 stammen met elkaar te vergelijken: Stammen afkomstig van klinisch zieke dieren werden vergeleken met stammen afkomstig van tonsillen van biggen van bedrijven zonder streptokokkenproblemen. Een eerste genetische vergelijking gaf destijds al aan dat er grote verschillen bestonden tussen deze populaties.

Binnen dit project is de virulentie van 4 serotype 9 stammen, 2 klinische en 2 dragerschap stammen, bepaald na een intraveneuze infectie van jonge biggen. Daaruit bleek dat er een groot verschil in virulentie bestond tussen klinische en dragerschap stammen. Beiden kunnen ziekte veroorzaken, maar de klinische stammen doen dat veel sneller en geven veel ernstiger symptomen dan de dragerschap stammen. Dit suggereert dat er inderdaad minstens 2 populaties serotype 9 stammen bestaan die verschillen in virulentie.

Vervolgens is een groot aantal *S. suis* serotype 9 isolaten volledig gesequenced om een beter beeld te krijgen van de verschillen tussen beide populaties. De collectie is aangevuld met serotype 9 stammen afkomstig van de verschillende private partners in het project. Uit de analyse van de sequenties blijkt dat de populatie binnen serotype 9 stammen zeer divers is. Dit geldt met name voor de dragerschap stammen. De klinische stammen lijken onderling veel meer op elkaar. Door deze grote diversiteit is het lastig om een analyse van de verschillen tussen beide groepen te maken. In het operon dat codeert voor het kapsel van serotype 9 blijkt echter een sequentie aanwezig te zijn die specifiek is voor de virulente isolaten. Hoewel het verschil in virulentie niet direct aan deze specifieke sequentie gekoppeld kan worden, lijkt er wel een verschil in kapseldikte te bestaan tussen virulente en dragerschap isolaten.

Diagnostiek

Op basis van het waargenomen genetische verschil tussen klinische stammen en dragerschap stammen, is een diagnostische PCR opgezet die alleen de virulente stammen detecteert. Er is voor gekozen om een kwantitatieve PCR inclusief interne positieve controle te ontwikkelen. Er zijn specifieke primers voor het betreffende gen (*cpsK*) ontwikkeld en een fluorescente probe voor de detectie van het PCR product. Daarnaast is een interne positieve controle ontwikkeld die gebruikt kan worden om te bepalen of er in een monster factoren aanwezig zijn die de efficiëntie van de PCR beïnvloeden. De PCR is eerst getoetst op de stammen die volledig zijn gesequenced. Vervolgens zijn ook de referentiestammen voor alle *S. suis* serotypes getest in deze nieuwe PCR. Bovendien is een collectie porcine pathogenen getest op kruis reactie. Uit alle resultaten blijkt dat de PCR inderdaad alleen de virulente isolaten aantoonde. Op andere stammen, zowel andere *S. suis* serotypes als andere bacteriële species, wordt regelmatig achtergrond gevonden. Deze achtergrond is echter altijd heel laag. Op basis van de resultaten is een cut-off van 35 PCR cycli bepaald. Stammen die onder de 35 cycli positief worden zijn virulente *S. suis* serotype 9, stammen die boven de 35 cycli positief worden niet. Er zijn nog een paar uitzonderingen, waar binnen het project nader naar wordt gekeken.

Tenslotte is de nieuw ontwikkelde PCR ingezet op de tonsilswabs waar de dragerschap isolaten uit zijn geïsoleerd. Dit zijn tonsilswabs die bij biggen en zeugen zijn genomen op bedrijven waar gedurende twee jaar geen streptokokken problemen zijn geweest. Deze swabs zijn geëluëerd en dit materiaal is ingevroren. Dit materiaal is gebruikt om te kijken of er op deze bedrijven naast dragerschap isolaten óók virulente serotype 9 stammen aanwezig zijn. Uit de data blijkt dat het percentage positiviteit zeer varieert binnen deze bedrijven. Er zijn bedrijven waar geen van de dieren positief is voor virulente serotype 9 stammen, terwijl op andere bedrijven 2/3 van de dieren positief is. Dit geeft aan dat er verschillen van dragerschap bestaan op de bedrijven. Er is nog weinig bekend over de relatie tussen dragerschap en ziekte. Toch lijken deze nieuwe gegevens nieuwe mogelijkheden te bieden om gericht de virulente serotype 9 te bestrijden met behulp van deze nieuwe PCR.

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 gevolg 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).

Door de ontwikkeling van een diemodel en diagnostische test specifiek voor serotype 9 isolaten, hebben de deelnemende partners nieuwe middelen om hun interventies te testen of in praktijk te implementeren.

Knelpunten: geef een korte beschrijving van de eventuele inhoudelijke knelpunten

Niet van toepassing.

Aantal opgeleverde producten (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: • 'Clonal expansion of a virulent <i>Streptococcus suis</i> serotype 9 lineage distinguishable from carriage subpopulations', Willemse <i>et al.</i>, Scient. Rep. (2019)-9:15429. • 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: '<i>Streptococcus suis</i> 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 <i>Streptococcus suis</i> 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 <i>Streptococcus suis</i> serotype 9 strain isolate can induce severe disease'. • In 2019 wordt een publicatie voorzien waarin het diemodel voor serotype 9 wordt beschreven. De eerste auteur zal Xiaonan Guan van SFR zijn, alle andere deelnemers publiceren mee. • In 2020 wordt een publicatie voorzien waarin de diagnostische test wordt beschreven. Eerste auteur zal Mirjam Boonstra van WBVR 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