

PPS 1Health4Food

Sectoroverstijgend onderzoek
dier & volksgezondheid (1Health)



1HEALTH
4FOOD

Veilig voedsel
produceren



NZO

nederlandse zuivel organisatie



WAGENINGEN
UNIVERSITY & RESEARCH



Universiteit Utrecht



FOOD GROUP



agrifirm

SBK

Stichting
Brancheorganisatie
Kalversector



MSD



ZuivelNL
KETENORGANISATIE VAN DE ZUIVELSECTOR



Ministerie van Economische Zaken



Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu
Ministerie van Volksgezondheid,
Welzijn en Sport



Faculteit der Diergeneeskunde

DOT uiergezondheid

Hanneke van Wichen en Karien Griffioen

Resultatendag 23 november 2016

Doelstelling verantwoord antibioticagebruik

Doel Duurzame Zuivelketen:

Vermindering antibioticaresistentie door verantwoord antibioticagebruik in de melkveehouderij in lijn met waarden Autoriteit diergeneesmiddelen (SDa)

Indicator :

Aandeel melkveebedrijven onder Sda actiewaarde > 90%

Realisatie tot nu toe (bron SDa)

2012: 96%

2013: 97%

2014: 99%

2015: 99%



Sterke reductie antibioticagebruik

2009-2015: 47% reductie antibioticagebruik melkveehouderij
→ Compliment voor melkveehouders en dierenartsen!

Rapport Stichting Autoriteit Diergeneesmiddelen (SDa):

- * “Het is opnieuw een prestatie van formaat dat de sector met laaggebruik en beperkte verschillen in gebruik tussen bedrijven in staat is gebleken om tot verdere reductie te komen.”



Beperkte inzet diagnostiek

- * Groot deel antibioticagebruik ingezet voor uiergezondheidsproblemen
- * Diagnostiek voor het opsporen van mastitisverwekkers wordt beperkt ingezet
- * Gerichtere inzet antibiotica is mogelijk!



DOT uiergezondheid voor verantwoord antibioticagebruik

- * Behoefte aan gebruiksvriendelijke, snelle, on-farm testen
- * Bedrijfsbehandelplannen kunnen hierop inspelen
- * Projectresultaat zal melkveehouders helpen bij het gericht (en daarmee verantwoord) inzetten van antibiotica



Diagnostiek Ontwikkeling en Toepassing voor uiergezondheid

Gerichte behandeling is mogelijk

- * Minnesota Biplate en Petrifilm onder labomstandigheden: beide testen in staat tot onderscheiden van behandelgroepen (McCarron et al., 2009)
- * Minnesota Biplate onder veldomstandigheden: 50% reductie antibioticagebruik, zonder effect op genezing, nieuwe infecties en afvoer (Lago et al., 2011a,b)

Doel eerste fase

- * Bepalen huidige gebruik en behoefte aan mastitis diagnostiek
- * Bepalen welke eigenschappen belangrijk worden bevonden

Beschrijvende statistieken

200 Telefonische interviews met random geselecteerde melkveehouders

Bereid tot deelname	Ja	Nee
# Enquêtes (%)	210* (46%)	249** (54%)
% Uiergezondheidsproblemen	30.1%	30.7%
# Volwassen koeien	92	90

* 195 bruikbare enquêtes

** 37% noemde tijdgebrek

Deelnemers representatief voor gemiddelde melkveehouder



Huidige gebruik bacteriologisch onderzoek

BO	KM	SKM	Droog
Vaak	34%	22%	7%
Sporadisch	33%	21%	7%
Nooit	33%	57%	86%
PCR	2%	0%	0%

KM: klinische mastitis

SKM: subklinische mastitis

Griffioen et al., 2016



Wat zou een test moeten vertellen aan de veehouder?

Is een antibioticabehandeling noodzakelijk? In geval van...

- * KM 57% (van de veehouders)
- * SKM 52%
- * Droogzetten 27% (hoog celgetal) / 13% (laag celgetal)

Welk antibioticum moet ik gebruiken? In geval van...

- * KM 64%
- * SKM 57%
- * Droogzetten 31%

Moet de AB behandeling verlengd worden? In geval van

- * KM 39%
- * SKM 31%



Als een test beschikbaar is die binnen 12 uur een behandeladvies geeft

Zou u deze gebruiken? (*altijd /meestal /soms*)

Test op dierenartsenpraktijk

- * KM 53%
- * SKM 46%
- * Droogzetten 20%

On-farm test

- * KM 71%
- * SKM 55%
- * Droogzetten 34%



“Welke testeigenschap is meest belangrijk?”

Score: 1: meest belangrijk naar 4: minst belangrijk

Gemiddelde score (SD)

Betrouwbaarheid

Time-to-result

Prijs

Bruikbaarheid

KM

1.5 (0.77)

2.2 (0.87)

3.3 (0.87)

3.1 (0.92)

SKM

1.3 (0.64)

2.9 (0.93)

2.9 (1.03)

2.8 (0.85)

Droog

1.3 (0.70)

3.3 (0.86)

2.7 (1.04)

2.7 (0.81)

“Welke testeigenschap is meest belangrijk?”

Score: 1: meest belangrijk naar 4: minst belangrijk

Vals
positieven
< 7%

Gemiddelde score (SD)

Betrouwbaarheid

Time-to-result

Prijs

Bruikbaarheid

KM

1.5 (0.77)

2.2 (0.87)

3.3 (0.87)

3.1 (0.92)

SKM

1.3 (0.64)

2.9 (0.93)

2.9 (1.03)

2.8 (0.85)

Droog

1.3 (0.70)

3.3 (0.86)

2.7 (1.04)

2.7 (0.81)

“Welke testeigenschap is meest belangrijk?”

Score: 1: meest belangrijk naar 4: minst belangrijk

Vals
positieven
< 7%

Gemiddelde score (SD)

Betrouwbaarheid

Time-to-result

Prijs

Bruikbaarheid

KM

1.5 (0.77)

2.2 (0.87)

3.3 (0.87)

3.1 (0.92)

SKM

1.3 (0.64)

2.9 (0.93)

2.9 (1.03)

2.8 (0.85)

Droog

1.3 (0.70)

3.3 (0.86)

2.7 (1.04)

2.7 (0.81)

KM 8u (P_{10} 2u; P_{90} 12u)

SKM 20u (P_{10} 4u; P_{90} 24u)

Droog 24u (P_{10} 5u; P_{90} 48u)

“Welke testeigenschap is meest belangrijk?”

Score: 1: meest belangrijk naar 4: minst belangrijk

Vals
positieven
< 7%

Gemiddelde score (S)

KM €15 (P_{10} €5; P_{90} €50)
SKM €15 (P_{10} €5; P_{90} €30)
Droog €10 (P_{10} €3; P_{90} €25)

Betrouwbaarheid

Time-to-result

Prijs

Bruikbaarheid

KM

1.5 (0.77)

2.2 (0.87)

3.3 (0.87)

3.1 (0.92)

SKM

1.3 (0.64)

2.9 (0.93)

2.9 (1.03)

2.8 (0.85)

Droog

1.3 (0.70)

3.3 (0.86)

2.7 (1.04)

2.7 (0.81)

KM 8u (P_{10} 2u; P_{90} 12u)

SKM 20u (P_{10} 4u; P_{90} 24u)

Droog 24u (P_{10} 5u; P_{90} 48u)

“Welke testeigenschap is meest belangrijk?”

Score: 1: meest belangrijk naar 4: minst belangrijk

Vals
positieven
< 7%

KM €15 (P_{10} €5; P_{90} €50)
SKM €15 (P_{10} €5; P_{90} €30)
Droog €10 (P_{10} €3; P_{90} €25)

Gemiddelde score (S)

Betrouwbaarheid

Time-to-result

Prijs

Bruikbaarheid

KM

1.5 (0.77)

2.2 (0.87)

3.3 (0.87)

3.1 (0.92)

SKM

1.3 (0.64)

2.9 (0.93)

2.9 (1.03)

2.8 (0.85)

Droog

1.3 (0.70)

3.3 (0.86)

2.7 (1.04)

2.7 (0.81)

KM 8u (P_{10} 2u; P_{90} 12u)

SKM 20u (P_{10} 4u; P_{90} 24u)

Droog 24u (P_{10} 5u; P_{90} 48u)

7.5 - 10 min
(P_{10} 3; P_{90} 15)

Samenvattend...



- * Huidige gebruik
 - * Weinig (time-to-result is te lang, weinig toegevoegde waarde)
- * Voorgenomen gebruik
 - * 2x meer dan huidige gebruik
- * Met name behoefte aan betrouwbare on-farm test voor KM
 - * Time-to-result < 8uur
 - * <€15
 - * 7.5 tot 10 min tijd aan handelingen

Tweede fase

- * Inventarisatie beschikbare testen
 - * Geselecteerde testen voor evaluatie in lab en veld
- * Inventarisatie beschikbare technologieën
 - * Ontwikkeling nieuwe testen

Criteria

- * Toepasbaar buiten lab
- * Korte time-to-result
- * Goedkoop



Beschikbare on-farm testen

- * Aantonen 'mastitis'
- * Aantonen 'verwekker'
- * Aantonen antibioticumgevoeligheid

→ Gezien criteria focus op testen die verwekker kunnen aantonen

Aantonen 'verwekker'

On-farm kweekmethoden

- * Klassieke kweekmethoden
- * Twee-, drie- of viervaksplaten
 - Minnesota Easy Culture System II
 - VetoRapid
 - Accumast
- * Andere selectieve media
 - Petrifilm
 - Speed Mam Color

PCR



On-farm kweekmethoden

Voordelen

- * Time-to-result 16-24uur
- * Identificatie van groepen bacteriën
- * Petrifilm: lange houdbaarheid

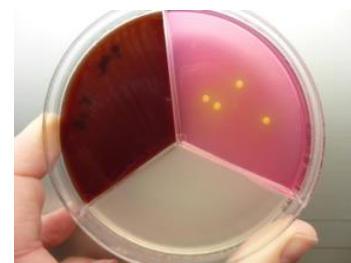
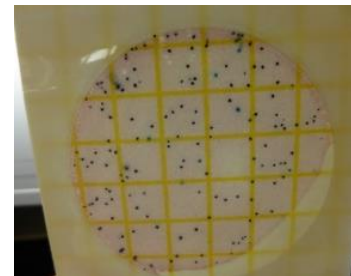
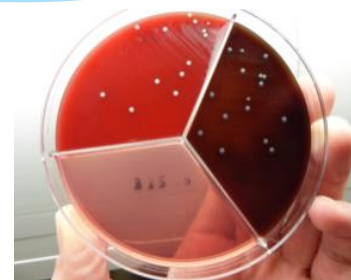
Nadelen

- * Differentiatie op bacterie groep
- * Soms voorbereiding melk noodzakelijk
 - Petrifilm 1:10 verdunning melk
- * Korte houdbaarheid verse kweekmedia
- * Geen controle op de kwaliteit



Lab evaluatie

- * Vijf testen geëvalueerd
 - * Minnesota Easy Culture System II
 - * Vetorapid
 - * Hardy Diagnostic Mastitis Triplate
 - * Chromagar GP/GN
 - * Petrifilm
 - * Rapid Aerobic Count Plate
 - * Coliform Count Plate
 - * Staph Express Count Plate



Lab evaluatie

- A. Alles behandeld, behalve geen groei
- B. Niets behandeld, tenzij G+ en G-
- C. Niets behandeld, tenzij G+

	Option A		Option B		Option C	
Treated of total	85%	(77-100)	83%	(74-100)	57%	(54-60)
Not treated of total	15%	(0-23)	17%	(0-26)	43%	(40-46)
Correspondingly treated	79%	(74-82)	70%	(62-74)	63%	(51-69)
Correspondingly not treated	54%	(0-81)	55%	(0-72)	47%	(36-73)
Sensitivity	92.9	(87.5-99.4)	91.3	(87.8-99.3)	82.1	(73.9-87.2)
Specificity	33.5	(0-54.3)	32.1	(0-50)	60.2	(49.7-66.6)

Ontwikkeling nieuwe testen

- * Veel verschillende technologieën mogelijk
- * Gezien criteria enkele mogelijkheden geselecteerd
- * Twee technologieën meegenomen voor verdere ontwikkeling
 - * LFIA = lateral flow immunoassay (zwangerschapstest)
 - * LAMP = loop mediated isothermal amplification

LFIA

Met antilichamen bacteriën invangen en zichtbaar maken

Voordelen

Allersimpelste test

On-farm

Snel

Foolproof

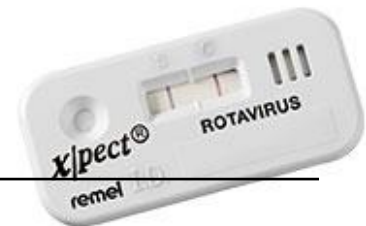
Geen apparaat nodig

Nadelen

Lastig te ontwikkelen (Melk is vet)

1 bacteriesoort per test

Niet van alle bacteriën antilichamen beschikbaar



LFIA

- * Prototype opgezet
 - * *S. aureus*
 - * Gevoeligheid in buffer 10^4 , in melk 10^5 SAU/ml
 - * Voorbehandeling: verdunnen, 'zeep' en EDTA, verhitten
- * Vooruitzicht: Volgend jaar verdere ontwikkeling mits gevoeligheid voldoende is



LAMP

Isotherme amplificatie: vermenigvuldigen van DNA bij één temperatuur

Voordelen

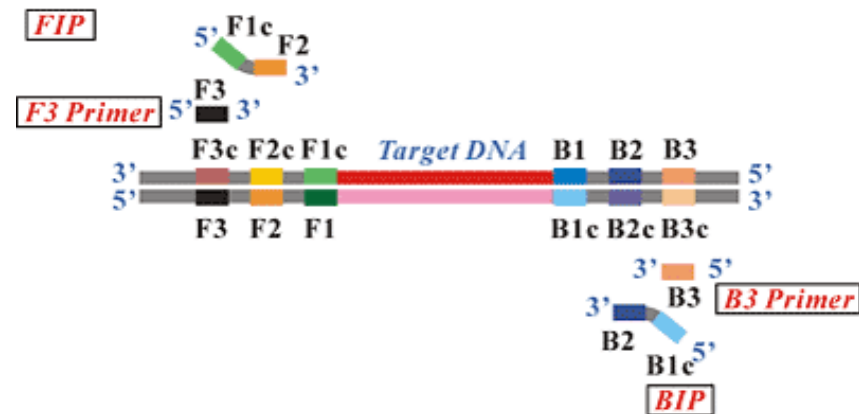
Eenvoudigere uitvoering dan PCR
Kan met en zonder uitleesapparatuur
Ervaring binnen onderzoeksgroep
(Cornelissen et al., 2016)

Nadelen

DNA isolatie noodzakelijk
Op DAP
1 bacteriesoort per test

LAMP

- * DNA-isolatie: lysis en extractie geoptimaliseerd
- * Assays ontworpen voor
 - * *S. aureus*, streptokokken, *Klebsiella* spp., *E. coli*, en *blaZ*
- * Assays getest
 - * Sensitiviteit en specificiteit
- * Gevoeligheid in melk
 - * Bacteriën: 25-5000 cfu/ml
 - * *blaZ*: 200-400 cfu/ml



Vervolg

- * Veldevaluatie bestaande testen
 - * Selectie geëvalueerde testen
- * Verdere evaluatie LAMP
 - * Melkmonsters verzameld tijdens veldevaluatie
- * Verdere ontwikkeling LFA



Referenties

- * SDa
- * McCarron, J.L., G. P. Keefe, S. L. B. McKenna, I. R. Dohoo, and D. E. Poole. 2009. Laboratory evaluation of 3M Petrifilms and University of Minnesota Bi-plates as potential on-farm tests for clinical mastitis . J. Dairy Sci. 92:2297–2305.
- * Lago, A., S. M. Godden, R. Bey, P. L. Ruegg, and K. Leslie. 2011a. The selective treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results: I. Effects on antibiotic use, milk withholding time, and short-term clinical and bacteriological outcomes. J. Dairy Sci. 94 :4441–4456.
- * Lago, A., S. M. Godden, R. Bey, P. L. Ruegg, and K. Leslie. 2011b. The selective treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results: II. Effects on lactation performance, including clinical mastitis recurrence, somatic cell count, milk production, and cow survival. J. Dairy Sci. 94 :4457–4467.
- * Griffioen, K., G.E. Hop, M.M.C. Holstege, A.G.J. Velthuis, T.J.G.M. Lam. 2016. Dutch dairy farmers' needs for microbiological mastitis diagnostics . J. Dairy Sci. 99:5551–61
- * Cornelissen, J.B., A. de Greeff, A.E. Heuvelink, M. Swarts, H.E. Smith, F.J. van der Wal. 2016. Rapid detection of *Streptococcus uberis* in raw milk by loop-mediated isothermal amplification. J. Dairy Sci. 99:4270-81

Met dank aan het projectteam

Faculteit Diergeneeskunde

- * Theo Lam
- * Dik Mevius

WBVR

- * Fimme Jan van der Wal
- * Jan Cornelissen
- * René Achterberg

GD diergezondheid

- * Annet Velthuis
- * Annet Heuvelink
- * Geralda Hop
- * Manon Holstege
- * Christian Scherpenzeel
- * Inge Berendsen
- * Remco Dijkman