

# 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

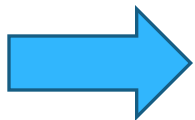
Jet Mars  
Annet Heuvelink  
Rianne Buter

R&D  
Gezondheidsdienst voor Dieren

# 1H4F



- \* 1Health4Food: publiek-privaat onderzoeksprogramma op het gebied van dier- en volksgezondheid
- \* Kennis ontwikkelen die ingezet kan worden voor verschillende dierlijke sectoren.



Kennis stelt dierhouders in staat rendabel te produceren op een wijze die veilig en gezond is voor mens en dier

# 1H4F project

2013 start :

\* **Diagnostiekontwikkeling en –toepassingen (DOT)**

➤ Luchtwegaandoeningen kalveren



partners o.a. CVI, MSD, van Drie Group, VION food group, Denkavit, GD, Ministerie EZ.

Indien succesvol ook voor andere diersoorten en aandoeningen

# 1H4F-DOT-Long

DOT –kalf      Onderdeel 1-5 (CVI)

- epidemiologisch onderzoek naar prevalentie van pathogenen op kalverbedrijven
- Relevantie van de verschillende pathogenen
- Variatie pathogenen binnen een bedrijf en tussen bedrijven
- Aantonen pathogenen in longspoelingen
- Virussen én bacteriën: validatie multiplex PCR-en CVI
- Uitslagen diagnostiek aan dier- en bedrijfsgegevens koppelen (medicijngebruik, opbrengst )

# 1H4F-DOT-Long

fase 6 van project:

GD + CVI

- Tools voor dierenarts die helpen bij therapiekeuze voor bacteriële infectie: sneltest die antibiotica resistentie aantoont
- Hoe: detectie DNA sequenties voor resistentiegenen in de ziekteverwekker: Micro-array (GD+CVI)
- Ultieme doel: “Direct” juiste antibiotica toedienen!

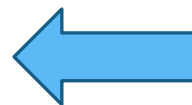
# Luchtwegpathogenen vleeskalveren

## Bacteriën :

- \* *Pasteurella multocida*
- \* *Mannheimia haemolytica*
- \* *Trueperella pyogenes*
- \* *Histophilus somni*
- \* ***Mycoplasma bovis***
- \* *Mycoplasma bovirhinis*
- \* *Mycoplasma dispar*

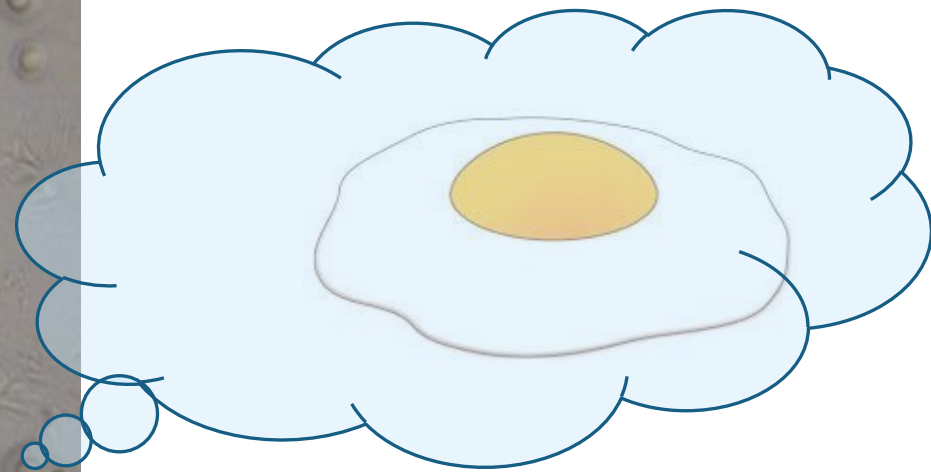
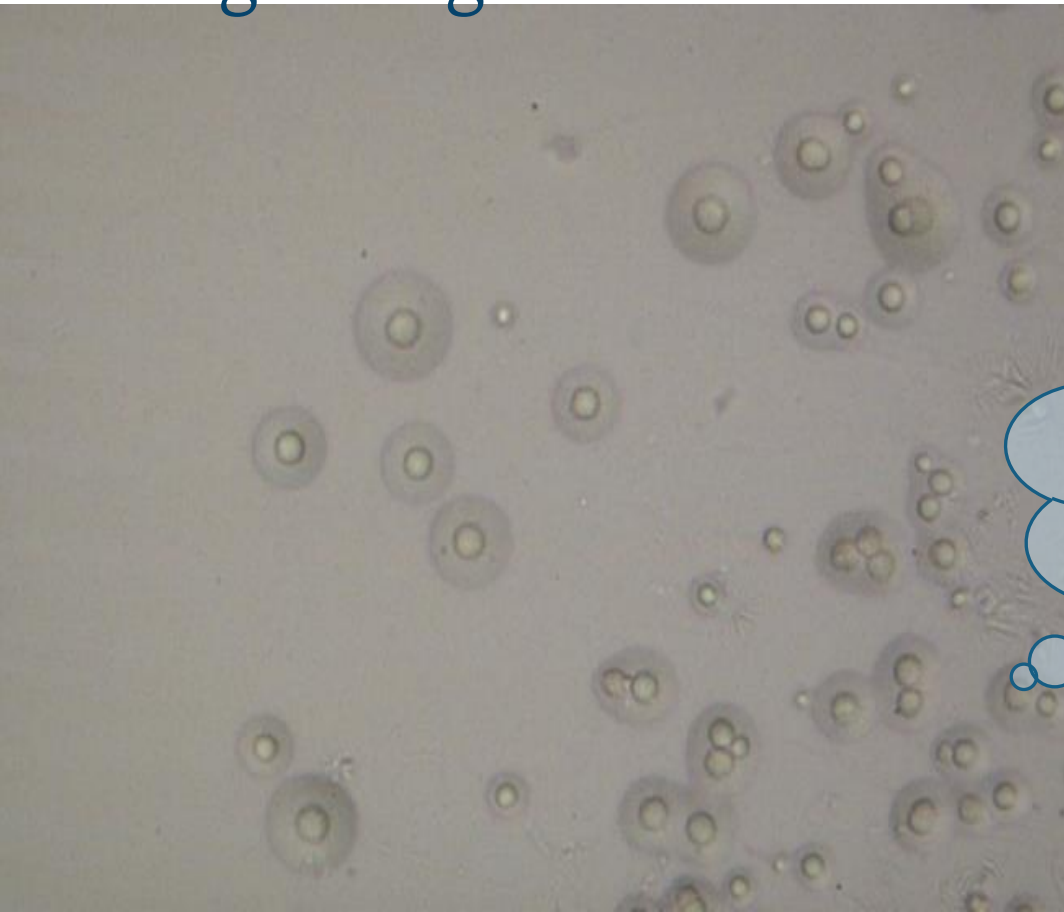
## Virussen:

- BRSV
- PI3
- BVDV
- BHV1
- ...
- ...



# *Mycoplasma bovis*

Moeilijk kweekbaar,  
langzame groei



GD veel ervaring



# Mycoplasma bovis

➤ Belangrijke pathogeen in rundvee

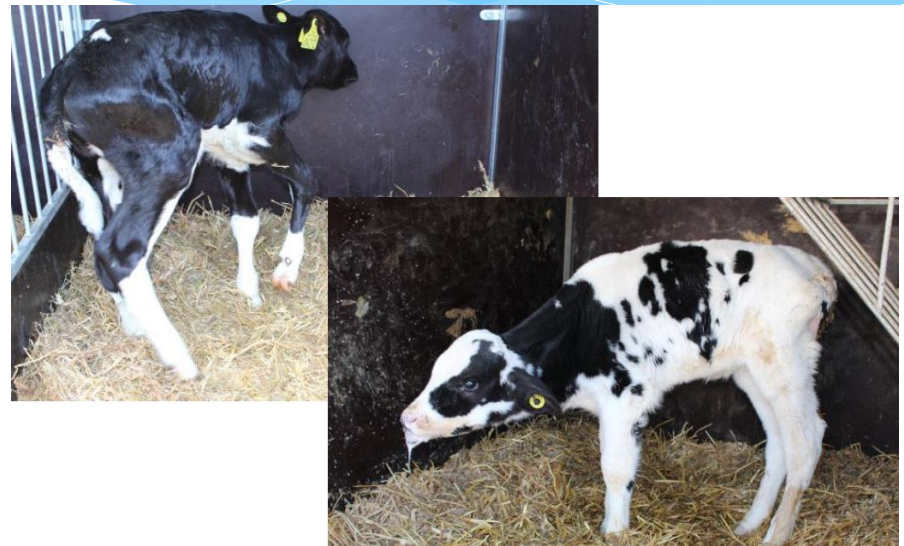
➤ Veroorzaker van

- \* longontsteking
- \* mastitis
- \* gewrichtsontsteking
- \* Oorontsteking

➤ Geen vaccin beschikbaar

➤ Bacterie zonder celwand . Diverse antibiotica werken in op de celwand van de bacterie: die kan je dus niet gebruiken voor Mycoplasma ☹

➤ Resistentie tegen antibiotica neemt toe van Mycoplasma



# *Mycoplasma* en antibiotica

## Beschikbaarheid antibiotica formularium:

- \* MLS groep (Macrolide – Lincosamide – Streptogramine)  
(tilmicosine, tulathromicine en tylosine),  
ook belangrijke groep voor humane *Mycoplasma* infecties
- \* Tetracyclines  
(oxytetracycline)
- \* Fluoroquinolonen  
(Enrofloxacin)

# *Mycoplasma* en resistentie

Eerst:

literatuur zoeken naar

- bekende mechanismen voor ontstaan van **resistentie**
- genen, of mutaties in genen, die hierbij gevonden zijn (in *Mycoplasma* )
- Testen ontwikkelen om deze genen aan te tonen

# *Mycoplasma* en antibiotica

En dan:

Genetische bevindingen in de *M. bovis* stammen  
vergelijken met “werkelijke” resistentie

Voor *Mycoplasma* was er geen antibiogram of MIC  
bepaling .....dus



MIC bepaling ontwikkeld

# *Mycoplasma* en antibiotica

- \* *Mycoplasma* langzaam groeiend
- \* Veeleisend mbt samenstelling kweekmedium
- \* Weinig/geen troebeling vloeibaar kweekmedium, noch voldoende groei op vaste voedingsbodems



Conventionele gevoeligheidstesten

- Geen *Mycoplasma* QC referentie stammen met “bekende” resistentie
- Geen specifieke breekpunten

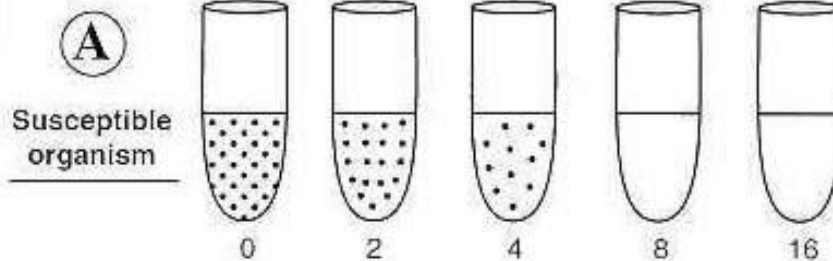
# Gevoeligheidsbepaling *Mycoplasma*

- Opzetten micro-bouillondilutietest
- Aflezing met kleuromslag
- Bepaling MIC van *Mycoplasma* spp. uit runderen

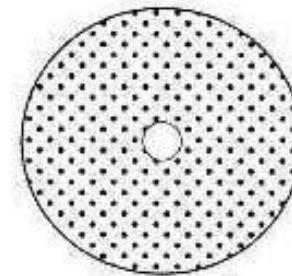
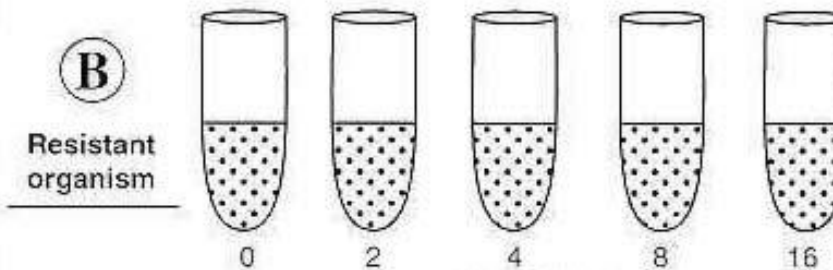
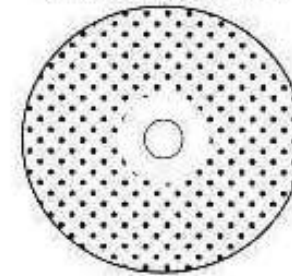
# Bouillonverdünnungsmethode

## Antibiotic susceptibility tests

### Minimum inhibitory concentration test



### Disk diffusion test

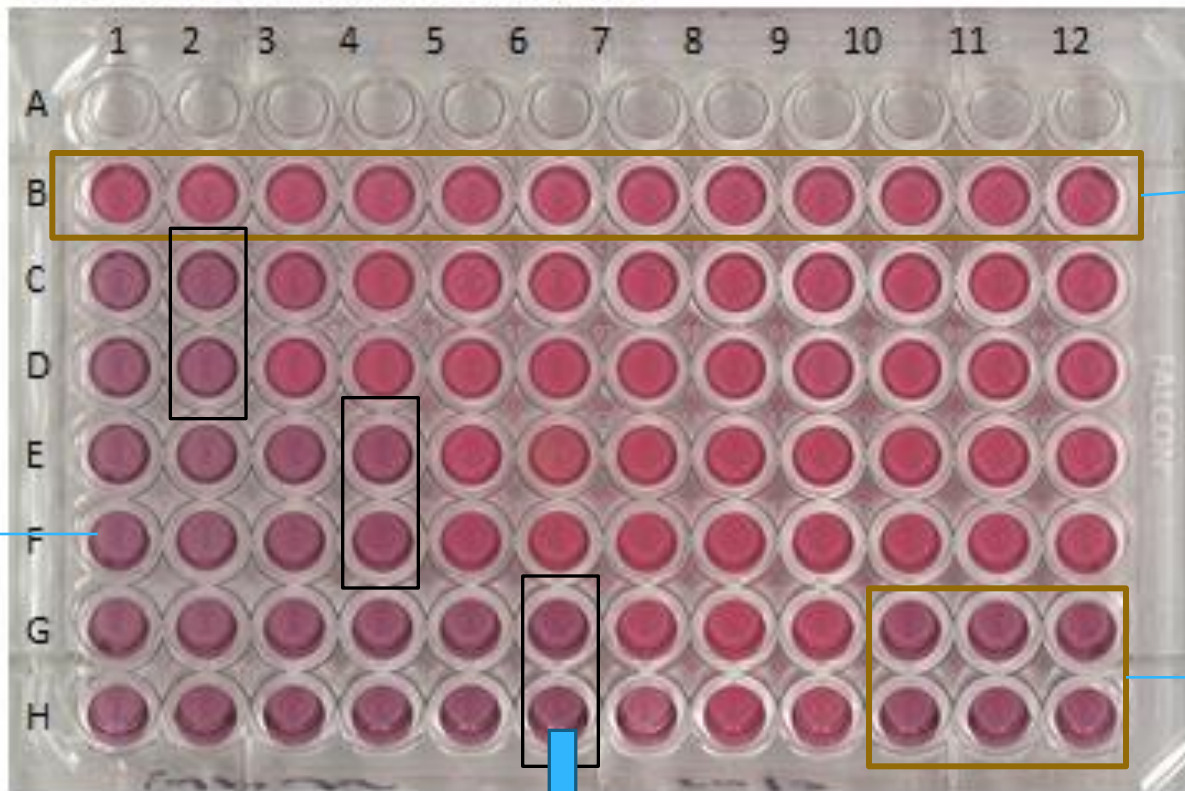


$\mu\text{g/ml}$  antibiotic

10  $\mu\text{g}$  antibiotic in discs

# Voorbeeld MIC test van 1 M bovis voor 3 AB

Mb2013-072 na 48h. incubatie bij 37°C



groeicontrôle

Geen groei

Alleen medium

Concentratie AB steeds lager

Min Inh Conc



# Resultaten, interpretatie

MIC:wat is interpretatie? bij welke concentratie is de kiem “resistent“ of “gevoelig” ?

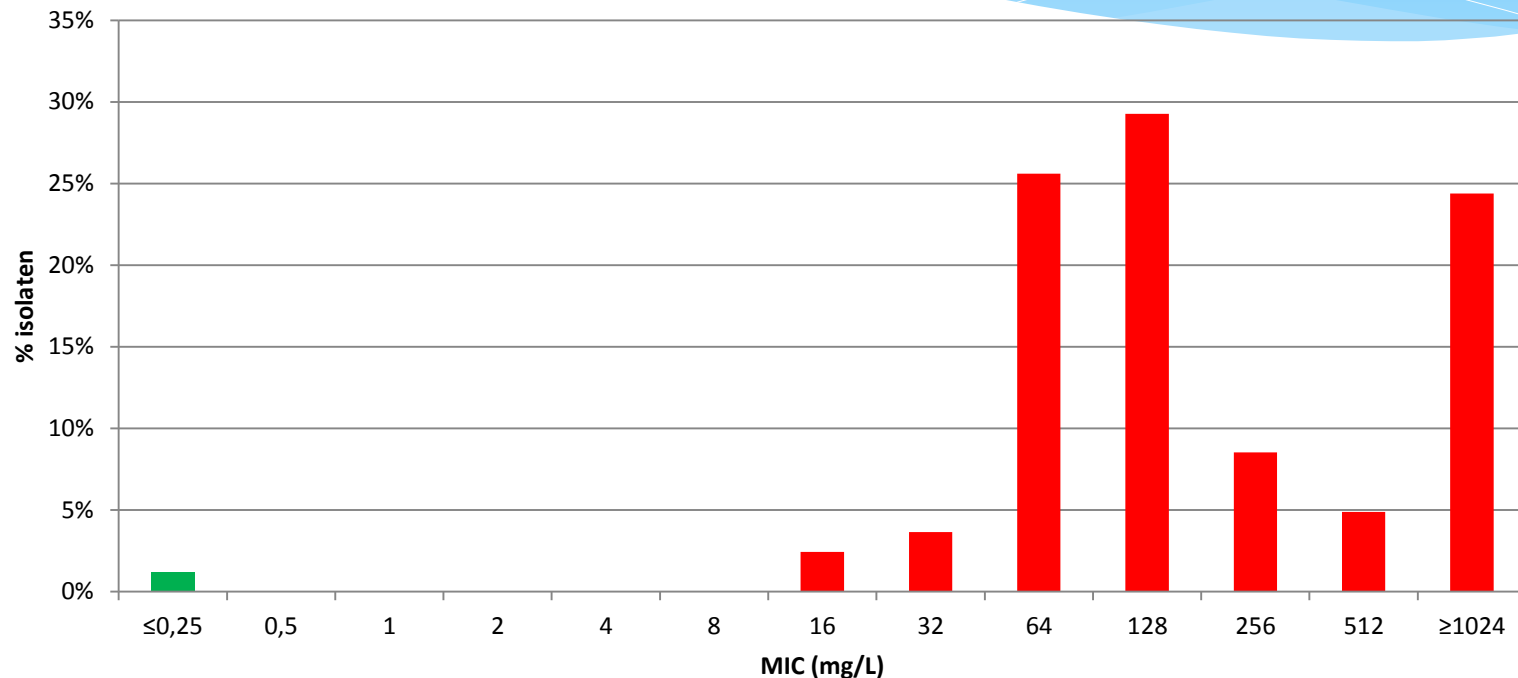
CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute:  
Geen breekpunten bekend ;

Wel: CLSI breekpunt Pasteurellaceae

Let wel: in lab  in het dier !

# Gevoeligheidsbepaling Mycoplasma

## Erythromycine



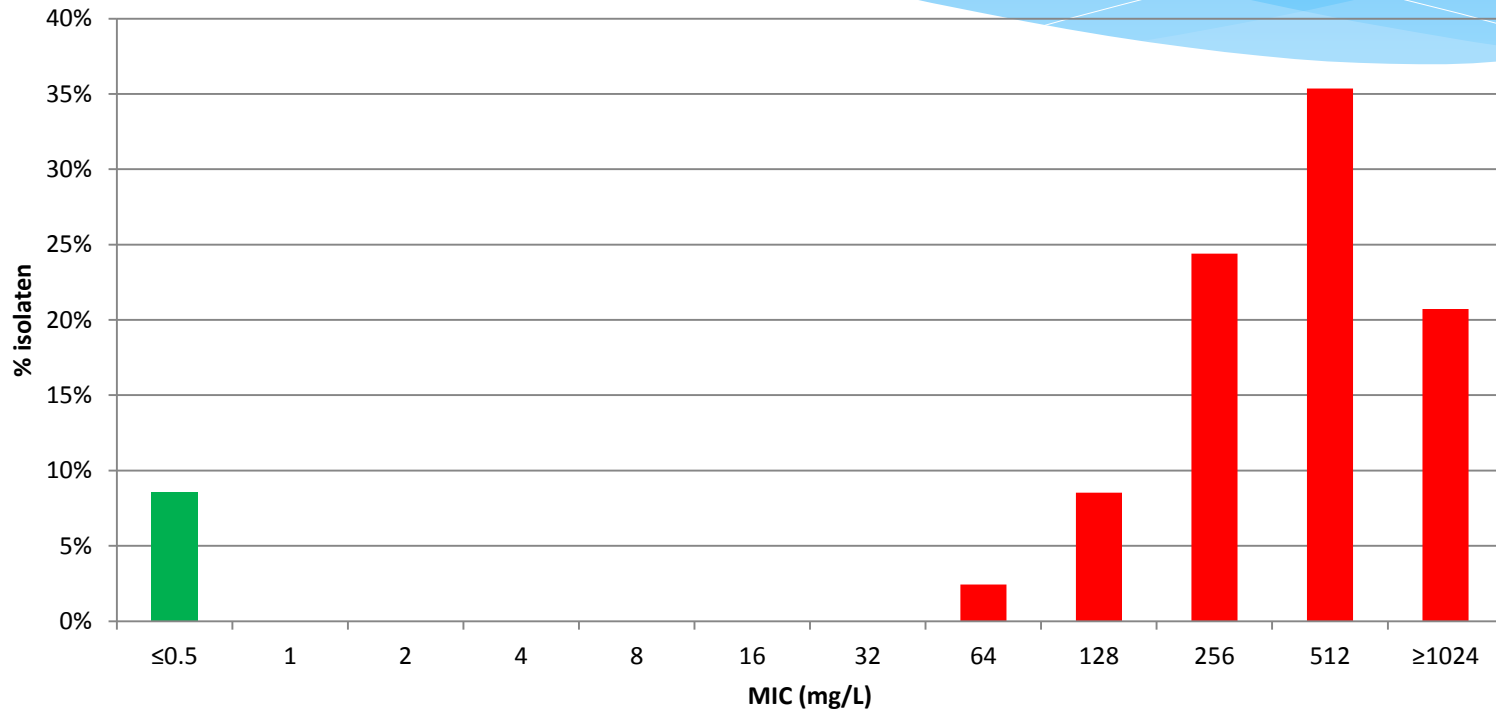
CLSI brekpunt zoals bij *Pasteurellaceae*:  $S \leq 2$  mg/L

1<sup>e</sup> keus, en: in vivo is niet in vitro, brekpunten onbekend

KNMvD Formularium Vleesvee: 1<sup>e</sup> keuze parenteraal

# Gevoeligheidsbepaling Mycoplasma

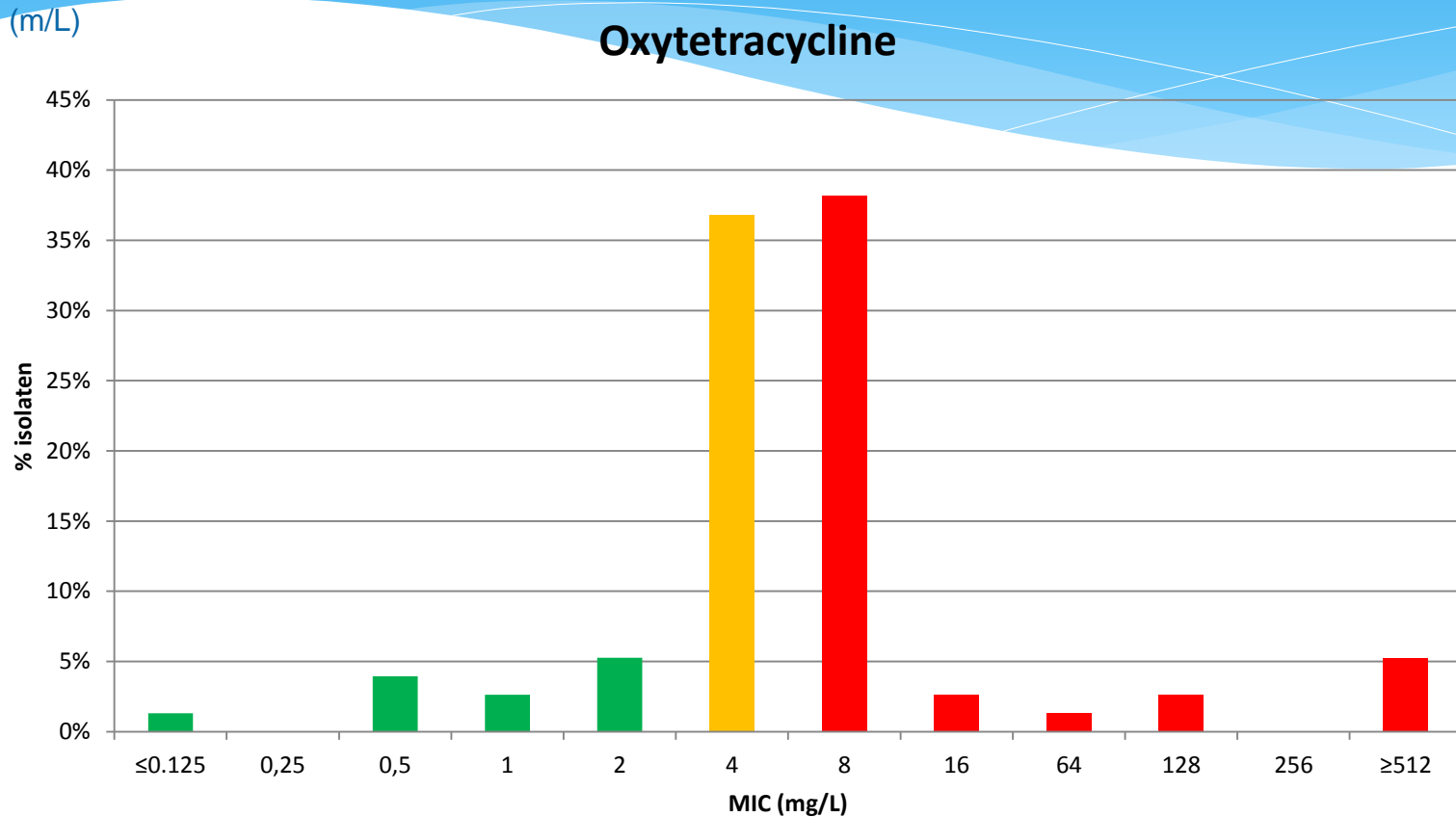
## Tilmicosine



CLSI brekpunt *Pasteurellaceae*: S≤8; I=16; R≥32 mg/L

KNMvD Formularium Vleesvee: 1<sup>e</sup> keuze parenteraal & oraal

# Gevoeligheidsbepaling Mycoplasma

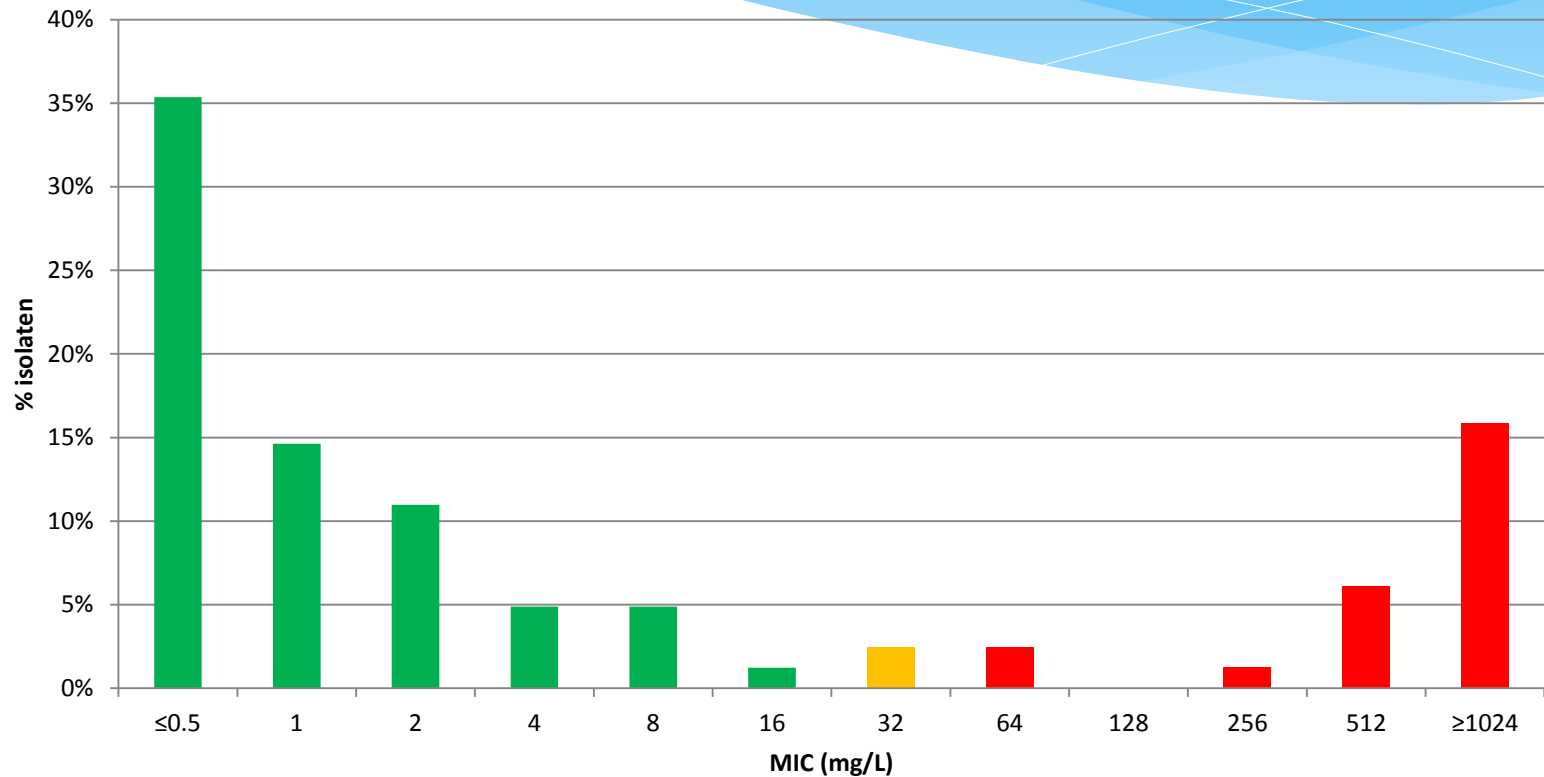


CLSI brekpunt *Pasteurellaceae*: S≤2; I=4; R≥8 mg/L

KNMvD Formularium Vleesvee: 1<sup>e</sup> keuze parenteraal

# Gevoeligheidsbepaling Mycoplasma

## Tulathromycine

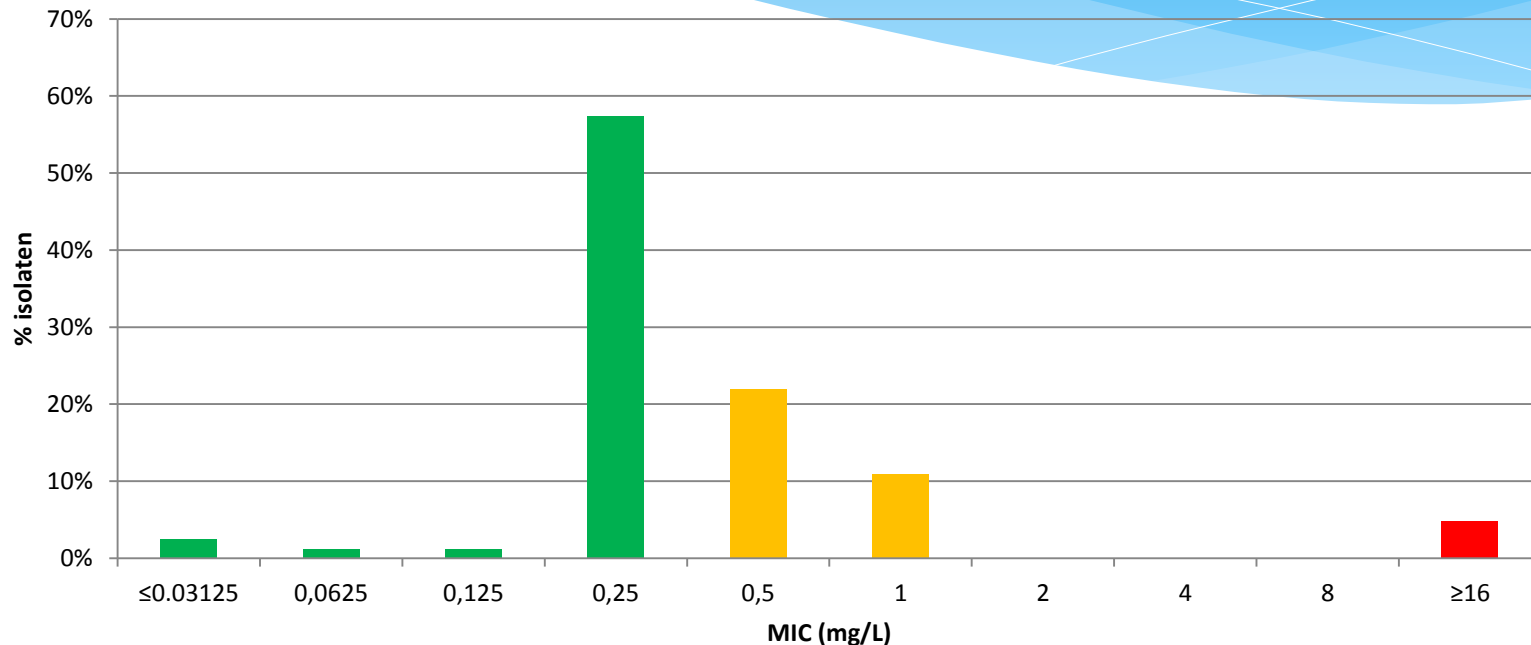


CLSI brekpunt *Pasteurellaceae*: S≤16; I=32; R≥64 mg/L

KNMvD Formularium Vleesvee: 2<sup>e</sup> keuze parenteraal

# Gevoeligheidsbepaling Mycoplasma

## Enrofloxacin



CLSI brekpunt *Pasteurellaceae*: S≤0,25; 0,5≤ I≤1; R≥2 mg/L

KNMvD Formularium Vleesvee: 3<sup>e</sup> keuze parenteraal & oraal

# Mycoplasma MIC

MIC bepaling *Mycoplasma* mbv microbouillonverduunningsmethode

Annet Heuvelink  
Constance Reugebrink

Veterinary Microbiology 189 (2016) 1–7



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Microbiology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/vetmic](http://www.elsevier.com/locate/vetmic)



## Antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma bovis* isolates from veal calves and dairy cattle in the Netherlands



Annet Heuvelink\*, Constance Reugebrink, Jet Mars

*GD Animal Health, Ambergstraat 7, 7418 EZ, Deventer, the Netherlands*

### ARTICLE INFO

**Article history:**  
Received 11 December 2015  
Received in revised form 6 April 2016  
Accepted 9 April 2016

**Keywords:**  
Bovine  
*Mycoplasma bovis*  
Antimicrobial  
Susceptibility

### ABSTRACT

Control of *Mycoplasma bovis* infections depends on good husbandry practices and antibiotic treatment. To allow more prudent use of antimicrobial drugs, there is a need for information on the susceptibility profile of this pathogen. The objective of the present study was to analyse the *in vitro* antimicrobial susceptibility of clinical *M. bovis* isolates in the Netherlands. The collection comprised 95 bovine isolates, originating from lungs ( $n=56$ ), mastitis milk ( $n=27$ ), and synovial fluid ( $n=12$ ), collected between 2008 and 2014. Minimal inhibitory concentrations (MICs) were assessed by broth microdilution, both by using in-house prepared MIC plates and by using commercially available MIC plates. For each antimicrobial agent, the range of MIC results, the MIC<sub>50</sub>, and MIC<sub>90</sub> values were calculated. *M. bovis* strains recently isolated in the Netherlands appeared to be characterized by relatively high MIC values for antimicrobial agents that, until now, have been recommended by the Dutch Association of Veterinarians for treating pneumonia caused by *Mycoplasma* species. Fluoroquinolones appeared to be the most efficacious in inhibiting *M. bovis* growth, followed by tulathromycin and oxytetracycline. The highest MIC values were obtained for erythromycin, tilmicosin, and tylosin. Future studies should be done on determining *M. bovis* specific clinical breakpoints, standardization of methods to determine MIC values as



# Doel

- \* Genen en mutaties in genen vinden in *M. bovis* die betrokken zijn bij resistentie tegen macrolides, fluoroquinolones en tetracyclines.
- \* Vergelijken van deze resultaten met resistentie (MIC)  
Overeenkomst tussen genen en mutaties en MIC waarden
- \* Deze data gebruiken voor de ontwikkeling van een sneltest om resistentie in *M. bovis* aan te tonen:

Micro-array



# Doel

Micro-array:

ultieme doel is om een monster uit een long (longspoelsel) direct op de array te testen om te ontdekken of er ergens resistentiegenen aanwezig zijn voor bepaalde antibiotica

(dus zonder direct de verantwoordelijke kiem aan te tonen of op te kweken)

# basis

- \* Eerst maar eens de genen en mutaties opsporen.....
- \* Vergelijken van deze resultaten met MIC resultaten:  
Kunnen we de fenotypische resistentie  
“verklaren” door specifieke mutaties en genen?

# Materiaal en Methode

- *Mycoplasma* isolaten GD
  - Kalveren met luchtwegproblemen
  - Runderen met mastitis / artritis
  - Referentiestammen
  
- Daarna ook 30 *M.bovis* uit veldproeven



Herkomst	N
Long	56
Melk	27
Punctaat	10
<i>Totaal</i>	<i>93</i>

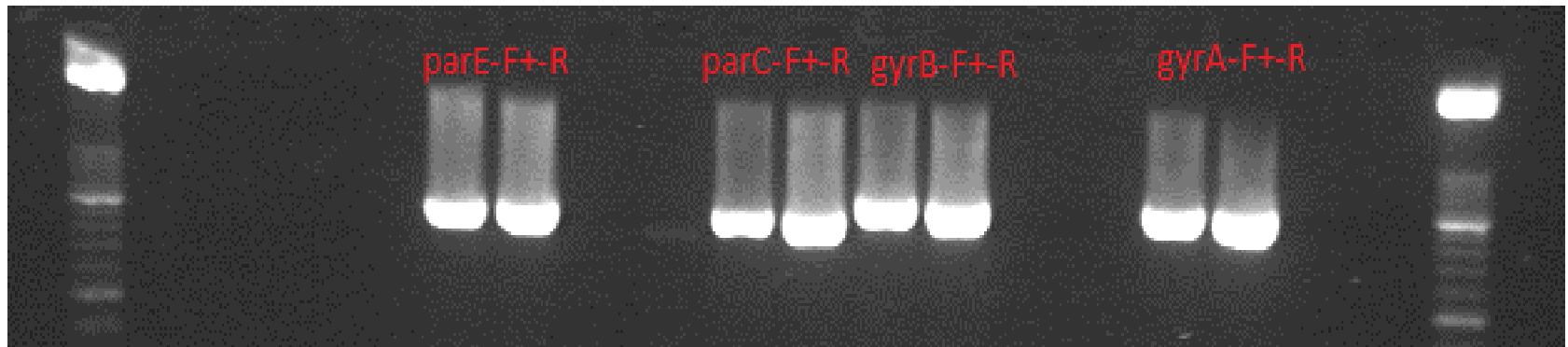
# Materiaal en Methode

- *Mycoplasma* isolaten
- MIC bepaald
- *M. bovis* (PCR) bevestigd
- In literatuur gevonden genen en mutaties
- Gen specifieke PCR's ontwikkeld
- Sequentie analyse van de PCR produkten
- Data-analyse in BioNumerics en Stata

Antibiotic group	Target
Tetracyclines	tetM
	16S rRNA
Macrolides	23srRNA
	domain II
	23 rRNA domain V
	rpID (L4)
	rpIV (L22)
Fluoroquinolones	gyrA
	gyrB
	parC
	parE

# Conventionele PCRen

- \* Bijvoorbeeld PCR voor resistentie genen fluoroquinolonen => sequentieanalyse van deze PCR produkten



# Resultaten Fluoroquinolones (enrofloxacin)

\* *gyrB* en *parE* géén relevante mutaties

Niet in  
longspoelsels

\* In gen *gyrA* mutatie in 4 van 93 *M. bovis* isolaten:  
zorgt voor één aminozuurverandering

Niet in  
longspoelsels

\* In *parC* mutatie in 13 van 93 *M. bovis* isolaten  
zorgt voor één aminozuur verandering

\* 3 isolaten beide mutaties: hoge MIC's=resistent

# Oxytetracycline

- \* *tetM* gen niet aangetoond in *M. bovis* isolaten
- \* Wel isolaten met hoge(re) MIC waarden gevonden
- \* Ander resistentie mechanisme? Lit, verder onderzoek

# Conclusies

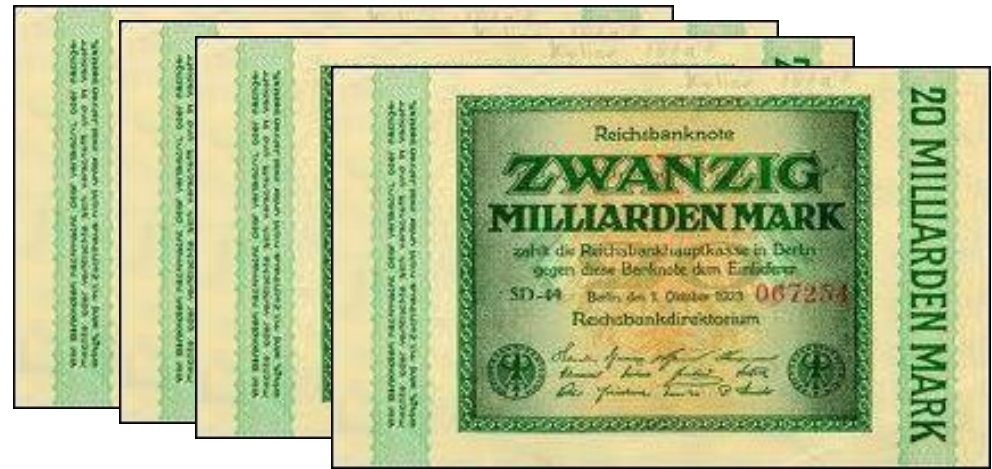
- \* Bruikbare MIC bepaling voor *Mycoplasma* ontwikkeld
- \* Verschillende mutaties gevonden in *M. bovis* met significante associatie met resistentie voor de gebruikte antibiotica
- \* Deze mutaties kunnen gebruikt worden voor de ontwikkeling van Micro-array op longspoelsels
- \* Echter: Nog lang niet alle resistentie mechanismen in *M. bovis* gevonden
- \* Verder onderzoek is nodig



# Vervolg 1H4F-DOT-Long

- \* Plannen voor 4 jaar nieuw onderzoek goedgekeurd
- \* O.a. Nadere typering *M. bovis*:
  - MLST typering
  - Whole genome sequentie analyse
  - Vervolg Ontwikkeling en validatie Micro-array AR genen
  - Methode concentreren/verhogen detectie *M. bovis* uit longspoelsel
  - Onderzoek virulentiefactoren *M. bovis*

- \* Financiering nog niet rond



# PPS 1Health4Food

Dank u



**1HEALTH**  
**4FOOD**

Veilig voedsel  
produceren



nederlandse zuivel organisatie



Universiteit Utrecht



FOOD GROUP



Stichting  
Brancheorganisatie  
Kalversector



MSD



KETENORGANISATIE VAN DE ZUIVELSECTOR



Ministerie van Economische Zaken



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