

## Samenvatting

Het doel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift was het vaststellen van de rol van bacteriële biofilm vorming bij therapie falen in het geval van mastitis bij het melkgevend rund. Biofilms zijn “a structured community of bacterial cells enclosed in a self produced matrix and adherent to an inert or living surface” (Costerton) ofwel ze zijn “een georganiseerde gemeenschap van bacteriën gekluisterd in een zelf geproduceerd omhulsel dat gehecht is aan een inert of levend oppervlakte”. Vanaf 1990 worden bacteriële biofilms onderzocht in relatie met chronische infecties. Sinds die tijd worden biofilm-gerelateerde infecties onderkend voor tal van humane bacteriële infectieziekten, zoals: ziekenhuisinfecties door *Staphylococcus aureus* en *epidermidis*, prostaatinfecties en blaasontsteking door *E. coli* en tandcariës, tandvleesontsteking en hartklepontsteking door *Streptococcus spp.*. Deze bacterie soorten zijn ook belangrijke veroorzakers van mastitis bij het rund.

Gezien de grote hoeveelheid informatie over biofilm vorming bij humane *S. aureus* infecties en het gebrek aan informatie over biofilm vorming bij *S. aureus* infecties in geval van mastitis bij runderen is besloten het onderzoek hierop te richten.

Allereerst werd bekeken of *S. aureus*, geïsoleerd uit runderen met mastitis, onderzocht kon worden in een antibiotica gevoeligheidstest waarin de bacteriën als biofilm werden gekweekt. Tijdens het onderzoek werd een nieuwe testmethode ontwikkeld waarmee de antibiotica gevoeligheid van bacteriën, groeiend in biofilm, beoordeeld kan worden. De verminderde gevoeligheid voor antibiotica van bacteriën groeiend in biofilm wordt veroorzaakt door drie mechanismen: 1) een tragere stofwisseling van de bacteriën in de biofilm, 2) de aanwezigheid van een beschermende omhullende laag rondom de bacteriën, en 3) een gewijzigd gedrag van bacteriën resulterend in het voorkomen van persistente ofwel overlevende cellen.

De uitkomsten van dit onderzoek werd vergeleken met de uitkomsten van de standaard antibiotica gevoeligheidstesten. Het bleek dat alle isolaten goed in staat waren om als biofilm te groeien en dat de gevoeligheid voor antibiotica 100 tot 1000 keer lager was voor de biofilm bacteriën, in vergelijking met de klassieke antibiotica gevoeligheidstesten. Volgens deze uitkomsten leek het onwaarschijnlijk dat er überhaupt nog *S. aureus* mastitis infecties effectief behandeld zouden kunnen worden, en dit leek niet in overeenkomst met de werkelijkheid.

Vanuit verschillende onderzoeken is bekend dat de duur van de antibioticabehandeling van invloed is op de effectiviteit van een behandeling; hoe langer een behandeling voortgezet wordt (bijvoorbeeld 5 dagen ipv 2 dagen) des te beter is de genezing na behandeling. Dit heeft geleid tot de ontwikkeling van een verlengde biofilm antibiotica gevoeligheids test, waarbij het effect van de duur van antibiotica behandeling gemeten werd. De uitkomsten lieten zien dat door een verlengde antibiotica blootstelling inderdaad een positief resultaat gezien werd bij de biofilm bacteriën, met echter duidelijke verschillen tussen bacterie stammen.

Tevens bleken oudere biofilms beduidend minder gevoelig voor antibiotica behandeling dan jonge biofilms, waardoor het praktische belang van vroege behandeling na vaststellen van de infectie duidelijk werd.

Aan de hand van een uitgebreide verzameling *S. aureus* mastitis isolaten die in 2006 in Nederland geïsoleerd waren uit melkkoeien in het kader van het UGCN (Uier Gezondheids Centrum Nederland) mastitis onderzoeksprogramma is nader onderzoek gedaan. De mate van biofilm vorming werd gemeten, en de aanwezigheid van genen die verondersteld werden invloed te hebben op biofilm vorming werd bepaald. Tevens werd onderzoek gedaan naar het type van de genen die het virulentie gedrag aansturen (*Agr*, *Assessory Gene Regulator*. Type I, II, III of IV) en de aanwezigheid van resistentie genen. De belangrijkste uitkomsten lieten zien dat er een duidelijke relatie is tussen het type *Agr* gen, en de mate van biofilm vorming. Tevens had het type *Agr* gen een zeer grote invloed op de kans op aanwezigheid van penicilline resistentie genen. Dit laatste was een zeer opmerkelijke bevinding, omdat het sterk de suggestie wekt dat er subpopulaties *S. aureus* bacteriën zijn, waarvan de ene subpopulatie wel, en de andere niet ontvankelijk is voor penicilline resistentie genen. Verder bleek de aanwezigheid van enkele niet- resistentie genen een duidelijke invloed te hebben op de antibiotica gevoeligheid van de biofilm bacteriën.

Aan de hand van eerder onderzoek naar de aanwezigheid van verschillende typen *Agr* genen onder *S. aureus* mastitis isolaten kon een groot verschil gevonden worden tussen onze resultaten en eerder onderzoek. Omdat het eerdere onderzoek was gebaseerd op *S. aureus* mastitis isolaten die tussen 1960 en 2000 geïsoleerd waren in het buitenland, werd besloten een verzameling oudere (1988 - 1994) Nederlandse isolaten te onderzoeken. Deze historische verzameling bleek een vergelijkbare *Agr* type verdeling te bevatten als de eerder onderzochte buitenlandse isolaten. Door de koppeling van het *Agr* type met penicilline resistentie is het logisch dat er tegelijkertijd ook een wijziging heeft plaatsgevonden in het voorkomen van penicilline resistentie bij *S. aureus* mastitis isolaten. Dit kon inderdaad bevestigd worden door historische gegevens, immers rond 1970 was het percentage penicilline resistente isolaten 50%, rond 2000 was het 25% en momenteel is het gedaald naar 10%. Omdat deze verandering in de antibiotica gevoeligheid niet goed verklaard kon worden door een verandering in antibioticum gebruik, werd in de literatuur gezocht naar redenen voor de verandering in frequentie van voorkomen van de verschillende *Agr* typen.

Recent onderzoek heeft aangetoond dat *S. aureus* isolaten van het *Agr* type waar wel penicilline resistentie bij voorkomt (*Agr* type I) in veel hogere mate binnenkomen in de cellen van de gastheer dan het *Agr* type waar geen penicilline bij voorkomt (*Agr* type II). Het binnendringen in de gastheercellen gaat tevens gepaard met een veel sterkere reactie van het afweersysteem van de gastheer, resulterend in een uitgebreide cellulaire immuunreactie. Deze verschillen in virulentie- gedrag tijdens infectie tussen de verschillende *Agr* typen, en de

resulterende verschillen in cellulaire immunreactie, zouden logischerwijs resulteren in verschillen in de mate van celgetal verhoging na een uierinfectie. Een infectie met het penicilline resistente *Agr* type I zou resulteren in een sterkere melk celgetal stijging in vergelijking met een penicilline gevoelige *Agr* II type infectie.

Een van de belangrijkste veranderingen voor de melkveehouderij was de invoering van het melktank celgetal als kwaliteits- criterium voor melkleveranties aan de melkfabriek. Bacteriële mastitisinfecties, zoals met een *S. aureus* bacterie, worden algemeen gezien als de belangrijkste reden voor celgetal verhogingen in de melk van runderen. Het celgetal limiet voor melkleveranties werd in 1971 gesteld op 1.000.000 cellen per ml melk, en stapsgewijs verlaagd naar 400.000 cellen in het jaar 2000. Tegelijkertijd is de frequentie van penicilline resistente *S. aureus* mastitis isolaten afgenomen.

De invoering van de melktank celgetal limieten heeft geleid tot een sterke selectiedruk op koeien met een chronisch verhoogd celgetal. Vanwege de onmogelijkheid om melk te verkopen met een te hoog celgetal, zijn vele koeien met een chronisch hoog celgetal afgevoerd.

Een opmerkelijke praktische conclusie van ons onderzoek is dan ook dat het voorkomen van penicilline resistentie is afgenomen door de selectie op koe celgetal. Omdat de penicilline gevoelige *S. aureus* isolaten (vooral *Agr* type II) meer biofilm produceren dan de penicilline ongevoelige *S. aureus* isolaten, lijkt het belang van biofilm vorming bij therapie falen toegenomen te zijn. Echter de *in vitro* biofilm antibiotica gevoeligheidstesten geven aan dat met een vroegtijdige en voldoende lange antibiotica therapie deze *S. aureus* isolaten beter te behandelen zijn dan de penicilline resistente isolaten.

De betekenis van het onderzoek voor de dierenarts in de praktijk is dat we nu een mogelijke verklaring hebben voor de teleurstellende therapie resultaten van *S. aureus* mastitis infecties bij het rund. De mogelijkheid van *S. aureus* bacteriën om biofilms te vormen maakt deze bacteriën ongevoelig voor antibiotica, zonder dat daar resistentie genen voor nodig zijn. Daarbij verklaren de mogelijkheid om biofilm te vormen ook twee verschijnselen, welke algemeen bekend zijn uit de dagelijkse praktijk. Ten eerste is bekend dat koeien met een zeer langdurige *S. aureus* mastitis nagenoeg geen kans hebben op genezing bij antibiotica behandeling. Dit komt overeen met het feit dat oudere biofilms ongevoeliger zijn voor antibiotica in vergelijking met jonge, pas ontstane biofilms. Ten tweede is bekend dat een langere antibiotica behandeling de kans op genezing verhoogd, en dit komt overeen met de resultaten uit ons onderzoek, waarbij de effectiviteit van de antibiotica verbeterd door de bacteriën hieraan langduriger bloot te stellen. De uitkomsten bieden een rationele basis voor een vroegtijdige, en voldoende lange antibiotica behandeling in het geval van *S. aureus* mastitis.