

Bedrijfsgebonden dierziekten (BO-08-010.02-019)

*Luchtwegproblemen en de problemen rondom de diagnostiek van
luchtwegaandoeningen in de Nederlandse vleeskalverhouderij.*

Adriaan F.G. Antonis



CENTRAL VETERINARY INSTITUTE

WAGENINGEN 

Bedrijfsgebonden dierziekten (BO-08-010.02-019)

*Luchtwegproblemen en de problemen rondom de diagnostiek van
luchtwegaandoeningen in de Nederlandse vleeskalverhouderij.*

Adriaan F.G. Antonis



Rapportage versie 5 maart 2013

Contents

Voorwoord	4
Inleiding	5
1. Doel	6
2. Aanpak	6
2.1. Sterkte en zwakte analyse diagnostische tools	7
2.1.1. Boviene herpesvirus 1 (BHV1)	7
2.1.2. Boviene virale diarree virus (BVDV)	8
2.1.3. Boviene parainfluenza 3 virus (PI3V)	8
2.1.4. Boviene Respiratoire Syncytieel Virus (BRSV)	8
2.2. Goed gedefinieerde controle monsters	9
2.2.1. Boviene herpesvirus 1 (BHV1)	10
2.2.2. Boviene virale diarree virus (BVDV)	10
2.2.3. Boviene parainfluenza 3 virus (PI3V)	10
2.2.4. Boviene Respiratoire Syncytieel Virus (BRSV)	10
2.3. Eerste evaluatie van beschikbare diagnostische tools	10
2.3.1. Bovine herpesvirus 1 (BHV1)	11
2.3.2. Bovine virale diarree virus (BVDV)	11
2.3.3. Boviene parainfluenza 3 virus (PI3V)	12
2.3.4. Bovine Respiratoir Syncytieel Virus (BRSV)	12
2.4. Een verkennend onderzoek in de kalverhouderij	13
2.4.1. Casussen versus controlecasussen	13
2.4.2. Virologisch onderzoek	14
2.4.3. Bacteriologisch onderzoek	14
2.4.3.1. <i>Mannheimia haemolytica</i>	15
2.4.3.2. <i>Pasteurella multocida</i>	15
2.4.3.3. <i>Arcanobacterium pyogenes</i>	15
2.4.3.4. <i>Haemophilus somnus</i>	15
2.4.4. Mycoplasma onderzoek	16
3. Resultaten	17
3.1. Sterkte-zwakte analyse diagnostische tools	17
3.2. Goed gedefinieerde controle monsters	17
3.3. Eerste evaluatie van beschikbare diagnostische tools	17
3.3.1. Bovine herpesvirus 1 (BHV1)	17

3.3.2.	Bovine virale diarree virus (BVDV)	18
3.3.3.	Bovine parainfluenza 3 virus (PI3V).....	18
3.3.4.	Bovine Respiratoir Syncytieel Virus (BRSV)	19
3.4.	Piloteren in de kalverhouderij	19
3.4.1.	Klinische verschijnselen.....	21
3.4.2.	Virale diagnostiek op basis van virusisolatie	22
3.4.3.	Virale diagnostiek op basis van serologisch onderzoek	23
3.4.4.	Bacteriële diagnostiek	24
3.4.5.	Mycoplasma onderzoek	25
3.4.6.	Antibioticum gevoeligheidsbepalingen	26
4.	Conclusies.....	29
5.	Aanbevelingen voor de toekomst	32
6.	Literatuur.....	34
	Bijlage 1 Uitslagen per pathogeen / per bedrijf	35

Voorwoord

Beste lezer,

Voor u ligt de rapportage van het project “Luchtwegproblemen en de problemen rondom de diagnostiek van luchtwegaandoeningen in de Nederlandse vleeskalverhouderij”, geschreven door Dr. Adriaan F.G. Antonis. Voor onszelf en voor het ministerie van EL&I was dit een spannend project. Hoewel endemische ziekten de verantwoordelijkheid zijn van de sector, hebben we in dit project duidelijk te maken met de relatie tussen het optreden van endemische dierziekten en de behandeling van dieren met antibiotica. Juist op dit terrein voert de overheid een duidelijk beleid. Het ministerie van EL&I bevordert dan ook de ontwikkeling van nieuwe kennis en instrumentarium om bedrijfsgebonden dierziekten op alternatieve wijzen, zowel preventief als therapeutisch, te bestrijden.

Dr. Antonis is recent gepromoveerd binnen het veld van de respiratoire aandoeningen bij kalveren. Hij heeft diverse nieuwe testen ontwikkeld en oude testen opgepakt. Tezamen met zijn ambitie om binnen de kalverensector rondom het thema bedrijfsgebonden dierziekten een lerend netwerk op te zetten, ontstond de mogelijkheid een diagnostisch onderzoek te starten. Implementatie via dierenartsenpraktijken met op de achtergrond inzet van het CVI. Aandacht is besteed aan het overleg van dierenartsen met kalverhouders en representanten uit de sector. Verrassend waren onder andere de resultaten met betrekking tot de diagnostiek: wat minder virale problematiek dan verwacht terwijl bacteriën (incl. mycoplasma's) meer problemen geven dan verwacht. De uitkomsten bieden de sector nieuwe handvaten voor preventie en controle van ziekte.

Ik nodig u uit om de rapportage te lezen. Hopelijk is dit een eerste stap is op weg naar een nieuw onderzoeksprogramma ‘bedrijfsgebonden dierziekten’. Aanbevelingen zijn onder meer het doorzetten van het lerend netwerk, waarmee nu een begin is gemaakt, en het door ontwikkelen van handzame diagnostiek waaronder ook multi-diagnostiek.

Rest mij de sectorale representanten, Ir. J. de Groot, Dhr. J. Achterstraat, Dhr. P. Mölder en deelnemende dierenartsen parktijken: Diergezondheidscentrum Boven-Veluwe, DAP Thewi te bedanken voor de openheid en het enthousiasme waarmee ze met ons hebben gewerkt. Het is bijzonder dat we in zo'n korte tijd, drie maanden, zoveel monsters uit de praktijk hebben mogen ontvangen en weten te analyseren!

Andre Bianchi

Directeur CVI van Wageningen UR

Inleiding

Het diergezondheidsbeleid, zoals vastgelegd in de Nationale Agenda Diergezondheid (NAD), stelt de veehouder in de eerste plaats zelf verantwoordelijk voor de gezondheid van zijn dieren. Hoewel de meeste veehouders op professionele wijze omgaan met de gezondheidszorg van hun dieren, is er sprake van een aantal bedrijfsgebonden gezondheidsproblemen dat in grote mate voorkomt in de huidige veehouderij. Als gevolg van deze bedrijfsgebonden aandoeningen kan een hoog antibioticumgebruik ontstaan, met het gevaar van antibioticumresistenties. Voor de bedrijfsgebonden dierziekten die een zoönotische karakter hebben, kan de gezondheid van de veehouder en het deel van de (beroeps)bevolking dat met de dieren in aanraking komt een belangrijke extra reden voor aandacht zijn. Daarnaast wordt het welzijn van dieren in aanzienlijke mate geschaad door sommige bedrijfsgebonden diergezondheidsproblemen. De doelstellingen van de NAD om bedrijfsgebonden diergezondheidsproblemen zoveel mogelijk terug te dringen raakt derhalve aan de politieke agenda op het gebied van dierwelzijn, preventie van zoönosen en vermindering van antibioticumgebruik en -resistentie. Het terugdringen van bedrijfsgebonden aandoeningen is daarmee een onlosmakelijk onderdeel van het werken aan een duurzame veehouderij.

De NAD agendeert vermindering van de bedrijfsgebonden dierziekten als gezamenlijk actiepoint van het bedrijfsleven en de overheid. In 2008 en 2009 is een inventarisatie uitgevoerd van de belangrijkste bedrijfsgebonden ziekten op varkens, rundvee en pluimveebedrijven (Bergevoet et al. / rapport 384, augustus 2010). Deze inventarisatie dient onder andere als aanzet voor de invulling van de rol van de overheid bij het terugdringen van bedrijfsgebonden diergezondheidsproblemen. Het ministerie stelt evenwel de sector en de veehouder als eerste verantwoordelijke voor de aanpak van bedrijfsgebonden diergezondheidsproblemen. Het ministerie vindt daarbij een aanpak vanuit de keten van groot belang. Een belangrijke beleidsdoelstelling in dit kader is de reductiedoelstelling voor het antibioticumgebruik. Deze moet in 2013 met 50% zijn teruggebracht. Deze beleidsdoelstelling vraagt om een stevige aanpak van bedrijfsgebonden diergezondheidsproblemen vanuit de verschillende diersectoren.

De aanpak van bedrijfsgebonden diergezondheidsproblemen vraagt om zowel kennisontwikkeling als kennisverspreiding gericht op de verbetering van huisvesting & management, om bestrijding en uitroeiing van endemische dierziekten en om het ontwikkelen van alternatieve behandelingstechnieken, die tot een verminderde inzet van antibiotica leiden (zie rapport Bergevoet et al.).

Voor de vleeskalverhouderij zijn door Bergevoet et al. De volgende bedrijfsgebonden aandoeningen geagendeerd: luchtwegproblemen (waaronder specifiek Bovine Respiratoir Syncytieel Virus, ook wel pinkengriep genoemd), maagdarmstoornissen (waaronder specifiek vermeld: *Clostridium botulinum* en coccidien maar ook voedingsstoornissen zonder specifiek gekoppeld agens) en Salmonellose. Om deze aandoeningen en daarmee het gebruik van antibiotica terug te dringen, worden een aantal algemene aanbevelingen gedaan. Maatregelen zouden genomen moeten worden gericht op de verbetering en/of ontwikkeling van diagnostische tools. Er moet gezocht worden naar meer, meer specifieke of alternatieve maatregelen voor de preventie van bedrijfsgebonden aandoeningen en er moet zou gezocht worden naar (alternatieve) therapeutische mogelijkheden.

Om de geïdentificeerde aandoeningen te kunnen beheersen, liggen er uitdagingen op het gebied van diagnostiek, kennisvergaring omtrent efficiënte preventie en bestrijding, therapie- en vaccinontwikkeling. Daarnaast liggen er uitdagingen op het gebied van onderwijs, advies en training om vergaarde kennis op een motiverende manier op veehouders over te brengen zodat deze kennis ook tot een juiste implementatie leiden. Een succesvolle aanpak bij het terugdringen van bedrijfsbonden aandoeningen vereist een multidisciplinaire aanpak.

Dit deelproject is uitgevoerd binnen het project inventarisatie en prioritering van bedrijfsgebonden dierziekten. Het deelproject is een verkennend onderzoek naar luchtwegproblemen bij vleeskalveren, waarbij is gefocust op de diagnostiek, de diagnostische mogelijkheden en de problemen rondom de diagnostiek. De uitkomsten van dit deelproject zijn beschreven in dit rapport.

1. Doel

Inventarisatie en een eerste evaluatie van beschikbare diagnostische tools, die nodig zijn om causale infectieuze agentia bij luchtwegproblemen te identificeren. In een verkennend onderzoek inventariseren welke pathogenen geïsoleerd worden bij kalveren met en zonder klinische verschijnselen van een luchtwegaandoening.

2. Aanpak

Luchtwegaandoeningen zijn veruit het belangrijkste gezondheidsprobleem bij kalveren. Alle kalveren komen vroeg of laat in aanraking met verschillende potentieel ziekteverwekkende micro-organismen. Het contact tussen een micro-organisme en gastheer kan wel of niet tot een infectie leiden. Als dit micro-organisme tot een infectie van de gastheer leidt, noemt men de gastheer vatbaar voor het micro-organisme. De vatbaarheid van de gastheer zegt niets over de vraag of de geïnfecteerde gastheer al dan niet met ziekteverschijnselen reageert. Niet iedere gastheer gaat ziekteverschijnselen tonen, wanneer ze in aanraking komen met ziekteverwekkende micro-organismen. Gastheren beschikken over een ingebouwd beschermingsmechanisme. Ziekteverwekkende micro-organismen moeten allerlei barrières passeren. Na een zogenaamde mechanische barrière komt een micro-organisme in aanraking met een eerstelijns verdedigingsgordel welke we het specifieke afweersysteem noemen. Het specifieke afweersysteem zal het specifieke afweersysteem op gang helpen en zorgen dat er een specifiek geheugen wordt aangezet wat de gastheer, bij een hernieuwd contact met hetzelfde micro-organisme, helpt een infectie te voorkomen of het klinisch effect van de infectie te minimaliseren.

Het aantonen van een ziekteverwekkend micro-organisme in het kalf zegt dus niets over een eventueel causaal verband tussen het micro-organisme (agens) en de ziekteverschijnselen. Daarom hebben wij in ons verkennend onderzoek ook monsters verzameld van kalveren, die geen ziekteverschijnselen van een luchtwegaandoening vertonen. Binnen ons verkennend onderzoek hebben wij ons gefocust op een aantal virussen, bacteriën en mycoplasmata, waarvan bekend is dat deze klinische problemen / luchtwegaandoeningen kunnen veroorzaken. Het klinische beeld, dat deze agentia afzonderlijk kunnen veroorzaken is bekend uit experimenteel onderzoek.

Het juist aantonen, of de diagnostiek, van een micro-organisme in het kalf is mede afhankelijk van een aantal factoren zoals de beschikbaarheid van een diagnostische test, de snelheid waarmee een

agens aangetoond kan worden, de gevoeligheid en de betrouwbaarheid van de test waarmee een specifiek agens aangetoond kan worden.

In het eerste deel van het project hebben we gekeken naar sterke en minder sterke eigenschappen van verschillende diagnostische tools van de meest belangrijke, vanuit de literatuur bekende, agentia (zie 3.1 Sterkte en zwakte analyse diagnostische tools). Om een indruk te krijgen van de gevoeligheid en de betrouwbaarheid van deze tools hebben we een panel van goed gedefinieerde controle monsters samengesteld (zie 3.2 goed gedefinieerde controle monsters). Vervolgens hebben we deze goed gedefinieerde controle monsters gebruikt voor een eerste evaluatie van een selectie van de beschikbare diagnostische tools (zie 3.3 Eerste evaluatie van beschikbare diagnostische tools). In het tweede deel van het project hebben we in een verkennend onderzoek, monsters verzameld van kalveren met klinische verschijnselen van een luchtwegaandoening. De gediagnosticeerde agentia zijn vergeleken met de geïsoleerde micro-organismen in kalveren die (nog) geen verschijnselen vertoonden van een luchtwegaandoening (zie 3.4 Piloteren in de vleeskalverhouderij).

De kennis die verzameld is moet de sector helpen bij een meer efficiënte bestrijding van de problematiek omtrent de luchtwegaandoeningen. De vergaarde kennis helpt bij het zoeken naar oplossingsrichtingen, zoals bijvoorbeeld de verbetering van de diagnostiek, de toepasbaarheid van de diagnostische tools, therapie- en vaccinontwikkeling, maar ook training van dierenartsen, veehouders en het ontwikkelen van het onderwijs.

2.1. Sterkte en zwakte analyse diagnostische tools

Beschikbare diagnostische tools zijn vergeleken in een sterkte-zwakte analyse om iets over bruikbaarheid van de tool te zeggen. Voorzichtige conclusies over de toepasbaarheid van de verschillende diagnostische tools onder praktijkomstandigheden zullen in hoofdstuk 5 geformuleerd worden. Hieronder eerst een overzicht van de meest voor de hand liggende virale agentia, waarvan verschillende diagnostische tools zijn vergeleken.

2.1.1. Boviene herpesvirus 1 (BHV1)

Bovine herpesvirus 1 (BHV1) behoort tot de alphaherpesvirussen, een subfamilie van de Herpesfamilie. BHV1 kan verschillende ziektes veroorzaken bij runderen, waarvan infectieuze bovine rhino-tracheïtis (IBR) de belangrijkste is. IBR is een acute ontsteking van de voorste luchtwegen, gekarakteriseerd door een rhinitis, tracheïtis en koorts. Het klinische beeld wordt in eerste instantie gekenmerkt door een heldere neusuitvloeiing, die in een later stadium meer muco-purulent wordt. De ophoping van secreta / excreta in de voorste luchtwegen kan tot een klinisch beeld van een acute benauwdheid leiden (verwijde neusgaten en met open-bek en gestrekte hals ademen). Bij een nauwkeurige inspectie van de voorste luchtwegen kan een beeld opleveren variërend van kleine met pus gevulde blaasjes tot een compleet witgekleurd / necrotisch celbeslag, wat als pathognomonisch voor IBR wordt beschouwd.

Hoewel de diagnose IBR / BHV1 op basis van het klinische beeld gesteld zou moeten kunnen worden kan een laboratorium diagnose, eventueel ter bevestiging, wenselijk zijn. Deze kan gesteld worden op basis van een serologisch onderzoek (aantonen van specifieke afweerstoffen tegen het BHV1 virus), virus isolatie, een fluorescente antistof kleuring van orgaanmateriaal of de detectie van viraal DNA m.b.v. moleculaire technieken (PCR).

2.1.2. Boviene virale diarree virus (BVDV)

Boviene virale diarree virus (BVDV) behoort tot de pestivirussen, een soort dat behoort tot de Flavivirusfamilie. Boviene virus diarree (BVD) is een economisch belangrijke virusziekte bij runderen. Er zijn verschillende klinische beelden ten gevolge van een BVDV infectie beschreven. Een acute BVDV infectie geeft meestal geen of milde klinische verschijnselen, maar kan o.a. een melkproductiedaling, een luchtwegaandoening, een tijdelijke algehele weerstandsvermindering of diarree tot gevolg hebben. Een infectie van een naïef (geen specifiek immunologisch geheugen tegen BVDV) drachtig rund, leidt tot een transplacentale infectie van de foetus. Het gevolg van de infectie is met name afhankelijk van de leeftijd van de foetus. Een transplacentale infectie voor de ca. 100^e dag van de dracht kan tot de geboorte van een persistent geïnficeerd kalf leiden. Deze persistent geïnficeerde kalveren herkennen het virus niet als lichaamsvreemd, maken geen specifieke afweerstoffen tegen het virus en zijn de belangrijkste verspreiders van het virus.

Voor het aantonen van BVDV zijn verschillende diagnostische tools beschikbaar, waarbij de virus isolatie als de gouden standaard wordt beschouwd. Er is een PCR beschikbaar waarmee persistent en transiënt geïnficeerde kalveren gediagnosticeerd kunnen worden. Beschikbare antigeen ELISA's lijken bruikbaar om persistente infecties aan te tonen, maar zouden minder geschikt kunnen zijn om transiënte infecties aan te tonen. De serologie tenslotte is bruikbaar bij transiënt geïnficeerde dieren, maar niet bij persistent geïnficeerde kalveren. De aanwezigheid van maternale afweerstoffen kan de diagnostiek m.b.v. serologie moeilijk of onmogelijk maken.

2.1.3. Boviene parainfluenza 3 virus (PI3V)

Boviene parainfluenza virus type-3 (PI3V) behoort tot de paramyxovirussen, een soort dat behoort tot de Paramyxovirusfamilie. PI3V wordt (samen met bRSV) gezien als één van de belangrijkste veroorzakers van het "*Bovine Respiratory Disease Complex*" (BRDC). PI3V is waarschijnlijk een ubiquitair virus. De meeste enkelvoudige ongecompliceerde infecties verlopen asymptomatisch of mild. Het gegeven daarentegen dat het virus met enige regelmaat geïsoleerd wordt uit runderen met ernstige klinische verschijnselen passend bij een voorste- en achterste luchtwegaandoening en andersom dat onder specifieke (experimentele) omstandigheden ernstige klinische verschijnselen geïnduceerd worden na inoculatie met PI3V, maken dat de klinische relevantie van het isoleren van dit virus niet onderschat mag worden.

2.1.4. Boviene Respiratoire Syncytieel Virus (BRSV)

Boviene respiratoir syncytieel virus (bRSV) behoort tot de pneumovirussen, een soort dat behoort tot de Paramyxovirusfamilie. BRSV wordt gezien als de meest belangrijke

veroorzaker van het belangrijkste veroorzakers van het “*Bovine Respiratory Disease Complex*” (BRDC). De meeste enkelvoudige ongecompliceerde infecties verlopen variërend van mild tot zeer ernstig. Van BRSV is inmiddels bekend dat er een leeftijdsafhankelijk effect is die de uitkomst van de klinische infectie mede bepaald.

Voor de hierboven beschreven virale agentia zijn verschillende diagnostische tools beschikbaar. De virussen kunnen relatief eenvoudig worden aangetoond in een virus isolatie test. Over het algemeen wordt de virus isolatie gezien als de gouden standaard test. De meeste bovine virussen veroorzaken een cytopathologisch effect wanneer de virussen zich in de gevoelige cellen, die voor deze test worden gebruikt, vermeerderen. Met een virus-specifieke immunologische kleuring wordt de diagnose bevestigd. BVDV toont geen cytopathologisch effect. Dit virus wordt direct aangetoond met een virus-specifieke immunologische kleuring. Een nadeel van de virus isolatie is dat de test i.h.a. lang duurt, variërend van drie dagen voor BHV1 tot zes/zeven dagen voor BRSV.

Diagnostisch tool	Sterke punten	Zwakke punten
Infectieus virus aantonen d.m.v. virus isolatie	Gouden standaard.	Duurt lang (drie tot zeven dagen)
Genetisch virus materiaal aantonen m.b.v. een PCR	Eenvoudig, snel en sensitief.	Toont ook niet infectieus virus aan.
Antigeen detectie m.b.v. een zogenaamde sneltest	Eenvoudig en snel.	Kans op vals negatieve uitslagen.
Specifieke afweerstoffen aantonen / serologie	Eenvoudig en snel.	Pas laat aantoonbaar, gepaarde sera nodig.

Voor BVDV en BRSV zijn diagnostische tools (commercieel) beschikbaar die genetisch virus materiaal aantonen. Deze tools (PCR) zijn relatief eenvoudig, snel en gevoelig. Als mogelijke beperking wordt wel aangegeven de PCR niet alleen infectieus (besmettelijk) maar ook niet-infectieus virus aantoonbaar.

Daarnaast zijn er ook een aantal zogenaamde “snelle testen” op de markt die wellicht direct bruikbaar zouden zijn voor gebruik op de plaats waar acute zorg nodig is. Deze testen zijn i.h.a. erg eenvoudig en snel uit te voeren, maar de kans op vals negatieve uitslagen is groter dan wanneer een virus isolatie of PCR wordt uitgevoerd.

Tenslotte bestaat in veel gevallen de mogelijkheid om een diagnose te stellen met behulp van serologisch onderzoek. In dat geval zijn in de meeste gevallen gepaarde sera nodig (afgenomen met een tussenliggende periode van drie weken). Een nadeel is de lange tijd voor een diagnose vastgesteld kan worden.

2.2. Goed gedefinieerde controle monsters

Een bank van goed gedefinieerde controle monsters werd aangelegd om bestaande diagnostische tools te kunnen evalueren, om eventuele nieuwe diagnostische tools in de toekomst te kunnen ontwikkelen en te kunnen valideren.

2.2.1. Boviene herpesvirus 1 (BHV1)

Een set van 51 monsters is geïdentificeerd als bank van goed gedefinieerde “controle” monsters. Deze monsters waren afkomstig uit, in het verleden uitgevoerd, experimenteel onderzoek. Achtentwintig (55%) monsters (exclusief twee “NB” monsters) werden in de virus isolatie test positief getest, negentien (37%) negatief en vier als niet te beoordelen (8%).

2.2.2. Boviene virale diarree virus (BVDV)

Een set van 89 monsters is geïdentificeerd als bank van goed gedefinieerde “controle” monsters. Deze monsters waren afkomstig uit, in het verleden uitgevoerd, experimenteel onderzoek. Achtendertig (43%) monsters werden in de virus isolatie test positief getest, eenenvijftig (57%) negatief.

2.2.3. Boviene parainfluenza 3 virus (PI3V)

Een set van 82 monsters is geïdentificeerd als bank van goed gedefinieerde “controle” monsters. Deze monsters waren afkomstig uit, in het verleden uitgevoerd, experimenteel onderzoek. Vierenvijftig (66%) monsters werden in de virus isolatie test positief getest, achtentwintig (34%) negatief.

2.2.4. Boviene Respiratoire Syncytieel Virus (BRSV)

Een set van 85 monsters is geïdentificeerd als bank van goed gedefinieerde “controle” monsters. Deze monsters waren afkomstig uit, in het verleden uitgevoerd, experimenteel onderzoek. Negenendertig (46%) monsters werden in de virus isolatie test positief getest, vierenveertig (52%) negatief en twee (2%) als niet te beoordelen.

Tabel 1 Samengevat aantal positieve en negatieve controle monsters voor de vergelijking van verschillende testsystemen

Virus isolatie	BHV1	BVDV	PI3V	BRSV
Positief	28	38	54	39
Negatief	19	51	28	44
Overig	4	0	0	2
Totaal	51	89	82	85

2.3. Eerste evaluatie van beschikbare diagnostische tools

Waar mogelijk werd een eerste evaluatie van eventuele direct beschikbare diagnostische tools uitgevoerd. Voor vier verschillende virale agentia (BHV1, BVDV, PI3V en BRSV) zijn monsters getest in de virus isolatie test, een zogenaamde sneltest (BHV1, BVDV en BRSV), een PCR (BVDV en BRSV) en een ELISA (PI3V). De resultaten van de verschillende testen zijn onderling vergeleken en beschreven in hoofdstuk 4.3.

2.3.1. Bovine herpesvirus 1 (BHV1)

Twee testen zijn onderling vergeleken. Monsters zijn getest in virus isolatie test en in een snelle test.

Voor de virus isolatie zijn de monsters geïncubeerd op een monolayer van embryonale bovine trachea (EBTr) cellen conform een standaard procedure. Deze cellen werden dagelijks beoordeeld op de aanwezigheid van een voor BHV1 specifiek celpathogeen effect (CPE): het achtereenvolgens afronden en loslaten van de cellen. Afhankelijk van de hoeveelheid infectieus virus wordt het CPE binnen 1 tot 3 dagen waargenomen. De celkweek werd na maximaal zes dagen afgebroken en met behulp van een gelabeld monoclonaal gericht tegen BHV1 werd een zogenaamde immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) uitgevoerd.

Als zogenaamde “snelle test” is de BIO-K 342 test van Bio-X Diagnostics (België) gebruikt. Het principe van deze test is gebaseerd op een Lateral Flow Devices technologie. Kort samengevat: de eventueel aanwezige lichaamsvreemde stof (antigeen) wordt gebonden door een specifieke (monoklonaal) antistof, verbonden aan de wand van de teststrip. Vervolgens wordt gewassen met een monoklonaal dat gelabeld is met een enzym en wat voor een kleuromslag in de test zorgt

2.3.2. Bovine virale diarree virus (BVDV)

De beschikbare monsters zijn getest in drie verschillende testsystemen: de virus isolatie test, een moleculair-diagnostische test (PCR) en een zogenaamde “snelle test”.

Voor de virus isolatie zijn de monsters geïncubeerd op een monolayer van embryonale bovine trachea (EBTr) cellen. Van BVDV is bekend dat de meeste virusstammen geen CPE veroorzaken. De celkweek werd na maximaal vijf dagen afgebroken en met behulp van een gelabeld monoclonaal gericht tegen BVDV werd een zogenaamde immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) uitgevoerd.

Met de LightCycler® RT-PCR wordt viraal (panpesti virus) RNA aangetoond in weefsel, witte bloedcellen, serum, plasma en eventuele andere lichaamsvloeistoffen (SOP 00-14-1288). Kort samengevat: Ribonucleïnezuur (Engels: Ribo Nucleic Acid), het erfelijke materiaal van het virus, wordt omgezet naar copy (c)DNA waarna het DNA vermenigvuldigd wordt of kan worden, gebonden wordt aan SYBR green, om met behulp van de specifieke LightCycler® software in een zogenaamde smeltcurve zichtbaar te maken.

Als zogenaamde “snelle test” is de SNAP* BVD Test van IDEXX gebruikt. Het principe van deze test is gebaseerd op de ELISA technologie. Kort samengevat: de eventueel in het monster aanwezige lichaamsvreemde stof (antigeen / BVDV) bindt aan toegevoegd antistof verbonden met een enzym. Dit complex bindt aan een antistof gericht tegen BVDV dat gebonden is aan het oppervlak. Activatie van het substraat zorgt voor een kleuromslag.

2.3.3. Boviene parainfluenza 3 virus (PI3V)

De beschikbare monsters zijn getest in twee verschillende testsystemen: de virus isolatie test en in een antigeen ELISA.

Voor de virus isolatie zijn de monsters geïncubeerd op een monolayer van embryonale bovine trachea (EBTr) cellen. Deze cellen werden dagelijks beoordeeld op de aanwezigheid van een voor PI3V specifiek celpathogeen effect (CPE): het achtereenvolgens afronden en loslaten van de cellen. De celweek werd na maximaal zeven dagen afgebroken en met behulp van een gelabeld monoclonaal gericht tegen PI3V werd een zogenaamde immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) uitgevoerd.

De BIO-K 338 Pulmotest van Bio-X Diagnostics (België) is een ELISA. Kort samengevat: de eventueel aanwezige lichaamsvreemde stof (antigeen) wordt gebonden door een specifieke (monoklonaal) antistof, verbonden aan de wand van de testplaat. Vervolgens wordt een monoklonaal dat gelabeld is met een enzym toegevoegd wat na toevoeging van een substraat voor een kleuromslag in de test zorgt.

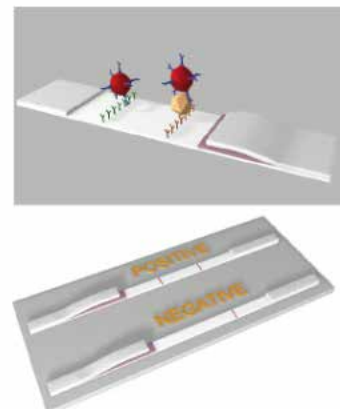
2.3.4. Bovine Respiratoir Syncytiaal Virus (BRSV)

De beschikbare monsters zijn getest in drie verschillende testsystemen: de virus isolatie test, een moleculair-diagnostische test (PCR) en in een zogenaamde “snelle antigeen test”.

Voor de virus isolatie zijn de monsters geïncubeerd op een monolayer van embryonale bovine trachea (EBTr)ellen. Deze cellen werden dagelijks beoordeeld op de aanwezigheid van een voor BRSV specifiek celpathogeen effect (CPE): de vorming van zogenaamde meerkernige reuscellen (syncytia). De celweek werd na maximaal zeven dagen afgebroken en met behulp van een gelabeld monoclonaal gericht tegen BRSV werd een zogenaamde immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) uitgevoerd.

Met de conventionele RT-PCR wordt viraal (BRSV) RNA aangetoond in neusuitvloeiSEL en longlavage materiaal. Kort samengevat: Ribonucleïnezuur (Engels: Ribo Nucleic Acid, RNA), het erfelijke materiaal van het virus, wordt omgezet naar copy (c)DNA waarna het DNA vermenigvuldigd wordt met BRSV specifieke primers. Het geamplificeerde (vermeerderde) DNA word op een agarosegel gebracht en zichtbaar gemaakt met ethidiumbromide.

Als zogenaamde “snelle test” is de BIO-K 253 test van Bio-X Diagnostics (België) gebruikt. Het principe van deze test is gebaseerd op een Lateral Flow Devices technologie. Kort samengevat: de eventueel in het monster aanwezige lichaamsvreemde stof (antigeen / BRSV) bindt aan colloïdaal goud met specifieke antilichamen tegen BRSV. Binding van dit complex aan specifieke antistoffen tegen BRSV die in een lijn op de teststrip zitten zorgt voor het zichtbaar worden van het signaal.



Figuur 1BIO K 253 - BRSV Strips

2.4. Een verkennend onderzoek in de kalverhouderij

De eerste resultaten van een pilotexperiment (concreet ervaren en observeren en een eerste aanzet tot een vertaling naar de theorie). In totaal zijn twintig verschillende bedrijven in het kader van dit verkennend onderzoek bezocht en bemonsterd. Op basis van het door de practicus ingevulde anamnese formulier zijn de bemonsterde kalveren geïnclassificeerd als “case” of “controlecase”. Casussen zijn kalveren met min of meer ernstige klinische verschijnselen van een voorste- en/of achterste luchtwegaandoening. Alle kalveren waren minimaal 3 weken oud. Van alle kalveren zijn longspoelmonsters verzameld, van enkele kalveren is ook een nasopharyngeale swab afgenomen en van de meeste kalveren is ook een bloedmonster voor serologisch onderzoek uit de halsader (vena jugularis) genomen. Indien geen virus werd geïsoleerd uit het verzamelde BALF monster is een tweede bloedmonster afgenomen, drie weken nadat het eerste monster werd afgenomen (gepaarde sera). Alleen gepaarde sera zijn verder serologisch onderzocht.

2.4.1. Casussen versus controlecasussen

Een casus is een kalf met klinische verschijnselen van een voorste luchtwegaandoening (oog- en/of neusuitvloeiing en hoesten). Het kalf scoort minimaal 2 volgens de klinische score kaart (Figuur 1) of een kalf met klinische verschijnselen van een achterste luchtwegaandoening (versnelde ademhaling en/of benauwdheid). Het kalf scoort minimaal 1.

Parameter:	Score 0 (afwezig)	Score 1 (mild)	Score 2 (matig)	Score 3 (ernstig)
Algemene indruk:	Helder, alert Normale eetlust Normaal gedrag	Verminderde respons Verminderde eetlust verder geen afwijkingen	Lusteloos, duidelijk sloom Duidelijk verminderde eetlust Kalf zondert zich af van de groep	Soporeus, reageert nauwelijks op stimuli. Kalf eet niet en is niet in staat om te staan zonder hulp.
Oog en/of neusuitvloeiing:	Geen oog- of neusuitvloeiing	Oog- of neusuitvloeiing is afwisselend waterig-slijmerig	Oog- of neusuitvloeiing is toegenomen. Persistent slijmerig of helder slijm vermengd met pusachtige (wit/gele) kleur uitvloeiing	Ernstige oog- of neusuitvloeiing. Persistent pusachtig of bloederig.
Hoesten:	Geen hoesten	Zo nu en dan een spontane (of geïnduceerde*) droge (niet productieve) hoest	Frequente spontane (of geïnduceerde*) droge of productieve hoest	Frequente spontane productieve hoest, geïnduceerde* hoest gaat over in een hoestbui / aanval.
Benauwdheid:	Normale ademhaling (RR < 50 ademhalingen / minuut)	Versnelde ademhaling (RR 51-70 ademhalingen / minuut)	Versnelde en/of abdominale ademhaling (RR 71-100 ademhalingen / minuut)	Ernstig versnelde ademhaling. Kalf is duidelijk benauwd (ademt met gestrekte hals, open bek, heeft schuim op de bek. (RR > 100 ademhalingen / minuut)

* Hoesten kan bij een voorste luchtweg infectie opgewekt worden door met de hand druk uit te oefenen t.h.v. het strottehoofd of op de trachea (midden op de trachea of net voor de borstingang).

Figuur 2 Klinische score kaart

Het ras en herkomst van de kalveren waren in dit onderzoek van ondergeschikt belang. De dierenartsen werden wel gevraagd de informatie te registreren, dit is echter niet of nauwelijks geregistreerd. Kalveren werden bij voorkeur bemonsterd voordat een antibacteriële therapie werd ingesteld. Of(en wanneer) een antibacteriële therapie was ingesteld werd vermeld op het anamnese formulier. Indien het kalf behandeld was, werd het gebruikte middel op het formulier vermeld.

Op ieder bemonsterd vleeskalverbedrijf met luchtwegaandoeningen zijn ook controlecasussen bemonsterd. Inclusie criterium: Een kalf vertoont geen verschijnselen van een luchtwegaandoening. Het kalf scoort (alle parameters) 0. Gevraagd is om per bedrijf een gelijk aantal casussen / controlecasussen te bemonsteren.

2.4.2. Virologisch onderzoek

Virussen, in tegenstelling tot bacteriën, groeien niet direct op voedingsbodems, zij hebben cellen nodig waarin zij zich kunnen vermenigvuldigen. Daartoe worden in kunststof plaatjes met putjes cellen gekweekt van dierlijke herkomst totdat een zogenaamde cellaag ontstaat, die een enkele cel dun is (monolayer). Het onderzoeksmateriaal wordt op de cellaag gebracht. De gekweekte cellen worden vervolgens dagelijks onder een microscoop bekeken. Als het onderzoeksmateriaal virus bevat gaat na enkele dagen incubatie de cellaag veranderen: het cytopathologisch of cytopathogeen effect (CPE). De manier waarop dit gebeurt is vaak per virussoort anders. De definitieve diagnose berust op het aankleuren van de aangedane cellen met specifieke -tegen het virus gerichte- antistoffen die gekoppeld zijn aan een kleurstof.

Het virologisch onderzoek is uitgevoerd met specifieke aandacht voor een viertal, voor kalveren bekende, ziekteverwekkende virussen: bovine herpesvirus 1 (BHV1), bovine virale diarree virus (BVDV), bovine parainfluenza 3 virus (PI3V) en bovine Respiratoir Syncytieel Virus (BRSV). Virusspecifieke gegevens zijn terug te vinden onder 2.1.

2.4.3. Bacteriologisch onderzoek

Voor het bacteriologisch onderzoek is het onderzoeksmateriaal op een voedingsmedium (agar) in een petrischaal gebracht. Deze petrischalen werden vervolgens op geschikte temperatuur geïncubeerd. Na een of meer dagen groeien de bacteriën, die vervolgens kunnen worden geïdentificeerd. Om de kans op aantonen van de bacteriën zo groot mogelijk te maken is gebruik gemaakt van een tweetal soorten voedingsbodems (Heart Infusion Sheep Blood agar en chocolade agar). Na beënting met monstermateriaal zijn de agarplaten vervolgens geïncubeerd onder verschillende omstandigheden, namelijk onder zuurstofomstandigheden (aeroob), onder zuurstofloze omstandigheden (anaeroob) en onder verhoogde concentraties CO₂. Dit omdat de vereiste groeiomstandigheden verschillen tussen diverse bacteriesoorten. Vervolgens zijn de agarplaten gedurende een aantal dagen beoordeeld op de groei van mogelijke pathogene bacteriën.

Het bacteriologisch onderzoek is uitgevoerd met specifieke aandacht voor een viertal, voor kalveren bekende, ziekteverwekkende bacteriën: *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Arcanobacterium pyogenes* en *Haemophilus somnus*. Indien grote aantallen koloniën van niet direct herkenbare bacteriën werden waargenomen is aanvullend onderzoek ingezet om deze bacteriën verder te typeren.

2.4.3.1. *Mannheimia haemolytica*

Mannheimia (M.) haemolytica is een gram-negatieve bacterie en wordt verondersteld de meest belangrijke bacteriële verwekker te zijn van acute luchtwegproblemen bij kalveren. Kalveren worden met deze bacterie besmet in de eerste levensweken door contact met de koe of andere kalveren. De bacterie resideert in de nasopharynx (neus/keelholte) en in de tonsillen (keelamandelen). Met name de tonsillen lijken de belangrijkste reservoir te zijn voor deze bacterie (Rice, Carrasco-Medina et al. 2007). Verschillende virulentie factoren van de bacterie spelen een rol bij bloedvatwand beschadigingen en de fulminante ontstekingsprocessen die op kunnen treden na een infectie van de longen. Een pneumonie wordt gekarakteriseerd door een acute cranioventrale (voorste onderste deel) fibrineuze tot fibropurulente pleuropneumonie.

2.4.3.2. *Pasteurella multocida*

Pasteurella (P.) multocida is een gram-negatieve bacterie. Kalveren komen in de eerste levensweken in aanraking met de bacterie door direct contact met de koe. *P. multocida* is een algemeen voorkomende bacterie in het nasopharyngeale (neus/keel) gebied. *P. multocida* veroorzaakt vaak luchtwegproblemen bij kalveren met een verminderde weerstand in perioden van stress. Over het algemeen lijken infecties met *P. multocida* een minder fulminant verloop te kennen dan infecties met *M. haemolytica*.

2.4.3.3. *Arcanobacterium pyogenes*

Arcanobacterium (A.) pyogenes (voorheen bekend als *Actinomyces pyogenes*) is een gram-positieve, staafvormige bacterie. Deze bacterie wordt frequent geïsoleerd uit abscessen van runderen en zo ook chronische abscesvormende bovine pneumonia. *A. pyogenes* wordt ubiquitair voorkomend verondersteld en komt waarschijnlijk voor op alle mucosale oppervlakten, zo ook in het nasopharyngeale (neus/keel) gebied. Het is bekend dat *A. pyogenes* een secundaire bacteriële ziekteverwekker is. Een infectie met *A. pyogenes* wordt waarschijnlijk voorafgegaan door een ander infectieus agens (zoals bijvoorbeeld het bovine respiratoire syncytieel virus). Catry et al. hebben in 2008 aangetoond dat het de meest geïsoleerde type bacterie was in kalveren die behandeld waren met fluoroquinolone in verband met het BRD complex (Catry, Croubels et al. 2008).

2.4.3.4. *Haemophilus somnus*

Haemophilus (H.) somni is een gram-negatieve bacterie die wordt geassocieerd met acute pneumonie. De macroscopische laesies komen sterk overeen met die van *M. haemolytica* (cranioventrale fibrineuze pleuropneumonie). *H. somni* wordt echter beduidend minder frequent aangetoond als mogelijke verwekker van een luchtwegaandoening.

2.4.4. Mycoplasma onderzoek

Het mycoplasma onderzoek is uitgevoerd door het VLA te Weybridge (in het kader van een structurele samenwerking binnen COVETLAB). Het Mycoplasma onderzoek is uitgevoerd met specifieke aandacht voor een drietal, voor kalveren bekende, ziekteverwekkende subtypes: *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma bovirhinis* en *Mycoplasma dispar*.

3. Resultaten

3.1. Sterkte-zwakte analyse diagnostische tools

De sterkte-zwakte analyse bestond uit een theoretische exercitie, waar met name naar de kansen en de bedreigingen van de verschillende diagnostische tools is gekeken. De traditionele kweekmethoden worden in het algemeen als “gouden standaard” beschouwd, maar hebben als nadeel dat ze vaak tijdrovend zijn, zie hoofdstuk 3.1. Voor wat de sterke en zwakte punten van de snelle tools betreft is de specificiteit en de sensitiviteit van verschillende testen berekend op basis van de uitslagen van de geteste monsters in de virus isolatie en de evaluatie van de uitslagen in de snelle diagnostische testen.

3.2. Goed gedefinieerde controle monsters

Bank (overzicht) van goed gedefinieerde controle monsters om bestaande diagnostische tools te kunnen evalueren, eventuele nieuwe diagnostische tools in de toekomst te kunnen ontwikkelen en te kunnen valideren.

3.3. Eerste evaluatie van beschikbare diagnostische tools

Waar mogelijk is een eerste evaluatie gedaan van eventuele direct beschikbare diagnostische tools (mits controle samples beschikbaar zijn). Voor drie van de vier virale agentia (BHV1, BVDV en BRSV) is een snelle diagnostische test beschikbaar, die wellicht voor “on site” toepassingen gebruikt kan worden. De resultaten van deze drie testen en de resultaten van een antigeen ELISA voor de detectie van P13V zijn vergeleken met de resultaten van de klassiek virologische test (de virus isolatie). Voor twee van de vier virale (BVDV en BRSV) agentia is een moleculair diagnostische (PCR) test beschikbaar. De resultaten van de PCR's voor BVDV en BRSV zijn wel samengevat maar niet in de vergelijking met de virus isolatie test meegenomen.

3.3.1. Bovine herpesvirus 1 (BHV1)

Een set van 51 monsters is getest in de virus isolatie test en in de BIO-K 342 test. Van 47 monsters werd in de virus isolatie test een uitslag vastgesteld. Vier monsters bleken niet te beoordelen bij het aflezen van de test. Met de BIO-K 342 test werd voor deze vier monsters wel een resultaat gevonden. Twee monsters zijn niet getest in de BIO-K 342 test.

Tabel 2 Samenvatting vergelijking twee diagnostische testen t.b.v. de BHV1 diagnostiek

	Virus isolatie	BIO-K 342 test
Positief	28 (59.6%)	27 (55.1%)
Negatief	19 (40.4%)	22 (44.9%)
Totaal	47	49

Op basis van de uitslag van de virus isolatie test is voor de BIO-K 342 test bepaald wat de specificiteit van de test is.

Tabel 3 Vergelijking van de BIO-K 342 test versus de virus isolatie test

Sneltest (BIO-K 342)	Positief	Negatief
Virus isolatie positief	19	7
Virus isolatie negatief	6	13

Op basis van deze eerste resultaten wordt een sensitiviteit van 73% en een specificiteit van 68% berekend.

3.3.2. Bovine virale diarree virus (BVDV)

Een set van 89 monsters is getest in de virus isolatie test, in de LightCycler® PCR en in de SNAP* BVD test. Van 89 monsters werd in de virus isolatie test een uitslag vastgesteld. Één monster is niet getest in de PCR en in de sneltest. Met de PCR werden 47 monsters positief getest. Vijftig monsters zijn (om kosten technische redenen) in de SNAP* BVD test meegenomen. In de SNAP* BVD test werden 14 monsters positief getest.

Tabel 4 Samenvatting vergelijking drie diagnostische testen t.b.v. de BVDV diagnostiek

	Virus isolatie	LightCycler® PCR	SNAP* BVD test
Positief	38 (42.7%)	47 (53.4%)	14 (28.0%)
Negatief	51	41	36
Totaal	89	88	50

Op basis van de uitslag van de virus isolatie test is voor de SNAP* BVD test bepaald wat de sensitiviteit en specificiteit van de test is.

Tabel 5 Vergelijking van de SNAP* BVD test versus de virus isolatie test

Sneltest (SNAP* BVD)	Positief	Negatief
Virus isolatie positief	14	10
Virus isolatie negatief	0	26

Op basis van deze eerste resultaten wordt een sensitiviteit van 58% en een specificiteit van 100% berekend.

3.3.3. Bovine parainfluenza 3 virus (PI3V)

Een set van 82 monsters is getest in de virus isolatie test en in de BIO-K 338 ELISA. Van 82 monsters werd in de virus isolatie test een uitslag vastgesteld. Vierenvijftig monsters zijn positief getest en 28 negatief. Achttien monsters werden positief getest in de BIO-K 338 ELISA versus 64 monsters negatief.

Tabel 6 Samenvatting vergelijking twee diagnostische testen t.b.v. de PI3V diagnostiek

	Virus isolatie	BIO-K 338
Positief	54 (65.9%)	18 (22.0%)
Negatief	28	64
Totaal	82	82

Op basis van de uitslag van de virus isolatie test is voor de BIO-K 338 ELISA bepaald wat de sensitiviteit en specificiteit van de test is.

Tabel 7 Vergelijking van de BIO-K 338 test versus de virus isolatie test

Sneltest (BIO-K 338)	Positief	Negatief
Virus isolatie positief	18	36
Virus isolatie negatief	0	28

Op basis van deze eerste resultaten wordt een sensitiviteit van 33% en een specificiteit van 100% berekend.

3.3.4. Bovine Respiratoir Syncytieel Virus (BRSV)

Een set van 85 monsters is getest in de virus isolatie test. Twee monsters waren niet te beoordelen in de virus isolatie test. Drieëntachtig monsters zijn getest in een conventionele PCR. In de BIO-K 253 test zijn 84 monsters getest. Één monster is niet in deze test onderzocht. Van 83 monsters werd in de virus isolatie test een uitslag vastgesteld. Negenendertig monsters zijn positief getest in de virus isolatie test. In 44 monsters werd geen BRSV aangetoond. In de BIO-K 253 test werd in 12 monsters BRSV aangetoond. In 72 monsters werd geen virus gedetecteerd.

Tabel 8 Samenvatting vergelijking drie diagnostische testen t.b.v. de BRSV diagnostiek

	Virus isolatie	PCR	BIO-K 336 test
Positief	39 (47.0%)	49 (59.0%)	12 (14.3%)
Negatief	44	34	72
Totaal	83	83	84

Op basis van de uitslag van de virus isolatie test is voor de BIO-K 336 test bepaald wat de sensitiviteit en specificiteit van de test is.

Tabel 9 Vergelijking van de BIO-K 336 test versus de virus isolatie test

Sneltest (BIO-K 336)	Positief	Negatief
Virus isolatie positief	10	28
Virus isolatie negatief	2	42

Op basis van deze eerste resultaten wordt een sensitiviteit van 26% en een specificiteit van 95% berekend.

In de PCR werden meer monsters (N=49) positief getest dan in de virus isolatie test (N=39). Dit verschil is te verklaren door het feit dat met de PCR viraal RNA wordt aangetoond en in de virus isolatie test alleen infectieus virus wordt aangetoond. De verklaring voor dit verschil mag dus gezocht worden in het feit dat de infectieusiteit van het virus is afgenomen. Infectieus virus kan afgenomen zijn door de opslag en/of de vries/dooi stap. Een andere (additionele) verklaring kan zijn dat de sensitiviteit van de PCR beter is in vergelijking met de virus isolatie test. Echter, er zijn twee goed gedefinieerde positieve samples in de PCR negatief getest, die in de virus isolatie positief getest zijn. Dit kan impliceren dat de PCR niet helemaal specifiek is, wat een andere verklaring kan zijn voor het hoog aantal positieven.

3.4. Piloteren in de kalverhouderij

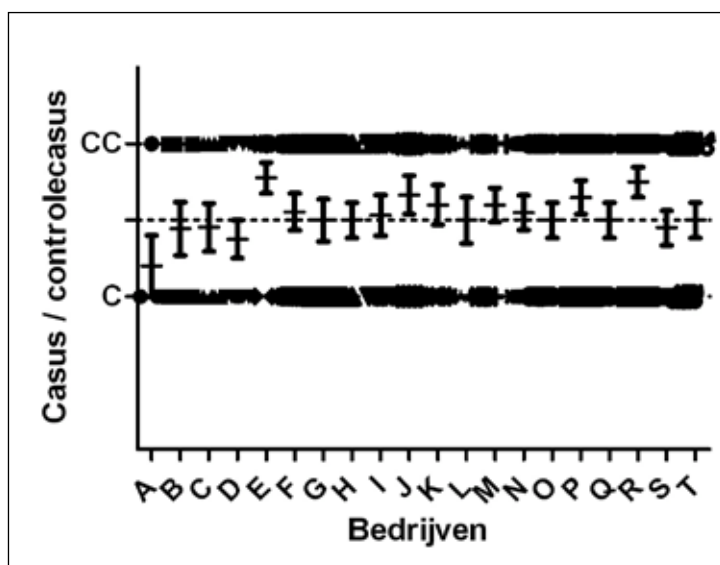
Met het "pilot-experiment" is geprobeerd om in een verkennend onderzoek binnen de vleeskalverhouderij te kijken naar potentiële virale en bacteriële agentia die een rol zouden kunnen spelen bij luchtwegproblemen binnen deze sector. Met dit doel zijn longspoelingen uitgevoerd, soms neus/keel swabs en veelal bloedmonsters verzameld bij "zieke" (casussen) en

“gezonde” (controlecasussen) kalveren. Om veehouders bereid te vinden om (gecontracteerde) dierenartsen deze monsters te laten verzamelen, was medewerking vanuit de kalverintegraties wenselijk. Indien de kalverintegraties niet bereid waren medewerking te verlenen aan een verkennend onderzoek, zou het onderzoek uitgevoerd moeten worden bij zogenaamde “vrije” mesters, veehouders niet bij een integratie zijn aangesloten. Omdat eventuele resultaten van een verkennend onderzoek, kalverhouders en dierenartsen werkzaam binnen de vleeskalverhouderij van up-to-date informatie zou moeten kunnen voorzien over potentiële veroorzakers van één van de grootste gezondheidproblemen binnen deze sector en een richting moet kunnen bieden bij het ontwikkelen van een plan van aanpak t.b.v. de preventie en behandeling van deze gezondheidsproblemen, had de directe betrokkenheid vanuit de sector een sterke voorkeur. Om deze reden heeft op maandag 4 oktober 2010 een gesprek plaats gevonden tussen onderzoekers van het Centraal Veterinair Instituut (CVI) van Wageningen UR en vertegenwoordigers van de drie grootste vleeskalverintegraties (de Van Drie groep, Alpuro en Denkavit). Namens het CVI namen Dr. Norbert Stockhofe, Drs. Vincent Rijsman en Dr. Adriaan Antonis, namens de integraties ir. Jacques de Groot (Van Drie groep) en John Achterstraat (Alpuro) en Drs. Teus Kreuger (DierGezondheidsCentrum Boven-Veluwe) deel aan deze gezamenlijke bijeenkomst. Ook Peter Mölder (Denkavit), ir. Henk Bekman (PVE) en Drs. Peter Theewis (DAP Thewi) waren uitgenodigd, maar bleken verhinderd. In deze bijeenkomst werd de bereidheid om te participeren in een verkennend onderzoek naar luchtwegproblemen binnen de vleeskalverhouderij door de integraties uitgesproken.

Op maandag 18 oktober 2010 zijn vier dierenartsen van twee dierenartsenpraktijken (DierGezondheidsCentrum Boven-Veluwe en DAP Thewi) geïnstrueerd en getraind in het doen van longspoelingen t.b.v. verkennend onderzoek. Specifieke instructies m.b.t. de selectiecriteria van casussen en controlecasussen, het verzamelen, verwerken, bewaren en versturen van monsters en de anamnese van de kalveren werden in een protocol vastgelegd.

Vervolgens hebben de betrokken dierenartsen op twintig bedrijven monsters en gegevens verzameld van casussen en controlecasussen.

Vanuit de onderzoekers was de wens uitgesproken om per bedrijf gelijke aantallen casussen en controlecasussen te selecteren. Uit figuur 2 blijkt op sommige bedrijven (bijvoorbeeld bedrijf A) meer casussen dan controlecasussen geselecteerd zijn en op andere bedrijven (bijvoorbeeld bedrijf E) meer controlecasussen dan casussen.



Figuur 3 Verhouding casussen versus controlecasussen per bedrijf

Totaal zijn 329 kalveren geselecteerd en bemonsterd. Op basis van de oorspronkelijke anamnese formulieren, zoals ingevuld door de dierenartsen, werden 170 casussen en 159 controlecasussen (52%-48%) geselecteerd. Na analyse van de anamnese formulieren door de onderzoeker, is het aantal casussen en controlecasussen aangepast: 148 casussen en 181 controlecasussen (45%-55%) zie tabel 14.

Tabel 10 Overzicht bemonsterde bedrijven / kalveren

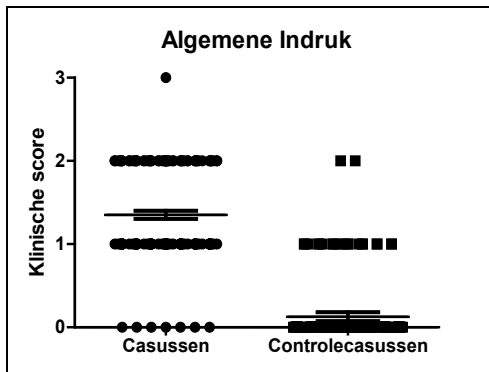
Bedrijf	Casussen	Controle-casussen	Bedrijf	Casussen	Controle-casussen
A	4	1	K	6	9
B	5	4	L	6	6
C	6	5	M	8	12
D	10	6	N	9	11
E	4	14	O	10	10
F	8	10	P	7	13
G	7	7	Q	10	10
H	10	10	R	5	16
I	7	8	S	11	9
J	5	10	T	10	10
TOTAAL	66	75	TOTAAL*	148	181

* Totaal van de eerste en de tweede kolom (casussen en controlecasussen)

3.4.1. Klinische verschijnselen

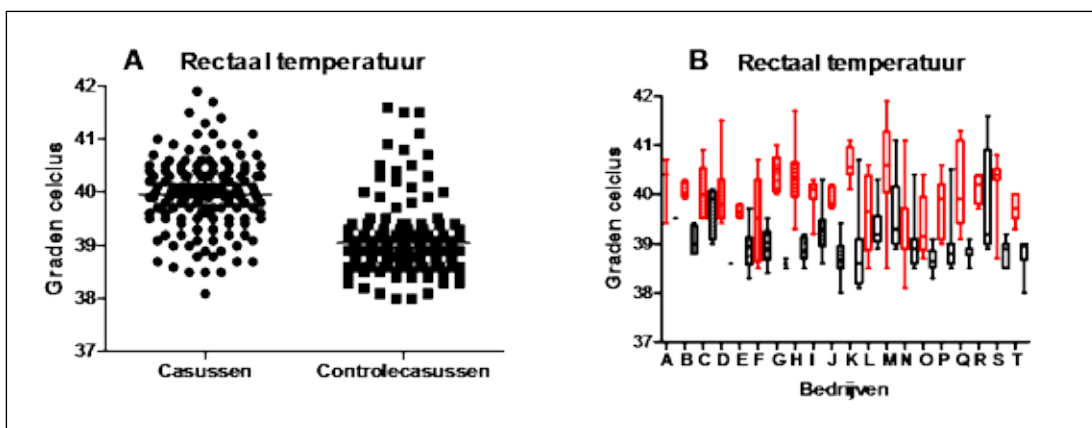
De betrokken dierenartsen werd gevraagd een score te geven voor de algemene indruk van het onderzochte kalf. Kalveren die een heldere, alerte indruk maakten, geen afwijkend gedrag en een normale eetlust vertoonden kregen score 0. Kalveren die een slome indruk maakten, een verminderde eetlust, maar verder geen afwijkingen vertoonden kregen score 1. Kalveren die een lusteloze, duidelijk slome indruk maakten, een duidelijk verminderde eetlust toonden en zich afzonderden van de groep kregen score 2. Kalveren die soporeus waren, niet of nauwelijks reageerden op externe stimuli, niet aten en niet konden staan zonder hulp kregen score 3.

Wellicht in de lijn der verwachting blijkt uit de vergelijking van de algemene indruk van casussen versus controlecasussen, dat kalveren met een luchtwegaandoening (casussen) een (significant, $p < 0.001$) ziekere indruk maken dan kalveren die geen (of nauwelijks) verschijnselen van een luchtwegaandoening vertonen. Casussen scoren gemiddeld 1.35 en controlecasussen scoren gemiddeld 0.12.



Figuur 4 Algemene indruk score: casussen versus controle casussen

Een soortgelijk beeld wordt waargenomen wanneer naar de gemiddelde rectaal temperatuur wordt gekeken bij casussen versus controlecasussen. Casussen hadden een significant ($p < 0.001$) hogere rectaal temperatuur (gemiddeld: 39.96) vergeleken met controlecasussen (gemiddeld: 39.6). Het overall beeld (figuur 4A) lijkt ook op bedrijfsniveau waarneembaar (figuur 4B). Per bedrijf zijn in een boxplot weergave de verschillen tussen casussen (in rood) versus controle casussen (in zwart) weergegeven.



Figuur 5 Rectaal temperatuur: casussen versus controlecasussen: overall [A] en per bedrijf [B].

3.4.2. Virale diagnostiek op basis van virusisolatie

Van 329 kalveren zijn longspoelingen verzameld die onderzocht zijn op aanwezigheid van vier virale agentia (BHV1, BVDV, PI3V en BRSV). In 78 kalveren werden één virus soort aangetoond en in 15 kalveren werden twee verschillende virus soorten aangetoond. De verdeling tussen casussen en controlecasussen is weergegeven in tabel 15. In verhouding lijken er vaker virussen gediagnosticeerd te worden bij casussen (32.4%) dan bij controlecasussen (24.9%). Het verschil is echter niet significant ($p = 0.13$).

Tabel 11 Samenvatting virusdiagnostiek op basis van de virus isolatie

	Casussen	Controlecasussen
Virus isolatie positief	48 (32.4%)	45 (24.9%)
Virus isolatie negatief	100 (67.6%)	136 (75.1%)
Totaal	148 (100%)	181 (100%)

Omgekeerd kan het interessant zijn te weten wat de klinische relevantie is van het isoleren van eerder vermelde specifieke virussen. Bij twee kalveren werd BHV1 geïsoleerd, bij 19 kalveren BRSV, bij 43 kalveren BVDV en 44 kalveren PI3V.

Tabel 12 Samenvatting virusdiagnostiek op basis van de virus isolatie

	BHV1	BRSV	BVDV	PI3V
Casussen	1	8 (2)	21 (5)	25 (7)
Controlecasussen	1	11 (7)	22 (3)	19 (6)
Totaal	2	19	43	44

Tussen haakjes het aantal kalveren waarbij een tweede virus soort werd geïsoleerd.

BHV1 werd bij één casus en één controlecasus aangetoond. BRSV werd bij acht casussen aangetoond en bij 11 controlecasussen. In negen gevallen werd er een tweede virus aangetoond (PI3V 7x en BVDV 2x). BVDV werd bij 43 kalveren geïsoleerd, bij 21 casussen en 22 controlecasussen. In negen gevallen werd er een tweede virus aangetoond (PI3V 6x en BRSV 2x). PI3V werd bij 43 kalveren geïsoleerd, bij 25 casussen en bij 19 controlecasussen. In 13 gevallen werd een tweede virus aangetoond (BRSV 7x en BVDV 6x).

3.4.3. Virale diagnostiek op basis van serologisch onderzoek

Met serologische onderzoek wordt bedoeld: het aantonen van specifieke antistoffen tegen virussen (of andere micro-organismen). Om een koppeling te maken tussen acuut optredende klinische problemen en een virale infectie zijn gepaarde sera genomen. Essentie van deze manier van bemonsteren is dat dezelfde dieren met een tussentijd van minimaal 3 weken getapt worden. Dit wordt gepaard serologisch onderzoek genoemd. De gebruikte serologische assay wordt weergegeven in een semi-kwantitatieve uitslag (- /+ / ++ / +++ / ++++ / +++++) Als in het eerste serummonster geen of weinig antistoffen aanwezig zijn en in het tweede significant (duidelijk) meer (van 0 naar positief, of meer dan twee plusjes op de semi-kwantitatieve schaal) antistoffen worden aangetoond, is verondersteld dat een infectie met het betreffende virus recent heeft plaatsgevonden en dat de betreffende virus als mogelijke oorzaak van de ziekte kan worden aangemerkt. De uitslagen zijn op koppelniveau beoordeeld (zie tabel 17). Noot: serologisch onderzoek is alleen uitgevoerd bij die dieren waar geen virus werd aangetoond. Daarnaast is serologisch onderzoek op boviene coronavirus (BCV) en boviene adenovirus (BAV) uitgevoerd. De resultaten van dit onderzoek zijn niet meegenomen in de verdere analyses.

Tabel 13 Samenvatting virusdiagnostiek op basis van het gepaarde serologisch onderzoek / bedrijf

Bedrijf	BCV	BAV	BHV1	BRSV	BVDV	PI3V
A	nee	?	nee	nee	?	ja
B	?	?	ja	ja	nee	nee
C	ja	ja	ja	ja	ja	nee
D	ja	ja	ja	ja	ja	ja
E	ja	ja	nee	nee	ja	ja
F	nee	?	ja	nee	ja	ja
G	ja	ja	ja	ja	ja	nee
H	?	ja	ja	ja	ja	ja
I	ja	ja	ja	nee	ja	ja
J	ja	?	ja	nee	?	ja
K	?	ja	ja	?	ja	nee
L	ja	ja	ja	?	ja	?
M	?	ja	ja	ja	ja	ja
N	nee	ja	ja	nee	ja	nee
O	ja	ja	ja	nee	ja	nee
P	ja	ja	ja	nee	ja	nee
Q	ja	ja	ja	nee	ja	ja
R	ja	?	ja	ja	?	ja
S	nee	nee	ja	nee	nee	ja
T	ja	ja	ja	ja	ja	ja
Totaal	12	14	18	15	8	12

Om op individueel dierniveau een conclusie te kunnen trekken over het al dan niet geïnfecteerd zijn geweest met één van de onderzochte virale agentia, zullen sera uit verdund moeten worden en in een virus neutralisatie of haemagglutinatie inhibitie test verder onderzocht moeten worden.

3.4.4. Bacteriële diagnostiek

Van 325 kalveren zijn longspoelingen verzameld die onderzocht zijn op aanwezigheid van bacteriële agentia in een bacteriekweek, waarbij met name gelet is op het voorkomen van *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Arcanobacterium pyogenes* en *Haemophilus somnus*. Bij 53 kalveren werden ook grote aantallen koloniën geïsoleerd in de longspoelingen van andere bacteriën die nader getypeerd zijn. In totaal werden in 215 kalveren mogelijk pathogene bacteriën aangetoond. In 21 kalveren werden twee verschillende pathogene bacterie soorten aangetoond. De verdeling tussen casussen en controlecasussen is weergegeven in tabel 14. Er is een significant ($p=0.0022$) verschil waarneembaar. Er worden vaker bacteriën gediagnosticeerd bij casussen (70.3%) dan bij controlecasussen (53.9%).

Tabel 14 Samenvatting bacteriediagnostiek op basis van de bacteriekweek

	Casussen	Controlecasussen
Bacterie isolatie positief	102 (70.3%)	97 (53.9.8%)
Bacterie isolatie negatief	43 (29.7%)	83 (46.1%)
Totaal	145 (100%)	180 (100%)

Omgekeerd kan het interessant zijn te weten wat de klinische relevantie is van het isoleren van eerder vermelde specifieke bacteriën.

Tabel 15 Samenvatting bacteriediagnostiek op basis van de bacteriekweek

	<i>A.pyogenes</i>	<i>M. Haemolytica</i>	<i>Pasteurella</i> *	Overig
Casussen	20 (13.8%)	36 (24.8%)	37 (25.5%)	23 (15.9%)
Controlecasussen	12 (6.7%)	22 (12.2%)	46 (25.6%)	24 (13.3%)
Totaal	32	58	83	47
P- waarde	0.0137	0.0788	0.9937	0.5241

* in 32 gevallen is uit de typering *Pasteurella multocida* gekomen; in 25 gevallen betrof het een *Pasteurella* spp.; en in 24 gevallen werd geen aanvullende typering uitgevoerd

A. pyogenes werd significant ($p=0.0137$) vaker bij casussen (20x) geïsoleerd dan bij controlecasussen (12x). Ook *Mannheimia haemolytica* werd vaker aangetoond bij casussen (36x) dan bij controlecasussen (22x). Het verschil is niet significant ($p=0.0788$), maar er lijkt een duidelijke trend waarneembaar. Er werden geen verschillen waargenomen tussen casussen en controlecasussen wat de frequentie van aantonen van *Pasteurella* betreft ($p=0.9937$). De resultaten zijn samengevat in tabel 20. *Haemophilus somnus* werd niet aangetoond.

In vier gevallen werden zowel *A. pyogenes* als *P. multocida* geïsoleerd. In drie gevallen werden zowel *A. pyogenes* en *M. haemolytica* geïsoleerd. In vier gevallen werden *Pasteurella* spp. en *M. haemolytica* samen aangetoond. In de overige (tien) gevallen waar meerdere soorten werden aangetoond, is geen typering meer uitgevoerd.

Van de "overige" bacteriën zijn 26 isolaten verder getypeerd. In 14 gevallen werden *Streptococci* (*bovis*, *plurimalium* of een spp.) geïsoleerd. Bij twee kalveren werd *Moraxella* geïsoleerd. Bij drie kalveren *Acidovorax* spp. Bij de overige kalveren *Proteus mirabilis* (1x); *Gallibacterium anales* (1x), *Psychrobacter* spp. (1x), *Bacteroides distasonis* (1x), bovine rumen bacterium (1x), *Actinomyces* spp. (1x) en *Lactobacillus mucosae* (1x). Over een eventuele klinische betekenis van de genoemde bacteriën is weinig bekend, maar in de meeste gevallen bestaat er waarschijnlijk geen relatie met het optreden van luchtwegproblemen.

3.4.5. Mycoplasma onderzoek

Van 329 kalveren zijn longspoelingen onderzocht op aanwezigheid van *Mycoplasma*. In 187 kalveren werden één of meer *Mycoplasma* subtypes aangetoond, in 72 kalveren werden twee of meer verschillende subtypes aangetoond en in 20 kalveren 3 of meer verschillende subtypes. De verdeling tussen casussen en controlecasussen is weergegeven in tabel 16. In verhouding lijken er vaker virussen gediagnosticeerd te worden bij casussen (32.4%) dan bij controlecasussen (24.9%). Het verschil is echter niet significant ($p=0.13$).

Tabel 16 Samenvatting Mycoplasma diagnostiek op basis van de Mycoplasma PCR

	Casussen	Controlecasussen
Mycoplasma PCR positief	89 (60.1%)	98 (54.1%)
Mycoplasma PCR negatief	59 (39.9%)	83 (45.9%)
Totaal	148	181

Ook hier is gekeken naar de mogelijke klinische relevantie van het isoleren van subtype Mycoplasma.

Tabel 17 Samenvatting Mycoplasma subtype diagnostiek

	M. bovis	M. bovirhinis	M. dispar	Unidentified
Casussen	44 (29.7%)	44 (29.7%)	47 (31.8%)	8 (5.4%)
Controlecasussen	38 (21.0%)	41 (22.7%)	37 (20.4%)	20 (11.0%)
Totaal	82	85	84	28
P- waarde	0.0721	0.1491	0.0210	<0.001

Mycoplasma dispar werd significant vaker geïsoleerd bij zieke kalveren, maar ook voor *Mycoplasma bovis* lijkt een trend waarneembaar. Achtentwintig subtypes zijn nog niet geïdentificeerd.

3.4.6. Antibioticum gevoeligheidsbepalingen

Van 38 *M. haemolytica* en 51 *Pasteurella* stammen (waarvan 31 *P. multocida*) is een gevoeligheidsbepaling uitgevoerd. Hierbij is de zogenaamde *minimum inhibitory concentration* (MIC) bepaald, dat wil zeggen de minimale concentratie van een bepaald antibioticum die de betreffende bacterie in zijn groei remt. Wanneer deze MIC hoger is dan de antibioticum spiegel die bij behandeling met het betreffende antibioticum in het lichaam wordt bereikt, wordt de bacterie als resistent beschouwd. De resultaten zijn vermeld in tabel 22.

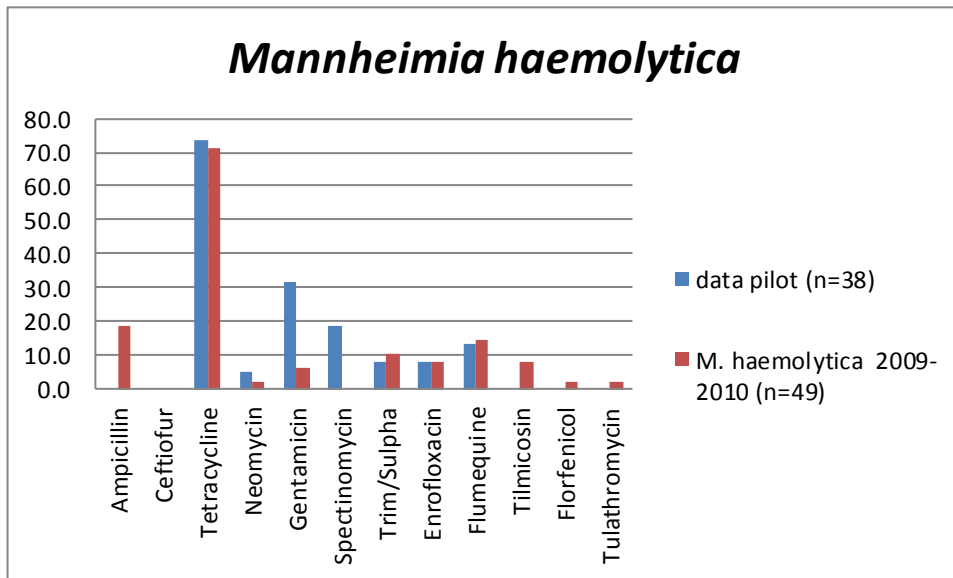
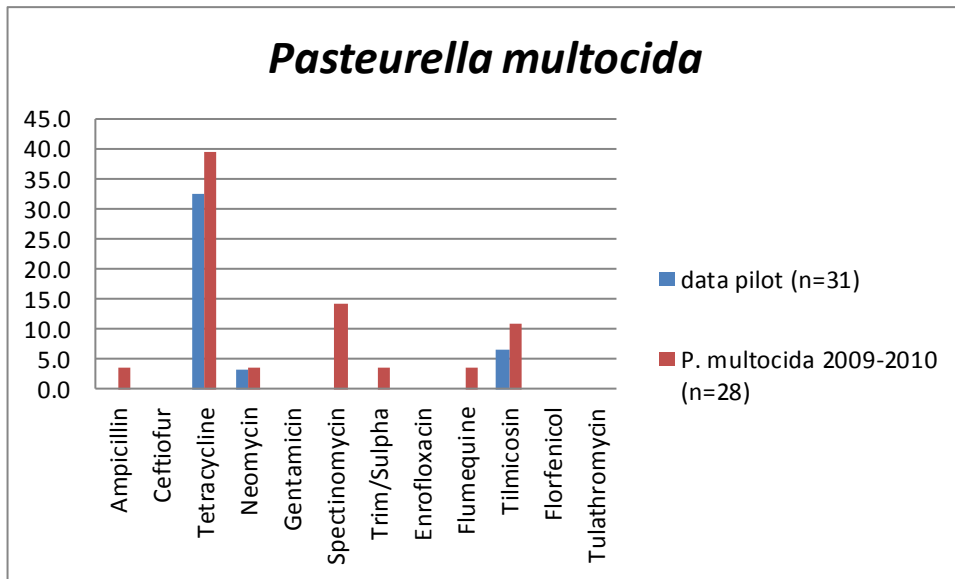
De resistentiepercentages van *M. haemolytica* en *Pasteurella* spp. uit kalveren die in dit project zijn geïsoleerd, zijn redelijk laag. Uitzondering vormt de tetracycline resistentie die zeer vaak werd gezien (31,4% van de *Pasteurella* stammen en maar liefst 73,7% van de *M. haemolytica* stammen) en gentamicine resistentie bij *M. haemolytica* stammen (31,6%). Over het algemeen zijn *M. haemolytica* stammen vaker resistent in vergelijking met *Pasteurella* spp.

Tabel 18. De MIC verdeling van 51 *Pasteurella* en 38 *M. haemolytica* stammen. De witte vakken geven aan welke concentraties van het antibioticum zijn getest. De verticale groene balken geven de breekpunten weer. Stammen met een MIC hoger dan deze concentratie worden beschouwd als resistent voor het betreffende antibioticum.

<i>Pasteurella</i> spp. (51)	R%	MIC (%) verdeling mg/L															
		0.015	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
Ampicilline	0					80.4	17.6					2.0					
Ceftiofur	0			98.0			2.0										
Tetracycline	31.4						13.7	2.0	45.1	2.0	5.9	19.6	9.8	2.0			
Neomycine	3.9								11.8	39.2	25.5	19.6			3.9		
Gentamicine	2.0							21.6	47.1	29.4				2.0			
Spectinomycine	2.0										5.9	62.7	27.5	2.0			2.0
Trim/sulfa	2.0				70.6	7.8	15.7	2.0	2.0								
Flumequine	5.9					74.5	3.9	11.8			3.9			3.9			
Enrofloxacin	2.0		82.4	7.8	3.9		2.0	2.0				2.0					
Tilmicosine	5.9						2.0	5.9	39.2	37.3	7.8	2.0	3.9		2.0		
Tulathromycine	0							2.0	82.4	11.8		3.9					
Florfenicol	0					7.8	88.2	2.0		2.0							

<i>M. haemolytica</i> (38)	R%	MIC (%) verdeling mg/L															
		0.015	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
Ampicilline	0					94.7	5.3										
Ceftiofur	0			100.0													
Tetracycline	73.7						2.6	23.7				42.1	23.7	7.9			
Neomycine	5.3								7.9	21.1	57.9	7.9	5.3				
Gentamicine	31.6							7.9	55.3	5.3			7.9	21.1	2.6		
Spectinomycine	18.4											5.3	76.3		13.2	5.3	
Trim/sulfa	7.9				44.7	7.9	2.6	7.9	28.9	7.9							
Flumequine	13.2					60.5	2.6		2.6	21.1	5.3			7.9			
Enrofloxacin	7.9		63.2			10.5	13.2	5.3	7.9								
Tilmicosine	0							2.6		42.1	47.4	7.9					
Tulathromycine	0								5.3	57.9	36.8						
Florfenicol	0					7.9		92.1									

De resistentiepercentages van stammen uit deze pilot komen redelijk overeen met die afkomstig van monsters die ingestuurd zijn naar microbiologisch diagnostische laboratoria. In onderstaande figuren (figuur 6) zijn resistentiepercentages van de stammen uit deze pilot vergeleken met data uit 2009 en 2010. Opvallend was daarbij dat bij *M. haemolytica* stammen in deze pilot vaker resistentie tegen spectinomycine en gentamicine werd gezien. Daarentegen kwam spectinomycine resistentie bij *Pasteurella* stammen minder vaak voor in vergelijking met de stammen uit diagnostische labs. De verschillen kunnen echter berusten op toeval, omdat slechts relatief kleine aantallen stammen zijn getest. De resultaten dienen dan ook met enige terughoudendheid te worden beoordeeld.



Figuur 6 resistentiepercentages van de stammen uit deze pilot vergeleken met data uit 2009 en 2010

4. Conclusies

In het deelproject “Luchtwegproblemen en problemen rondom de diagnostiek van luchtwegaandoeningen in de Nederlandse vleeskalverhouderij” binnen het beleidsondersteunend programma BO-08-010.02-019 is een inventarisatie en een eerste evaluatie van beschikbare diagnostische tools, die nodig zijn om het eventuele causale infectieuze agens bij luchtwegproblemen te identificeren, gemaakt.

Potentiele microbiële agentia kunnen op verschillende wijzen gediagnosticeerd worden. Voor virale en bacteriële agentia zijn klassieke detectie methoden beschikbaar, waarmee infectieuze virussen en bacteriën geïsoleerd en getypeerd kunnen worden. De detectiemethoden zijn gebaseerd op isolatie van de agentia in *in vitro* celculturen of serologische testen gebaseerd op het aantonen van specifieke afweerstoffen gericht tegen het agens. Meer recentelijk detectiemethoden zijn nucleïnezuur gebaseerde testen. Eén van de belangrijkste beperkingen van deze methodes is echter dat slechts één of een handvol doelwitorganismen per test gedetecteerd kunnen worden, waardoor een efficiënte routinematige detectie van potentiële ziekteverwekkende micro-organismen belemmerd wordt. Een beperking van de klassieke detectie methoden gebaseerd op de isolatie van het agens en het aantonen van een antistof respons als gastheerrespons, is de lange tijd van kweken (maximaal 7 dagen) en de tijd tussen het nemen van gepaarde sera (2 tot 3 weken). Drie diagnostische tools die gebruikt kunnen worden op de plaats waar directe zorg geboden moet worden, zogenaamde “Place Of Care” (POC) tools zijn geëvalueerd. Alle drie de testen zijn gebaseerd op het aantonen van het virus d.m.v. antistoffen. De specificiteit, de kans dat een test een terecht negatieve uitslag geeft, van de BHV1, BRSV en BVDV POC tool was respectievelijk 68%, 95% en 100%. De sensitiviteit (gevoeligheid) van de drie testen was respectievelijk 73%, 26% en 58%. Voor een snelle detectie van PI3v is een antigeen ELISA gebruikt, die hier een sensitiviteit van 33% en een specificiteit van 100% bleek te hebben. Conclusie is, dat de huidige snelle POC tools niet geschikt zijn om transient (kortdurend) geïnfecteerde kalveren te diagnosticeren. Voor de detectie van bacteriële agentia zijn nog geen POC tools beschikbaar.

In het verkennend veldonderzoek zijn 329 kalveren gescreend op aanwezigheid van BHV1, BVDV, BRSV, PI3V, H. somnus, A. pyogenes, M. haemolytica, Pasteurella spp., M. bovis, M. bovirhinis en M. dispar in longspoelmonsters. Het nemen van longspoelmonsters bleek, na een korte training van de uitvoerende dierenartsen, praktisch en redelijk eenvoudig uitvoerbaar. De individuele monsters zijn virologisch en bacteriologisch onderzocht. De resultaten zijn per bedrijf weergegeven (zie appendix 1). De “bedrijfsfoto’s” zijn een momentopname, maar zouden uitstekend bruikbaar moeten kunnen zijn in bijvoorbeeld een longitudinale studie, waar naar mogelijke effecten van interventiestrategieën wordt gekeken. In de bedrijfsfoto’s wordt de mogelijke rol van bekende ziekteverwekkende micro-organismen duidelijk zichtbaar.

Wanneer klinisch zieke kalveren (casussen) vergeleken worden met klinisch gezonde (controlecasussen) kalveren valt een aantal zaken op. Virussen worden aangetoond bij casussen en bij controlecasussen. Wellicht in de lijn der verwachting werd niet vaker een virus gediagnosticeerd bij casussen dan bij controlecasussen. Een mogelijke verklaring hiervoor is de tijd tussen monsternamen bij het kalf en het verwerken van de monsters op het laboratorium. Een lange periode zou een negatief effect op de infectieusiteit van het agens kunnen hebben. Een andere mogelijke verklaring, zou het moment van monsternamen kunnen zijn. De piek in de virusuitscheiding ligt voor

de meeste virussen voor de top van de klinische infectie en voor een deel in de incubatieperiode. Dit betekent dat op bedrijven waar casussen positief zijn voor een virus juist ook de gezond uitziende controlecasussen een virusuitscheiding kunnen laten zien. De klinisch zieke dieren kunnen zelfs alweer virus negatief zijn en misschien serologisch positief getest worden. BRSV infecties worden op 18 bedrijven aangetoond, op 17 bedrijven d.m.v. virusisolatie en op acht bedrijven m.b.v. een serologisch onderzoek. PI3V infecties worden op 18 bedrijven aangetoond, op 12 bedrijven d.m.v. virusisolatie en op 12 bedrijven m.b.v. een serologisch onderzoek. BVDV infecties worden op 18 bedrijven aangetoond, op 8 bedrijven d.m.v. virusisolatie en op 15 bedrijven m.b.v. een serologisch onderzoek. BHV1 infecties worden op 19 bedrijven aangetoond, op 2 bedrijven d.m.v. virusisolatie en op 18 bedrijven m.b.v. een serologisch onderzoek. Het is dus op basis van de verkregen informatie uit de gebruikte diagnostische testen moeilijk te zeggen of en welk virus uiteindelijk de kliniek heeft veroorzaakt. Om hier meer duidelijkheid in te krijgen moet aanvullend serologisch onderzoek uitgevoerd worden. Individuele sera zullen in een virus neutralisatie test onderzocht moeten worden. Mogelijk klinisch relevante waarnemingen worden ook gedaan in het bacteriologisch en mycoplasma onderzoek. Bij klinisch zieke dieren wordt significant vaker *A. pyogenes* ($P=0.0137$) en *M. dispar* ($P=0.0210$) gediagnosticeerd. Een trend naar significantie lijkt waarneembaar voor *M. haemolytica* ($p=0.0788$) en *M. bovis* ($P=0.0721$). Aan het doel, concreet ervaren en observeren en een eerste aanzet maken in een vertaling naar de theorie (zie figuur 7), lijkt hiermee voldaan te zijn.



Figuur 7 stappenplan t.b.v. het beheersen / uitroeien van specifieke infecties. Dit stappenplan van onderdeel van het onderzoeksvoorstel in 2010. In 2009 is een inventarisatie uitgevoerd van de belangrijkste bedrijfsgebonden aandoeningen op o.a. mest kalverbedrijven. Binnen het beleidsondersteunend onderzoek van het CVI is het voorstel gedaan om specifieke gezondheidsproblemen bij kalveren in de praktijk concreet te ervaren (stap 1). Hierbij is een focus aangebracht op luchtwegaandoeningen bij mestkalveren. Eind 2010 is een pilot-experiment uitgevoerd met als doel "observeren" (stap 2). Logische vervolgstappen, zouden stap 3 en 4 zijn, waarin een vertaalslag gemaakt moet worden naar de oplossing (conceptualiseren) en een praktijktoetsing ("experimenteren").

Een aantal vragen blijven open staan. Kunnen diagnostische tools verbeterd worden en kunnen verbeterde diagnostische tools ons helpen bij de aanpak van endemische dierziekten? Voor de keuze van de diagnostische test of combinatie van testen is de uiteindelijke vraagstelling van groot belang. Het bepalen of een specifiek virus aanwezig is op een bedrijf stelt andere eisen aan een test dan de klinische diagnostiek van een ziek kalf. Voor snelle POC diagnostiek is verdere ontwikkeling van de antigeen testen noodzakelijk, met name voor de verbetering van de sensitiviteit. Echter, ook snelle nucleïnezuur gebaseerde testen zijn in ontwikkeling voor gebruik als POC device. Van belang voor eigenlijk al deze testen is dat zij de mogelijkheid hebben om meerdere micro-organismen tegelijkertijd kunnen aantonen. Ook voor monitoringsdoeleinden is het ontwikkelen dergelijke

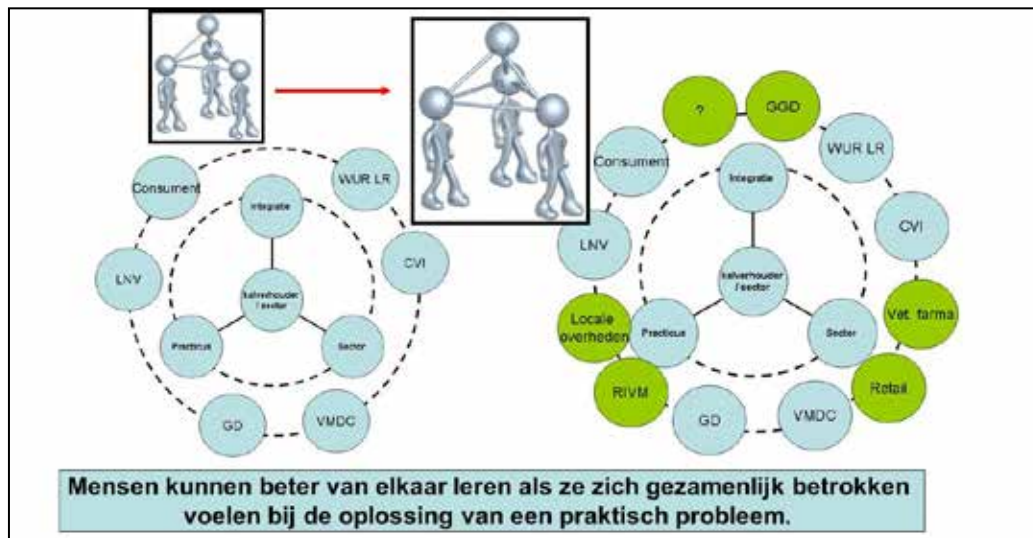
multiplex assay voor de simultane detectie van meerdere virussen, bacteriën en mycoplasma belangrijk om inzicht te krijgen in de aanwezigheid en gedrag van pathogenen in een bedrijf om vervolgens gericht te kunnen interveniëren. Ontwikkelingen van nieuwe POC diagnostische tools hebben een duidelijke toegevoegde waarde en kunnen juist eenvoudig en doeltreffend ingezet worden in de Nederlandse vleeskalverhouderij dankzij het strak georganiseerde en integrale karakter van de sector. Uiteraard is de ontwikkeling van een generiek detectieplatform van meerwaarde voor alle diersectoren.

De belangrijkste vraag, hoe diagnostische tools een bijdrage kunnen leveren de bestrijding van endemische dierziekten is in dit onderzoek niet beantwoordt en zou onderzocht moeten worden in een vervolgproject. Een longitudinale studie waarbij kalveren gedurende langere tijd vervolgd worden kan helpen om variabele over een langere tijd te constateren, meer duidelijkheid te scheppen over de rol van virale agentia in luchtwegproblemen bij kalveren en het effect van een efficiëntere diagnostiek zichtbaar te maken. Bedrijfsfoto's zoals gemaakt binnen het verkennend onderzoek kunnen daarbij helpen.

5. Aanbevelingen voor de toekomst

- In het verkennend onderzoek zijn gegevens van de dieren, de bedrijven van herkomst, klinische data en monsters verzameld. Een groot deel van de beschikbare data behoeft nog een verdere analyse. Longspoelmonsters kunnen bijvoorbeeld verder virologisch onderzocht worden. Een mogelijke onderzoeksvraag zou kunnen zijn: zijn er andere virussen, waar nu niet naar gekeken is, die een rol spelen in de luchtwegproblemen bij kalveren?
- Verder onderzoek naar de causaliteit van voorkomende pathogenen bij luchtwegproblemen.
- Verder invullen van kennisvragen op het gebied van diagnostiek, ontwikkeling van diagnostische tools. De kalverhouderijsector heeft met name behoefte aan snelle en betrouwbare diagnostische tools, die bij voorkeur “on site” ingezet kunnen worden.
- Naast een POC diagnostische tool zou ingezet kunnen worden op de ontwikkeling van een generiek detectieplatform voor de simultane detectie van meerdere virussen, bacteriën en mycoplasmas: een multiplex-diagnostische tool. Zo'n multiplex diagnostische tool zou bijvoorbeeld ingezet kunnen worden bij de veterinaire praktijken die de grootste rol spelen bij de veterinaire bedrijfsbegeleiding in de vleeskalverhouderij. De voordelen van een multiplex diagnostische tool zijn: (1) tijdswinst, (2) kostenbesparing en daardoor (3) een betere bedrijfsmonitoring en –begeleiding. In één test / run kunnen meerdere virussen, bacteriën en/of mycoplasmas gedetecteerd kunnen worden. Bovendien heeft de multiplex diagnostische tool het voordeel dat de tool voor mobiele toepassing geschikt gemaakt kan worden. De tool zou eenvoudig op een veterinaire praktijk geplaatst kunnen worden, maar ook voor gebruik bijvoorbeeld achter in de auto of op andere specifieke locaties geschikt gemaakt kunnen worden. Monsters hoeven dan niet meer per definitie ingezonden te worden. De kosten van een dergelijke test zijn al snel voordeliger dan wanneer verschillende testen ingezet moeten worden (omslag ligt bij ca. drie afzonderlijke testen in vergelijking met de multiplex tool). Als tenslotte veehouder en dierenarts meer inzicht krijgen in welke ziekten en pathogenen op een bedrijf voorkomen, kan een gerichtere en efficiëntere bestrijding worden ingezet.
- Het pilotexperiment zou gevolgd kunnen worden door een groter experiment waar met behulp van bijv. de gezondheidsmonitor aangetoond wordt dat met een intensievere en/of betere veterinaire (inclusief diagnostische) ondersteuning op kalverhouderijen een significante bijdrage geleverd kan worden aan de verbetering van de gezondheid van kalveren, een reductie van interventiestrategieën en daarmee aan een meer duurzame kalverhouderij.
- Waarborgen van de inbedding van de opgedane kennis in onderwijs en veterinaire beroepsgroep. Ieder onderzoek is van nature een “lerend proces”, het gaat verder dan alleen verzamelen van een status quo. De insteek van ieder onderzoek zou moeten zijn, kennis vergaren, delen en borgen. Deze rapportage is een eerste aanzet hierin. Daarnaast zouden we de vergaarde informatie moeten delen op verschillende niveaus. Het eerste niveau zou de veehouder moeten zijn. Hij / zij wil weten wat er speelt op zijn / haar bedrijf, maar ook andere directe betrokkenen (zoals de verschillende integraties) moeten geïnformeerd worden over hetgeen gevonden is en gedeeld moeten worden in de (nieuwe) inzichten die hiermee verkregen zijn. Tenslotte zijn er dierenartsen en vele andere belanghebbenden (zie figuur 8) die willen weten wat er speelt, waar kansen en bedreigingen liggen. De in dit rapport beschreven resultaten zijn teruggekoppeld naar de direct betrokkenen, begeleidende dierenartsen, en naar de betrokken integraties.

- Initiëren van een Lerend Netwerk Endemische Dierziekten Kalverhouderij (zie figuur 8). Het LNEKD zal verder moeten groeien met als primaire doel expertise ontwikkeling en kennisverspreiding. Op de lange termijn zou het LNEKD een groot netwerk kunnen worden waarin niet alleen naar technische innovaties gekeken wordt, maar rekening houdende met specifieke afwentelingen nagedacht kan worden over systeem innovaties, die tot een betere gezondheid en gezondheidszorg leidt, met oog voor mens, dier en milieu. Een LNEKD heeft een kans van slagen met instemming / inbreng van de integraties. De eerste aanzet is gemaakt met het verkennend onderzoek. De opgedane kennis is gedeeld met praktici, de integraties en de sector.

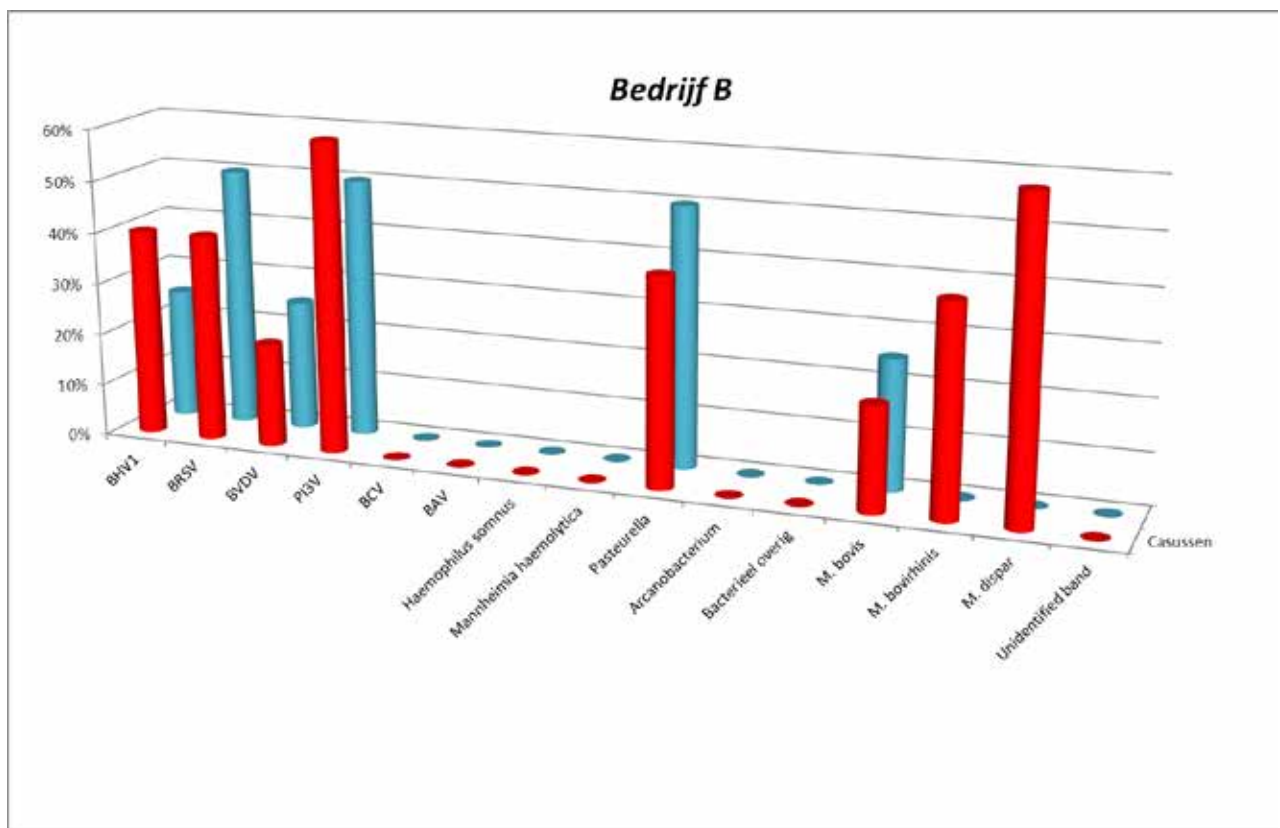
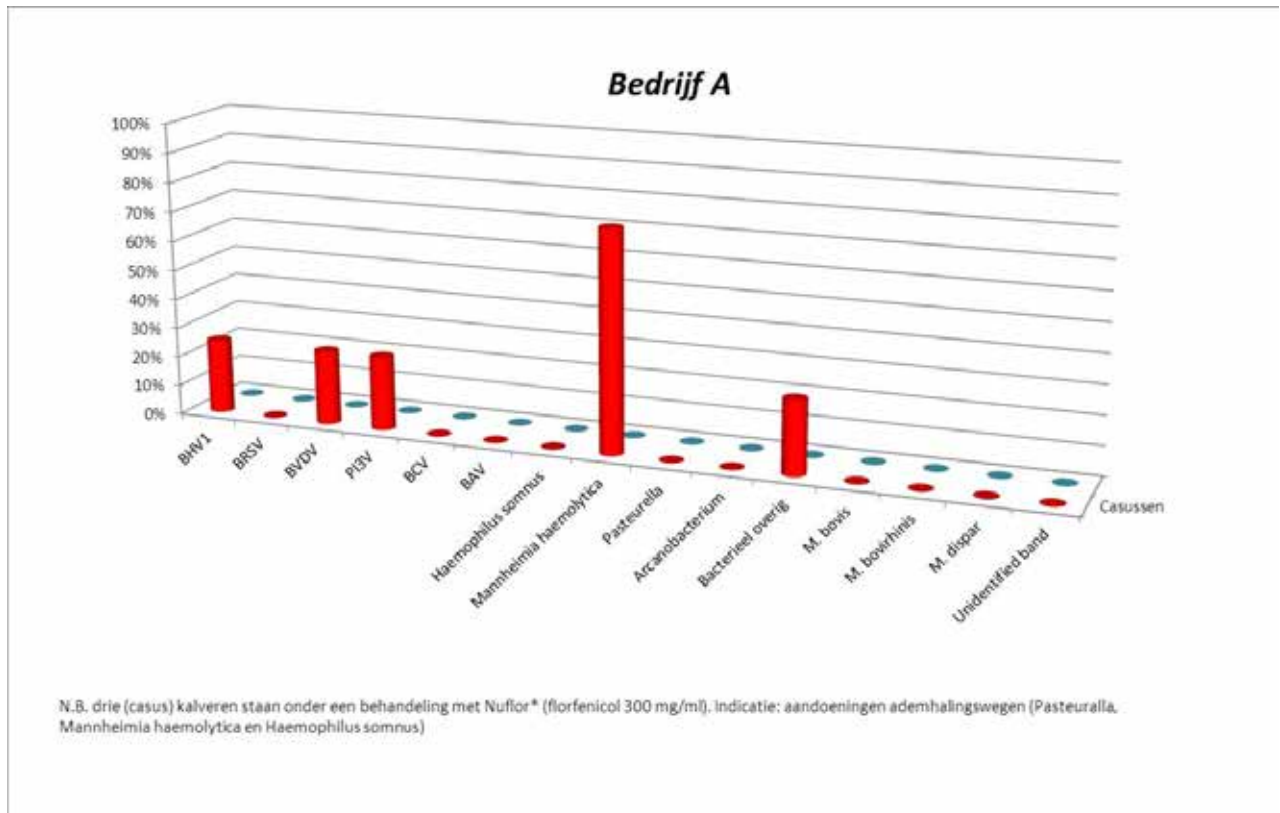


Figuur 8 Initiëren van een Lerend Netwerk Endemische Dierziekten Kalverhouderij. Een lerend netwerk is gericht op de ontwikkeling en verspreiding van kennis en expertise. De twee kleinere ingevoegde plaatjes symboliseren dat kennis co-creatie is. De eerste aanzet tot een lerend netwerk is gemaakt in 2010. Er is gewerkt aan kennis- en expertise ontwikkeling. De eerste resultaten zijn gedeeld in verschillende presentaties, maar ook een rapportage en mogelijke publicaties moeten bijdrage aan de kennisdoorstroming vanuit het publieke naar het private en sectorale domein.

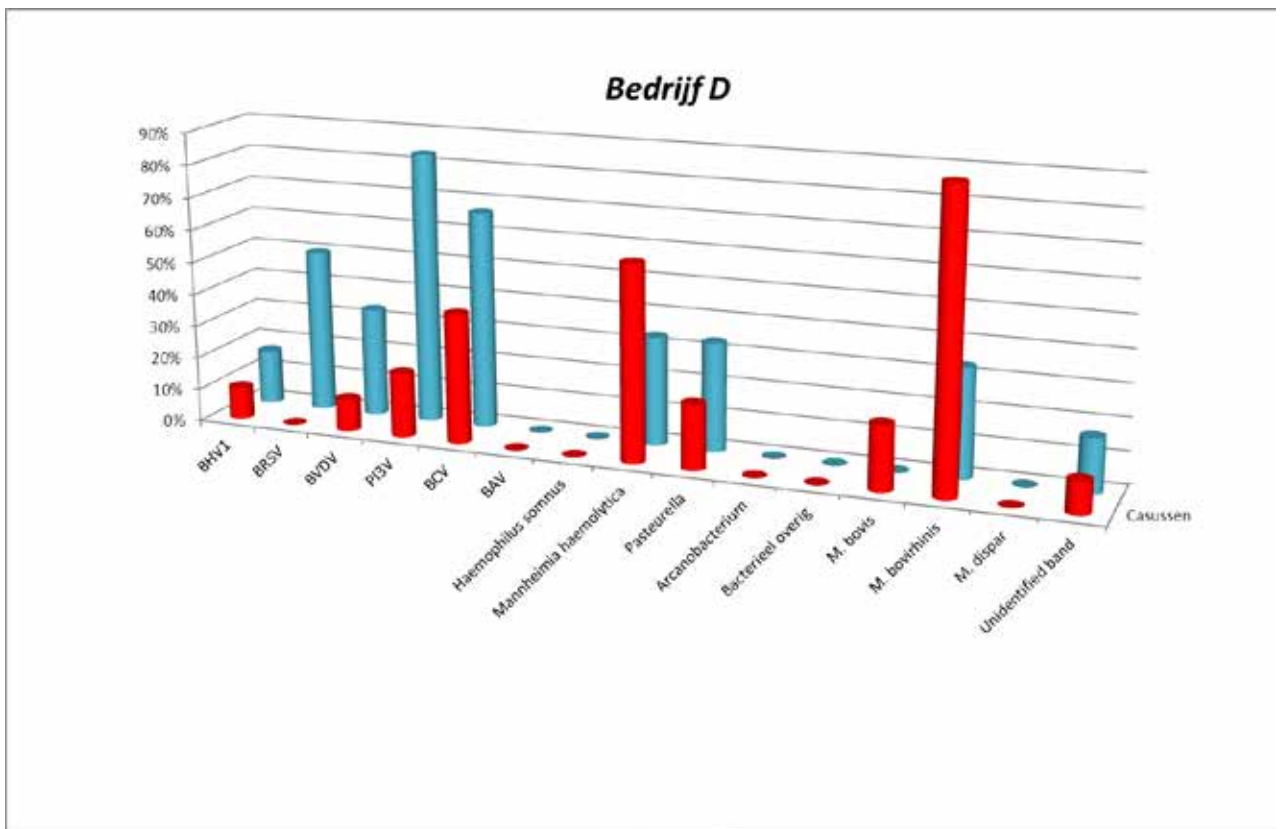
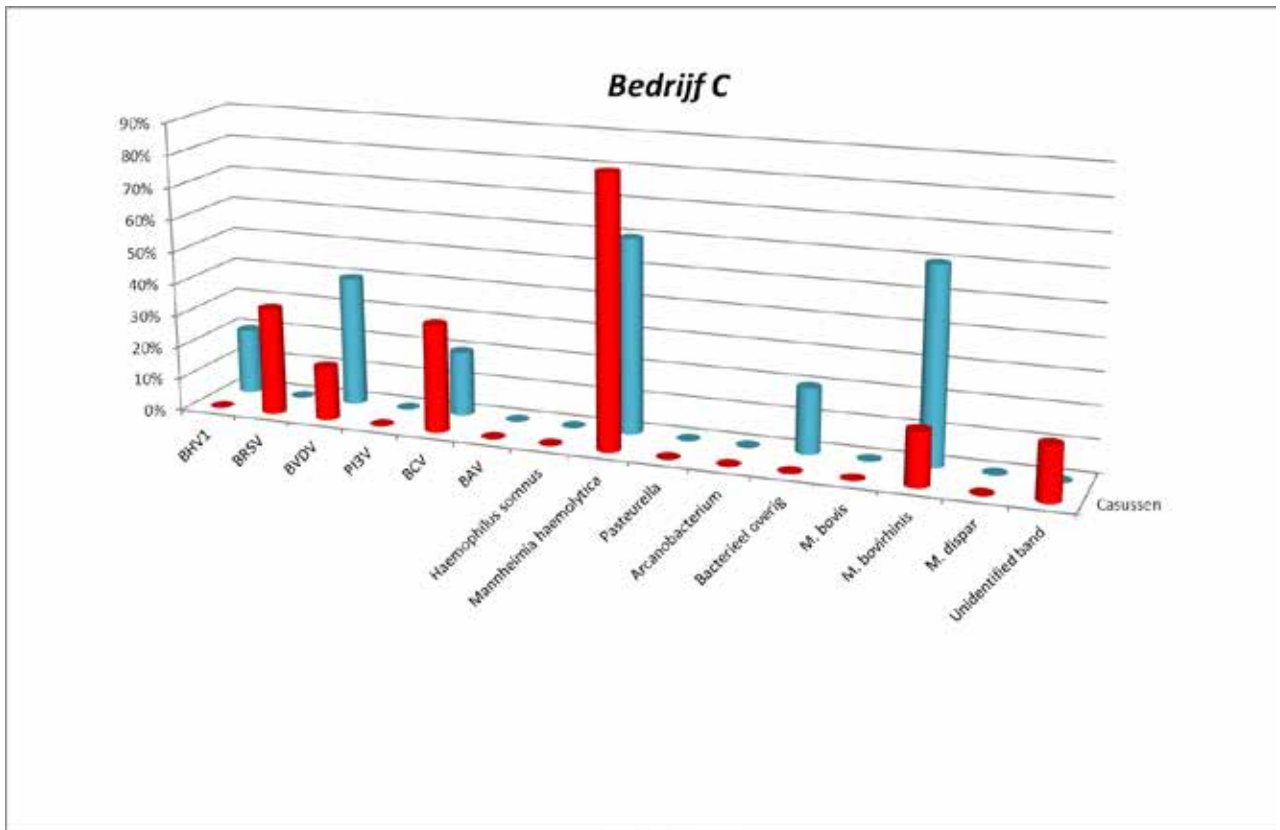
6. Literatuur

- Catry, B., S. Croubels, et al. (2008). "Influence of systemic fluoroquinolone administration on the presence of *Pasteurella multocida* in the upper respiratory tract of clinically healthy calves." Acta Vet Scand**50**: 36.
- Rice, J. A., L. Carrasco-Medina, et al. (2007). "Mannheimia haemolytica and bovine respiratory disease." Anim Health Res Rev**8**(2): 117-28.

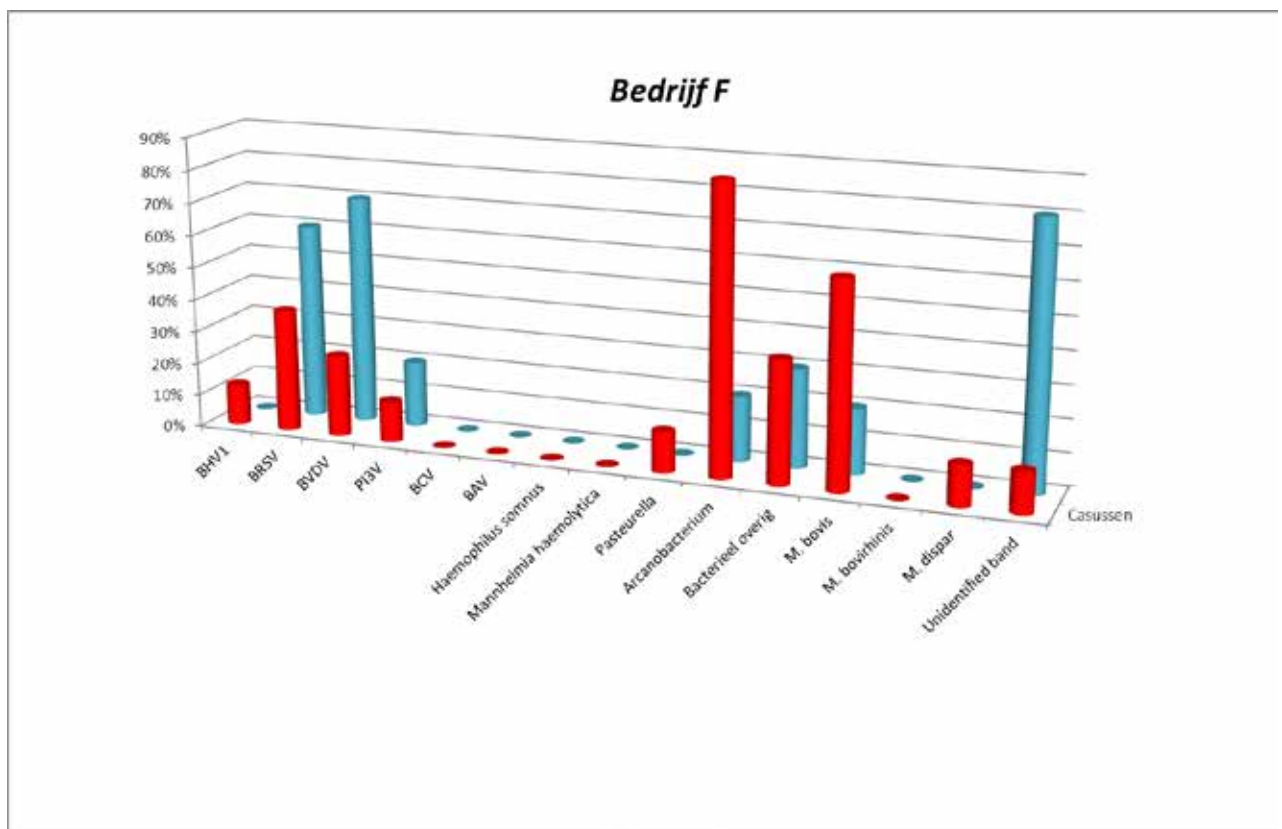
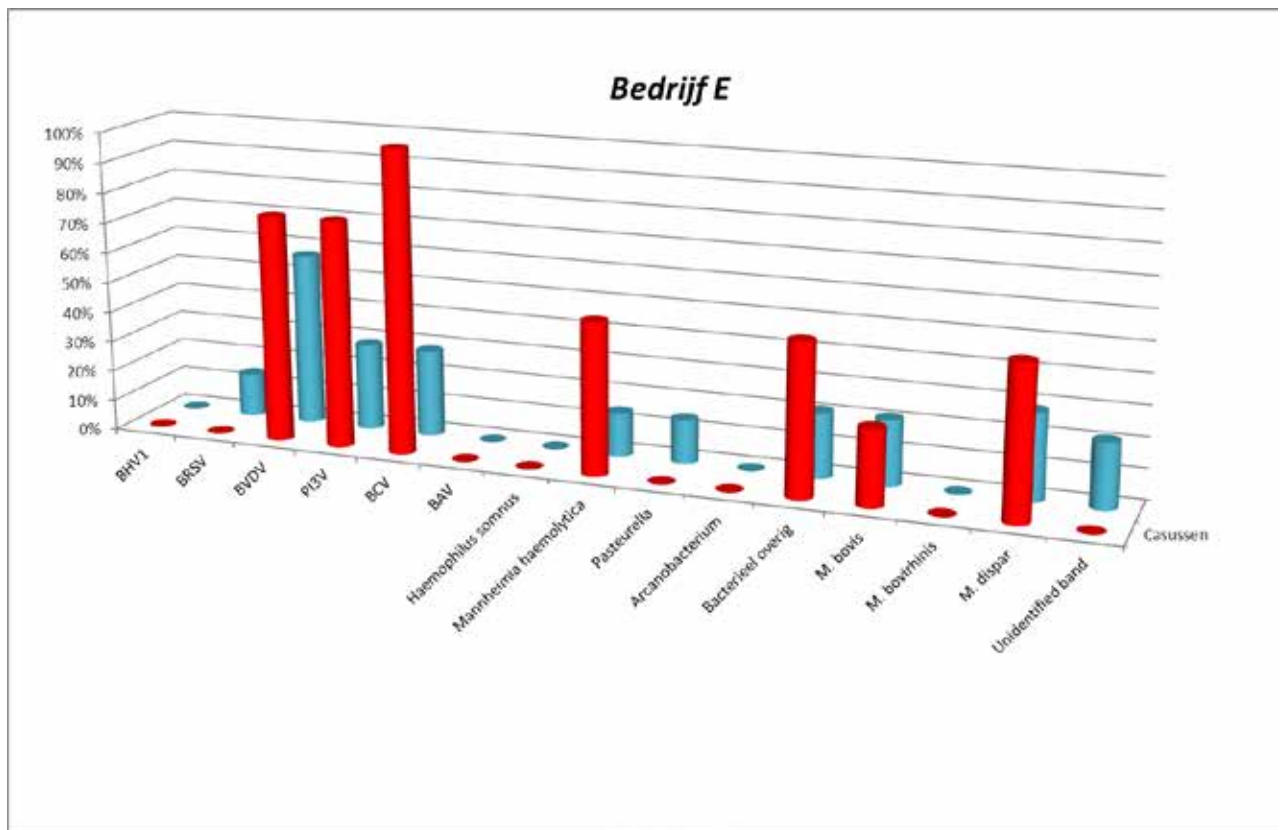
Bijlage 1 Uitslagen per pathoog / per bedrijf



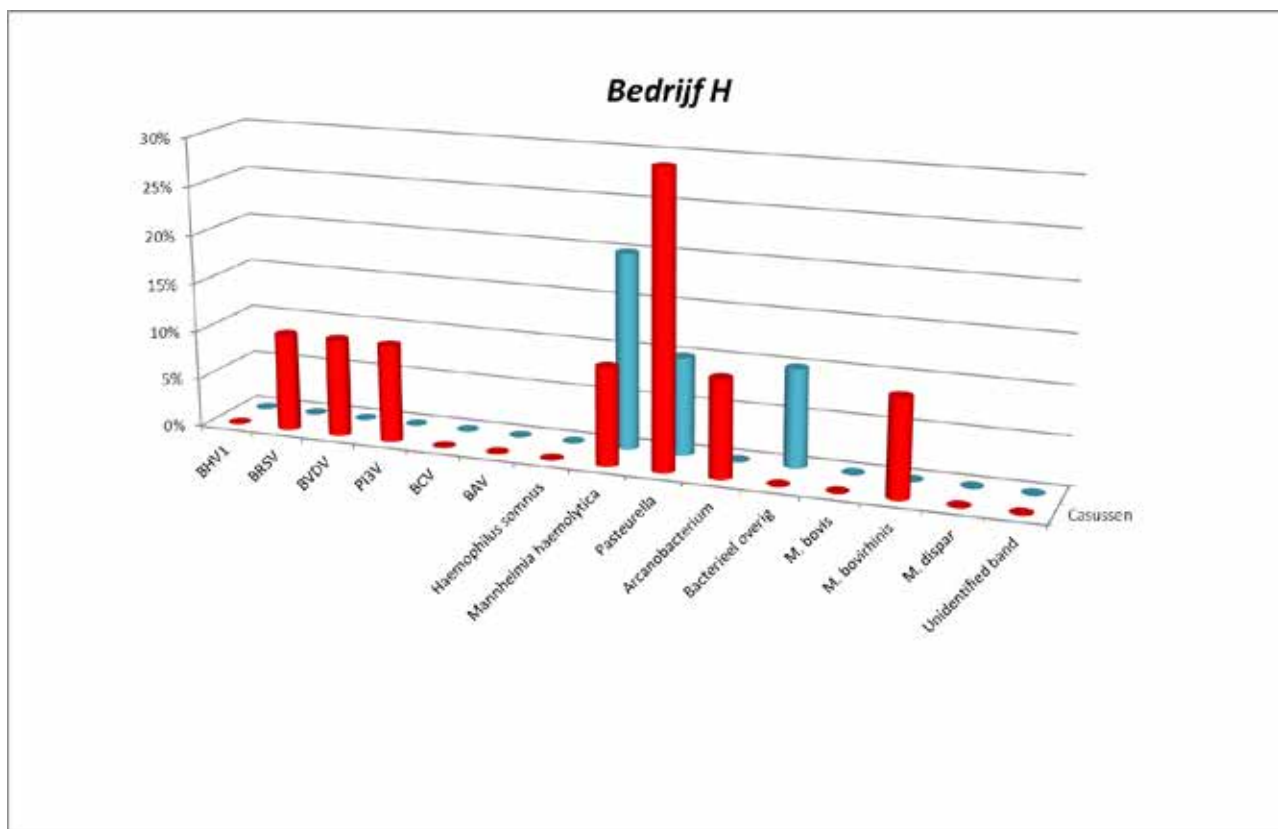
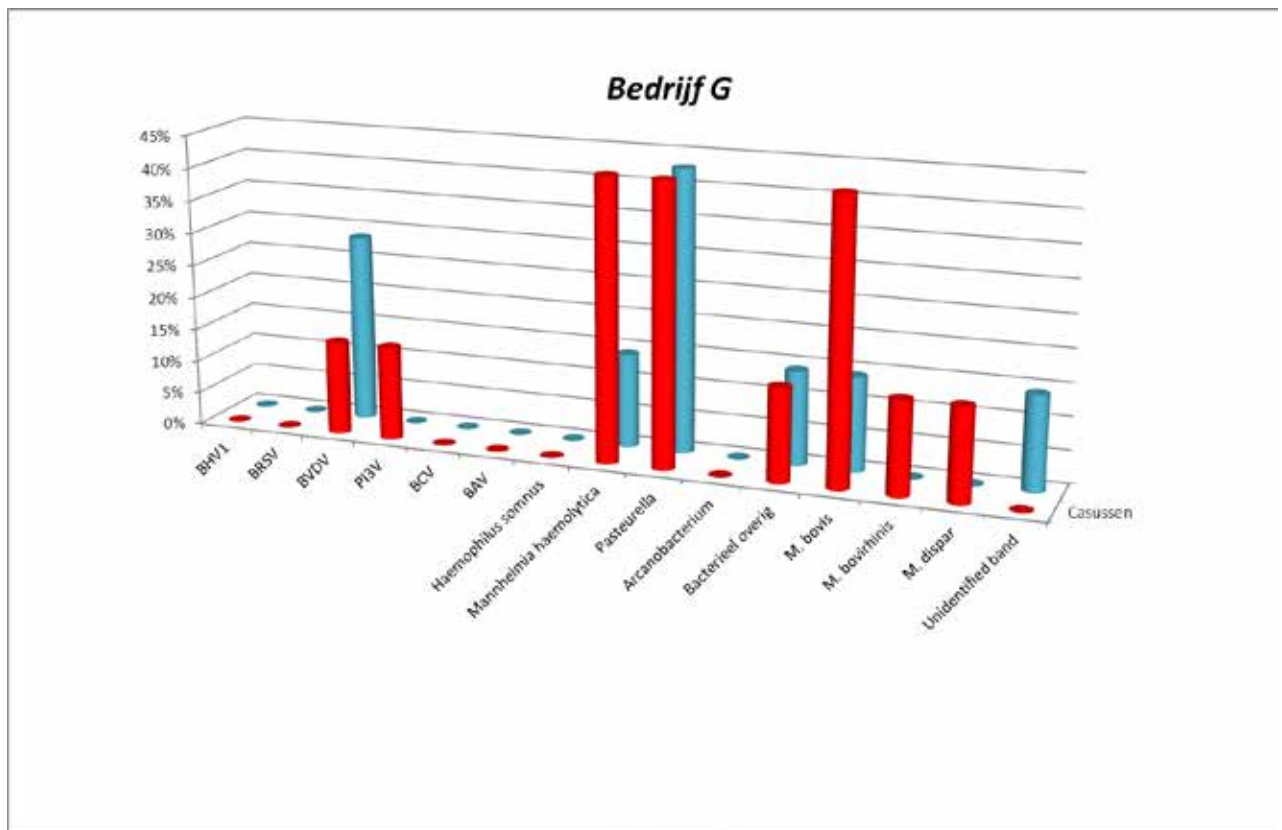
Percentueel zijn in rood de casussen en in blauw de controlecasussen weergegeven.



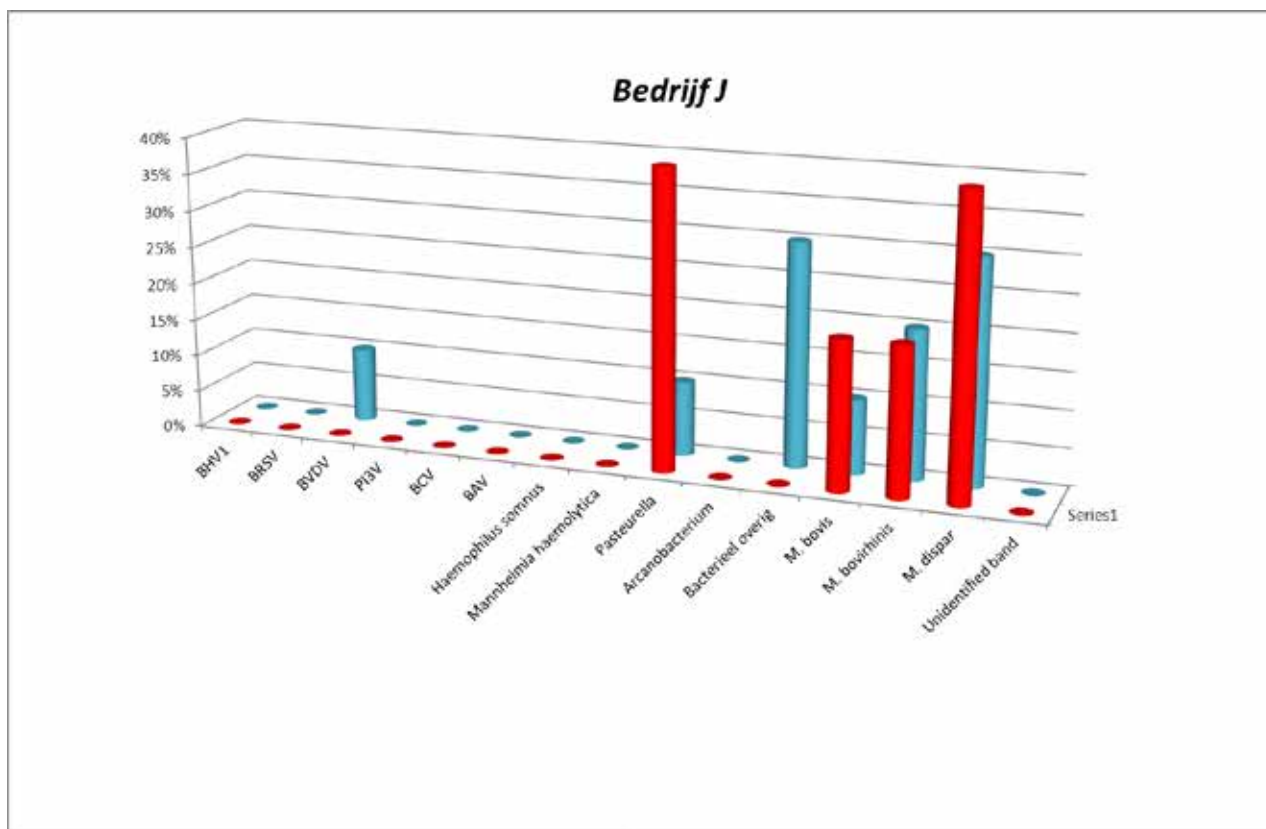
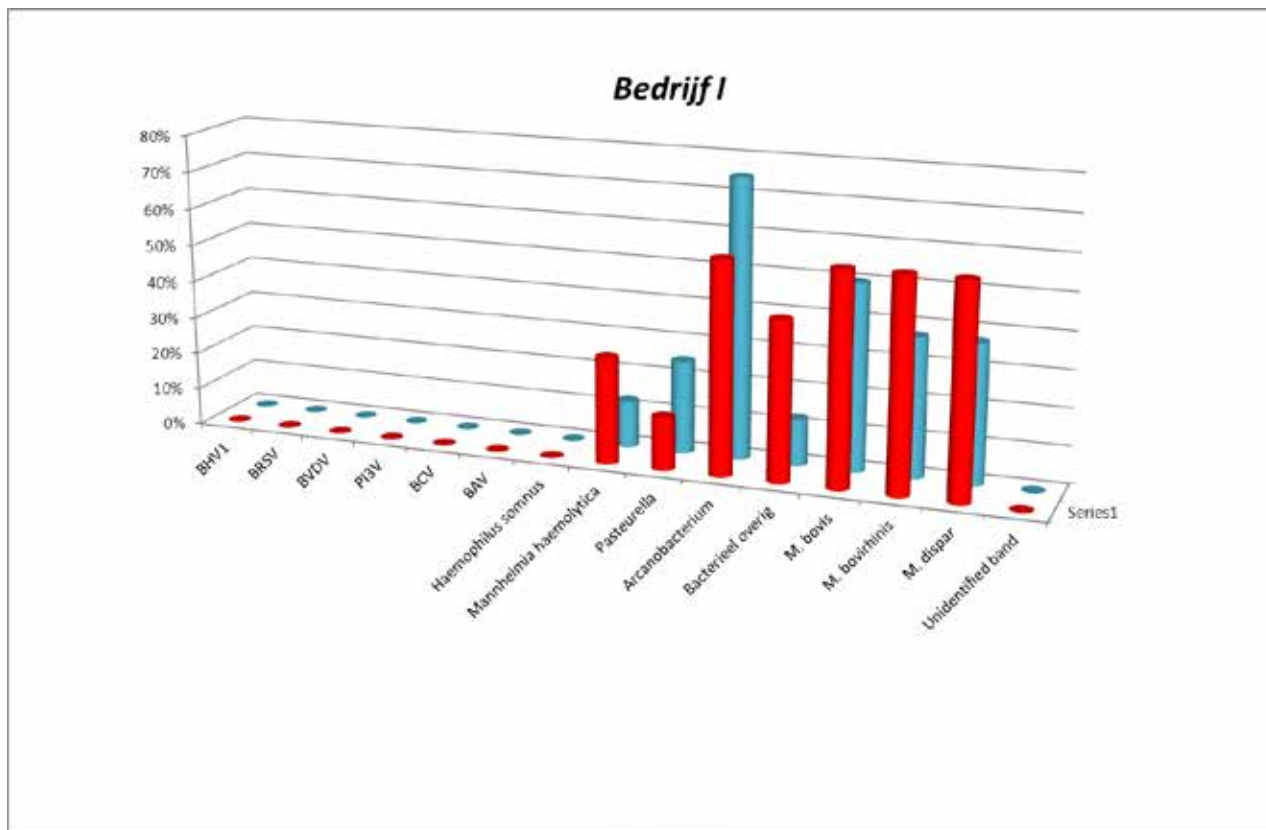
Percentueel zijn in rood de casussen en in blauw de controlecasussen weergegeven.



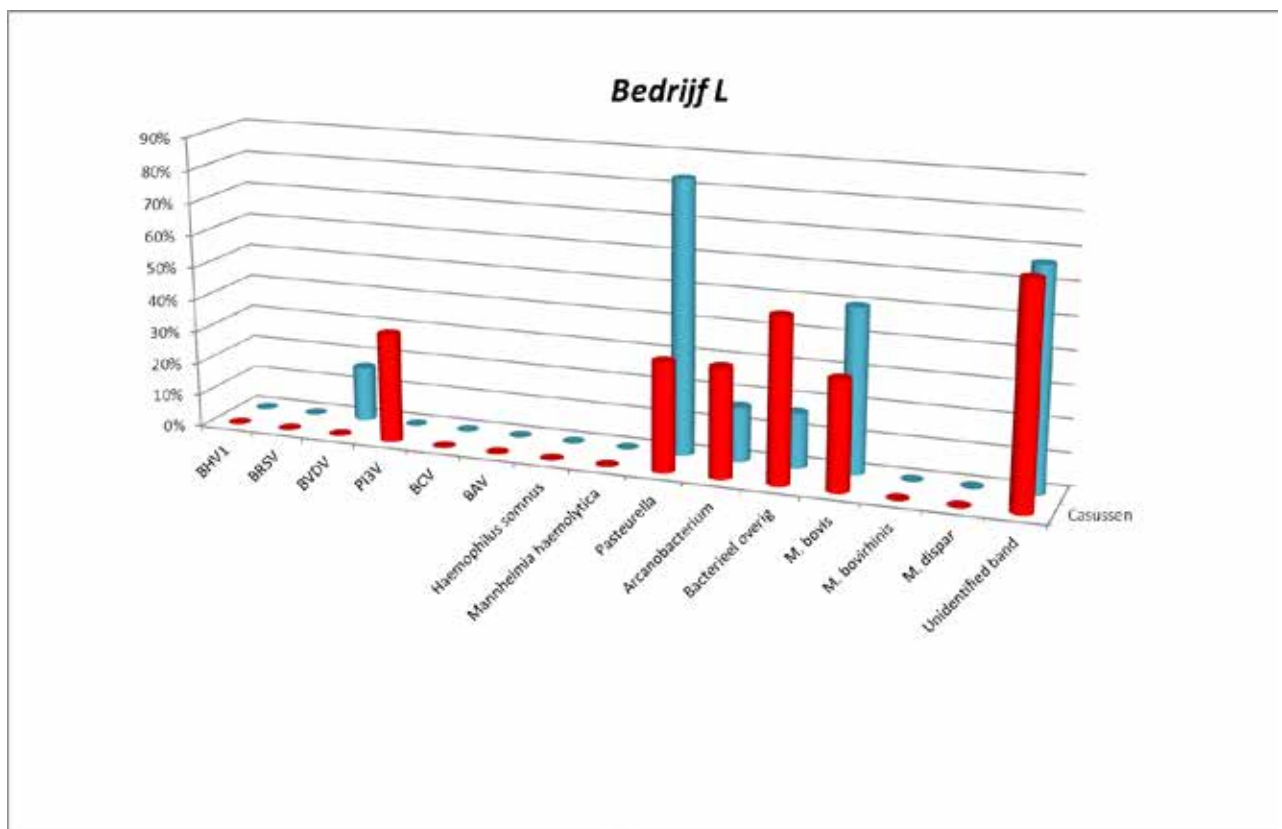
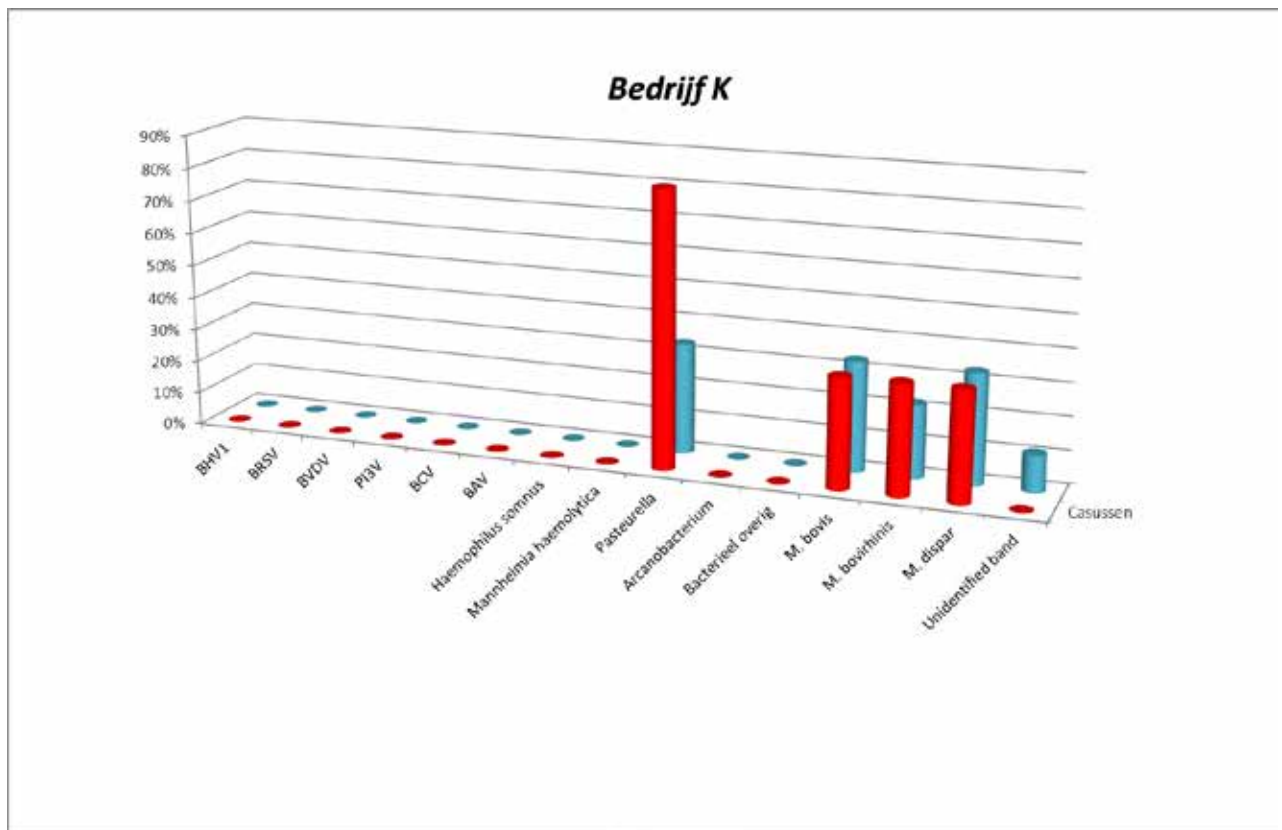
Percentueel zijn in rood de casussen en in blauw de controlecasussen weergegeven.



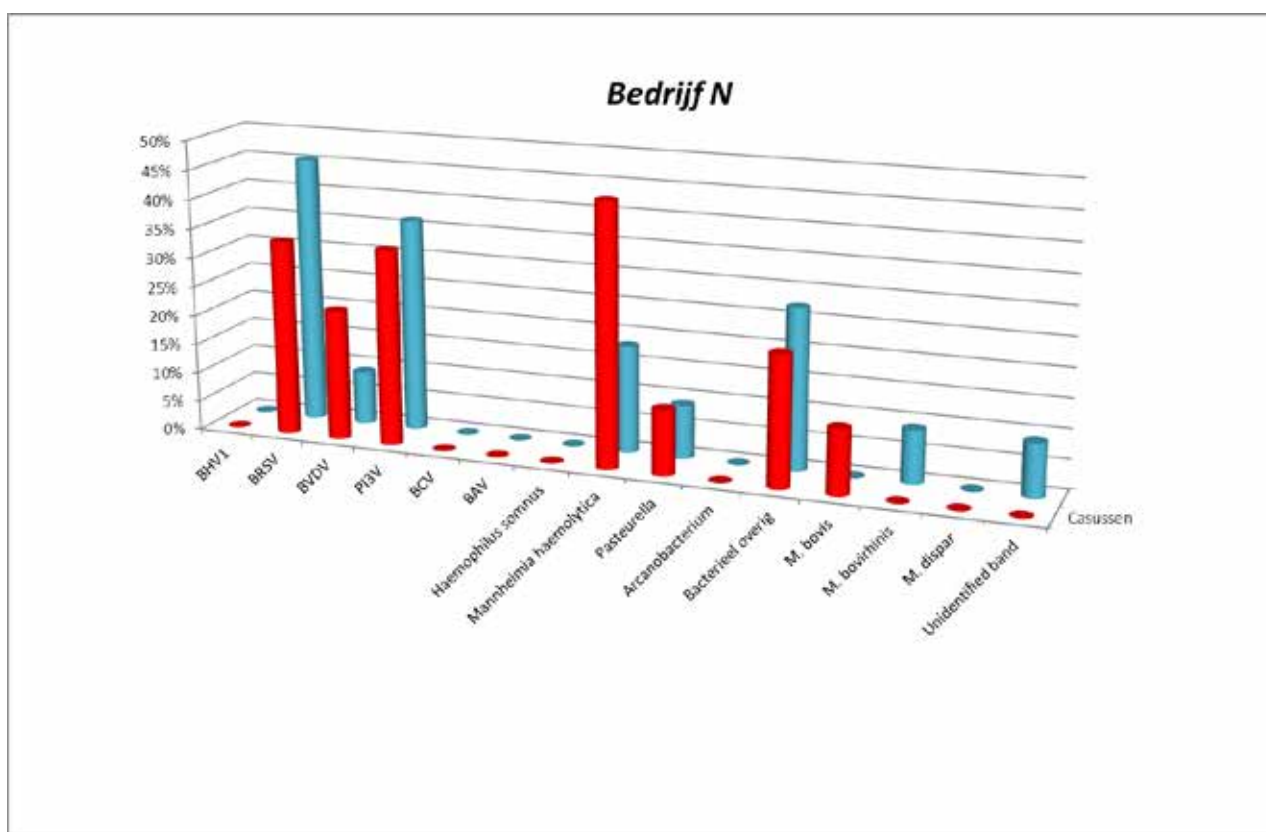
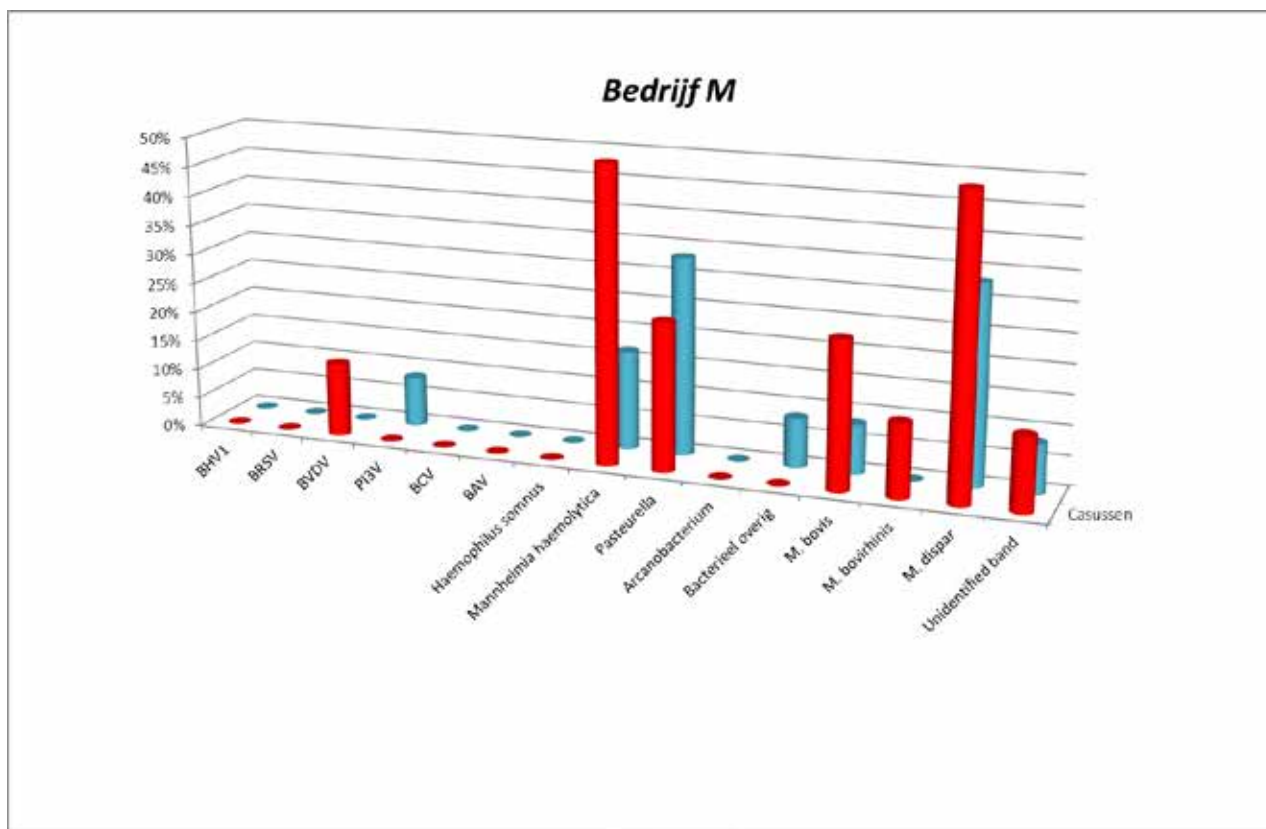
Percentueel zijn in rood de casussen en in blauw de controlecasussen weergegeven.



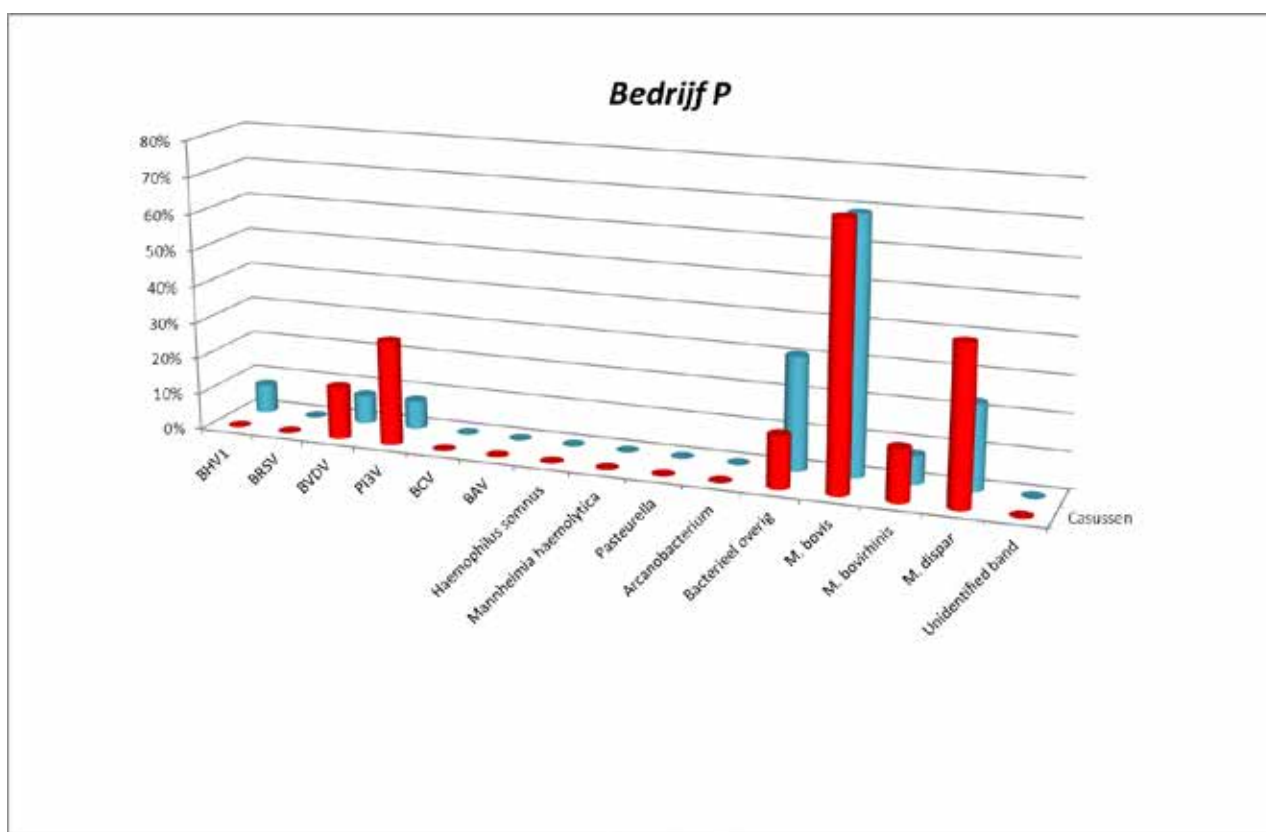
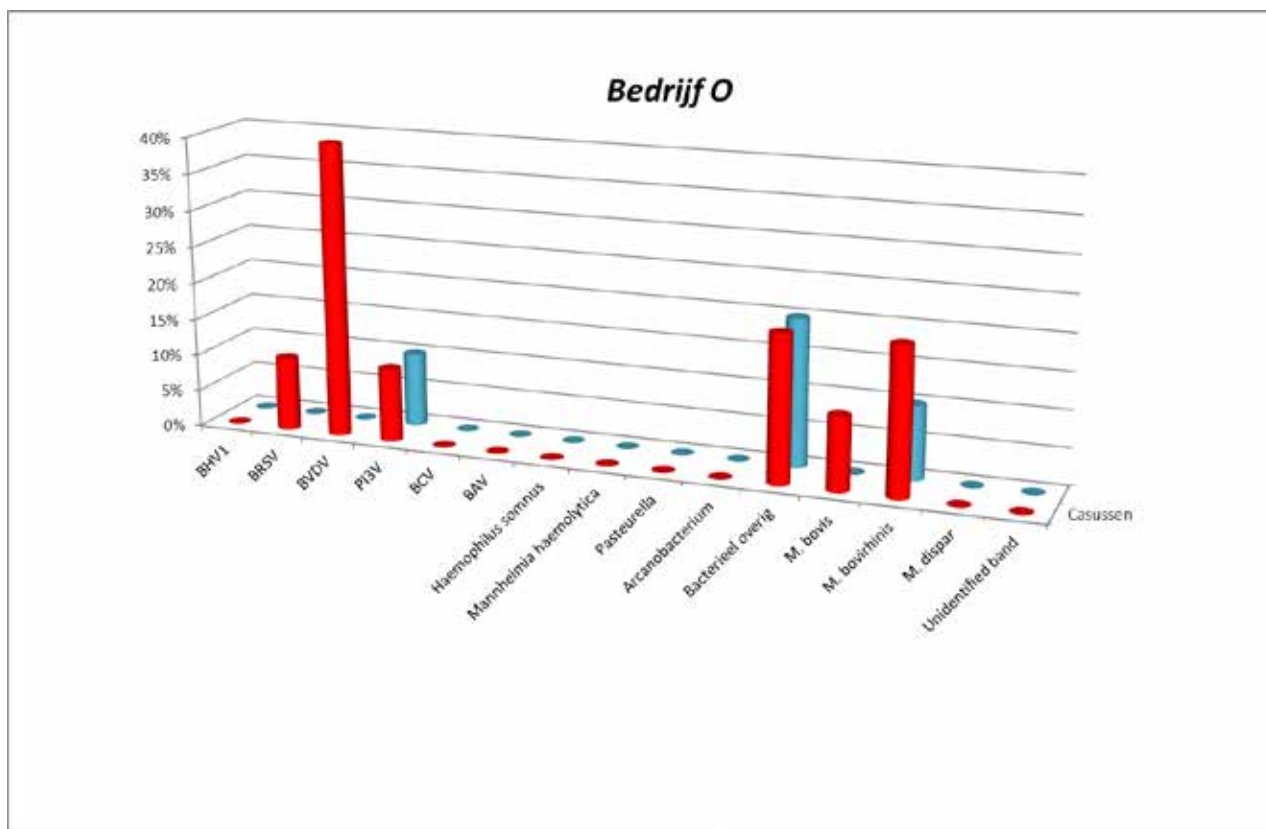
Percentueel zijn in rood de casussen en in blauw de controlecasussen weergegeven.



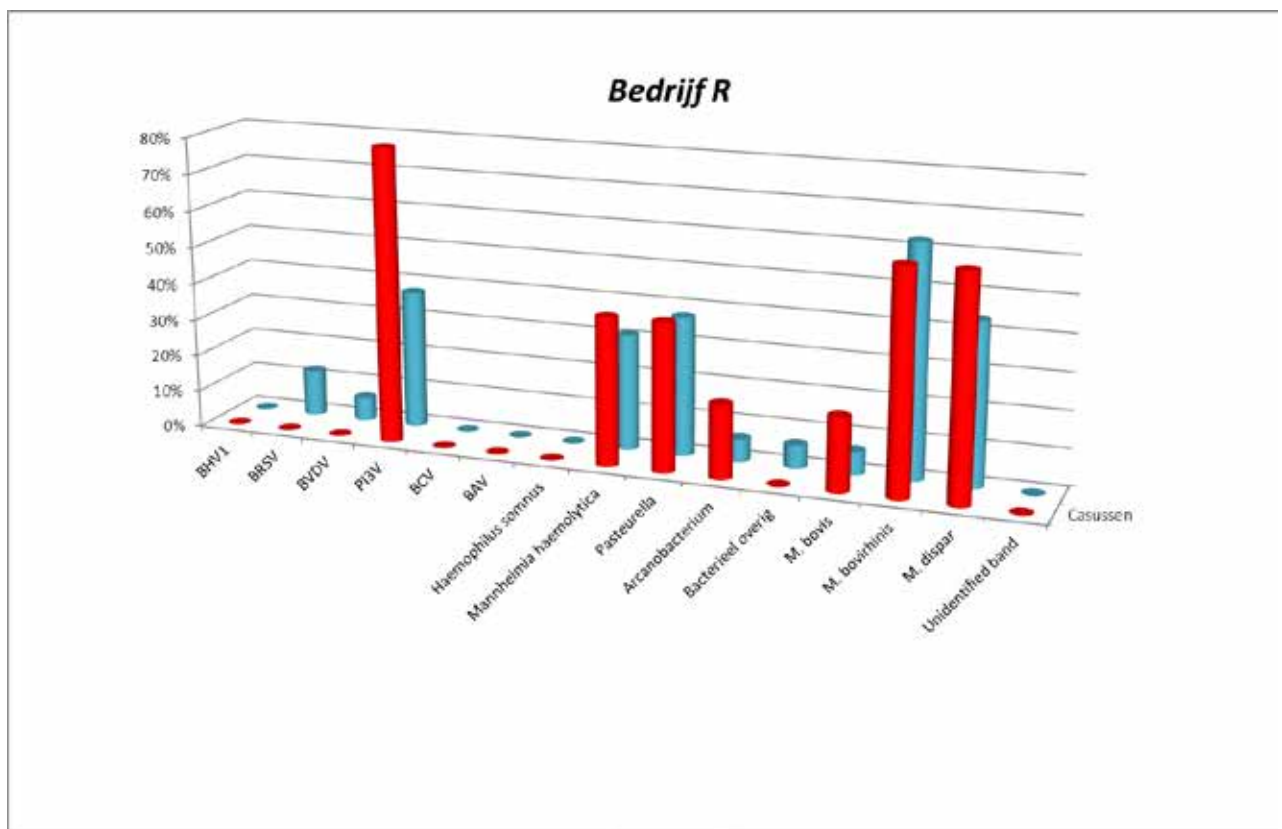
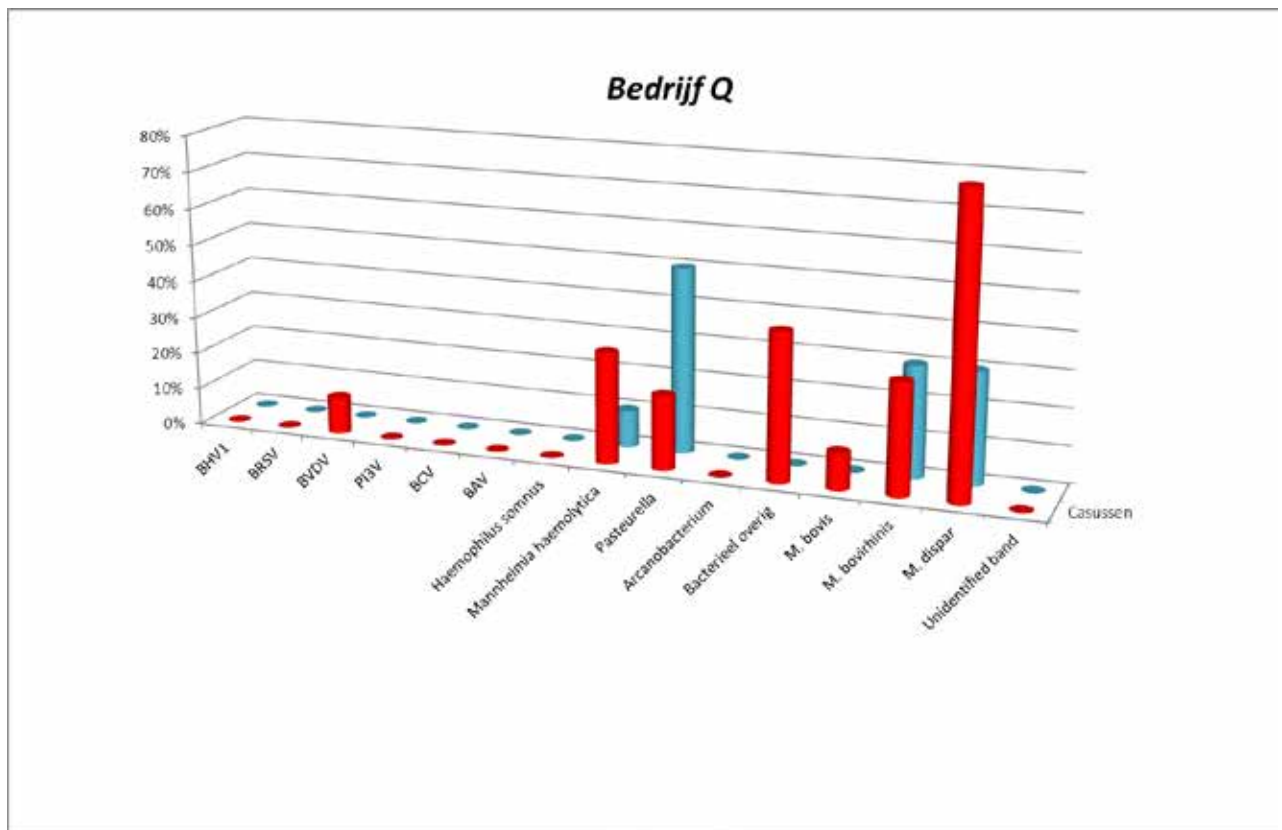
Percentueel zijn in rood de casussen en in blauw de controlecasussen weergegeven.



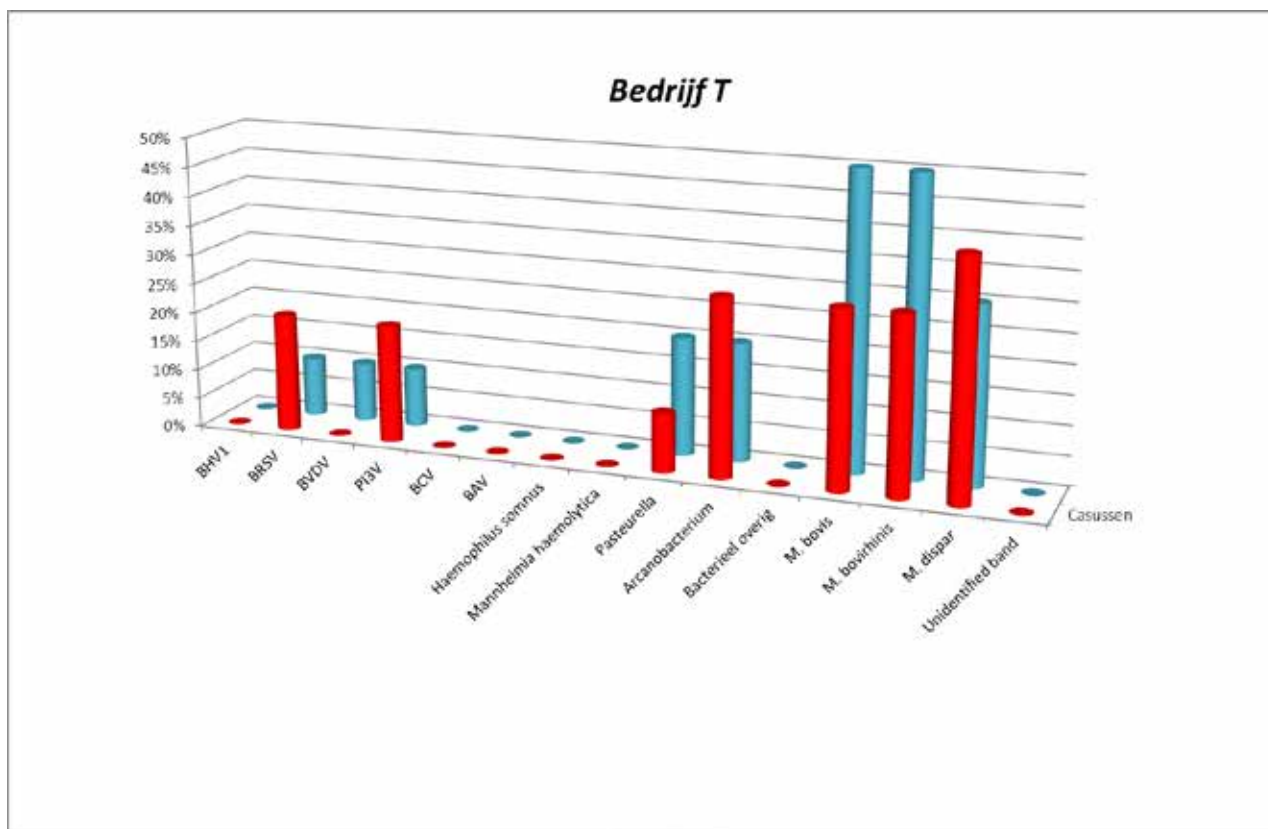
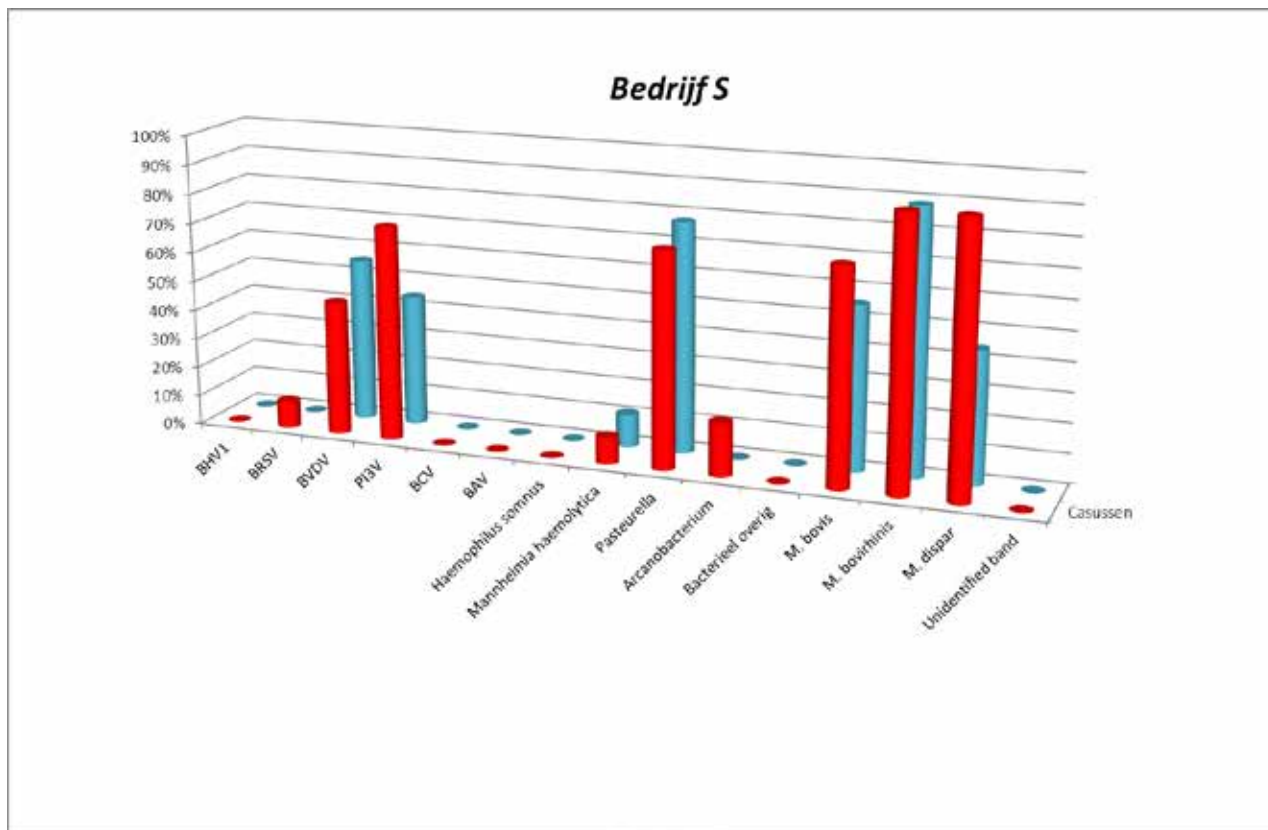
Percentueel zijn in rood de casussen en in blauw de controlecasussen weergegeven.



Percentueel zijn in rood de casussen en in blauw de controlecasussen weergegeven.



Percentueel zijn in rood de casussen en in blauw de controlecasussen weergegeven.



Percentueel zijn in rood de casussen en in blauw de controlecasussen weergegeven.



CENTRAL VETERINARY INSTITUTE
WAGENINGEN UR