Bruikbaarheid van een Tankmelk ELISA voor het aantonen van longwormuitbraken

Door: Drs. Philip Verbeek
Studentnummer 3051404
Augustus – December 2010

Begeleiders: Dr. Harm Ploeger
Drs. Mathilde Uiterwijk

Departement Infectieziekten en Immunologie
Afdeling Klinische Infectiologie

Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Utrecht

Inhoud

Abstract 2

Introductie 3

Doel van het onderzoek 7

Materiaal en Methoden 9

Resultaten 12

Discussie 21

Conclusie 26

Referenties 27

Bijlagen 1 & 2

Abstract

Infections of the bovine lungworm *Dictyocaulus viviparus* are the main cause for respiratory disease in (young) cattle. Increasing numbers of clinical lungworm infections are being seen in herds of adult dairy cows in the Netherlands. Serological testing is one of the methods being used to diagnose these infections. Recent studies have suggested the detection of antibodies with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in milk samples instead of sera as a possible tool to diagnose lungworm infections. To assess the value of the detection of antibodies in bulk milk in order to diagnose clinical outbreaks, 16 affected and 21 non-affected (control) herds of adult cattle have been sampled on faeces, sera and bulk milk. Two types of ELISA using two different antigens from adult worms (the 'Hannover' ELISA based on a recombinant Major Sperm Protein; the 'GD' ELISA based on a specific low molecular weight antigen) were tested. The results were said to be positive or negative in relation to a set cut-off value expressed as Optical Density Ratio (ODR). The 'Hannover' ELISA exhibited a sensitivity and specificity of 50% and 90,5% for detecting outbreaks using a cut-off value of 0,493. The 'GD' ELISA showed a sensitivity and specificity of 100% and 28,6% using a cut-off value of 0,07. Although both ELISA's could not satisfactory distinguish affected herds from non-affected herds, they were predictive of the % seropositivity of the individual animals in the herd.

In addition, a national survey has been executed to estimate the prevalence of outbreaks in herds in the Netherlands. In October of 2010 305 dairy farms were sampled on bulk milk in order to assess the level of lungworm antibodies. 60 farmers were contacted and asked whether clinical signs of lungworm were or had been present during the current season. Using the 'GD' ELISA 81% of the 305 herds was positive for antibodies. Out of 60 herds, 4 had experienced clinical signs of lungworm (6,7%). Out of these 4 bulk milk samples, 3 samples originated from a group of 20 samples with an ODR between 0,24 – 0,37 (15%). Apparently, the results of the ELISA reflect a kind of seroprevalence and do not in any way show a prevalence in clinical outbreaks of lungworm.

1 Introductie

1.1 Inleidend

Het voorkomen van *Dictyocaulus viviparus* infecties in melkveekoppels in Nederland is het onderwerp van verscheidene studies door de jaren heen. De volwassen longworm kan bij de gastheer een parasitaire bronchitis veroorzaken als gevolg van larvale migratie naar de longen na orale opname van de infectieuze L3 larven. De voornaamste klachten die hieruit voortkomen zijn hoesten, vermagering en, in het geval van melkvee, melkgiftdaling (Holzhauer et al., 2003). Reeds decennialang is bekend dat longworm de voornaamste oorzaak is voor respiratoire klachten bij het jongvee (Michel, 1969; Saatkamp et al., 1994; Holzhauer et al., 2003). In de meeste gevallen leidt de besmetting van een koppel kalveren of pinken niet tot een uitbraak. Naast het gebruik van preventieve maatregelen zoals vaccinatie en ontworming is dit vooral te danken aan de immuniteitsopbouw binnen de jongveekoppel (Eysker et al., 1993). Vanaf begin jaren '90 wordt een toename gezien van het aantal uitbraken van longworm bij volwassen melkvee. In het Verenigd Koninkrijk werd dit al zichtbaar door het toenemende aantal meldingen van longwormproblemen bij melkvee (McKeand, 2000). In Nederland is o.a. door de Gezondheidsdienst voor Dieren (GD) opgemerkt dat longworminfecties onder de volwassen dieren steeds vaker voorkomen en dat dit lang niet altijd tijdig wordt onderkend door landbouwhuisdierenartsen (Holzhauer et al., 2003).

1.2 (Sero)prevalentie longwormuitbraken

Inzicht in de prevalentie en dynamiek van longworminfecties binnen melkveebedrijven is van wezenlijk belang om effectieve bestrijdings- en preventieprogramma's te ontplooien.
Voor wat betreft de Nederlandse situatie is al in 1981 onderzoek gedaan naar de seroprevalentie van longworm op melkveebedrijven aan de hand van een ELISA gebaseerd op ongezuiverde antigenen van de volwassen longworm (Boon et al., 1984). Wanneer er geen onderscheid werd gemaakt tussen de verschillende leeftijdsgroepen binnen de bemonsterde koppels bleek 91% van de koppels seropositief. Onderzoek uit 1997 naar de diagnostische waarde van een ELISA gebaseerd op 'low-molecular-weight' specifieke antigenen afkomstig van de volwassen longworm betrof onder andere de bemonstering van 64 melkveehouderijen. Tot 73% van de bemonsterde bedrijven bleek seropositieve dieren te hebben met de kanttekening dat het hier bedrijven betrof met een geschiedenis van longworm in voorgaande jaren (Cornelissen et al., 1997). Onderzoek naar het voorkomen van patente infecties bij melkkoeien op melkveebedrijven in de regio rond Utrecht liet 77% positieve bedrijven zien. Dit betrof het aantal bedrijven dat in de periode februari-augustus minimaal 1 keer een individueel dier met een positieve mestuitslag liet zien (Eysker et al., 1994). Gegevens uit het Verenigd Koninkrijk laten zien dat het aantal gemelde uitbraken van longworm onder het melkvee vanaf 1994 een gestage groei laat zien met een toename van 64% in 1997 t.o.v. het voorgaande jaar. Deze cijfers zijn wellicht nog ondergewaardeerd aangezien veel veehouders zelf maatregelen nemen zonder een dierenarts in te schakelen (McKeand, 2000).

1.3 Epidemiologie

Er is dus in verschillende studies vastgesteld dat longworminfecties op een aanzienlijk deel van de melkveebedrijven een rol speelt. Dit zegt echter niets over het voorkomen van longworminfecties met een klinisch verloop bij individuele dieren en/of bij de melkgevende koppel als geheel. Factoren van grote invloed hierop zijn de immuniteitsopbouw bij het jongvee, het verloop van de opgebouwde immuniteit gedurende de latere levensjaren en de kans die de koppel melkvee heeft om in aanraking te komen met individuen die infectieuze longwormlarven uitscheiden.

Verspreiding van een longworminfectie binnen een koppel jongvee vindt plaats via weidebesmetting. Bij maagdarmwormen zoals *Nematodirus* of *Ostertagia* spelen seizoensinvloeden een belangrijke rol als het gaat om de hoeveelheid infectieuze larven (en daarmee de infectiedruk) op het weiland. Bij longworm is de besmettingsgraad van het weiland veel directer geassocieerd met de aanwezigheid van uitscheiders binnen de koppel. Dit is voor een aanzienlijk deel toe te schrijven aan de snelle translatie van larven via de schimmel *Pilobolus* (± 1 week) en de daaropvolgende relatief korte overlevingstijd van de larven (Eysker and van Miltenburg, 1988). Een prepatent periode in acht nemend van plusminus 3 weken zou men kunnen stellen dat nieuwe besmettingsgolven om de maand plaatsvinden en er dus opeenvolgende generaties longwormen ontstaan (Michel, 1969). Over de immuniteitsopbouw tijdens deze generaties kan veel worden gespeculeerd. Met de detectie van patente infecties als uitgangspunt kan worden vastgesteld dat een 1^{e} generatie van larvale uitscheiding na eerste blootstelling vaak opgevolgd wordt door een 2^{e} generatie van lagere larvale uitscheiding, wijzend op een zekere mate van immuniteitsopbouw. Deze daling kan ook pas in de 3^{e} generatie worden ingezet. Daar waar de immuniteitsopbouw in de voorgaande generatie toch te laag is kunnen zich klinische klachten ontwikkelen in de daaropvolgende generatie. Een en ander maakt echter de ontwikkeling van de eerste klinische symptomen vanaf de 3e generatie, en dus na 3 maanden in het weideseizoen, veel minder waarschijnlijk (Michel, 1969; Eysker and van Miltenburg, 1988; Eysker et al., 1993).
Volwassen koeien blijven gevoelig voor infectie wanneer ze niet eerder in aanraking zijn gekomen met de parasiet. Deze situatie kan voorkomen wanneer opfok van jongvee op longwormvrije percelen of bedrijven plaatsvindt of wanneer jongvee zodanig goed wordt ontwormd dat er geen weerstandsopbouw plaatsvindt. Er zijn ook aanwijzingen dat volwassen koeien weer gevoelig worden voor infectie wanneer ze niet periodiek gechallenged worden in het veld. Van kalveren is bekend dat de geïnduceerde immuniteit door vaccinatie met bestraalde longwormlarven niet blijvend is en dat een (lichte) veldinfectie essentieel is voor de opbouw van langdurige immuniteit (McKeand, 2000). Het is nog onduidelijk in welke mate deze problematiek een rol speelt bij volwassen melkvee en wat de invloed is van vaccinatie en ontwormingsstrategieën bij het jongvee op het voorkomen van uitbraken bij de volwassen koppel (Ploeger, 2002). Complicerende factor is de beschrijving van het zogenaamde 'herinfectiesyndroom'. Hierbij wordt betoogd dat als het aantal opgenomen infectieuze L3 larven maar hoog genoeg is dit kan leiden tot klinische klachten bij dieren die al eerder een infectie hebben doorgemaakt en dus immuniteit hebben opgebouwd. In dit geval veroorzaakt de afdoding van migrerende larven een overgevoeligheidsreactie in de longen (Smith, 1996; Wapenaar et al., 2007). De ontwikkeling van volwassen wormen en dus een patente infectie blijft hierbij achterwege (Holzhauer et al., 2003).

1.4 Ontstaan van een uitbraak

Onder koppels kalveren en pinken spelen een aantal factoren een rol bij het ontstaan van een uitbraak. Dragers blijken voor een groot deel verantwoordelijk voor de initiële weidebesmetting als startpunt voor opeenvolgende besmettingsgolven. Dragerschap onder de volwassen koeien beperkt zich tot enkele dieren en veroorzaakt een relatief lage besmettingsgraad van het weiland (Saatkamp et al., 1994). De al eerder genoemde prevalentie studie naar patente infecties binnen koppels melkvee liet zien dat binnen de meeste melkveekoppels dragers voorkomen. Naast het feit dat hierdoor een (lichte) weidebesmetting in stand wordt gehouden, is dit fenomeen belangrijk voor het op peil houden van de immuniteit binnen de volwassen koppel (Eysker et al., 1994). In het geval van een uitbraak blijken jonge (en dus vaak gevoelige) dieren vaak de bron van infectie te zijn door hun hoge uitscheiding en aanzienlijke bijdrage aan de opbouw van de weidebesmetting. Hierdoor kunnen klinische verschijnselen al na 1 of 2 generaties longwormen optreden (Saatkamp et al., 1994). Overwintering van larven op de weide als oorzaak voor primaire infecties in het voorjaar als startpunt voor een eventuele uitbraak speelt niet of nauwelijks een rol en is slechts een enkele keer aangetoond bij onderzoek aan de Faculteit Diergeneeskunde te Utrecht. (Eysker et al., 1992).

1.5 Diagnostische methoden

Bij de keuze, het gebruik en de interpretatie van diagnostische methoden moet rekening worden gehouden met de hiervoor beschreven epidemiologische dynamiek van longworminfecties. Het klinische beeld kan opvallen waarbij respiratoire klachten in combinatie met managementfactoren (beweiding, ontworming) doorslaggevend kunnen zijn. Mogelijke verwarring met andere differentiaal diagnostische respiratoire aandoeningen is echter niet uitgesloten (de Leeuw and Cornelissen, 1991). Mestonderzoek door middel van de Baermann methode laat bij experimenten met kalveren een zeer hoge gevoeligheid zien. Factoren als een groter volume aan faeces en de mate waarin larven zich kunnen ontwikkelen tot volwassen longwormen leidt mogelijk tot een lagere sensitiviteit voor het aantonen van patente infecties bij volwassen melkvee (Eysker, 1997). Voor serologisch onderzoek zijn enkele ELISA's beschikbaar. Een veel in Nederland toegepaste ELISA is ontwikkeld op basis van een gezuiverd 'low-molecular-weight' specific antigen (saELISA) afkomstig van de volwassen longworm. Deze test scoort hoog in zowel sensitiviteit (97%) als specificiteit (97%) (de Leeuw and Cornelissen, 1993) en zelfs nog hoger in een vergelijkend onderzoek met een IHA-test waarbij sensitiviteit op 100% lag (Cornelissen et al., 1997). Een in Duitsland ontwikkelde ELISA maakt gebruik van het recombinant Major Sperm Protein (MSP) antigen van de mannelijke volwassen longworm. Deze test vertoond een sterke correlatie met de eigenschappen van de eerstgenoemde saELISA waarbij een sensitiviteit werd gevonden van >99% en waarbij infecties met een lage wormlast konden worden gedetecteerd (zij het dat de dieren in het experiment met 3000+ larven werden geïnfecteerd) (von Holtum et al., 2008). Aansluitend is er recentelijk onderzocht of de MSP-ELISA gebruikt kan worden voor het aantonen van antilichamen in de (tank)melk (Fiedor et al., 2009). Bij experimenteel geïnfecteerde vaarzen werd de ELISA testuitslag van individuele melkmonsters vergeleken met de uitslag van overeenkomstige serummonsters. De sensitiviteit en specificiteit van de test voor melkmonsters werd gevalideerd op basis van een cut-off waarde in Optical Density (OD). Boven deze waarde werd vastgesteld dat een

sensitiviteit en specificiteit haalbaar bleek voor melkmonsters van respectievelijk 100% en 97%.
De saELISA detecteert seroconversie op zijn vroegst 4 weken post-infectie (de Leeuw and Cornelissen, 1993). Andere onderzoeken spreken over detectie vanaf minimaal 6 weken afhankelijk van het interval van monstername waarbij na 8 weken alle experimenteel geïnfecteerde dieren positief testten (Cornelissen et al., 1997). Evenzo zal dit gelden voor de MSP-ELISA aangezien beide ELISA's zeer sterk correleren met elkaar. Bij kalveren wordt de detectie van positieve dieren door middel van de Baermann methode al gevoelig geacht te zijn na 3,5-4 weken post-infectie (Eysker, 1997). De ELISA wordt in de beginfase geacht sensitiever te zijn bij volwassen melkvee dan de Baermann-methode voor het aantonen van longworminfecties. De uitscheiding van larven (en dus de aanwezigheid van een patente infectie) blijkt rond 20 weken na besmetting van experimenteel geïnfecteerde kalveren verdwenen te zijn waarbij de detectie van antilichamen na 24 weken post-infectie begint af te nemen (Cornelissen et al., 1997). Een meer realistische weergave van deze dynamiek bij veldinfecties is waarschijnlijk het negatief worden van het mestonderzoek 2 maanden post-infectie waarbij antilichamen nog te detecteren zijn 4-6 maanden post-infectie (Holzhauer et al., 2003; Fiedor et al., 2009).

2 Doel van het onderzoek

2.1 Validatie tankmelk ELISA

Het voorgaande toont dat de diagnostiek voor het aantonen van een longworminfectie voor het individuele dier op basis van mest, serologie en/of melkmonsters zeer bruikbaar is. Echter, de soms lastige koppelbrede identificatie en differentiatie van de klinische symptomen, de relatieve ongevoeligheid van de Baermann bij volwassen koeien en het feit dat een positieve uitslag bij serologisch onderzoek de patente fase overschrijdt, maken een tijdige koppeldiagnose longworm uitdagend. Voortbouwend op de in Duitsland uitgevoerde validatie van de (MSP) ELISA bij melk is geopperd dat het eenmalig testen van een tankmelk monster een waarschijnlijkheidsdiagnose voor een uitbraak op koppelniveau zou kunnen bevestigen. Door de onduidelijke correlatie tussen een patente infectiestatus en seropositiviteit evenals het verdunningseffect wat optreedt wanneer zowel seronegatieve als seropositieve dieren bijdragen aan de tankmelk valt de bruikbaarheid van een tankmelk ELISA in twijfel te trekken. In dit onderzoek is een validatie van deze tankmelk test uitgevoerd aan de hand van een case-control studie waarbij melkveebedrijven met en zonder longwormuitbraak zijn bemonsterd op mest, serum en tankmelk. Tevens worden suggesties gedaan tot mogelijke aanpassing van de cut-off waarde die zou moeten worden gebruikt bij de interpretatie van de uitslag van de tankmelk ELISA.

2.2 Identificatie en interpretatie risicofactoren

Evenzo komt naar voren dat de mate van immuniteit van nieuw geïntroduceerde dieren in combinatie met aanwezig dragerschap in de bestaande koppel belangrijke factoren zijn voor de opbouw van weidebesmetting en de voorwaarden scheppen voor het ontwikkelen van een uitbraak. Er dient dus onderscheid te worden gemaakt tussen de vaarzen en meerderekalfs-koeien aangezien beide groepen in immunologisch opzicht een andere fase doormaken of hebben doorgemaakt. Dit gegeven, in combinatie met de voorgeschiedenis van de koppel jongvee op het gebied van beweiding, ontworming en vaccinatie, maakt mede deel uit van deze studie. Enerzijds is gekeken naar het aandeel vaarzen binnen de bemonsterde koppels en de verschillen in testuitslagen die zijn gevonden tussen de koeien en de vaarzen. Hierbij is de relatie gelegd naar de uitslag van de tankmelk ELISA. Anderzijds is door middel van een vragenlijst in kaart gebracht hoe het management heeft plaats gevonden op de bemonsterde bedrijven ten aanzien van beweiding, de opfok van jongvee en preventieve maatregelen.

2.3 Prevalentie onderzoek

Er is dus sprake van een toename van het aantal longwormuitbraken onder de volwassen melkveekoppels. Er is alleen niet bekend welk deel van de melkveekoppels in Nederland zijn aangedaan. Daartoe is een landelijke steekproef genomen van ongeveer 300 melkveebedrijven welke zijn bemonsterd op tankmelk. Uit deze steekproef zijn een aantal bedrijven geselecteerd op basis van de uitslag van de tankmelk ELISA. De betreffende veehouders zijn kort ondervraagd over het voorkomen van een longwormuitbraak onder de koppel melkvee in het huidige weideseizoen. De resultaten van deze landelijke survey dragen tevens bij aan het oordeel of een tankmelk ELISA waardevol kan zijn voor het diagnosticeren van een uitbraak en zullen mogelijk aanleiding zijn tot herziening van de gebruikte cut-off waarde zoals deze wordt gehanteerd door de officiële diagnostische

laboratoria.

2.4 Verwachtingen vooraf

In dit onderzoek zal worden bepaald of de uitslag van een tankmelk ELISA indicatief is voor de uitbraakstatus op een bedrijf. Het resultaat van de tankmelk ELISA zal, door ODR cut-off waarden te relateren aan de individuele serologie en de indeling in uitbraak en controlebedrijven, op waarde worden geschat. De verwachting is dat vooral de uitbraakbedrijven positief zullen zijn in de tankmelk. Betreffende de inventarisatie van de risicofactoren is het waarschijnlijk dat vooral de vaarzen gevoelig zijn voor longworminfecties. Het is de verwachting dat voornamelijk deze dieren seropositief zullen zijn met als mogelijk gevolg dat zij het meeste zullen bijdragen aan de tankmelkuitslag. Eerdere (sero)prevalentieonderzoeken hebben aangetoond dat een aanzienlijk deel van de Nederlandse melkveehouderijen besmet is met longworm. Verwacht wordt dat uit de resultaten van de landelijke survey geen verband wordt aangetoond tussen een positieve tankmelkuitslag en het wel of niet voorkomen van een longwormuitbraak.

3 Materiaal en methoden

3.1 Case-control studie

De selectie van de bemonsterde melkveebedrijven vond plaats via aanbod van een aantal dierenartsenpraktijken in Midden-Nederland. Bedrijven waren bij voorkeur binnen een straal van 50 km van Utrecht gelegen. Bij de afzonderlijke dierenartsenpraktijken werd het verzoek neergelegd om enerzijds bedrijven te melden waar een verdenking was van een longwormuitbraak op basis van klinische verschijnselen en anderzijds bedrijven te melden waarvan de veehouder wilde meewerken als zijnde controlebedrijf. De controlebedrijven dienden klachtenvrij te zijn waarbij de melkveekoppel 10 weken voor monstername niet mocht zijn behandeld met ontwormingsmiddelen.

3.1.1 Monstername
Op alle bedrijven werden de volgende monsters genomen:
- Een tankmelkmonster in duplo
- Een faecesmonster van 20 vaarzen die tenminste 1 maand waren meegeweid
- Een faecesmonster van 20 koeien van tweede pariteit of ouder
- Een bloedmonster, afgenomen uit de staartvene, van dezelfde 20 vaarzen en koeien

De te bemonsteren dieren werden ad random geselecteerd, onafhankelijk van het voorkomen van wel of geen klachten. Wanneer het aantal te bemonsteren dieren niet werd gehaald (met name in het geval van vaarzen), werden zoveel dieren bemonsterd als beschikbaar waren

3.1.2 Mestonderzoek
De mestmonsters werden onderzocht op de aanwezigheid van longwormlarven met de Baermann-methode waarbij 30 gram mest werd ingezet. De monsters werden ingezet bij kamertemperatuur (20-25°C) om zo de meest optimale omstandigheden te creëren voor het opvangen van larven (Andersen and Walters, 1973; Eysker, 1997). Er werd minimaal 18 uur gewacht alvorens de telling werd uitgevoerd. Aangegeven werd of een monster wel of niet positief was en hoeveel larven er werden gevonden.

3.1.3 Serologisch onderzoek
De individuele serumbuizen werden overnacht bewaard bij 4°C waarna ze 1 uur geïncubeerd werden bij 37°C om vervolgens te worden afgedraaid gedurende 10 minuten bij 3000 rpm. Van de individuele sera werd 1 ml in duplo bewaard in 96 wells microtiterblokken. Deze werden bewaard bij een temperatuur van -20 °C, en uiteindelijk naar de Gezondheidsdienst voor Dieren (GD) te Deventer gestuurd. Serologische onderzoek op longworm antilichamen werd uitgevoerd met behulp van de gestandaardiseerde Ceditest ELISA op basis van een gezuiverd 'low-molecular-weight' specific antigen (saELISA) tegen de volwassen longworm (Cornelissen et al., 1997). De uitslag van de test werd weergegeven op basis van een ODR (Optical Density Ratio) cut-off waarde van 0,3. Deze cut-off waarde kwam tot stand door aan de hand van de extinctieniveaus van de individuele welletjes de OD-waarde in % te relateren aan de OD-waarde van de positieve controle. Daar waar de GD de test herhaald heeft voor een aantal individuele sera als gevolg van een licht afwijkende positieve controle zijn de resultaten genomen van de eerste test. De testuitslagen zijn op twee manieren verwerkt in de data-analyse namelijk als zijnde positief dan wel negatief volgens de normering van de GD en als percentuele ODR-waarde.

3.1.4 Melkonderzoek

De tankmelkmonsters zijn in duplo met een hoeveelheid van plusminus 10 ml genomen op de betreffende melkveebedrijven. De monsters zijn bewaard bij een temperatuur van -20 °C en aan het eind van de monstername opgestuurd naar de GD te Deventer en het Instituut voor Parasitologie van de faculteit Diergeneeskunde aan de Universiteit van Hannover. De melkmonsters zijn bij de GD Deventer getest op de aanwezigheid van antilichamen met behulp van de reeds beschreven ELISA op basis van het low-molecular-weight specific antigen (Cornelissen et al., 1997). Dezelfde melkmonsters zijn in Hannover getest op longworm antilichamen met behulp van een ELISA op basis van het recombinant Major Sperm Protein van de volwassen mannelijke longworm (MSP-ELISA) (von Holtum et al., 2008). De uitslag van een tankmelkmonster is per bedrijf weergegeven als ODR-waarde. Deze ratio kwam tot stand door de OD waarde van de tankmelkmonsters te delen door de gemiddelde OD waarde van de positieve controle. Bij beide ELISA's betrof dit een positief serummonster. De GD in Deventer hanteerde een cut-off waarde van 0,07; Hannover hanteerde een cut-off waarde van 0,493. Wanneer een individuele ODR-waarde boven de gestelde cut-off waarde uitkwam werd een monster als positief bevonden. De testuitslagen zijn op twee manieren verwerkt in de data-analyse namelijk als zijnde positief dan wel negatief en als percentuele ODR-waarde.

3.1.5 Vragenlijst

Tijdens de bedrijfsbezoeken is een korte vragenlijst voorgelegd aan de veehouder ter identificatie van een aantal bedrijfskenmerken en managementfactoren (*zie bijlage 1*). De vragen in de enquête zijn in gesloten vorm opgesteld zodat een statistische verwerking van de gegevens mogelijk werd gemaakt.

3.2 Prevalentieonderzoek

Er is een landelijke steekproef onder melkveebedrijven uitgevoerd waarbij 305 bedrijven zijn bemonsterd op 10 ml tankmelk. De bedrijven zijn ad random geselecteerd door per provincie een aantal dierenartsenpraktijken aan te schrijven om de monstername uit te voeren. Vooraf is aangegeven hoeveel monsters er verwacht werden van elke praktijk. De aantallen zijn tot stand gekomen naar het aandeel wat elke provincie heeft aan de totale landelijke hoeveelheid melkveebedrijven:

Zeeland	4
Flevoland	5
Noord Brabant	46
Overijssel	28
Gelderland	52
Limburg	11
Noord-Holland	14
Drenthe	48
Groningen	15
Utrecht	18
Friesland	40
Zuid-Holland	24

De tankmelkmonsters werden bij de GD getest op antilichamen op de manier zoals beschreven voor het tankmelkonderzoek in de case-control studie. Er werd een selectie gemaakt van 60 bedrijven aan de hand van de gevonden ODR waarde:

- 20 bedrijven met de laagste ODR waarde
- 20 bedrijven met een gemiddelde ODR waarde (20 bedrijven rond de mediaan)
- 20 bedrijven met de hoogste ODR waarde

Deze bedrijven werden telefonisch benaderd waarbij, alvorens de uitslag te communiceren i.v.m. de oblectiviteit, een korte vragenlijst werd doorgenomen met de veehouder betreffende het voorkomen van een longwormuitbraak op het bedrijf in het afgelopen weideseizoen en het ontwormingsbeleid (*zie bijlage 2*).

3.3 Statistische verwerking

Binnen de case-control studie zijn de uitslagen van de tankmelkmonsters tussen bedrijven vergeleken. Gekeken werd of de hoogte van de tankmelkuitslag gerelateerd was aan het percentage koeien en vaarzen wat positief test in de ELISA. Ook werd gekeken of de bedrijven die als uitbraakbedrijf zijn beoordeeld hoger scoren in de tankmelk ELISA. Hieraan gekoppeld werd bij opeenvolgende cut-off waarden bepaald hoe de test scoorde in sensitiviteit en specificiteit binnen de gebruikte onderzoeksopzet. De statististische methodiek omvatte het gebruik van T-toetsen voor het vergelijken van gemiddelden en de Chi^2-toets voor het bepalen van associaties.
Eveneens werden de tankmelkuitslagen van de GD en Hannover met elkaar vergeleken op basis van correlatie om de overeenkomst tussen de twee testen weer te geven.
Voor wat betreft het identificeren van risicofactoren werd gekeken in hoeverre de vaarzen dan wel de koeien bijdragen aan de infectieopbouw binnen de koppel. Het percentage positieve vaarzen en de hoogte van de individuele ODR-waarden werd vergeleken met het wel of niet positief scoren van het bedrijf in de tankmelk. Tevens is gekeken in hoeverre factoren als leeftijd van eerste weidegang, periode van weidegang van de volwassen koppel en ontworming van het jongvee correleren met een positieve tankmelkuitslag. De relevante vergelijkingen werden wederom beoordeeld met behulp van de T-toets, Chi^2-toets en correlatiecoëfficiënten.
De resultaten van het prevalentieonderzoek maakten een vergelijking mogelijk tussen de klinische situatie op een bedrijf en de uitslag van de tankmelk ELISA. Gekeken werd of de ODR-waarde van de tankmelk correleerde met het wel of niet aanwezig zijn van klinische klachten bij het volwassen melkvee. Deze analyse werd wederom bij verschillende cut-off waardes gedaan. Afhankelijk van de waarde van de uitslag van de tankmelk ELISA werd aangegeven op hoeveel procent van de melkveebedrijven in Nederland longworm een rol speelt op basis van seropositiviteit en/of uitbraakstatus onder het volwassen melkvee.

4 Resultaten

4.1 Uitbraak- en controlebedrijven

In het totaal zijn 37 bedrijven bemonsterd binnen de case-control studie: 21 controlebedrijven en 16 uitbraakbedrijven (*zie kaart 1*). Deze 16 uitbraakbedrijven werden ons aangeboden als zijnde bedrijven waar de dierenarts een verdenking had van klinische longworminfectie bij de volwassen koppel. Bij 2 van de 21 controlebedrijven werd het vee niet beweid.

Kaart 1: Verspreiding van de 37 bemonsterde controle- en uitbraakbedrijven

4.1.1 Mestmonsters

Van de in het totaal 1287 bemonsterde dieren is van 1277 dieren een mestmonster genomen. 175 dieren (13,7%) bleken positief te testen op longwormlarven met de Baermann-methode waarbij minimaal 1 larve werd aangetoond. Hiervan waren 114 dieren afkomstig van uitbraakbedrijven (65,1%). Van de 37 bemonsterde koppels in de case-control studie lieten tenminste 21 koppels minimaal 1 positief individu zien (56,8%). Bij vergelijking tussen de controlegroep en de uitbraakgroep bleken 13 van de 16 uitbraakbedrijven minimaal 1 positief dier te hebben (81,3%). Bij de controlegroep lag dit percentage op 38,1%.

4.1.2 Individuele serologie

Van de 1287 bemonsterde dieren zijn er 1285 serologisch getest op antilichamen tegen longworm volgens de testmethode van de GD. Dieren werden positief bevonden op het moment dat ze de cut-off ODR-waarde van 0,3 overschreden. 261 van de 1285 dieren (20,3%) testten positief op antilichamen tegen longworm. Uit deze groep testten 102 dieren ook positief in de mest (39,1%). Voor de uitbraakbedrijven lag dit percentage op 46,2%. Van alle dieren testten 147 vaarzen seropositief (56,3%).

Van de dieren die positief waren bij mestonderzoek bleken er 102 seropositief (58,3%). Van de 114 dieren die in de uitbraakbedrijven positief testten in de mest waren er 79 seropositief (69,3%). Van de 94 vaarzen die positief testen bij mestonderzoek bleken er 47 seropositief (50%). Van de 81 koeien die positief testten bij mestonderzoek bleken er 55 seropositief (67,9%).

4.1.3 % positieve sera op bedrijfsniveau

Bij 31 van de 37 bemonsterde bedrijven werd minimaal 1 dier positief getest op longwormantilichamen (83,8%). Van de 16 uitbraakbedrijven testten er 14 positief (87,5%). Van de 21 controlebedrijven waren dit er 17 (81%).

Om weer te geven welke fractie van de vaarzen en koeien per bedrijf seropositief waren werd een gecorrigeerd percentage seropositieve dieren berekend. Dit, aangezien de selectie van vaarzen en koeien binnen de steekproef niet representatief was voor de verdeling binnen de gehele koppel. Deze correctie werd berekend door de fracties seropositieve koeien en vaarzen *binnen* de steekproef te vermenigvuldigen met de aantallen koeien en vaarzen in de gehele koppel en de som hiervan te delen door het totaal aantal dieren in de koppel. Het gemiddelde percentage dieren wat seropositief testte verschilde significant tussen controle- en uitbraakbedrijven (10,6% tegen 29,9%) (Tweezijdige T-test; $t = 2,7$; $P < 0,05$).

4.2 Tankmelkuitslagen case-control studie

De tankmelkmonsters van de bedrijven in de case-control studie zijn 2 keer getest op antilichamen: 1 keer bij de GD en 1 keer in Hannover. Van 1 uitbraakbedrijf is slechts één tankmelkmonster genomen welke is getest bij de GD. Beide instituten gaven de uitslag van de monsters weer als ODR (% kleur t.o.v. de positieve controle) en als zijnde positief of negatief ten opzichte van een vastgestelde cut-off waarde. Opgemerkt moet worden dat beide instituten sterk overeenkomende antigenen gebruikten bij de uitvoering van de test maar dat er sprake was van afwijkende protocollen.

4.2.1 Tankmelkuitslagen Hannover

Van de 36 bemonsterde bedrijven testten 10 bedrijven positief op antilichamen in de tankmelk op basis van een cut-off waarde van 0,493 (27,8%). Van de uitbraakbedrijven testten 8 bedrijven positief (50%) wat overeenkomt met een sensitiviteit binnen de case-control studie van 50%. Van de controlebedrijven bleken 2 bedrijven positief te zijn in de tankmelk (9,5%) wat overeenkomt met een specificiteit van de tankmelktest binnen de studie van 90,5%. Hierbij moet echter wel worden opgemerkt dat 1 controlebedrijf een tankmelkuitslag toonde die *gelijk was aan* de cut-off waarde.

Evenzo is in *Fig. 1* te zien hoe de gemiddelde ODR-waarde van de sera zich verhouden tot de tankmelk ODR. De gemiddelde ODR-waarden van de sera tussen bedrijven met een positieve en negatieve tankmelkuitslag verschilden significant van elkaar (Tweezijdige T-test; $t = 6,25$; $P < 0,01$). Voor een vergelijking van het % positieve sera tussen bedrijven met een positieve en negatieve tankmelkuitslag gold hetzelfde. Hierbij kan worden opgemerkt dat trendmatig meer dan 30% van de sera op een bedrijf positief zou moeten zijn om de cut-off waarde van minimaal 0,493 te behalen om een tankmelkuitslag positief te laten zijn (*Fig. 2*).

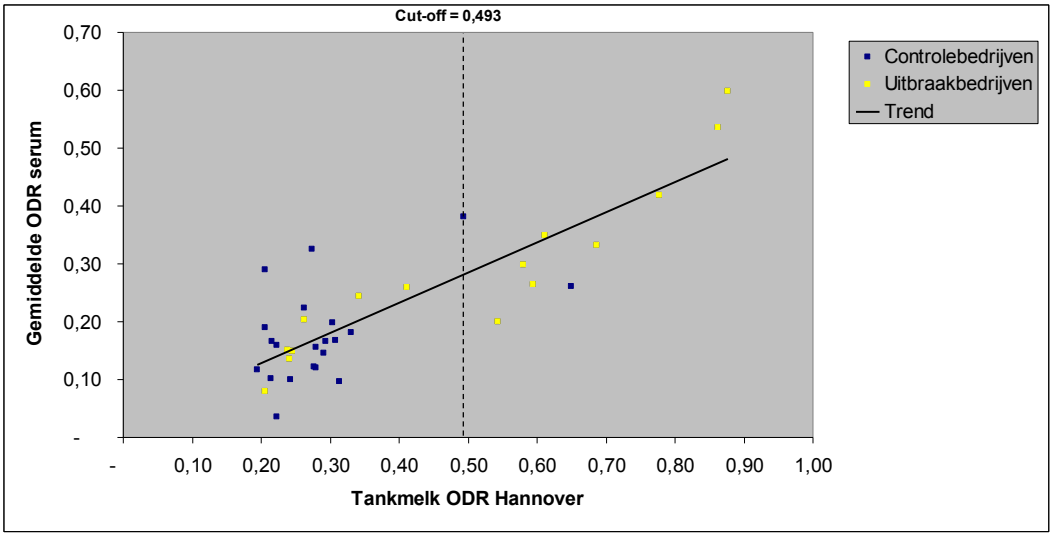

Fig. 1: Verband tussen de gemiddelde ODR-waarde van de sera met de hoogte van de tankmelk ODR Hannover

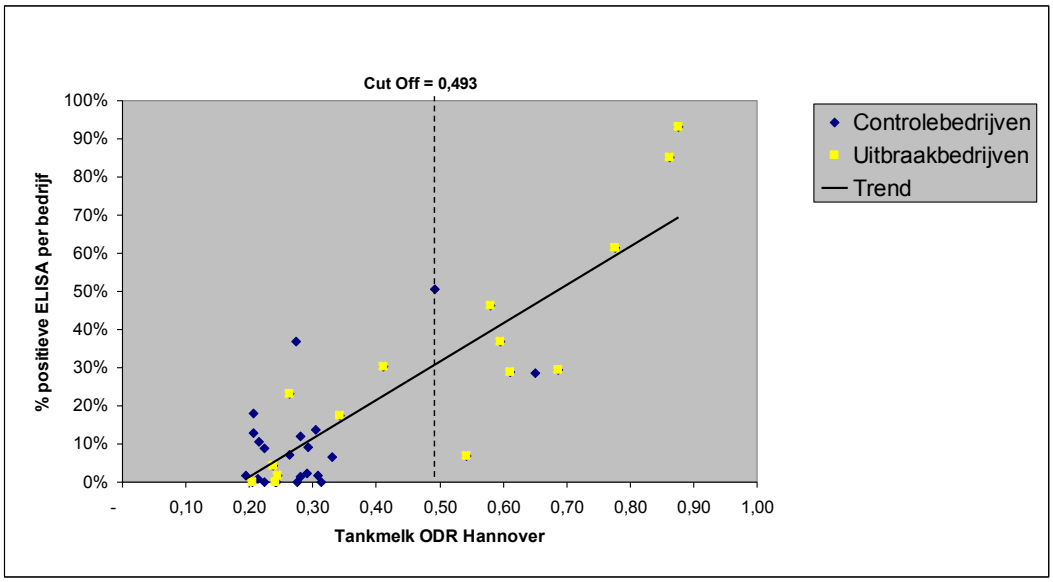

Fig. 2: Verband tussen het percentage positieve ELISA per bedrijf met de hoogte van de tankmelk ODR Hannover

De gemiddelde tankmelk ODR binnen de controlebedrijven lag op 0,2896 tegenover 0,4984 bij de uitbraakbedrijven. Deze waarde lag significant hoger voor de uitbraakbedrijven (tweezijdige T-test; $t = 3,6$; $P < 0,002$). Als gekeken werd naar de proportie van de tankmelkmonsters die door Hannover als positief werd bevonden bleek er een significant verschil te zijn tussen de proportie positieve tankmelkuitslagen tussen de controle- en uitbraakbedrijven ($Chi^2 = 6,3$; $P < 0,01$).

4.2.2 Tankmelkuitslagen GD

De door de GD gebruikte ELISA voor het aantonen van antilichamen tegen longworm was nog niet eerder gebruikt voor het aantonen van antilichamen in melkmonsters. Bepaling van de herhaalbaarheid en cut-off waarde van de test diende nog plaats te vinden. In *Fig. 3* wordt de hoge correlatie ($R^2 = 0,996$) weergegeven tussen het gemiddelde van de testuitslagen en de individuele testuitslagen.

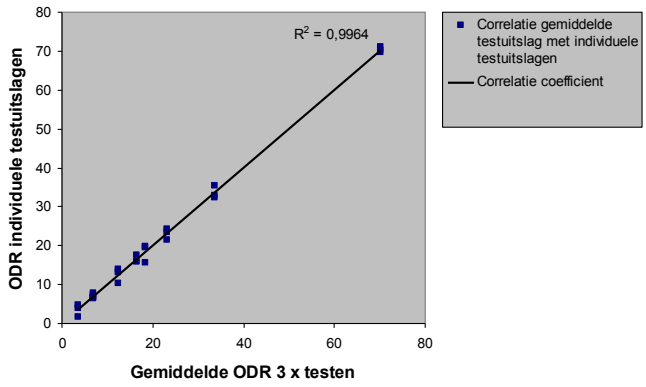

Fig. 3: Gemiddelde ODR van de testuitslagen uitgezet tegen de individuele testuitslagen

De cut-off waarde van de test moest worden bepaald door de gevonden ODR aan een aantal zaken te relateren. Allereerst door de verkregen ODR-waarde in het licht te zien van de uitbraakstatus en individuele serologie van de bedrijven uit de case-control studie. Ten tweede door een relatie te leggen met de tankmelkuitslagen uit Hannover waar de cut-off waarde al min of meer bepaald is. Uiteindelijk zou door een trendmatige analyse van de tankmelkresultaten uit de landelijke survey, mede aan de hand van seroprevalentie gegevens uit voorgaand onderzoek, een betekenis kunnen worden gegeven aan de gestelde cut-off waarden.
Vanaf een tankmelk ODR van 0,07 bleken alle uitbraakbedrijven in de case-control studie positief te testen wat een sensitiviteit van 100% oplevert. Van de 21 controlebedrijven testten 6 bedrijven negatief bij deze waarde wat overeenkomt met een specificiteit van 28,6%. De gemiddelde tankmelk ODR van de controlebedrijven lag op 0,120 tegenover 0,284 bij de uitbraakbedrijven. Dit gemiddelde was bij de uitbraakbedrijven significant hoger (Tweezijdige T-test; $t = 3{,}11$; $P < 0{,}05$). Wanneer de gemiddelde ODR van de controlebedrijven (0,120) als cut-off waarde wordt aangehouden verschuiven de sensitiviteit en specificiteit van de test binnen de studie naar respectievelijk 81,3% en 57,1%. Wanneer bij dit gemiddelde 1 x de SD wordt opgeteld dan verschuiven sensitiviteit en specificiteit naar respectievelijk 56,3% en 81%. Een specificiteit van 100% wordt gevonden vanaf een ODR van 0,289. Hierbij past een sensitiviteit van 31,3% (*zie tabel 1*).

Cut-off waarde ODR	**Sensitiviteit**	**Specificiteit**
0,070	100%	28,6%
0,120	81,3%	57,1%
0,120 + 1 x SD	56,3%	81%
0,289	31,3%	100%

Tabel 1: Sensitiviteit en specificiteit van de Tankmelk ELISA GD bij verschillende cut-off waarden

De correlatie tussen de gemiddelde ODR van de sera en de tankmelk ODR wordt weergegeven in *Fig. 4*. De correlatiecoëfficiënt R is gelijk aan 0,840 met een R^2 van 0,7056. Deze correlatie blijkt significant te zijn met een $P < 0{,}01$.

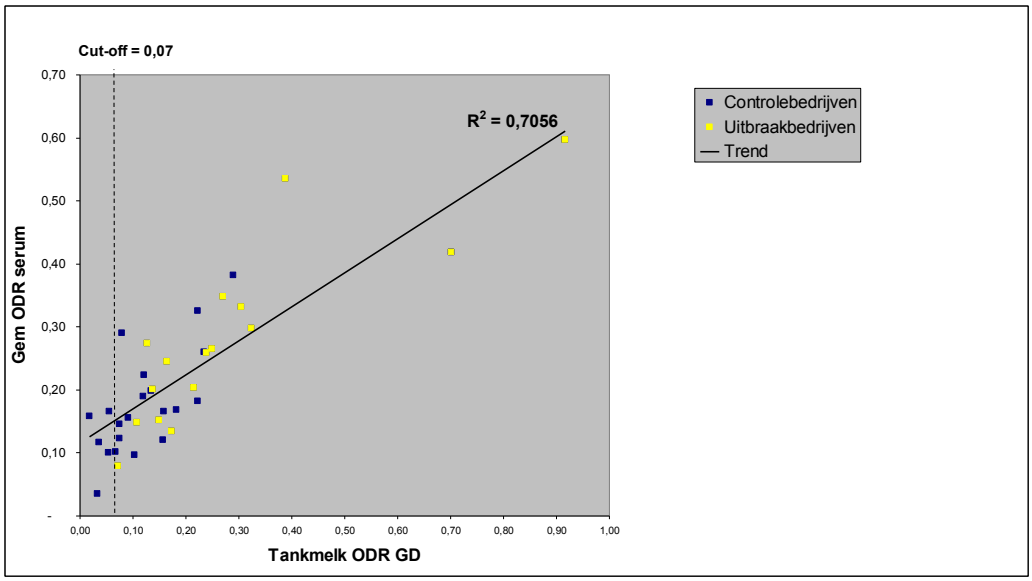

Fig. 4: Verband tussen de gemiddelde ODR-waarde van de sera en de hoogte van de tankmelk ODR GD

4.2.3 Vergelijking Tankmelk ODR Hannover met Tankmelk ODR GD

In *Fig. 5* wordt de correlatie weergegeven tussen de tankmelkuitslag uit Hannover en die van de GD. Met een R en R^2 van respectievelijk 0,828 en 0,686 blijkt deze significant te zijn met een $P < 0,01$.

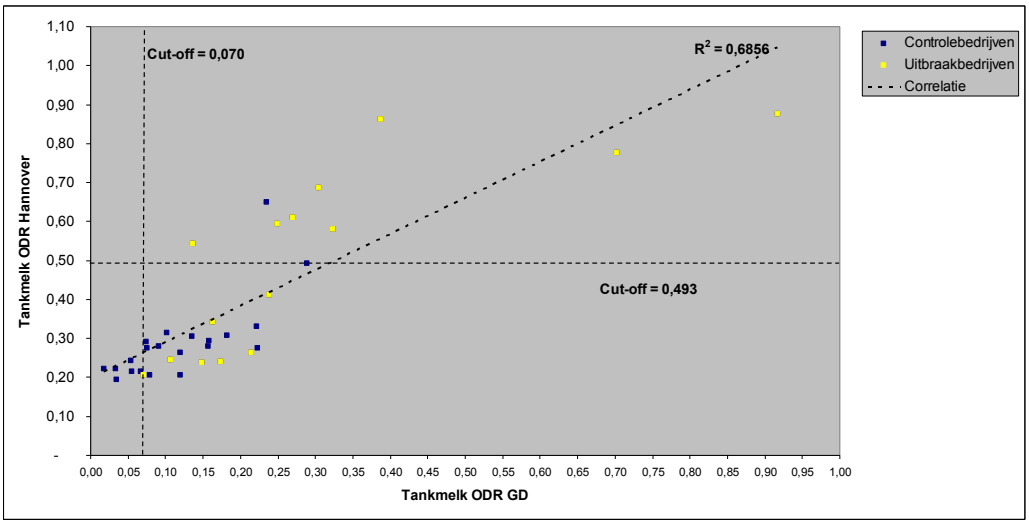

Fig. 5: Correlatie tussen de tankmelk ODR Hannover en tankmelk ODR GD

4.3 Factoren van invloed op de Tankmelk ODR

4.3.1 Factoren van invloed op de Tankmelk ODR: vaarzen versus koeien

Bij de analyse of vaarzen dan wel koeien bijdragen aan een positieve tankmelkuitslag werd gebruik gemaakt van de tankmelkuitslag uit Hannover omdat hierbij al een duidelijke cut-off waarde is bepaald.

Over alle 37 bemonsterde bedrijven lag het gemiddelde % seropositieve vaarzen significant hoger dan het gemiddelde % seropositieve koeien (Tweezijdige T-test; $t = 2,310$; $P < 0,05$). Voor de controlebedrijven kwam een soortgelijke significantie naar voren (Tweezijdige T-test; $t = 2,478$; $P < 0,05$). Wanneer alleen de 16 uitbraakbedrijven werden bekeken

was dit verschil niet meer significant maar scoorde de vaarzen nog altijd hoger in het gemiddelde % seropositiviteit (Tweezijdige T-test; t = 1,284; 0,2 < P < 0,3) (*Fig. 6*).

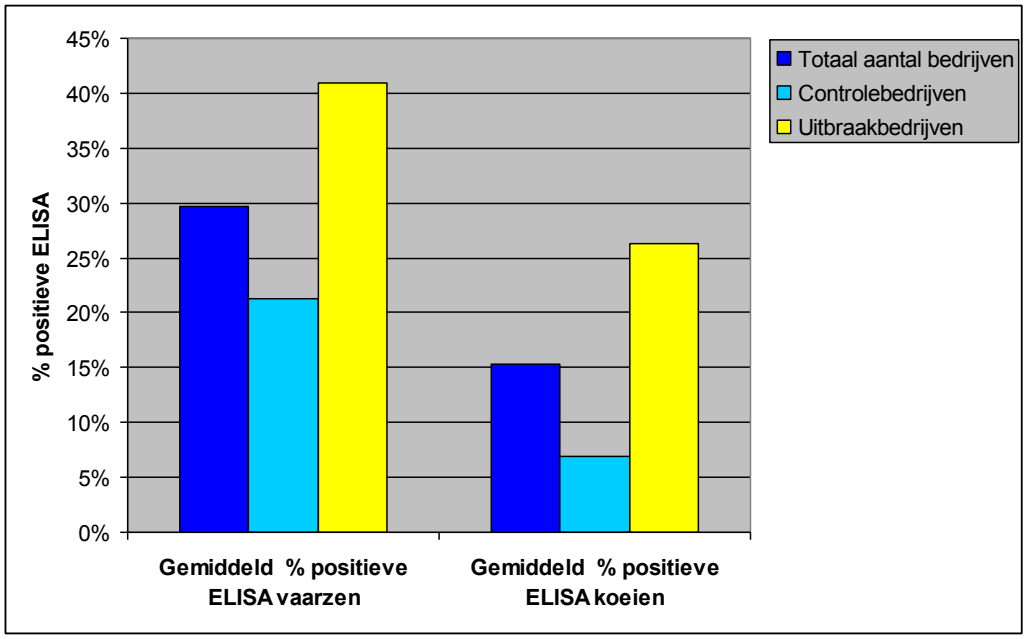

Fig. 6: Vergelijking van het percentage positieve ELISA vaarzen met het percentage positieve ELISA koeien voor het totaal aantal case-control bedrijven, voor de controlebedrijven en voor de uitbraakbedrijven

Bij de bedrijven met een positieve tankmelkuitslag lag de gemiddelde ODR van de sera van de vaarzen significant hoger dan bij bedrijven met een negatieve tankmelkuitslag (Tweezijdige T-test; t = 4,253; P < 0,001). Bij dezelfde vergelijking maar dan voor de koeien bestond een soortgelijk verschil (Tweezijdige T-test; t = 5,857; P < 0,01). Wanneer de koeien en vaarzen onderling werden vergeleken blijkt dat onder alle 37 bedrijven uit de case-control studie de vaarzen een significant hogere gemiddelde ODR hadden in serologie dan de koeien (Tweezijdige T-test; t = 2,165; P < 0,05). Wanneer deze zelfde vergelijking wordt gemaakt voor bedrijven met een positieve tankmelkuitslag is dit verschil niet meer significant en liggen de gemiddelde ODR-waarden in serologie voor de koeien en de vaarzen op respectievelijk 0,332 en 0,398 (Tweezijdige T-test; t = 1,067; 0,2 < P < 0,3).

4.3.2 Factoren van invloed op de ODR: weidegang en ontworming

Aan de 37 veehouders uit de case-control studie is een vragenlijst voorgelegd om een aantal specifieke bedrijfskenmerken te identificeren.

Bij 3 controlebedrijven was er geen weidegang van het volwassen melkvee. Bij 2 van deze bedrijven waren vaarzen aanwezig die positief testten in serologie (6% en 79% van de bemonsterde vaarzen). Als gekeken wordt naar de leeftijd bij eerste weidegang kan onderscheid worden gemaakt tussen groepen jongvee die jonger zijn dan 12 maanden en jongvee dat ouder is dan 12 maanden op het moment van eerste weidegang. De proportie jongvee dat ouder is dan 12 maanden verschilt niet significant van het deel dat jonger is dan 12 maanden bij een vergelijking tussen bedrijven met een positieve dan wel negatieve tankmelkuitslag (Chi^2 = 0,004; 0,7 < P < 0,8). Een zelfde proportionele vergelijking maar dan tussen controle- en uitbraakbedrijven levert eveneens geen significant verschil in proporties op (Chi^2 = 0,06; 0,7 < P < 0,8). Uit de studie blijkt geen enkele correlatie aanwezig te zijn tussen de leeftijd van weidegang en de hoogte van de tankmelk ODR (*zie Fig. 7*).

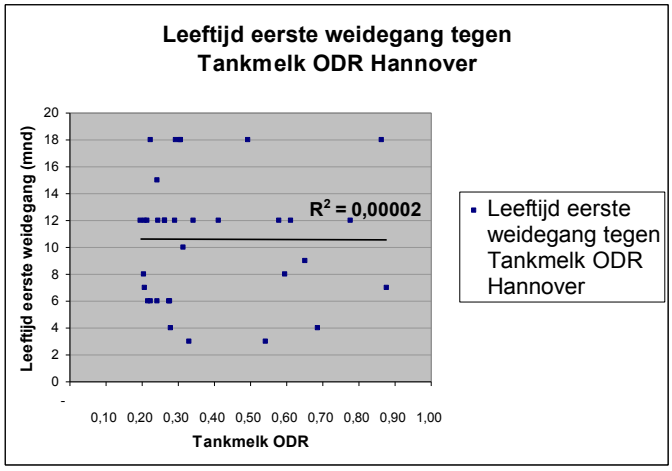

Fig. 7: Correlatie tussen de leeftijd van eerste weidegang en de hoogte van de tankmelk ODR Hannover

27 van de 37 bedrijven in de studie ontwormde het jongvee preventief (73%). De proportie bedrijven dat het jongvee ontwormt verschilt niet significant van dat deel wat niet ontwormt bij een vergelijking tussen bedrijven met een positieve dan wel negatieve tankmelkuitslag ($Chi^2 = 0{,}000$; $0{,}6 < P < 0{,}7$).
3 van de 37 bedrijven in de studie vaccineerde tegen longworm met entstof wat levende, bestraalde L3 larven bevatte.

4.4 Landelijke steekproef tankmelk

In het totaal zijn 305 willekeurig geselecteerde melkveebedrijven, evenredig verdeeld over 12 provincies, bemonsterd op tankmelk. De monsters zijn onderzocht op antilichamen volgens de door de GD gebruikte ELISA. De gemiddelde ODR van het totaal aantal bedrijven was 0,13. De uitslagen waren min of meer normaal verdeeld (*zie Fig. 8*).

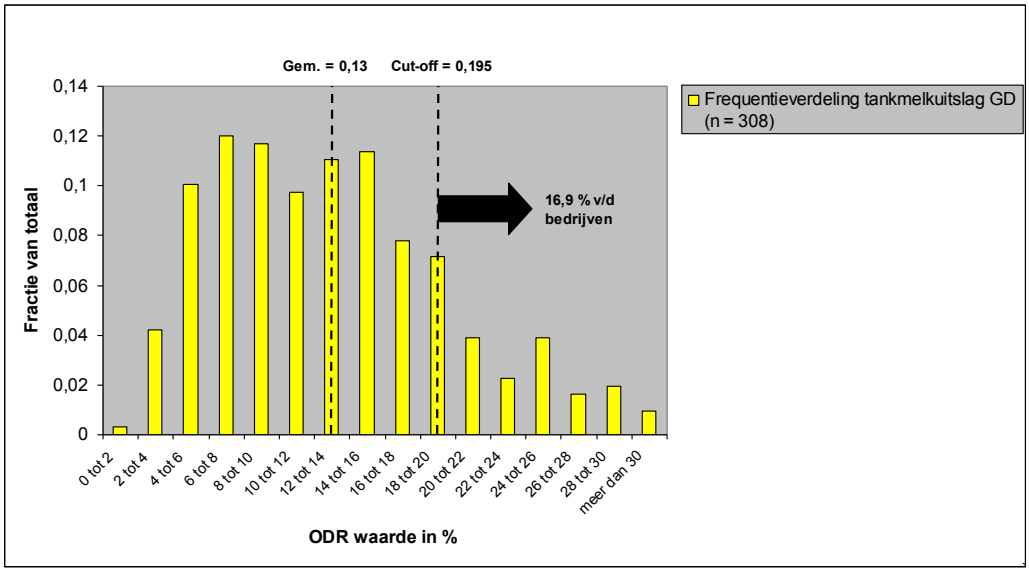

Fig. 8: Frequentieverdeling van de tankmelk ODR binnen de prevalentie studie (n = 305)

Wanneer de cut-off waarde van 0,07 wordt gehanteerd (zie voorgaande) blijkt 80,8% van de bedrijven in de steekproef positief voor antilichamen in de tankmelk. Wanneer

dezelfde methode voor cut-off bepaling wordt gehanteerd zoals eerder besproken, blijkt dat 16,9% van de bedrijven positief testten op antilichamen bij een cut-off van 0,195 (gemiddelde van de controlebedrijven uit de case-control studie + 1 x SD) (*zie fig. 8*).

4.4.1 Aantal uitbraken

Uit de 305 bemonsterde bedrijven zijn 60 bedrijven geselecteerd en telefonisch benaderd met een aanvullende vragenlijst. De bedrijven zijn geselecteerd op basis van indeling in drie verschillende groepen ODR-waarden. Elke groep betrof 20 bedrijven met ODR-waarden van respectievelijk 2,3-4,7, 11,4-13 en 24,3-36,8 (*zie kaart 2*). Van deze 60 bedrijven bleken 4 bedrijven klinische klachten te hebben gehad van longworm bij het volwassen melkvee in het afgelopen weideseizoen. Van deze 4 'klinische' bedrijven werden de klachten tot 2 weken na de datum van monstername (week 41) opgemerkt. Het betrof 1 bedrijf uit de groep met gemiddelde ODR-waarden (0,11-0,13) waarbij de klachten waren gerapporteerd door de veehouder en er geen officiële diagnose is gesteld door de dierenarts. 3 bedrijven behoorde tot de groep van 20 bedrijven met de hoogste ODR-waarden (0,24-0,37) wat neerkomt op 15%. Hierbij was de diagnose gesteld door de dierenarts.

Kaart 2: Aantal benaderde bedrijven in de prevalentiestudie. De 20 met ster gemarkeerde bedrijven lagen in de groep met de hoogste ODR-waarde

4.4.2 Preventieve ontworming

Zo op het eerste gezicht lijkt er vooral in de groepen bedrijven met gemiddelde en hoogste ODR-waarden preventief te worden ontwormd. Analyse van de proportie bedrijven wat preventief ontwormd in relatie tot de drie groepen met lage, gemiddelde en hoge ODR laat echter zien dat er geen significant verschil is in ontwormen tussen

de drie verschillende groepen ($Chi^2 = 4{,}208$; $0{,}1 < P < 0{,}2$). 10 van de 60 bedrijven vaccineerde tegen longworm (16,7%).

4.4.3 Weidegang

Bij 4 van de 60 benaderde bedrijven was geen weidegang van het volwassen melkvee. Deze 4 bedrijven hadden een ODR die lag tussen de 0,029 en 0,045. Er lijkt een duidelijke correlatie te zijn tussen de lengte van de periode van beweiding en de hoogte van de tankmelk ODR (*zie Fig. 9*).

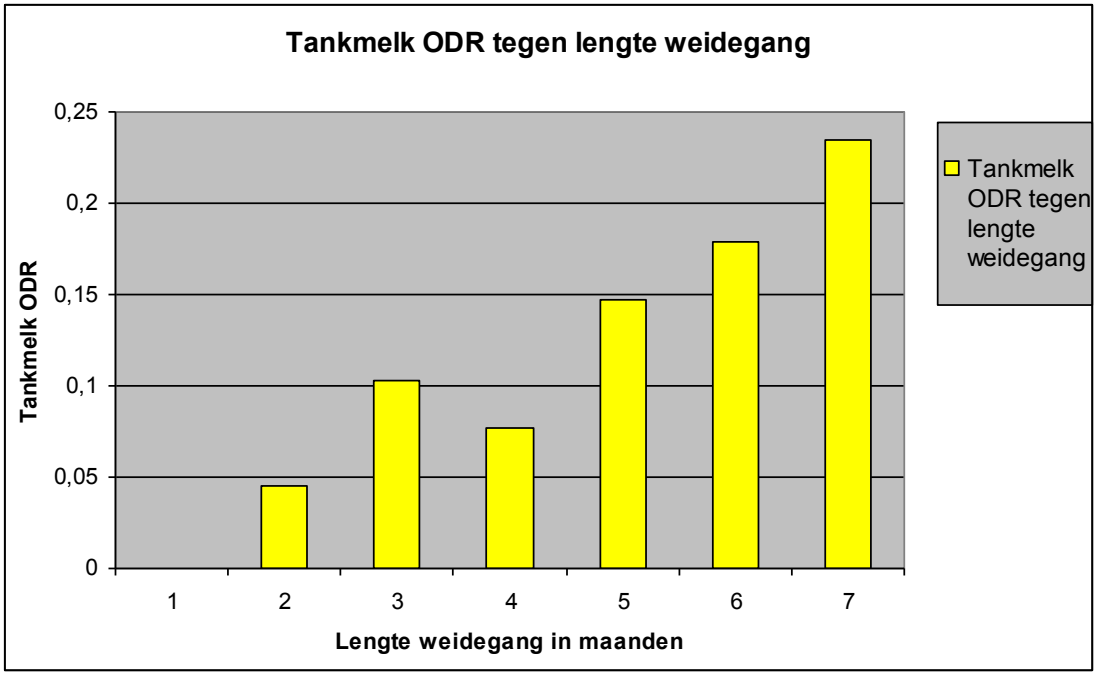

Fig. 9: Hoogte van de tankmelk ODR GD bij verschillende perioden van weidegang

Wanneer voor enkele categorieën van lengte van weidegang de gemiddelde ODR wordt berekend blijkt bij de vergelijking van deze waarden een significant verschil te bestaan tussen de gemiddelde ODR en de lengte van beweiding (Eenzijdige ANOVA; $F = 3{,}598$; $P < 0{,}02$) (*zie tabel 2*).

Categorie weidegang	Aantal bedrijven	Som	Gemiddelde ODR	Variantie
2-3 maanden	5	45,61	9,12	135,65
4 maanden	8	61,62	7,70	20,42
5 maanden	12	176,6	14,72	156,4
6-7 maanden	31	571,3	18,43	74,01

Tabel 2: Vergelijking van de gemiddelde tankmelk ODR tussen bedrijven met verschillende lengtes van periode van weidegang

5 Discussie

5.1 De waarde van mestonderzoek en serologie als diagnostisch middel

De dierenarts kan, met klinische klachten als uitgangspunt, een diagnose van longworm bevestigen met behulp van aanvullend mestonderzoek. Hiermee kan een patente infectie worden aangetoond. Bij de uitbraakbedrijven in de case-control studie kan dit verband worden waargenomen: 81,3% van de uitbraakbedrijven laat minimaal 1 positieve Baermann zien en, wat minder overtuigend, 65,1% van alle positieve dieren zijn afkomstig van uitbraakbedrijven.
Bij de keuze om serologie in plaats van mestonderzoek als aanvullende diagnostiek te nemen moet met een aantal zaken rekening worden gehouden. 58,3% van alle dieren die positief testten in de mest waren ook seropositief. Specifiek voor de uitbraakbedrijven, waar de associatie met klachten meer voor de hand ligt, betrof dit percentage 69,3%. Vanuit de serologie bekeken testten 39,1% van alle seropositieve dieren positief in de mest. Binnen de groep uitbraakbedrijven lag dit percentage op 46,2%. Wanneer serologie als uitgangspunt wordt genomen worden een aantal dieren met patente infecties gemist. Dit geldt zelfs voor dieren binnen uitbraakbedrijven waar de link met klinische symptomen eerder kan worden gelegd. Of dit percentage rond de 30% ligt is onderwerp van discussie. Ongetwijfeld bevinden zich dragers onder de dieren met een positief mestmonster en het is nog onduidelijk hoe seropositiviteit zich verhoud tot dragerschap. Een aantal dieren zal seropositief worden bevonden terwijl er geen patente infectie meer aanwezig is. Afgaande op de gegevens is dit aantal hoog. Hierbij moet worden opgemerkt dat de Baermann-methode bij volwassen koeien met een patente infectie een stuk minder gevoelig is. Bovendien zal een seropositieve uitslag altijd in combinatie met klinische klachten moeten worden geïnterpreteerd.
Duidelijk is dat op uitbraakbedrijven een significant groter deel van de dieren seropositief test. Hierbij moet worden opgemerkt dat de kans op het vóórkomen van minimaal 1 seropositief dier ongeveer gelijk is tussen controle- en uitbraakbedrijven. Het is dus de vraag hoeveel individuele sera positief dienen te zijn en in welke mate om invloed uit te kunnen oefenen op de hoeveelheid antilichamen in de tankmelk.

5.2 Interpretatie van de tankmelkuitslag uit Hannover

In de setting van de case-control studie liggen sensitiviteit en specificiteit van de tankmelk ELISA uit Hannover op respectievelijk 50% en 90,5% voor het aantonen van een uitbraak (cut-off = 0,493).
De helft van het aantal uitbraakbedrijven wordt niet als zodanig opgemerkt. Dit hoge aantal vals-negatieven zou kunnen komen door de tijd tussen eerste patentie en de opbouw van antilichamen. Uit het voorgaande blijkt immers dat een patente infectie niet per definitie seropositiviteit oplevert aangezien de opbouw van antilichamen bij beginnende patentie achterblijft bij de larvale uitscheiding (kanttekening hierbij is echter wel dat het bij uitbraakbedrijven vaker gaat om dieren met klinische klachten die al enige tijd in de patente fase zitten). Daarnaast zou een verdunningseffect kunnen optreden doordat ook seronegatieve dieren bijdragen aan de tankmelk. Ook de opzet van de studie zou de sensitiviteit van de test kunnen vertekenen. Een uitbraakbedrijf is toegewezen aan de uitbraakgroep op basis van waarnemingen van veehouder en dierenarts. Hierdoor spelen factoren van subjectiviteit een rol die voortkomen uit een verschil in perceptie van bijvoorbeeld klinische symptomen.

De specificiteit van de ELISA voor het aantonen van patente infecties lijkt laag wanneer gebruik wordt gemaakt van individuele serologie zoals blijkt uit de voorgaande vergelijking tussen mestonderzoek en serologie. Bij de tankmelk test blijkt de specificiteit hoog. Om een reden aan te geven voor de hoge specificiteit van de tankmelktest kan weer worden verwezen naar het verdunningseffect. Individueel zal een dier op basis van serologie eerder vals-positief blijken te zijn voor het hebben van een patente infectie; op koppelniveau blijken er genoeg seronegatieve dieren te zijn in de koppel om dit effect teniet te doen. Deze aanname wordt versterkt door de constatering dat de gemiddelde ODR waarde van de sera alsook het percentage positieve dieren bij de bedrijven met een positieve tankmelk weldegelijk significant hoger ligt dan bij de bedrijven met een negatieve tankmelkuitslag. Trendmatig blijkt uit *Fig. 1* en *2* dat een gemiddelde ODR waarde van tussen de 0,25 en 0,30 wellicht tot een tankmelk ODR leidt die boven de cut-off waarde ligt waarbij minimaal 30% van de dieren seropositief dient te zijn.
Interessant is de vraag wat nu wenselijk is. Blijkbaar is de cut-off waarde voor de tankmelk ELISA uit Hannover zo gesteld dat een positieve uitslag daadwerkelijk een uitbraak betreft (laag aantal vals-positieven). Voor een koppelinfectie zoals (long)worminfecties zou betoogd kunnen worden dat het aantal vals-positieven zo klein mogelijk moet worden gehouden. Als dierenarts wil je alleen behandelen bij werkelijk positieve bedrijven bijvoorbeeld in het kader van resistentieontwikkeling. Bovendien kunnen bedrijven waarbij de diagnose onzeker is op een later tijdstip worden hertest wanneer symptomen duidelijker zichtbaar worden. Of hierbij een eventuele verergering van klinische klachten acceptabel is, is onderwerp van discussie en heeft onder andere te maken met het moment waarop economische schade optreedt.

5.3 Interpretatie van de tankmelkuitslagen van de GD

Uit de resultaten blijkt dat de gemiddelde tankmelk ODR bij de uitbraakbedrijven significant hoger ligt dan de gemiddelde ODR bij de controlebedrijven. Ook is er een significante correlatie aanwezig tussen de gemiddelde ODR-waarde van de sera en de tankmelk ODR. Dit geeft grond voor onderscheid tussen controle- en uitbraakbedrijf op basis van de tankmelkuitslag van de GD. Bij de interpretatie van de individuele uitslagen gaat het onder andere om een verkenning van een reeks aan cut-off waarden waarboven een monster als positief kan worden aangemerkt. Bij een cut-off waarde van 0,07 is sprake van een sensitiviteit van 100% en een specificiteit van 23,6%. Feitelijk is dit de omgekeerde wereld in vergelijking met Hannover. De aanname dat een positieve tankmelkuitslag gelijk staat aan een uitbraak gaat in deze situatie niet op. De uitslag zegt meer iets over het voorkomen van longworm op het bedrijf zonder dat klinische symptomen aanwezig hoeven te zijn. In feite gaat het hier om het weergeven van seroprevalentie die volgens eerdere onderzoeken tussen de 73% en 91% zou kunnen liggen (Boon et al., 1984; Cornelissen et al., 1997). Uit *tabel 1* valt op te maken dat de sensitiviteit en specificiteit verschuiven bij verschillende cut-off waarden. De gemiddelde tankmelk ODR van de controlebedrijven plus 1 keer de standaarddeviatie laat een cut-off waarde zien van 0,195. Hierbij komen sensitiviteit en specificiteit meer in de buurt van de test uit Hannover. Voor de selectie van positieve bedrijven die daadwerkelijk een uitbraak hebben is dit een wenselijker beeld.

Tussen de hoogte van de tankmelk ODR uit Hannover en die van de GD blijkt een significante correlatie te bestaan. De absolute ODR-waarden verschillen echter. De GD heeft dan ook bij de uitvoering van de test een ander protocol gebruikt. Er is gebruik gemaakt van een 1:2 verdunning van de melk, daar waar Hannover gebruik maakt van een 1:1 verdunning. Daarnaast kunnen factoren als antigen-bindende capaciteit van ELISA-platen en de concentraties conjugaat voor variatie in extinctieniveau's zorgen bij eenzelfde concentratie antilichamen. Met het protocol van de GD is een goede herhaalbaarheid van de test vastgesteld. In deze setting kan gesteld worden dat beide testen in potentie een goede weergave kunnen geven van de mate van seropositiviteit van individuele dieren in de koppel.

5.4 De invloed van koppel- en managementfactoren op de tankmelkuitslag

Over alle 37 bedrijven in de case-control studie blijken bij de vaarzen het hoogste percentage seropositieve dieren voor te komen. Ook binnen de uitbraakbedrijven scoren de vaarzen het hoogst zij het dat het geen significant verschil meer is. Uit deze data zou kunnen worden opgemaakt dat de vaarzen een in immunologisch opzicht actievere rol spelen bij de weerstandsopbouw van de koppel. Logischerwijs zou dit dan de groep dieren zijn waar de aandacht naar uit moet gaan wanneer longworm een rol speelt in de koppel. Men moet dan denken aan de zorg voor een goede weerstandsopbouw bij het jongvee of een ontwormingsbeleid specifiek gericht op deze dieren. Uit de resultaten blijkt ook dat bij een positieve tankmelkuitslag (Hannover) een significant hogere gemiddelde ODR-waarde onder de vaarzen wordt gevonden. Dit geldt echter ook voor de koeien. Het is zelfs zo dat bij een vergelijking van de gemiddelde ODR-waarden tussen de vaarzen en de koeien er geen significant verschil meer is waar te nemen bij een positieve tankmelk (ODR van respectievelijk 0,398 en 0,332). In *Fig. 10* wordt dit grafisch zichtbaar gemaakt. Blijkbaar zijn er weliswaar minder koeien seropositief, maar zijn de individuele uitschieters zo hoog dat er een correctie van het gemiddelde naar boven plaatsvindt. Wanneer er bij een longwormverdacht bedrijf serologische diagnostiek wordt bedreven ter bevestiging van de waarschijnlijkheidsdiagnose zou een dierenarts zich niet moeten beperken tot het alleen bemonsteren van de vaarzen. Deze groep dieren heeft weliswaar een grotere kans op het vertonen van seropositiviteit maar ook bemonstering van koeien met klachten zou in de lijn van bovenstaande data een diagnose kunnen bekrachtigen. Overigens roepen de resultaten van deze studie vragen op over het zogenaamde herinfectiesyndroom. Blijkbaar reageren ook de oudere koeien op een longwormuitbraak met een sterke titerstijging al lag dit niet in de verwachting in verband met de al opgebouwde weerstand. Meer onderzoek zal moeten worden verricht naar de dynamiek van immuniteitsopbouw bij dieren die de parasiet al een keer zijn tegen gekomen.

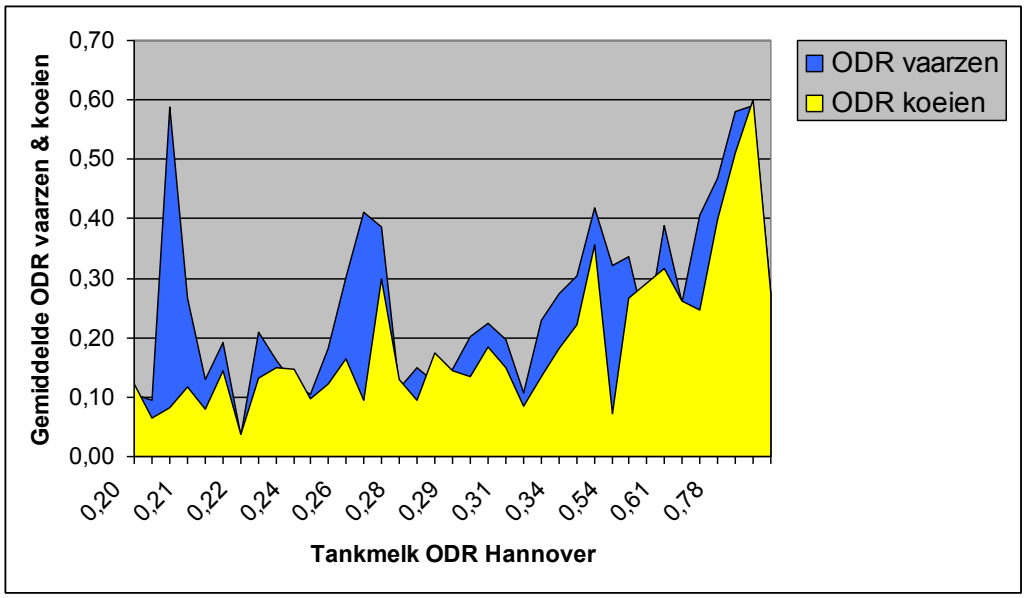

Fig. 10: Visualisatie van het verloop van de gemiddelde serum ODR-waarde van vaarzen t.o.v. koeien bij een stijgende tankmelk ODR Hannover

Voor wat betreft weidegang als mogelijke factor in de weerstandsopbouw van jongvee blijkt geen enkele significante correlatie aanwezig te zijn tussen de leeftijd van eerste weidegang en de hoogte van de tankmelk ODR. Er zou beredeneert kunnen worden dat naarmate de leeftijd van eerste weidegang hoger wordt er minder gelegenheid is voor het jongvee om weerstand op te bouwen. Ook zou de kans groter zijn dat er vaarzen in de koppel worden geïntroduceerd die nog nooit buiten zij geweest. Een en ander zou kunnen leiden tot een hoger aantal naïeve dieren in de koppel met een hoger risico op explosieve toename van de weidebesmetting. Ook werd geen verband gevonden tussen het wel of niet ontwormen van het jongvee en de uitslag van de tankmelk ELISA. Men zou kunnen verwachten dat het 'te goed' ontwormen van het jongvee tot een groter aantal gevoelige dieren in de koppel kan leiden. Meer gedetailleerd onderzoek is nodig naar de rol die beweiding en ontworming van jongvee spelen bij het voorkomen van klinische klachten van longworm in de volwassen koppel. Er zou dan bijvoorbeeld gekeken moeten worden naar de precieze leeftijd van eerste weidegang, de duur van weidegang, het tijdstip van ontwormen en het type percelen waar op beweid wordt.

5.5 Landelijke steekproef tankmelk

Uitgaande van de eerder genoemde cut-off waarde van 0,07 komt het percentage positieve bedrijven in de landelijke survey uit op 80,8%. Dit percentage is vergelijkbaar met de seroprevalentie-cijfers uit voorgaande onderzoeken. Dit gegeven ondersteunt de aanname dat de tankmelk ELISA zoals nu uitgevoerd door de GD een test is die eerder longworm-positieve bedrijven detecteert dan uitbraakbedrijven. Wanneer de cut-off waarde verschoven wordt naar een waarde waarboven uitbraakbedrijven zouden worden gedetecteerd is het percentage positieve bedrijven 16,9%. Helaas zijn er nauwelijks data bekend die iets zeggen over de prevalentie van bedrijven met een longwormuitbraak. In een Vlaams onderzoek is recentelijk gekeken naar de prevalentie van longworminfecties onder 1800 melkveebedrijven in Vlaanderen op basis van de uitslag van de tankmelk ELISA zoals ontwikkeld in Hannover. De prevalentie die werd gevonden was 19,6% waarbij echter onduidelijk

is, zoals ook opgemerkt door de onderzoekers, of de positieve bedrijven daadwerkelijk geassocieerd konden worden met klinische klachten en/of productieverlies (Bennema et al., 2009). In Zweden werd recentelijk met dezelfde tankmelk ELISA uit Hannover een prevalentieonderzoek gedaan onder 113 biologische en 113 conventionele melkveehouderijen. Voor de biologische bedrijven werd een prevalentie van 18% gevonden en voor de conventionele bedrijven een prevalentie van 9%. De associatie met uitbraakstatus kon ook in dit onderzoek niet worden vastgesteld (Hoglund et al., 2010).
Bij de 60 geselecteerde bedrijven voor telefonische benadering bleken 4 bedrijven een longwormuitbraak te hebben gehad. Slechts 3 van de 20 bedrijven met een ODR-waarde tussen de 0,24 en 0,37 meldden een uitbraak. Dit geeft aan dat de bovenstaande prevalentiecijfers van bedrijven met een positieve tankmelk in deze studie niets zeggen over de prevalentie van uitbraakbedrijven. Meer onderzoek lijkt nodig naar de precieze opbouw van de individuele ODR-waarden gedurende het weideseizoen om een uiteindelijke tankmelkuitslag op de juiste wijze te interpreteren.
In het al eerder genoemde Vlaamse prevalentieonderzoek werd al betoogd dat des te later in het seizoen de tankmelk wordt getest, hoe eerder deze weer negatief is door een daling van de individuele antilichaamtiters in de loop van het weideseizoen (Bennema et al., 2009). Dit wordt ondersteund door de dynamiek van de weerstandsopbouw waarbij na een aantal ‘ronden’ van weidebesmetting de uitscheiding van larven sterk afneemt en de patente infecties ‘uitdoven’ bij de individuele dieren (Michel, 1969; Eysker and van Miltenburg, 1988; Eysker et al., 1993). Uit *Fig. 9* kan echter een opvallend positieve trend worden opgemaakt waarbij naarmate de weidegang langer duurt er juist opbouw van antilichamen plaatsvindt. Deze constatering wordt gesteund door het feit dat er een significant verschil is gevonden tussen de ODR gemiddeldes bij de verschillende tijdsintervallen: ODR 2-3 maanden < ODR 4 maanden < ODR 5 maanden < ODR 6-7 maanden. De bewering dat de tankmelk ODR gedurende het weideseizoen juist afneemt blijkt hier niet op te gaan. Kennelijk zijn er toch factoren binnen de huidige Nederlandse melkveebedrijven die zorgen dat het volwassen melkvee gedurende het gehele weideseizoen blootgesteld wordt aan patente infecties met een continue aanwezige weerstandsopbouw als gevolg. Een mogelijke verklaring hiervoor is het feit dat gedurende het gehele weideseizoen vaarzen worden geïntroduceerd in de koppel die in meer of mindere mate gevoelig kunnen zijn. Hierdoor wordt afgeweken van de dynamiek in immuniteitsopbouw zoals wordt gezien bij het jongvee.

6 Conclusie

Ongeachte een situatie van wel of geen longwormklachten zullen bij een groot deel van de melkveebedrijven in Nederland seropositieve en zelfs Baermann-positieve dieren gevonden worden. Een diagnose van longworm met behulp van aanvullend onderzoek dient dan ook altijd ondersteund te worden door het waarnemen van klinische klachten bij de bemonsterde dieren. Mestonderzoek op longwormlarven lijkt nog steeds de meest geschikte methode: enerzijds zijn er meer mest-positieve dieren aanwezig op een uitbraakbedrijf; anderzijds is de associatie van een positieve mestuitslag met klinische klachten op een uitbraakbedrijf nu eenmaal sterker. Individuele serologie is ook bruikbaar. Hierbij moeten klinische klachten bij voorkeur overtuigend aanwezig zijn.
Zelfs als longwormklachten worden waargenomen in een koppel zal een tankmelk ELISA zoals ontwikkeld in Hannover en bij de GD, laag scoren in sensitiviteit. Een aanzienlijk deel van de bedrijven met klinische longworminfecties zal niet als positief worden aangemerkt. Verwijzend naar de beschreven aannames in paragraaf 2.4 kan aan de hand van een tankmelkuitslag onvoldoende onderscheid worden gemaakt tussen bedrijven met en zonder longwormuitbraak. Wel lijkt de tankmelk ELISA uit Hannover, afhankelijk van de gekozen cut-off waarde, bij een positieve uitslag daadwerkelijk een uitbraakbedrijf te detecteren. Op basis hiervan zou, afhankelijk van de waarde die gegeven wordt aan sensitiviteit en specificiteit, de test in de toekomst bruikbaar kunnen zijn in de praktijk. De tankmelk ELISA zoals uitgevoerd door de GD is nog in ontwikkeling. Uit de data blijkt dat de test seropositiviteit binnen de koppel prima detecteert. Op basis van sensitiviteit en specificiteit binnen de case-control studie scoort de test slechter dan de tankmelk ELISA uit Hannover. Afgaande op de resultaten van het landelijke prevalentieonderzoek tankmelk is de waarde die aan de test moet worden gegeven voor het opsporen van uitbraakbedrijven minimaal. De conclusie is dat met het prevalentieonderzoek geen verband is aangetoond tussen de testuitslag en het voorkomen van longwormuitbraken. Over de prevalentie van longwormuitbraken in Nederland zijn dan ook geen gefundeerde uitspraken te doen.
Met betrekking tot de populatie melkvee in Nederland kan gesteld worden dat zich onder de vaarzen proportioneel waarschijnlijk meer seropositieve dieren bevinden. Dit is het duidelijkst zichtbaar op de controlebedrijven. Wanneer een melkveebedrijf zich echter in een fase van uitbraak bevindt wordt gezien dat de hoogte van de antilichaamtiter bij de oudere koeien toeneemt in vergelijking met dezelfde groep dieren op controlebedrijven. Blijkbaar zijn het dus ook de oudere koeien die een bepaalde gevoeligheid voor patente longworminfecties tentoonspreiden. Waarschijnlijk dragen koeien onder uitbraakomstandigheden aanzienlijk bij aan de opbouw van de hoeveelheid antilichamen in de tank en kan met dit onderzoek niet worden aangenomen dat vooral de vaarzen bijdragen aan de infectieopbouw.

Referenties

Andersen, F.L., Walters, G.T., 1973. *Efficacy of the Baermann technique for recovery of Dictyocaulus viviparus larvae from bovine feces*. Am. J. Vet. Res. 34 (1), 39-40.

Bennema, S., Vercruysse, J., Claerebout, E., Schnieder, T., Strube, C., Ducheyne, E., Hendrickx, G., Charlier, J., 2009. *The use of bulk-tank milk ELISAs to assess the spatial distribution of Fasciola hepatica, Ostertagia ostertagi and Dictyocaulus viviparus in dairy cattle in Flanders (Belgium)*. Vet. Parasitol. 165 (1-2), 51-57, 10.1016/j.vetpar.2009.07.006.

Boon, J.H., Kloosterman, A., van der Lende, T., 1984. *The incidence of Dictyocaulus viviparus infections in cattle in the Netherlands. II. Survey of sera collected in the field*. Vet. Q. 6 (1), 13-17.

Cornelissen, J.B., Borgsteede, F.H., van Milligen, F.J., 1997. *Evaluation of an ELISA for the routine diagnosis of Dictyocaulus viviparus infections in cattle*. Vet. Parasitol. 70 (1-3), 153-164.

de Leeuw, W.A., Cornelissen, J.B., 1993. *Comparison of three enzyme immunoassays for diagnosis of Dictyocaulus viviparus infection*. Vet. Parasitol. 49 (2-4), 229-241.

de Leeuw, W.A., Cornelissen, J.B., 1991. *Identification and isolation of a specific antigen with diagnostic potential from Dictyocaulus viviparus*. Vet. Parasitol. 39 (1-2), 137-147.

Eysker, M., 1997. *The sensitivity of the Baermann method for the diagnosis of primary Dictyocaulus viviparus infections in calves*. Vet. Parasitol. 69 (1-2), 89-93.

Eysker, M., Boersema, J.H., Cornelissen, J.B., Kooyman, F.N., de Leeuw, W.A., 1992. *Dictyocaulus viviparus in calves: effect of rotational grazing on the development of infections*. Vet. Parasitol. 41 (1-2), 127-135.

Eysker, M., Claessens, E.W., Lam, T.J., Moons, M.J., Pijpers, A., 1994. *The prevalence of patent lungworm infections in herds of dairy cows in The Netherlands*. Vet. Parasitol. 53 (3-4), 263-267.

Eysker, M., Saatkamp, H.W., Kloosterman, A., 1993. *Infection build-up and development of immunity in calves following primary Dictyocaulus viviparus infections of different levels at the beginning or in the middle of the grazing season*. Vet. Parasitol. 49 (2-4), 243-254.

Eysker, M., van Miltenburg, L., 1988. *Epidemiological patterns of gastrointestinal and lung helminth infections in grazing calves in The Netherlands*. Vet. Parasitol. 29 (1), 29-39.

Fiedor, C., Strube, C., Forbes, A., Buschbaum, S., Klewer, A.M., von Samson-Himmelstjerna, G., Schnieder, T., 2009. *Evaluation of a milk ELISA for the serodiagnosis of Dictyocaulus viviparus in dairy cows*. Vet. Parasitol. 166 (3-4), 255-261, 10.1016/j.vetpar.2009.09.002.

Hoglund, J., Dahlstrom, F., Engstrom, A., Hessle, A., Jakubek, E.B., Schnieder, T., Strube, C., Sollenberg, S., 2010. *Antibodies to major pasture borne helminth infections in bulk-tank milk samples from organic and nearby conventional dairy herds in south-central Sweden*. Vet. Parasitol. 171 (3-4), 293-299, 10.1016/j.vetpar.2010.04.002.

Holzhauer, M., Ploeger, H.W., Verhoeff, J., 2003. *Lungworm disease in dairy cattle: symptoms, diagnosis, and pathogenesis on the basis of four case reports*. Tijdschr. Diergeneeskd. 128 (6), 174-178.

McKeand, J.B., 2000. *Vaccine development and diagnostics of Dictyocaulus viviparus*. Parasitology 120 Suppl, S17-23.

Michel, J.F., 1969. *The control of some nematode infections in calves*. Vet. Rec. 85 (12), 326-329.

Ploeger, H.W., 2002. *Dictyocaulus viviparus: re-emerging or never been away?* Trends Parasitol. 18 (8), 329-332.

Saatkamp, H.W., Eysker, M., Verhoeff, J., 1994. *Study on the causes of outbreaks of lungworm disease on commercial dairy farms in The Netherlands*. Vet. Parasitol. 53 (3-4), 253-261.

Smith, B.P., 1996. *Large Animal Internal Medicine*. Elsevier Health Services.

von Holtum, C., Strube, C., Schnieder, T., von Samson-Himmelstjerna, G., 2008. *Development and evaluation of a recombinant antigen-based ELISA for serodiagnosis of cattle lungworm*. Vet. Parasitol. 151 (2-4), 218-226, 10.1016/j.vetpar.2007.11.006.

Wapenaar, W., Barkema, H.W., Eysker, M., O'Handley, R.M., 2007. *An outbreak of dictyocaulosis in lactating cows on a dairy farm*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 231 (11), 1715-1718, 10.2460/javma.231.11.1715.

Bijlage 1: Vragenlijst case-control studie

Vragenlijst longwormonderzoek 2010

Algemeen:
- Hoe groot is de koppel melkgevend vee (exclusief droge koeien)? (aantal)
- Hoeveel vaarzen zijn aanwezig in deze koppel? (aantal)
- Hoe is het afkalfpatroon? (wel/geen pieken)
- In welke maand is de piek? (1 t/m 12)?
- Komen de vaarzen gelijkmatig in de koppel? (ja/nee)
- Wat is het productieniveau van het bedrijf (305 dagen productie)? (getal)
- Zijn er na het opstallen in 2009 dieren aangekocht/aangevoerd en toegevoegd aan de koppel melkvee? (ja/nee)
- Datum van eerste weidegang dit seizoen? (datum)

Klinisch:
- Is er melkproductiederving opgetreden? (ja/nee)
- Zo ja hoeveel (liters in tank)? (getal/koe of vaars)
- Zijn de koeien onrustig tijdens het melken bv. afvallen van melkstellen? (ja/nee)
- Vanaf welke datum zijn de eerste klachten geconstateerd? (datum)
- Is er al sterfte opgetreden? (ja/nee) Zo ja hoeveel? (aantal)

Opfok:
- Wordt de opfok uitbesteed? (ja/nee)
- Wanneer komt het jongvee voor het eerst buiten? (leeftijd in mnd)
- Wordt het jongvee beweidt op aparte percelen waar geen melkvee of droge koeien worden geweid? (ja/nee)

Historie:
- Wanneer was de laatste longworm uitbraak op het bedrijf? (datum)
- Wordt het melkvee preventief ontwormd? (ja/nee)
- Zo ja, hoeveel tijd na introductie (mn. vaarzen)? (aantal wkn)
- Wordt het jongvee (kalf/pink) preventief ontwormd? (ja/nee)
- Hoelang na datum van eerste weidegang wordt het jongvee ontwormd? (aantal wkn)
- Wordt er therapeutisch ontwormd? (ja/nee)
- Met welk middel? (naam)
- Wordt er gevaccineerd tegen longworm? (ja/nee) Zo ja, welke dieren? (leeftijd dieren)

Eigen waarneming: (percentage van koppel, ernst):

Bijlage 2: Vragenlijst telefonische enquête tankmelksurvey

Vragenlijst landelijk prevalentieonderzoek longworm 2010

Klinisch:

- Is er een longwormuitbraak geweest? (ja/nee)

- Heeft een DA de uitbraak vastgesteld? (ja/nee)

- Zo ja, hoe is de diagnose gesteld? (symptomen, mest, bloed)

- Wat zijn de klachten hieraan gekoppeld:
    - % Hoesten? (ja/nee)
    - Melkproductiederving? (ja/nee)
    - Sterfte? (ja/nee)

- Is er behandeld? (ja/nee + middel)

Algemeen:

- Hoe groot is de koppel melkgevend vee (exclusief droge koeien)? (aantal)

- Hoeveel vaarzen zijn aanwezig in deze koppel? (aantal)

- Zijn er na het opstallen in 2009 dieren aangekocht/aangevoerd en toegevoegd aan de koppel melkvee? (ja/nee)

- Hoe lang heeft het melkvee buiten gelopen? (maanden)

- Wanneer komt het jongvee voor het eerst buiten? (leeftijd in mnd)

Ontworming:

- Wordt het melkvee preventief ontwormd? (ja/nee + middel)

- Zo ja:
    - Welke dieren? (vaars en/of koe)
    - Wanneer? (begin/ tijdens/ eind weidseizoen)

- Wordt het jongvee (kalf/pink) preventief ontwormd? (ja/nee + middel)

- Op welk moment vanaf weidegang wordt het jongvee ontwormd? (begin/ tijdens/ einde weideseizoen)

- Wordt er gevaccineerd tegen longworm? (ja/nee + leeftijd)