

# RISICOFACTOREN VOOR EEN LANGDURIG SALMONELLA ANTILICHAAM POSITIEVE TANKMELK

*Wat maakt het verschil?*



Naam: Drs. G.T. Hofste  
Student nummer: 3050653  
Academiejaar: 2009-2010

Begeleider: Dr. R. Jorritsma  
Hoofdafdeling: Departementen Gezondheidszorg Landbouwhuisdieren  
Onderzoeksgroep: Advances in Veterinary Medicine

# Inhoudsopgave

Samenvatting.....	2
Hoofdstuk 1: Inleiding .....	3
1.1 Achtergrond.....	3
1.2 Doel van het onderzoek.....	6
Hoofdstuk 2: Materiaal en Methode .....	7
2.1 Onderzoeksmethode .....	7
2.2 Melkveebedrijven .....	7
2.3 Epidemiologie .....	8
2.4 Statistiek .....	10
Hoofdstuk 3: Resultaten.....	11
3.1 Univariate analyse .....	11
3.2 Multivariate analyse .....	12
Hoofdstuk 4: Discussie .....	15
Hoofdstuk 5: Conclusie.....	17
Dankwoord.....	18
Referenties.....	19
Bijlagen .....	20
Bijlage 1: Enquête veehouders.....	20
Bijlage 2: Eigen Checklist.....	29

## Samenvatting

In deze case control studie is onderzoek gedaan naar de aanwezigheid van factoren voor een langdurige Salmonella besmetting. Dit onderzoek is gedaan op bedrijven die langdurig een positieve tankmelkuitslag hadden voor antilichamen tegen Salmonella en bedrijven die langdurig een negatieve tankmelkuitslag hadden. Het onderzoek is mede naar aanleiding gedaan van het streven van de melkfabrieken om de tankmelk van melkveebedrijven in 2011 negatief te krijgen voor Salmonella.

Het onderzoek is uitgevoerd met 24 positieve bedrijven (cases) en 24 negatieve bedrijven (controls) die aan elkaar gekoppeld zijn. De bedrijven zijn gelegen in een tweetal regio's waarin relatief veel serologisch positieve bedrijven voorkomen, namelijk de provincie Groningen en Utrecht. De bedrijven zijn gekoppeld met als criterium dat ze in een straal van maximaal 1 kilometer van elkaar liggen en dus waarschijnlijk onder invloed staan van dezelfde omgevingsfactoren. De bedrijven hebben allemaal een enquête gekregen met daarin vragen over het bedrijf. Vervolgens zijn de bedrijven bezocht waarbij de onderzoeker de enquête heeft opgehaald en een score lijst heeft ingevuld met risicofactoren.

Na analyse van de verzamelde gegevens zijn een aantal resultaten verkregen. Hierbij worden factoren als risicofactor gezien wanneer ze significant ( $P \leq 0.05$ ) verschillend zijn tussen beide onderzoeksgroepen. Dit is ten eerste de frequentie van het bezoek van de klauwbekapper. Deze komt meer op positieve bedrijven vaker dan één keer per jaar dan op negatieve bedrijven. Dit zou een risico voor introductie voor Salmonella kunnen zijn, maar ook een gevolg van meer klauwproblemen bij een langdurige Salmonella besmetting. Daarnaast is het aantal keer per dag schoonvegen een risicofactor. Vooral op langdurig positieve bedrijven wordt de stalvloer minder dan vier keer per dag schoongemaakt. Ook de reinheid van de huisvesting van kalveren scoort minder goed op deze bedrijven. Beiden zouden ervoor kunnen zorgen dat de Salmonella besmetting op het bedrijf aanwezig blijft doordat er niet hygiënisch genoeg gewerkt wordt. Als laatste is hoesten bij de kalveren meer aanwezig bij de langdurig positieve bedrijven. Dit kan in lijn zijn met het lagere hygiëne niveau waardoor dierziekten beter op bedrijven kunnen gedijen.

Het is met deze studie lastig te zeggen of de risicofactoren nu een oorzaak of gevolg zijn van een langdurige Salmonella infectie, maar er kan wel gezegd worden dat bepaalde factoren vaker op langdurig positieve bedrijven voorkomen in vergelijking met langdurig negatieve bedrijven. Aandacht aan deze risicofactoren schenken kan zeker nuttig zijn. Nu de melkfabrieken eisen gaan stellen aan de melk wat betreft het aanwezig zijn van de antilichamen tegen Salmonella zullen de bedrijven met een langdurig ongunstige tankmelk actie moeten ondernemen.

# Hoofdstuk 1: Inleiding

## 1.1 Achtergrond

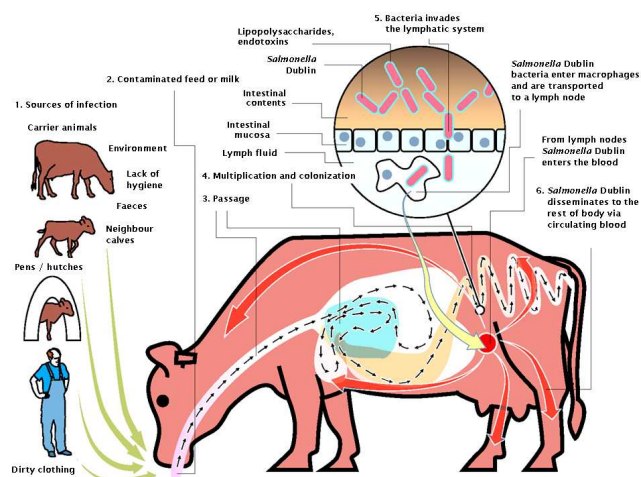
In de huidige Nederlandse melkveehouderijsector staat de bacterie Salmonella erg in de belangstelling. Door de melkfabrieken en de consument wordt een steeds hogere kwaliteit van de melk verwacht. De melk moet gezonder en veiliger worden. Dit heeft ook betrekking op de aanwezigheid van de Salmonella bacterie. Salmonella kan namelijk via melk en vlees bij de mens terecht komen en daar ziekte veroorzaken, ook wel zöonose genoemd. Normaal gesproken kan de pasteurisatie van melk en de verhitting van vlees de bacterie doden, maar wanneer dit onvoldoende gebeurt is er besmetting mogelijk. Sinds april 2008 onderzoeken en registreren de melkfabrieken via Qlip<sup>®</sup> de aanwezigheid van Salmonella antilichamen in de tankmelk. In het kader van de aanpak van Salmonella hebben de melkfabrieken het voornemen om vanaf 2011 bedrijven met een aantal keer positieve tankmelk te benaderen, om te informeren of er een plan van aanpak is. In de toekomst zullen de melkfabrieken alleen melk afnemen van bedrijven die in de tankmelk negatief zijn voor antilichamen tegen Salmonella.

In Nederland komen bij levende dieren enorm veel typen Salmonella voor. De typering van de Salmonella isolaten vindt vaak op serogroep-niveau plaats. Er wordt dan een onderverdeling gemaakt op basis van de O-antigenen in serogroepen A tot en met E. Bij runderen komen voornamelijk twee typen Salmonella voor, namelijk *Salmonella enterica* subspecies *Typhimurium* (serogroep B) en *Salmonella enterica* subspecies *Dublin* (serogroep D). De bacterie leeft in de omgeving en in de dieren. De besmettingen van koeien met deze bacteriën vindt plaats door orale opname van besmet voedsel, water, melk, of uit een besmet milieu of via de infectie van kalveren<sup>17</sup>. De bacterie zou ook nog opgenomen kunnen worden via de luchtwegen of conjunctiva, maar die kans is erg klein<sup>5</sup>.

### Ziekteproces

Wanneer de bacterie eenmaal door de koe opgenomen, is koloniseert hij zich in de darm. De bacteriën vermenigvuldigen zich in het darmlumen en dringen de epitheelcellen binnen van de dunne darm, het caecum en het colon. Zij dringen door tot in de lamina propria en veroorzaken daar een hemorrhagische tot pseudomembraneuze enteritis. Dit leidt tot hypersecretie en malabsorptie. De bacterie kan zich handhaven en vermenigvuldigen in de fagocyten van de koe. Als de bacterie niet wordt opgenomen door een macrofaag kan hij in het bloed terecht komen en een bacteraemie veroorzaken.

Deze laatste fase komt vooral bij *S. Dublin* voor en minder bij *S. Typhimurium*. Sommige Salmonella stammen hebben een hogere virulentie dan anderen. Hierdoor kunnen ze beter de intestinale cellen en het lymfoïde systeem omzeilen en daardoor een systemische infectie veroorzaken. De klinische symptomen zullen dan ook verergeren. Bij jonge kalveren werkt het immuunsysteem nog niet hetzelfde als bij een volwassen rund. Wanneer een bacterie het lichaam binnen dringt is het kalf minder in staat om de groei van de bacterie tegen te gaan



Figuur 1: Pathogenese Salmonella<sup>5</sup>

en te elimineren. Daarom zijn ze erg gevoelig voor een bacteriële infectie. Een goede biest voorziening is dan ook cruciaal om voldoende antilichamen binnen te krijgen om een mogelijke infectie te voorkomen<sup>5</sup>.

De uitscheiding na besmetting kan op verschillende manieren plaats vinden, namelijk vooral via de mest, maar ook via melk, urine, speeksel en vaginale afscheiding<sup>17</sup>. De uitscheiding van de bacterie in de mest is het meest omvangrijk en begint tussen 1 en 7 dagen na opname van de bacterie. De uitscheiding is gemiddeld na 15 tot 17 dagen<sup>7</sup> gestopt. Wanneer er dragers (zie verder) ontstaan, kan de bacterie jaren achtereen uitgescheiden worden. Als een koe de bacterie uitscheidt via vaginale afscheiding, wordt de bacterie niet altijd ook in de mest uitgescheiden of gevonden.<sup>4</sup>

Bij besmetting van een dier kunnen er verschillende klinische ziektebeelden ontstaan. Deze worden onderverdeeld in de peracute-, acute-, chronische- en asymptomatische persistente infectie. Bij een **peracute infectie** zal het dier binnen 1 tot 2 dagen na infectie doodgaan met enkele klinische symptomen, nadat het dier een korte periode van septicaemie en endotoxische shock heeft doorgemaakt. Dit komt vooral voor bij kalveren (die nog weinig weerstand hebben en) blootgesteld zijn aan een hoge *Salmonella* besmetting. Ook kan dit plaatsvinden bij infectie van de eerste koeien van een volledig gevoelige koppel. Bij een **Acute infectie** heeft de infectie in de darmen plaats gevonden en is mogelijk systemisch geworden. Er kunnen zich symptomen voordoen bij kalveren als: koorts, depressie, verminderde eetlust, pneumonie, benauwdheid, bloederige- of waterige diarree met soms mucus en/of fibrine slierten, artritis en osteomyelitis. De laatste twee kunnen leiden tot laminitis en warme gezwollen gewrichten. Ook meningoccefalitis kan ontstaan met nerveuze verschijnselen. Bij volwassen dieren zijn de symptomen: bloederige of waterige diarree, koorts, depressie, abortus, melkproductie daling en vermindering van de eetlust.

Wanneer er een **Chronische infectie** ontstaat, volgt deze op een acute infectie. Deze wordt het meeste gezien bij dieren ouder dan 6 week. De dieren blijven dan achter in groei, hebben een smerige vacht, zijn wat suffig, hebben een lichte temperatuursverhoging en de mest is slecht verteerd. Ook artritis en osteomyelitis wordt gezien. Voor *Salmonella Dublin* is de necrose van de oorhuid of distale ledematen kenmerkend. Dit wordt veroorzaakt doordat daar immunocomplexen vastlopen. Bij het ene dier wordt dan de bacterie nog wel uitgescheiden, maar bij de ander niet.

Tot slot is er nog de **Asymptomatische, persistente infectie (drager)** over. De dragers kunnen ontstaan doordat *Salmonella* een facultatief intracellulaire bacterie is, die kan overleven in de phagolysosoom van macrofagen. Hierdoor kunnen ze ontkomen aan de gevolgen van de bactericide werking van antilichamen en het complement systeem<sup>17</sup>. Dit kan bij alle leeftijden voorkomen en volgt op een acute infectie. De bacterie is dan nog wel in de inwendige organen, lymfe knopen en in de darmwand aanwezig. Ook kan de bacterie op sommige momenten via de mest uitgescheiden worden, maar de dieren vertonen dan geen symptomen. Bij de dragers kan ook nog onderscheid gemaakt worden tussen actieve dragers en passieve dragers. De actieve dragers scheiden in elke omgeving de bacterie uit zonder dat ze symptomen vertonen. De passieve dragers scheiden alleen de bacterie uit op het moment dat er actieve dragers in de buurt zijn (bijvoorbeeld dezelfde stal). De passieve dragers kunnen ook geactiveerd worden op het moment dat de koe veel stress ondervindt. Bij de passieve dragers zijn ook geen symptomen zichtbaar. Voor de verspreiding van de *Salmonella* bacterie zijn dragers de gevaarlijkste dieren, omdat je de uitscheiders niet kan herkennen aan de klinische symptomen<sup>5</sup>.

## Diagnostiek

Om een mogelijke Salmonella besmetting te onderzoeken zijn er verschillende diagnostische testen beschikbaar. Om te kijken of er wel of geen Salmonella op het bedrijf aanwezig is laat de zuivelindustrie vanaf april 2008 door Qlip<sup>®</sup> drie keer per jaar een standaard tankmelkonderzoek doen naar antilichamen tegen Salmonella. Deze test is op basis van een B/D-ELISA en maakt geen onderscheid tussen Salmonella serogroep B of D. Er kan met deze test niet gedifferentieerd worden tussen *S. Dublin* en *S. Typhimurium*. De uitslag van de test is pas positief wanneer meer dan 10% van de koppel koeien antilichamen uitscheidt in de melk<sup>14</sup>. Dit betekent dat wanneer de uitslag positief is, minimaal 10% van de melkgevende koeien Salmonella antilichamen uitscheidt in de melk. Hierbij zijn dus de droogstaande koeien niet meegenomen. Wanneer de uitslag van het tankmelk onderzoek negatief is, kan het zo zijn dat minder dan 10% van de koppel antilichamen uitscheidt of dat er toch geen antilichamen uitgescheiden worden. De uitslag kan wisselen van positief naar negatief of andersom als er koeien droog worden gezet of wanneer enkele serologisch positieve dieren juist melk gaan geven. Daarnaast kan er onderzoek gedaan worden bij het jongvee. Hierbij wordt er meestal bloedonderzoek (ELISA) gedaan naar antilichamen tegen Salmonella van de vijf jongste kalveren vanaf een leeftijd van 90 dagen<sup>15</sup>.

Wanneer er een Salmonella besmetting op een bedrijf aangetoond is, moeten om serologisch negatief te worden de uitscheidende (zieke) dieren opgespoord worden. Van de verdachte dieren kan serologisch bloedonderzoek (ELISA) en bacteriologisch mestonderzoek gedaan worden door middel van ophoping. De ELISA kan gebruikt worden om snel te onderzoeken of de betreffende koe antilichamen tegen Salmonella in haar bloed heeft. Dit heeft als nadeel dat als er onderzocht moet worden of het dier recent een Salmonella infectie heeft doorgemaakt, er gepaarde sera onderzocht moeten worden. Het tweede bloedmonster kan pas later (paar week) genomen worden. Ook kan de bacterie zelf niet aangetoond worden via het bloed. Via mestonderzoek, middels ophoping, kan er wel geprobeerd worden de bacterie te kweken. Wanneer de kweek Salmonella groei laat zien, heb je de bacterie 100% zeker aangetoond. Het nadeel van kweek is dat de koe niet per se de bacterie hoeft uit te scheiden en dat als ze hem wel uitscheidt het mogelijk niet voortdurend is, dus dat de bacterie niet in het monster gevonden wordt. Bij een negatieve mestkweek kan er niet geconcludeerd worden dat de koe de bacterie niet bij zich draagt. Bij het diagnosticeren van een Salmonella koe moeten er na een serologisch positief bloedmonster meerdere mestmonsters gekweekt worden om de besmetting met Salmonella aan te tonen. Wanneer een koe al met antibiotica behandeld is, heeft mestonderzoek weinig zin, want de bacterie kan dan al geëlimineerd zijn.

Om te onderzoeken of een Salmonella besmette koe zich heeft ontwikkeld tot een drager moet er zes maanden na het eerste positieve bloedmonster opnieuw een serologisch bloedonderzoek uitgevoerd worden. De antilichamen, die gemaakt zijn tegen Salmonella, verdwijnen voor het grootste deel na ongeveer vijf maanden uit het bloed. Zes maanden na infectie wordt er bij het grootste deel van de voorheen besmette koeien geen antilichamen meer gevonden tegen Salmonella<sup>13</sup>. Bij drager dieren blijven antilichamen langer dan zes maanden in het bloed aanwezig. Wanneer bij deze dieren ook na zes maanden nog antilichamen in het bloed aanwezig zijn kan er ook mest onderzoek gedaan worden om de bacterie aan te tonen. Hierbij vindt men echter niet altijd de bacterie. Wanneer de kweek negatief is, is een drager dier niet aangetoond, maar sluit het ook niet uit.

Als alternatief voor de ELISA bloedonderzoeken is er sinds kort bij de Gezondheidsdienst<sup>®</sup> ook een individueel melkmonster onderzoek mogelijk. Er wordt dan bij de MPR-meting een individuele antilichaam bepaling gedaan (door middel van ELISA) voor Salmonella op de genomen melkmonsters. Deze test heeft in vergelijking met het serum onderzoek een wat betere specificiteit en een wat lagere sensitiviteit<sup>5</sup>.

### Prevalentie

Ongeveer 10% van de Nederlandse melkveebedrijven is besmet met Salmonella, op 10% van deze besmette bedrijven lopen dragers rond. Per besmet bedrijf zijn dat er ongeveer 2 à 3. De bedrijven die positief zijn zullen voor een deel proberen vrij te worden van Salmonella, maar het lukt niet altijd om het beoogde resultaat te behalen. Bij deze bedrijven is het van belang om te weten waardoor ze besmet raken en dan vervolgens langdurig besmet blijven. Daarnaast zijn er ook bedrijven in dezelfde regio die wel Salmonella negatief zijn en dus niet besmet zijn geraakt. De vraag is welke factoren verschillend zijn tussen beide groepen bedrijven.

### **1.2 Doel van het onderzoek**

Het doel van deze onderzoeksstage is om bij bedrijven met langdurige positieve tankmelk uitslagen voor Salmonella antilichamen (cases) de risicofactoren voor de blijvende Salmonella besmetting te inventariseren en te analyseren. Om te bepalen wat nu risicofactoren zijn voor een blijvende Salmonella besmetting is er een referentiekader nodig. Hiervoor worden bedrijven gebruikt die negatief zijn voor Salmonella antilichamen in de tankmelk (controls). Uit de resultaten kan inzicht worden verkregen over de knelpunten wat betreft een Salmonella besmetting.

Wanneer de veehouder wil proberen vrij te worden van Salmonella kan dan aan deze punten aandacht worden besteed. Niet alle risicofactoren zullen met een gewijzigde bedrijfsvoering aangepast kunnen worden. De resultaten kunnen mogelijk een antwoord geven op de vraag waarom bepaalde bedrijven besmet raken met Salmonella en waarom de bacterie op juist deze bedrijven blijft rondzingen.

De  $H_0$  hypothese die voor dit onderzoek aangenomen wordt is dat “Langdurig tankmelk positieve bedrijven verschillen van tankmelk negatieve bedrijven ten aanzien van de bedrijfsvoering en omgevingsfactoren”. Wanneer deze  $H_0$  hypothese verworpen wordt geldt de  $H_1$  hypothese, namelijk “Langdurig tankmelk positieve bedrijven verschillen niet van tankmelk negatieve bedrijven ten aanzien van de bedrijfsvoering en omgevingsfactoren”.

## Hoofdstuk 2: Materiaal en Methode

### 2.1 Onderzoeksmethode

Bij het uitvoeren van het onderzoek worden de twee typen melkveebedrijven (cases en controls) vergeleken. Voor deze bedrijven is een enquête opgesteld, waarin gevraagd wordt naar bedrijfseigenschappen die mogelijk risicofactoren voor een Salmonella besmetting zouden kunnen zijn, zie bijlage 1.<sup>2,3,9,10,11,12</sup> Daarnaast is er een checklist waarmee tijdens een bedrijfsbezoek het bedrijf objectief door de onderzoeker beoordeeld wordt, zie bijlage 2.<sup>2,3,9,10,11,12</sup> In de checklist zijn ook een aantal punten aanwezig, waarbij een score wordt gebruikt. Deze score is weergegeven op een schaal van 1 tot en met 5. De schaal kan verschillende waarden “vies (1) tot en met schoon (5)” en “weinig (1) tot en met veel (5)” aannemen.

### 2.2 Melkveebedrijven

De bedrijven die in aanmerking kwamen voor het onderzoek zijn gelegen in een tweetal regio's waarin relatief veel serologisch positieve bedrijven voorkomen, namelijk de provincie Groningen en Utrecht. Een langdurig positief bedrijf, case, moest aan het criterium voldoen dat hij langer dan 1 jaar, zie SIR model, een positieve tankmelkuitslag had voor antilichamen tegen Salmonella. De langdurig negatieve bedrijven, controls, zijn gekoppeld aan de positieve met als criterium dat ze in een straal van maximaal 1 kilometer van elkaar liggen en dus waarschijnlijk onder invloed staan van dezelfde omgevingsfactoren. De negatieve bedrijven moesten ook langer dan 1 jaar een negatieve uitslag hebben voor Salmonella antilichamen. In totaal zijn 24 koppels gevonden, waarvan er 21 gelegen zijn in de provincie Groningen en 3 in de provincie Utrecht. Voor het vinden van de bedrijven in de provincies Groningen en Utrecht zijn 4 dierenartsenpraktijken in Groningen en 1 in Utrecht benaderd.

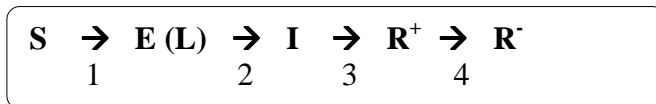
Samen met de dierenartsen is er gekeken welke bedrijven mogelijk langdurig positief zouden kunnen zijn (op basis van kennis van de bedrijven). Sommige dierenartsen hebben zelf deze mogelijk geschikte bedrijven opgebeld, in andere praktijken heeft de onderzoeker dat zelf gedaan. De veehouders werden gevraagd naar de huidige status van de tankmelk voor Salmonella antilichamen en de vorige uitslagen. Toen alle case bedrijven gevonden waren is hetzelfde proces opnieuw doorgelopen, maar nu voor mogelijke controle bedrijven. Van de deelnemende veehouders zijn de tankmelkuitslagen van de onderzoeken naar antilichamen tegen Salmonella verzameld sinds de invoering van het standaard onderzoeken van de tank vanaf april 2008. Dit zijn dus drie metingen per jaar. Deze tankmelkonderzoeksgegevens zijn vrijgegeven door Qlip<sup>®</sup>, nadat de meewerkende veehouders en de melkfabrieken hiervoor toestemming hebben gegeven. Ook is er voor het onderzoek verklaard dat de gegevens anoniem zullen blijven en niet aan derden zullen worden verstrekt.

Wanneer de bedrijven geschikt bevonden waren, kregen ze de enquête toegestuurd. Één à twee week later werden de bedrijven bezocht om de enquête op te halen en het bedrijf te bekijken, zodat de checklist kon worden ingevuld. Om waarnemingen zo objectief mogelijk beoordeeld worden, zijn ze zoveel mogelijk gestandaardiseerd. Zo zijn er eerst een aantal andere bedrijven bekeken om een normaal beeld van de hygiëne, vogels en dergelijke aspecten te krijgen. Aan de hand hiervan zijn dan in de checklist categorieën opgesteld, zodat de bezochte bedrijven goed in een categorie ingedeeld konden worden.



## 2.3 Epidemiologie

Voor het onderzoek moesten bedrijven worden geselecteerd die geen acute uitbraak van Salmonella hadden, waardoor ze een positieve tankuitslag hadden voor Salmonella antilichamen. Om bedrijven met een positieve tank als gevolg van een uitbraak uit te sluiten, is er een aangepast SIR model<sup>16</sup> gebruikt. Hierin wordt een uitbraak van Salmonella nagebootst. Er wordt gekeken vanaf het moment van uitbraak hoelang het duurt totdat er weer een negatieve tankuitslag zou zijn. Voor de epidemiologie is de formule in figuur 2 van toepassing om verschuivingen van categorieën dieren weer te geven<sup>14</sup>. Figuur 3 is de legenda bij figuur 2.



Figuur 2: Formule het SIR model van Salmonella

S= aantal gevoelige dieren

E (L)= aantal dieren in latente periode

I= aantal infectieuze dieren

R<sup>+</sup>= aantal herstelde dieren die antilichamen in de melk uitscheiden

R<sup>-</sup>= aantal herstelde dieren die geen antilichamen meer in de melk uitscheiden

-----

$$1 = (\beta \times S \times I) / N$$

$$2 = \varepsilon \times E$$

$$3 = \alpha \times I$$

4= periode dat de antilichamen bij een hersteld dier in de melk zijn te vinden

-----

$\beta$ = infectiesnelheidsparameter =  $R_0 \times \alpha$

N= totaal aantal dieren in de koppel

$\varepsilon$ = snelheidsparameter voor latente periode naar infectieuze periode

$\alpha$ = herstelsnelheidsparameter =  $1 / D$

D= duur infectieuze periode

Figuur 3: Legenda bij figuur 2<sup>14</sup>

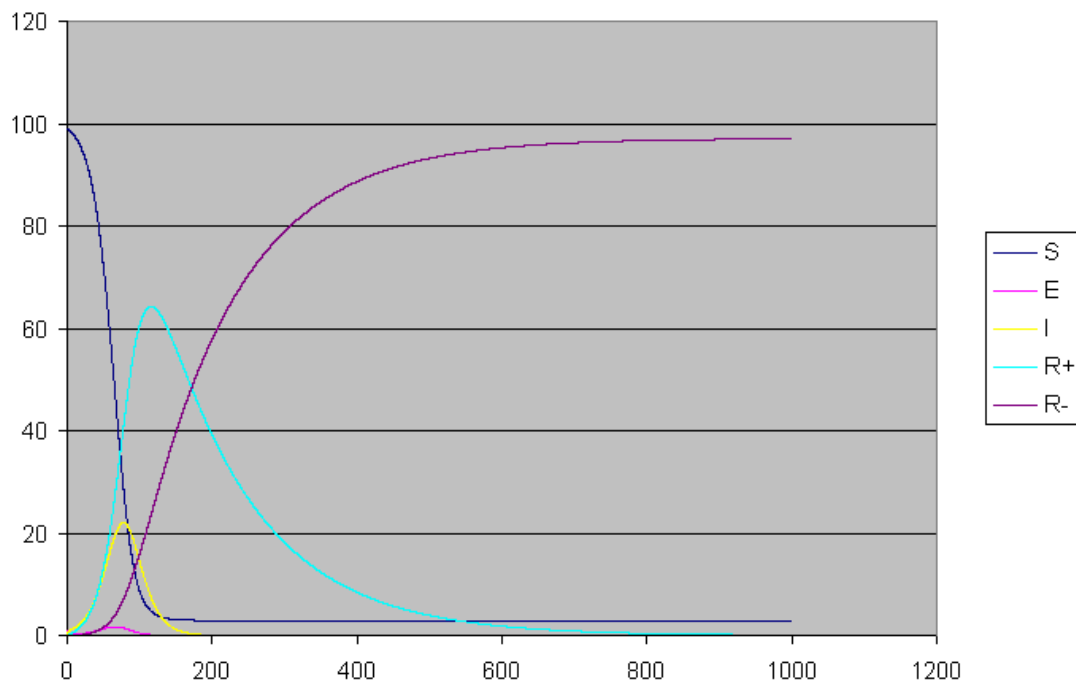
Voor het simulatie model zijn een aantal aannames gedaan om een zo realistisch verloop van de epidemiologie van een Salmonella infectie in een melkveebedrijf te laten zien. Als “gemiddeld aantal koeien per melkveebedrijf” is gekozen voor 100 dieren. Om de infectie te laten verlopen dient er één dier in de latente periode te verkeren, daarom is als uitgangssituatie gekozen voor E=1. De overige 99 dieren zitten dan in de gevoelige periode, S=99. Door middel van een simulatie is er gekeken hoe het verloop is over het aantal dieren in het infectieuze stadium, het herstelde stadium waarin ze wel antilichaam uitscheiden en het herstelde stadium zonder uitscheiding van antilichamen.

Om dit simulatie model te laten verlopen zijn waarden nodig voor de lengte van de periode tussen twee stadia, zie figuur 2 en 3. De duur van de eerste periode (1), tot moment van infectie, kan met de formule uit figuur 3 berekend worden. Hiervoor is de infectiesnelheidsparameter ( $\beta$ ) van belang, die berekend wordt met de  $R_0$  en  $\alpha$ . Voor de  $R_0$  waarde is gekozen voor 2. Dit is gedaan op basis van het artikel van Van Schaik et al<sup>8</sup>, daar is een  $R_0$  berekend van 2.5 voor *Salmonella Dublin* en 1.3 voor *Salmonella Typhimurium*. De  $\alpha$  wordt berekend met D, duur infectieuze periode, die 15 dagen bedraagt (zie verder).

Vervolgens is de lengte van de latente periode (2) 1 dag en de lengte van de infectieuze periode (3) 15 dagen van belang. Hierover is geen informatie van runderen bekend en daarom is deze periode gekozen naar aanleiding van het artikel van Robertsson<sup>7</sup>, waarin is onderzocht wanneer kalveren beginnen met uitscheiden en stoppen met uitscheiden na infectie. De kalveren zijn op dag 1 geïnfecteerd met de *Salmonella Dublin* of *Salmonella Typhimurium* bacterie en zijn in de daarop volgende dagen getest op uitscheiding van de bacterie. Op de tweede dag na infectie zijn de kalveren gemiddeld begonnen met uitscheiden en stoppen na 12 en 19 dagen respectievelijk voor *Salmonella Dublin* en *S. Typhimurium*. Voor dit onderzoek zijn deze waarnemingen gebruikt en is de lengte van infectieuze periode op 15 dagen gezet.

Vanaf het moment dat de koeien geen bacterie meer uitscheiden bevinden ze zich in het herstelde stadium waarin ze wel antilichamen uitscheiden. Na 180 dagen (periode 4) scheidt het grootste deel van de koeien geen antilichamen meer uit. Gedurende zes maanden na infectie zijn normaal gesproken de antilichamen aanwezig in het bloed en de melk. Aan het eind van deze periode neemt de spiegel af tot nul.<sup>13</sup> Na de vierde periode bevinden de koeien zich dus in het herstelde stadium zonder uitscheiding van antilichamen. Deze zijn dus ook niet meer van invloed op het dan wel positief of negatief zijn van de tankmelk.

Met behulp van voorgenoemde gegevens kan het SIR model uitgevoerd worden. De grafiek die ontstaat is te zien in figuur 4. Hierin is te zien dat na ongeveer 365 dagen het aantal dieren op het bedrijf dat antilichamen uitscheidt in de melk onder de 10% zit en de tankmelk dus negatief moet worden voor antilichamen tegen Salmonella. Een bedrijf is langdurig besmet als er langer dan 365 dagen een besmetting op het bedrijf aanwezig is. Dit staat gelijk aan drie of meer achtereenvolgende positieve tankmelkuitslagen voor Salmonella.



Figuur 4: Simulatie model grafiek van een Salmonella epidemie binnen een bedrijf na besmetting.

## **2.4 Statistiek**

Voor de statistische analyse van het onderzoek wordt een Conditionele logistische regressie uitgevoerd, door middel van het COX proportional hazard model, omdat de waarnemingen (bedrijven) gekoppeld zijn. In dit model wordt gewerkt met afhankelijke en onafhankelijke variabelen. De afhankelijke variabele is het wel of niet langdurig positief zijn van de tankmelk op antilichamen. De onafhankelijke variabelen zijn de verschillende factoren die mogelijk een risico zouden kunnen vormen. De test geeft een uitkomst op de vraag “in hoeverre wordt de kans op een langdurig positieve tankmelkuitslag beïnvloed door de onafhankelijke variabelen”. De factoren die onderzocht worden zijn in een aantal groepen onder te verdelen, namelijk bedrijfskenmerken, bezoekers aan bedrijven en algemene hygiëne<sup>1</sup>

De factoren zijn eerst allemaal individueel via een univariate analyse getest. Dit heeft de mogelijke risicofactoren gegeven op basis van de significantie (P-waarde) en de odds-ratio. Uit de uitslagen werden de factoren geselecteerd die een P-waarde hebben van 0.10 of lager en een odds-ratio groter dan 3 (of kleiner dan 0.4). Deze zijn in een multivariate analyse getest in een Backward selectie op basis van een Logistische Regressie. De factoren die vervolgens overblijven zijn risicofactoren.

De analyses zijn uitgevoerd in SPSS<sup>®</sup> 16.0 for Windows, Release 16.0.2 (Apr. 28, 2008).

## Hoofdstuk 3: Resultaten

### 3.1 Univariate analyse

Na uitvoering van de univariate analyse zijn er 19 factoren uitgekomen die aan de eisen voldoen voor de multivariate analyse. Deze factoren zijn samen met de P-waarde, de odds-ratio en het betrouwbaarheidsinterval in tabel:1 genoemd. De factoren zijn in drie categorieën ingedeeld, namelijk bedrijfskenmerken, bezoekers aan bedrijven die mogelijk voor introductie zouden kunnen zorgen en algemene hygiëne dat er voor zou kunnen zorgen dat een infectie op het bedrijf aanwezig blijft.

Tabel: 1, factoren die voldoen aan eisen van univariate analyse

Factor	x ja Pos (nvt)	X ja Neg (nvt)	P-waarde	Odds-ratio (BI 95%)
<b>Bedrijfskenmerken</b>				
IBR status: ONBEKEND	10	4	0.099	3.000 (.81-11.08)
≤ 5 veehouders in straal 1 km	10	24	0.057	0.015 (.00-1.13)
Zomer: pulp in rantsoen?	8	3	0.097	6.000 (.72-49.84)
Hoesten bij de kalveren	16	9	0.067	3.333 (.92-12.11)
Drinkbak: type snelafvoer drinkbak	5	12	0.067	0.300 (.08-1.09)
<b>Bezoekers aan bedrijven</b>				
>1x/jaar klauwbekapper op bedrijf	14	7	0.067	3.333 (.92-12.11)
>1x/maand bedrijfshulp op bedrijf	9	3	0.080	4.000 (.85-18.84)
Professioneel bedrijf voor ongedierte bestrijding	1(1)	6	0.097	0.167 (.02-1.38)
Mate vogels (1,weinig-5,veel) ≥4	14	4	0.019	6.000 (1.34-26.81)
Mate overlast ongedierte ≥3 (1,weinig - 5, veel)	10	3	0.054	4.500 (.97-20.83)
Is de overlast van ongedierte vnl. in: jongveestal?	18	10	0.046	3.667 (1.02-13.14)
<b>Algemene hygiëne</b>				
Mate schoonheid sluis (1,vies-5, schoon) ≤2	10	3	0.054	4.500 (.97-20.83)
Komt hond in de stal?	16 (6)	10 (5)	0.069	7.000 (.86-56.9)
< 4x/dag stalvloer schoonvegen	17	9	0.046	3.667 (1.02-13.14)
Mate strooisel in box ≤2 (1,weinig-5, veel)	19	10	0.027	5.500 (1.22-24.81)
Waterbak schoonmaken: ≤ 1x/maand	18	11	0.067	3.333 (.92-12.11)
Mate reinheid huisvesting kalveren (1, schoon - 5, vies) ≤2	18	6	0.011	5.000 (1.45-17.27)
<5 dagen staan kalverhokken leeg	10(9)	3(7)	0.097	6.000 (.77-49.84)
Mate reinheid huisvesting jongvee (1, schoon - 5, vies) ≤2	18	6	0.011	5.000 (1.45-17.27)

### **3.2 Multivariate analyse**

In de multivariate analyse zijn alle factoren uit tabel:1 gebruikt. De resultaten zijn weergegeven in tabel:2. De factoren met een grijze balk gaven een foutmelding bij de uitvoering van de test. Als factoren niet tot het einde zijn overgebleven staat aangegeven bij welke stap ze eruit gegooid zijn. Uiteindelijk zijn uit dit model een viertal factoren overgebleven, namelijk “>1x/jaar klauwbekapper op het bedrijf”, “<4x/dag stalvloer schoonvegen”, “mate reinheid huisvesting kalveren  $\leq 2$ ”, “hoesten bij kalveren”.

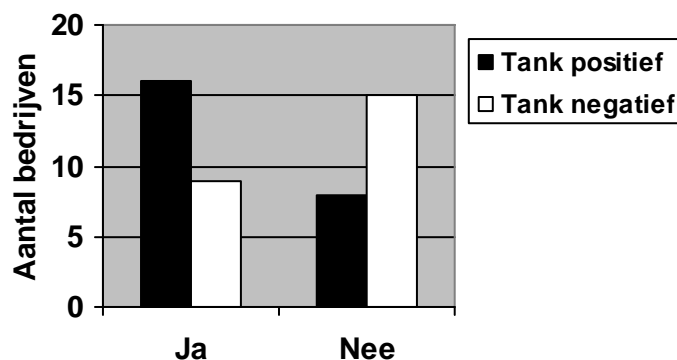
Deze factoren zijn de overgebleven risicofactoren. Wanneer deze risicofactoren aanwezig zijn heb je een grotere kans op een langdurig positieve tankmelk ten opzichte van een langdurig negatieve tankmelk. Zo is de kans op een langdurig positieve tankmelk 7.9 keer zo groot, ten opzichte van een langdurige negatieve tankmelk, als er vaker dan 1 keer per jaar een klauwbekapper op het bedrijf komt. Wanneer er minder dan vier keer per dag de stalvloer wordt schoongeveegd is deze kans 7.6 keer zo groot, wanneer de reinheid van de huisvesting van de kalveren een score krijgt van twee of minder is de kans 12.3 keer zo groot en als laatste is er als er gehoest wordt bij de kalveren de kans 9.7 keer zo groot op een langdurig positieve tankmelk ten opzichte van een langdurig negatieve tankmelk.

Tabel 2: Uitslagen multivariate analyse van factoren

<b>Factor</b>	<b>Stap (eruit)</b>	<b>P-waarde</b>	<b>Odds-ratio (BI 95%)</b>
<b><u>Bedrijfskenmerken</u></b>			
IBR status: ONBEKEND			
$\leq 5$ veehouders in straal 1 km			
Zomer: pulp in rantsoen?			
Hoesten bij de kalveren	over	0.142	9.699 (.47-200.8)
Drinkbak: type snelafvoer drinkbak			
<b><u>Bezoekers aan bedrijven</u></b>			
>1x/jaar klauwbekapper op bedrijf	over	0.071	7.938 (.84-75.12)
>1x/maand bedrijfshulp op bedrijf	2	0.821	1.745 (.01-217.0)
Professioneel bedrijf voor ongedierte bestrijding	4	0.807	.578 (.01-46.44)
Mate vogels(1,weinig-5,veel) $\geq 4$			
Mate overlast ongedierte $\geq 3$ (1,weinig - 5, veel)			
Is de overlast van ongedierte vnl. in: jongveestal?	7	0.715	.565 (.03-12.14)
<b><u>Algemene hygiëne</u></b>			
Mate schoonheid sluis (1,vies-5, schoon) $\leq 2$	5	0.762	.562 (.01-23.45)
Komt hond in de stal?	6	0.768	1.511 (.97-23.5)
< 4x/dag stalvloer schoonvegen	over	0.085	7.644 (.75-77.57)
Mate strooisel in box $\leq 2$ (1,weinig-5, veel)			
Waterbak schoonmaken: $\leq 1$ x/maand	3	0.830	1.549 (.03-83.15)
Mate reinheid huisvesting kalveren (1, schoon - 5, vies) $\leq 2$	over	0.079	12.330 (.75-203.5)
<5 dagen staan kalverhokken leeg			
Mate reinheid huisvesting jongvee (1, schoon - 5, vies) $\leq 2$			

### 3.3 Bedrijfskenmerken

De bedrijfskenmerken zijn onderzocht om te zien of er bepaalde factoren aanwezig zijn die in relatie gebracht kunnen worden met een langdurige Salmonella besmetting. Na de univariate analyse blijken de factoren, “IBR-status: onbekend”, “≤ 5 veehouders in straal 1 km”, “zomer: pulp in rantsoen”, “hoesten bij de kalveren”, “drinkbak: type snelafvoer drinkbak” duidelijk verschillend van de rest, zie tabel:1. Wanneer deze factoren werden getoetst met de multivariate analyse bleek alleen “hoesten bij de kalveren” over te blijven, zie tabel:2. Hoesten bij de kalveren is een duidelijke risicofactor die aanwezig is bij 16 bedrijven met een langdurige Salmonella besmetting en bij 9 negatieve bedrijven, zie figuur 5.

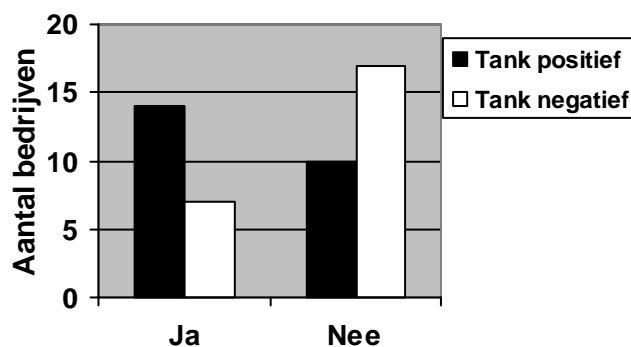


Figuur 5: Hoesten de kalveren?

### 3.4 Bezoekers aan bedrijven

De verschillende bezoekers aan bedrijven zouden mogelijk een indruk kunnen geven van de introductieroutes van Salmonella op een bedrijf. Hiervoor zijn allerlei routes onderzocht. Na de univariate analyse bleken de bedrijfshulp, de klauwbekapper en de vogels opvallend. Wanneer er dan vogels op een bedrijf aanwezig zijn, waren dat er bij de langdurig positieve bedrijven ook meer dan op negatieve bedrijven en ook vooral in de jongveestal. De verhoogde aanwezigheid van de bedrijfshulp en de klauwbekapper kunnen geïnterpreteerd worden als een verhoogde kans op introductie van Salmonella op het bedrijf, maar ook als meer vraag door meer problemen op het bedrijf als gevolg van Salmonella. Als laatste bleek uit de univariate analyse dat negatieve bedrijven vaker dan langdurig positieve bedrijven een professioneel ongedierte bestrijdingsbedrijf inschakelen om ongedierte op te ruimen, zie tabel:1.

Na de multivariate analyse bleef alleen de klauwbekapper over, zie tabel:2. Het vaker dan 1 keer per jaar op bedrijven komen is een risicofactor voor Salmonella op 14 langdurig positieve bedrijven en op 7 negatieve bedrijven, zie figuur 6.

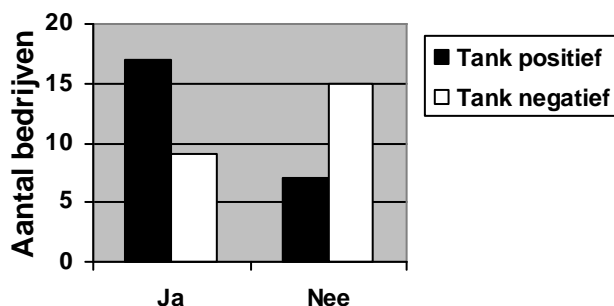


Figuur 6: Komt de klauwbekapper >1x/jaar?

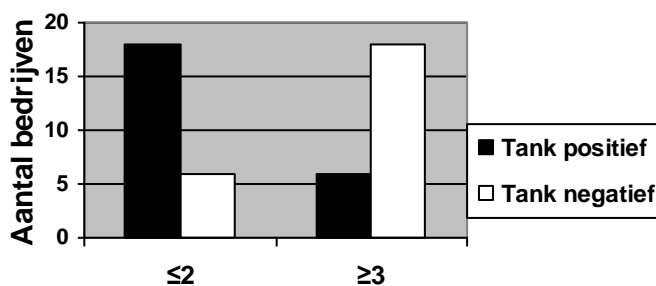
### 3.5 Algemene hygiëne

De algemene hygiëne op het bedrijf zou kunnen zorgen voor het aanwezig blijven van de Salmonella infectie op het bedrijf. Na de univariate analyse bleken de factoren, “Mate schoonheid sluis (1,vies – 5, schoon)”, “ $\leq 2$  Komt hond in de stal?”, “ $< 4x/dag$  stalvloer schoonvegen”, “Mate strooisel in box  $\leq 2$  (1, weinig – 5, veel)”, “Waterbak schoonmaken:  $\leq 1x/maand$ ”, “Mate reinheid huisvesting kalveren (1, schoon – 5, vies)  $\leq 2$ ”, “ $< 5$  dagen staan kalverhokken leeg” en “Mate reinheid huisvesting jongvee (1, schoon – 5, vies)  $\leq 2$ ” opvallend, zie tabel:1.

De multivariate analyse van deze factoren geeft aan dat het minder dan 4 keer per dag de stalvloer schoonvegen en een score van 2 of minder voor mate van reinheid van de huisvesting van kalveren risicofactoren zijn, zie tabel:2. De eerste risicofactor is aanwezig bij 17 langdurig positieve bedrijven en op 9 negatieve bedrijven, zie figuur 7. De tweede risicofactor is aanwezig bij 18 langdurig positieve bedrijven en 6 negatieve bedrijven, zie figuur 8.



Figuur 7: Wordt de roostervloer minder dan vier keer per dag schoongemaakt?



Figuur 8: Score voor de mate van reinheid van de huisvesting van kalveren (1, schoon – 5, vies)

## Hoofdstuk 4: Discussie

Na onderzoek bleken enkele factoren significant verschillend te zijn tussen bedrijven die geen Salmonella antilichamen in de tankmelk hadden en bedrijven die wel Salmonella antilichamen hadden. De vierfactoren die na de multivariate analyse overbleven waren “>1x/jaar klauwbekapper op het bedrijf”, “<4x/dag stalvloer schoonvegen”, “mate reinheid huisvesting kalveren  $\leq 2$ ” en “hoesten bij kalveren”. Deze risicofactoren zijn dus aanwezig bij bedrijven die langdurig geïnfecteerd zijn met Salmonella op het bedrijf. Naast deze risicofactoren zijn er ook een aantal factoren die na de univariate analyse overbleven, maar bij de multivariate analyse eruit gehaald zijn. Sommige van deze factoren waren wel significant, maar niet zodanig van invloed dat ze na de multivariate overbleven. Ook waren een aantal factoren niet significant, maar was er wel een trend te zien. Dit is mogelijk te verklaren door een te kleine steekproef grootte of dat ze toch niet verschillend genoeg zijn tussen de twee groepen bedrijven. Mogelijk zouden deze factoren wel significant zijn bij een grotere steekproef grootte.

Van de 25 cases en 25 controle bedrijven waarmee begonnen is, wilde één case bedrijf niet meer meewerken, waardoor ook het gekoppelde controle bedrijf afviel. Het onderzoek is vervolgens gedaan met 24 cases en 24 controls. Om een objectieve score van bedrijven nog zekerder te stellen moeten bedrijven nog meer blind gescoord worden. Tijdens het scoren van bedrijven moet niet bekend zijn of het bedrijf positief dan wel negatief is. Ook dan moet er eerst gescoord worden voordat er met de boer over het bedrijf gepraat wordt.

Er zijn ook een heel aantal factoren onderzocht, waarvan de literatuur vermeldt dat het risicofactoren zijn voor een Salmonella besmetting. In dit onderzoek bleken sommige van deze factoren geen risicofactor. De vraag is dan of deze risicofactoren eerder wel aanwezig waren op het bedrijf, bijvoorbeeld een aantal jaren geleden, en nu weggenomen zijn. Mogelijk zouden dan de risicofactoren alleen voor een Salmonella introductie hebben gezorgd en zijn er andere factoren waardoor de infectie op het bedrijf blijft bestaan en niet verdwijnt. Ook zou het mogelijk zijn dat de controle bedrijven sommige risicofactoren voor Salmonella wel bezitten, maar dat zij tot dusver geluk hebben gehad dat de bacterie nooit is binnen gedrongen op het bedrijf.

In het onderzoek van Vaessen et al<sup>10</sup> is gevonden dat de aankoop van dieren, voedingssamenstelling en leverbot risicofactoren zijn voor een Salmonella besmetting, deze factoren zijn in dit onderzoek niet als risicofactor naar voren gekomen. Het verschil met mijn onderzoek is mogelijk te verklaren doordat bij de onderzochte positieve bedrijven de aankoop al verminderd is bij het begin van de Salmonella infectie. Weinig onderzochte bedrijven, zowel positief als negatief, deden mee aan een leverbot onderzoek. Een verschil was ook niet aantoonbaar. In het onderzoek van Vaessen et al<sup>10</sup> zijn ook grotere hoeveelheden bedrijven onderzocht via ander soort vragen. Daarnaast heeft Veling et al<sup>12</sup> gevonden dat de aanwezigheid van katten op het bedrijf een risicofactor was, in dit onderzoek was juist de aanwezigheid van de hond en dan met name in de stal een risicofactor. De aankoop van mest was bij Veling et al<sup>12</sup> een risicofactor, in dit onderzoek is in beide groepen nauwelijks mest aangekocht. Ook hebben zij gemeten of de biest voor het kalf van de eigen moeder kwam, dit was in hun onderzoek een risicofactor. In dit onderzoek is hetzelfde gemeten, maar hier bleek dat de kalfjes op alle bedrijven in beide groepen, op één na, de melk van de eigen moeder kregen.



De hygiëne aspecten, zoals gevonden in dit onderzoek zijn in beide eerder genoemde studies nauwelijks onderzocht en zijn dan ook niet echt te vergelijken. Ook zijn er geen scores gemaakt van bedrijfsbezoeken van verschillende personen. De verschillen tussen de resultaten van de andere studies en deze studie zijn mogelijk te verklaren door een groter aantal gebruikte bedrijven in de andere studies, waardoor factoren daar eerder significant verschillend zijn. Ook de manier van vraagstelling kan van invloed zijn op de uitslagen. Als laatste zijn in dit onderzoek langdurig positieve en negatieve bedrijven gebruikt, terwijl in andere studies acuut besmette bedrijven onderzocht zijn.

Uit dit onderzoek kan eigenlijk niet een conclusie getrokken worden over of bepaalde risicofactoren nu een oorzaak dan wel een gevolg zijn van een Salmonella besmetting. De studie is een moment opname, wanneer er oorzaken of gevolgen aangeduid zouden moeten worden is een longitudinale studie van bedrijven vereist. De resultaten van dit onderzoek geven aan dat bepaalde risicofactoren meer gevonden worden op langdurig positieve bedrijven dan op langdurig negatieve bedrijven.

De veehouders van de case bedrijven vertelden ook dat ze afgelopen jaren nauwelijks klinische symptomen van Salmonella hebben gezien. De vraag is dan ook, zijn er geen symptomen of merken de veehouders de symptomen niet op? Op sommige bedrijven is een individueel melkmonster onderzoek of bloedonderzoek gedaan op alle koeien. Hieruit zijn wel degelijk koeien gevonden die positief zijn op antilichamen (vaak >10% van de koppel). Op deze dieren is dan ook mestonderzoek gedaan, maar tot dusver is hier de bacterie nog niet uit gekweekt. Ook niet na herhaaldelijk onderzoek van bloed en mest. Doordat de bacterie niet gevonden werd en de koe niet ziek was, was er voor de veehouder ook geen reden om de koe op te ruimen. Mogelijk zou de koe de bacterie intermitterend uitscheiden, niet ziek zijn en toch de infectie op het bedrijf op een bepaald niveau houden.

---

## Hoofdstuk 5: Conclusie

Na het uitvoeren van de case control studie zijn er een viertal duidelijke risicofactoren gevonden bij bedrijven met een langdurig Salmonella positieve tankmelk in vergelijking met bedrijven met een negatieve tankmelk. Dit is ten eerste de frequentie van het bezoek van de klauwbekapper. Deze komt meer op positieve bedrijven vaker dan één keer per jaar dan op negatieve bedrijven. De kans op een langdurig positieve tankmelk is dan 7.9 keer zo groot ten opzichte van een langdurige negatieve tankmelk. Dit zou een risico voor introductie voor Salmonella kunnen zijn, maar ook een gevolg van meer klauwproblemen bij een langdurige Salmonella besmetting. Daarnaast is het aantal keer per dag schoonvegen een risicofactor. Vooral op langdurig positieve bedrijven wordt de stalvloer minder dan vier keer per dag schoongemaakt. De kans op een langdurig positieve tankmelk is dan 7.6 keer zo groot. Ook de reinheid van de huisvesting van kalveren scoort minder goed op deze bedrijven, hierdoor wordt de kans op een langdurig positieve tankmelk 12.3 keer zo groot. Beiden zouden ervoor kunnen zorgen dat de Salmonella besmetting op het bedrijf aanwezig blijft doordat er niet hygiënisch genoeg gewerkt wordt. Als laatste is hoesten bij de kalveren meer aanwezig bij de langdurig positieve bedrijven, waardoor de kans 9.7 keer zo groot wordt. Dit kan in lijn zijn met het lagere hygiëne niveau waardoor dierziekten beter op bedrijven kunnen gedijen.

Om een langdurige besmetting op een bedrijf mogelijk te stoppen of te voorkomen zou aan deze factoren aandacht kunnen worden besteed. Besmette bedrijven zullen moeten proberen vrij te worden, omdat de melkfabrieken mogelijk zwaardere eisen gaan stellen aan de melk en het voor de dieren beter is als ze geen Salmonella besmetting hebben.

## Dankwoord

Als afsluiting van de onderzoeksstage wil ik dr. R. Jorritsma bedanken als begeleider van mijn onderzoeksstage. Met name voor de hulp bij het opzetten van de case-control studie, zijn ervaring met onderzoek en het nuttige en sturende commentaar op het onderzoeksproces. Daarnaast wil ik dr. D. Klinkenberg bedanken voor de hulp bij het opzetten van een simulatiemodel voor het verloop van een acute Salmonella infectie in een gevoelig runderkoppel. Ook wil ik dhr. H. Vernooij bedanken voor de hulp bij het gebruik van SPSS<sup>®</sup> voor de statistische analyse van de onderzoeksresultaten.

Verder wil ik de meewerkende dierenartsenpraktijken bedanken voor het helpen zoeken naar de bedrijven die geschikt waren voor gebruik in het onderzoek. Dit waren DAP Zuidhorn, Dierenkliniek Winsum, DAP van Stad tot Wad, DAP van Zeebroeck en ULP Harmelen.

Uiteraard heeft mijn onderzoek niet kunnen plaatsvinden zonder de meewerkende veehouders, dus bij deze wil ik ze ook bedanken voor hun medewerking.

## Referenties

1. Cessie, Saskia le, *SPSS handleiding*, okt 2008, LUMC Medische statistiek
2. Heuvelink, A.E., J.T.M. Zwartkruis, C.van Heerwaarden, B.Arends, V. Stortelder, E. de Boer. *Pathogene bacteriën en parasieten in faeces van wilde dieren en in oppervlaktewater*. Tijdschr. Diergeneeskunde (2008); 133:330-335
3. Losinger, W.C., S.J.Wells, L.P.Garber, H.S.Hurd. *Management factors related to Salmonella shedding by dairy heifers*. J.Dairy.Sci. (1995) 78:2464-2472
4. Mateus A, Taylor DJ, Brown D, Mellor DJ, Bexiga R, Ellis K. *Looking for the unusual suspects: a Salmonella Dublin outbreak investigation*. Public Health. 2008 Dec; 122(12):1321-3.
5. Nielsen, L.R., *Overview of pathogenesis epidemiology and diagnostic tools necessary for successful surveillance and eradication of Salmonella Dublin from the Danish cattle population* (2009)
6. Nielsen, L.R., L.D. Warnick, M.Greiner. *Risk factors for changing test classification in the danisch surveillance program for Salmonella in Dairy herds*. J. Dairy Sci. 90:2815-2825
7. Robertsson J.A., *Humoral antibody responses to experimental and spontaneous Salmonella infections in cattle measured by ELISA*, Zentralbl. Veterinarmed. B (1984) 31:367-380.
8. Schaik, G. van, D. Klinkenberg, J. Veling, A.Stegeman, *Transmission of Salmonella in dairy herds quantified in the endemic situation*. Vet. Res. 38 (2007) 861-869.
9. Schaik, G.van, Y.H.Schukken, M.Nielen, A.A.Dijkhuizen e.a. *Probability of and risk factors for introduction of infectious diseases into Dutch SPF dairy farms: a cohort study*. Prev.Vet.Med. 54 (2002) 279-289
10. Vaessen, M.A., J. Veling, K. Frankena, E.A.M. Graat, T. Klunder, *Risicofactoren voor Salmonella Dublin-infecties op melkveebedrijven*. Tijdschr. Diergeneeskunde (1998); 123: 349-51.
11. Vanselow, B.A., S.Hum, M.A.Hornitzky e.a. *Salmonella Typhimurium persistence in a hunter valley dairy herd*. Australian Veterinary Journal Vol.85 No.11 Nov 2007
12. Veling, J., H. Wilpshaar, K. Frankena, C. Bartels, H.W. Barkema, *Risk factors for clinical Salmonella enterica subsp. Enteric serovar Typhimurium infection on Dutch dairy farms*. Prev. Vet. Med. 54 (2002) 157-168.
13. Veling, J., F.G. van Zijderveld, A.M. van Zijderveld-van Bommel, H.W. Barkema, H. Schukken, *Evaluation of three newly developed Enzyme-Linked Immunosorbent assays and two agglutination tests for detecting Salmonella enterica subsp. Enterica serovar Dublin infections in dairy cattle*. Journal of Clinical Microbiology Dec. 2000, p 4402-4407.
14. Xiao, Y, R.G. Bowers, D.Clancy, N.P. French. *Understanding the dynamics of Salmonella infections in dairy herds: a modeling approach*. Journal of Theoretical Biology 233 (2005) 159-175.
15. GezondheidsDienst<sup>®</sup> Deventer
16. Ontwikkeld door dr. D. Klinkenberg, Faculteit Diergeneeskunde, te Utrecht
17. Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD. Diseases associated with *Salmonella* species. In: Veterinary Medicine. 10<sup>th</sup> Edition. Saunders Company (Elsevier); 2007. pagina 896-920.

# Bijlagen

## Bijlage 1: Enquête veehouders

### Enquête veehouders Salmonella Onderzoek:

Naam: .....

Datum: .....

Bedrijfsadres: Straat + Nr: .....

Postcode: .....

Plaats: .....

Dit is een onderzoek vanuit de Faculteit Diergeneeskunde te Utrecht. Het doel van het onderzoek is om erachter te komen welke zaken ertoe leiden dat een melkveebedrijf langdurig Salmonella positief in de tankmelk blijft. Hiervoor worden bedrijven met een langdurig (>1 jaar) positieve tankmelk vergeleken met bedrijven die negatief zijn op antilichamen in de tankmelk. Met de uitslagen wordt bekeken welke zaken er toe zouden kunnen leiden dat de tankmelk langdurig positief blijft op antilichamen tegen Salmonella. Met de ingevulde gegevens zal discreet omgegaan worden.

Ik zal met u een afspraak maken wanneer ik langs zou kunnen komen om de ingevulde enquête op te halen en een rondje over uw bedrijf te lopen om bepaalde zaken te bekijken, als dat mogelijk is.

Alvast bedankt voor uw medewerking.

Bij \*: doorhalen wat niet van toepassing is.

#### ❖ Algemeen:

##### 1) **Diergezondheid:**

###### A. Status:

- a. BVD: (E) vrij (1) / verdacht (2) / aanwezig (3) / onbekend (4) \*
- b. ParaTBC: (F) vrij (1) / verdacht (2) / aanwezig (3) / onbekend (4) \*
- c. IBR: (G) vrij (1) / verdacht (2) / aanwezig (3) / onbekend (4) \*

###### B. Leverbot:

- a. Wordt er onderzoek gedaan naar leverbot op uw bedrijf? (H) Ja / Nee \*
- b. Ja, Is er leverbot aangetoond op het bedrijf? (I) Ja / Nee \*
- c. Behandelt u tegen leverbot? (J) Ja / Nee \*

- C. Is er Salmonella aangetoond op het bedrijf? (K) Ja / Nee \*
- a. Ja: Wanneer voor het eerst? (M).....
- b. Welke monsters worden genomen bij een verdenking op Salmonella?
- Bloed (N)
  - Mest (O)
  - Qlip<sup>®</sup> tankmelkonderzoek wordt gedaan (standaard) (P)
- c. Welke behandeling wordt ingesteld wanneer een Salmonella positieve koe wordt gevonden? (hokjes aanvinken, indien van toepassing)
- Antibiotica (Q)
  - Ontstekingsremmer (R)
  - Ander medicijn (S), nl .....
  - Isolatie van de koe van andere koeien (T)
  - Koe wordt direct opgeruimd (U)
  - Anders (V), nl .....
- d. Doet u mee met een Salmonella monitorings-/bestrijdingsprogramma? (W)
- Ja / Nee \*
- Ja: namelijk:  Gezondheidsdienst Deventer (X)
- Individueel MPR melkonderzoek (Y)
  - Jongvee check (Z)
- e. Wat doet u zelf om een mogelijke Salmonella besmetting te verminderen / te stoppen? (AB) .....
- .....
- D. Kalveren:
- a. Hoeveel verwerpers had u vanaf november 2008 tot nu? (AC).....
- Als u verwerpers had, is de oorzaak ervan bekend? (AE)Ja / Nee \*
- Ja: namelijk (AG):.....
- b. Hoeveel levende kalveren zijn er vanaf november 2008 tot nu geboren? (AH)
- .....
- c. Hoeveel kalveren zijn er vanaf november 2008 tot nu dood geboren? (AI)
- .....

## 2) Management:

- A. Hoeveel lacterende- + droge koeien heeft u?(AM) <70(1)/70-140(2)/>140(3) \*
- B. Worden er dieren aangekocht/aangevoerd (AN)? Ja / Nee \*
- a. Ja: wat wordt er aangevoerd?  Jongvee (AO)
- Melkkoeien (AP)
- Stieren (AQ)
- b. Ja: komen ze van een vergelijkbaar dierziektestatus bedrijf?(AR)Ja / Nee \*
- ➔ Nee: worden deze dieren in quarantaine gehouden bij aankomst?(AS)
- Ja / Nee \*
- c. Ja: vindt er controle op Salmonella plaats bij aankomst? (AT)Ja / Nee \*
- ➔ Ja: d.m.v. (AU): mestonderzoek / bloedonderzoek \*
- C. Wordt het jongvee extern opgefokt? (AV) Ja / Nee \*
- a. Ja: wordt daar alleen jongvee van u opgefokt? Ja / Nee \*
- ➔ Nee: wat weet u van de dierziekte-status van de andere bedrijven waarvan het jongvee daar loopt?.....
- .....
- D. Grenst uw land aan dat van andere veehouders? (AW) Ja / Nee \*
- a. Ja: Kan uw vee met dat van andere veehouders contact hebben? (AX)
- Ja / Nee \*
- b. Ja: Hoe is de scheiding?  Sloot (AY)
- Draad (AZ)
- Weg (BA)
- Anders (BB), nl .....
- ➔ Breken de koeien er ook wel eens door? (BC) Ja / Nee \*
- c. Nee: wat is de afstand tot de dichtstbijzijnde veehouder?(BE)
- ± 0.1 km(1) / 0.5 km(2) / 1 km(3) / 3 km(4) / 5 km(5) \*
- E. Gebruikt u land van een collega boer om uw vee op te weiden?(BF)Ja / Nee \*
- a. Ja: is dit een:  Veehouder (BG)
- Akkerbouwer (BH)
- ➔ Indien veehouder: weidt uw collega daar ook zijn vee op?(BI)Ja / Nee \*
- ➔ Indien veehouder: wat is de Salmonella status van die collega?
- vrij / verdacht / aanwezig / onbekend \*
- b. Brengt de collega boer ook mest op dit land? (BJ) Ja / Nee \*

- F. Gebruikt een collega boer uw land om zijn vee op te weiden? (BK) Ja / Nee \*
- a. Ja: weidt u uw vee daar ook op? (BL) Ja / Nee \*
- b. Ja: wat is de Salmonella status van die collega?  
vrij / verdacht / aanwezig / onbekend \*
- G. Hoeveel veehouders zijn er bij u in een straal van 1 km?(BN)  
 $\pm$  1 / 5 / 10 / 15 / 20 / Geen \*
- H. Komen landbouwmachines van andere boeren/loonwerker op uw bedrijf?(BO)
- a. Ja: namelijk:(hokjes aanvinken, indien van toepassing) Ja / Nee \*
- Gierinjecteur (BP)
- Wagen voor vaste mest (BQ)
- Voermengwagen (BR)
- Trekker (BS)
- ➔ Worden deze voor en na uitwisseling gereinigd?(BU) Voor / Na / Niet \*
- I. Doet u met uw koeien mee aan keuringen/ shows o.i.d. (BV) Ja / Nee \*
- J. Heeft u een hond en/of kat ?(omcirkelen indien aanwezig) (BW) Ja / Nee \*
- a. Komt uw hond in de stal? (BX) Ja / Nee \*
- b. Komt uw kat in de stal? (BY) Ja / Nee \*
- K. Worden er andere diersoorten op het bedrijf gehouden? (BZ) Ja / Nee \*
- a. Ja: namelijk:  Varkens (CA)
- Pluimvee (CB)
- Paarden (CD)
- Schapen (CE)
- Geiten (CF)
- b. Ja: is bij deze diersoorten ook Salmonella aangetoond?(CG)  
Ja / Nee / Onbekend\*

### 3) Bezoekers contact:

- A. Hoe vaak per maand, gemiddeld, komen de volgende personen op het bedrijf?:
- a. Dierenarts ..... x/maand (CJ), waarvan in de stal: ..... x (CK)
- b. Inseminator ..... x/maand (CL), waarvan in de stal: .....x (CM)
- c. Voervoorlichter..... x/maand (CN), waarvan in de stal: ..... x (CO)
- d. Veehandelaar..... x/maand (CP), waarvan in de stal: ..... x (CQ)
- e. Klauwbekapper..... x/jaar (CR), waarvan in de stal: ..... x (CS)
- f. Bezoekende collega veehouder:  
..... x/maand (CT), waarvan in de stal: ..... x (CU)



- g. Loonwerker..... x/maand (CV), waarvan in de stal: ..... x (CW)  
h. Bedrijfshulp..... x/maand (CX), waarvan in de stal: ..... x (CY)

#### 4) Mest/ boxen:

- A. Wordt er mest aangevoerd naar het bedrijf? (DA) Ja / Nee \*  
a. Ja: wat voor soort:  Varkensmest (DB)  
 Rundermest (DC)  
 Kippen- of eendenmest (DD)
- B. Hoeveel tijd zit er minimaal en maximaal tussen mest uitrijden op een perceel en beweiden van de melkkoeien? Minimaal: ..... wk (DF)
- C. Hoe vaak wordt de stalvloer schoon geveegd? (DJ) ..... / dag  
a. Gebeurt dit met:  (Automatische) handschuif (DK)  
 Mestkettingschuif (DL)  
 Mestrobot (DM)
- D. Hoe vaak worden de boxen schoongemaakt? (DO) ..... / dag
- E. Gebruikt u strooisel in de boxen? (DP) Ja / Nee \*  
a. Ja: welk strooisel gebruikt u?  Zaagsel (DQ)  
 Gehakseld stro (DR)  
 Anders (DS), nl... ..  
b. Ja: hoe vaak wordt er opgestrooid? (DU) ..... / wk

#### 5) Ongedierte:

- A. Doet u aan muizen / ratten bestrijding? (DW) Ja / Nee \*  
→ Ja: namelijk:  Gif (DX)  
 Vallen (DY)  
 Kat (DZ)  
 Professioneel bestrijdingsbedrijf (EA)

❖ Jongvee:

**1) Voer:**

A. Biest:

- a. Waar komt de biest voor het kalf vandaan?(F) Moeder koe (1) / diepvries (2)
- b. Hoeveel liter biest krijgen ze in de eerste 24 uur? (H) ..... L
- c. Wordt de biest gegeven via:  Sonde (I)
  - Fles (J)
  - (Speen)emmer (K)
  - Zelf uit koe drinken (L)

B. Melk:

- a. Krijgen de kalveren koemelk of kunst melk?(N) Koemelk / kunstmelk \*
  - b. Vanaf wanneer?(P) ..... dagen
  - c. Indien koemelk: (R) uit de tank / antibioticum melk \*
- C. Vanaf hoeveel dagen krijgen ze beschikking over hooi/water/krachtvoer? (T)  
..... dgn
- D. Op hoeveel weken worden de kalveren gespeend?(U) ..... wk

**2) Hokken:**

- A. Worden de kalverhokken altijd schoongemaakt na elk kalf? (X) Ja / Nee \*
- a. Ja: hoe worden ze schoongemaakt en waarmee?
    - Uitmesten (Y)
    - Hoge druk spuit (Z)
    - Ontsmetten (AA)
    - Hokje verplaatsen (AB)
  - b. Ja: hoelang staan de kalverhokken leeg? (AD) ..... / dagen
  - c. Nee: na hoeveel kalveren reinigt u de hokken? (AF) ..... kalveren

❖ Melkkoeien:

1) **Afkalven:**

- A. Zijn er twee aparte hokken, 1 voor het afkalven en 1 voor de zieke koeien? (E)  
Ja / Nee \*
- B. Wat doet u met de huisvesting als er twee zieke koeien zijn? (G).....  
.....
- C. Wat doet u met de huisvesting als er twee kalfkoeien zijn? (H) .....  
.....
- D. Hoe vaak worden de hok(ken) schoongemaakt? (J) .....  
.....
- E. Worden de kalveren binnen een uur na de geboorte van de moeder gescheiden?  
(K) Ja / Nee \*
- a. Nee: hoelang laat u het kalf bij de moeder lopen? (M)..... uren
- F. Zijn er vaak groepen koeien die bijna tegelijk moeten kalven of is het  
regelmatig verspreid over het jaar? (O) Gegroepeerd / regelmatig \*

2) **Voer (zomer):**

- A. Krijgt uw vee weidegang? (Q) Ja / Nee \*
- a. Ja: welke dieren?(hokjes aanvinken, indien van toepassing)
- Melkkoeien: van.....(S)t/m ..... (maand)(T) .....uur/dag(Z)
- Droge koeien: van.....(U)t/m ..... (maand)(V).....uur/dag(AA)
- Jongvee: van.....(W)t/m ..... (maand)(X).....uur/dag(AB)
- b. Ja: komt het jongvee op dezelfde percelen te lopen als het melkvee in  
hetzelfde jaar?(AC) Ja / Nee \*
- c. Ja: zijn de percelen waar het jongvee loopt dit jaar bemest:
- d.m.v. gieren (AD) Ja / Nee \*
- d.m.v. beweiding melkvee (AE) Ja / Nee \*
- B. Wordt er ook kuilgras op stal bijgevoerd? (AF) Ja / Nee \*
- C. Welke producten worden aangekocht:  Kuilgras (AG)
- Hooi (AH)
- Stro (AI)
- Anders (AJ), nl.....

D. Welke bijproducten gebruikt u?  Mais (AL)

Pulp (AM)

Soja (AN)

Anders (AO), nl.....

Welke daarvan worden aangekocht? .....

E. Geeft u de koeien een extra mineralen mix? (AP) Ja / Nee \*

a. Ja: namelijk aan:  Jongvee (AQ)

Lacterende koeien (AR)

Droge koeien (AS)

b. Ja: doet u dit naar aanleiding v/e mineralen status onderzoek?(AT) Ja / Nee \*

c. Ja: doet u dit omdat er te weinig mineralen in het voer zitten?(AU) Ja / Nee \*

d. Ja: doet u dit voor de zekerheid?(AV) Ja / Nee \*

F. Water:

a. Hoe is de watervoorziening binnen?  Slootwater (AW)

Leidingwater (AX)

Bronwater (AY)

b. Hoe is de watervoorziening buiten?  Slootwater (AZ)

Leidingwater (BA)

Bronwater (BB)

c. Staan de koeien soms te dringen bij de waterbakken na het melken?(BC)

Ja / Nee \*

d. Hoe vaak worden de drinkbakken schoongemaakt? (BE)

Elke dag / 2x wk / 1x wk / 1x mnd / <1x mnd / indien vies \*

e. Kunnen de koeien de mogelijkheid om uit de sloot te drinken?(BF) Ja / Nee \*

➔ Ja: is de sloot stilstaand of stromend water?  Stilstaand (BG)

Stromend (BH)

➔ Stromend: is dit water in contact met besmette Salmonella bedrijven?

(BJ) Ja / Nee \*

**3) Voer (winter):**

A. Voert u 100% kuilgras in de winter? (BL) Ja / Nee \*

a. Nee: wat is de samenstelling van uw rantsoen?

Kuilgras:.....% (BM)

Maïs:.....% (BN)

Pulp:.....% (BO)

Soja:.....% (BP)

Anders:.....% (BQ)

B. Geeft u de koeien een extra mineralen mix? (BR) Ja / Nee \*

a. Ja: namelijk aan:  Jongvee (BS)

Lacterende koeien (BT)

Droge koeien (BU)

a. Ja: doet u dit naar aanleiding v/e mineralen status onderzoek?(BV) Ja / Nee \*

b. Ja: doet u dit omdat er te weinig mineralen in het voer zitten?(BW) Ja / Nee \*

c. Ja: doet u dit voor de zekerheid?(BX) Ja / Nee \*

C. Water:

a. Waar komt het vandaan:  Slootwater (BY)

Leidingwater (BZ)

Bronwater (CA)

b. Hoe vaak worden de drinkbakken schoongemaakt? (CB)

Elke dag / 2x wk / 1x wk / 1x mnd / <1x mnd / indien vies \*

**BEDANKT VOOR UW MEDEWERKING!**

## **Bijlage 2: Eigen Checklist**

### ❖ Jongvee:

#### 1) **Huisvesting:**

A. Is de huisvesting van het jongvee gescheiden van de melkkoeien?

a. Ja, de huisvesting van het jongvee (<8 mnd) is gescheiden dmv:

Verschillende stal (E)

Muur (F)

Hek (G)

a. Ja, de huisvesting van het jongvee (>8 mnd) is gescheiden dmv:

Verschillende stal (H)

Muur (I)

Hek (J)

→ Hoe vindt de hygiëne tussen het jongvee en de melkkoeien plaats? (L)

.....

b. Nee, is er contact tussen de kalveren en de koeien mogelijk? (M) Ja / Nee

B. Kalveren (<4 wk) zijn gehuisvest:  Iglo met stro (N)

Eenlingbox met stro (O)

Groepshuisvesting met stro (P)

a. Hoe schoon is de huisvesting? (R) *Vies* 1 – 2 – 3 – 4 – 5 *Schoon*

C. Jongvee (>4 wk) zijn gehuisvest:  Potstal (S)

Ligboxenstal (T)

Anders (U), nl.....

a. Hoe schoon is de huisvesting? (W) *Vies* 1 – 2 – 3 – 4 – 5 *Schoon*

#### 2) **Diergezondheid:**

A. Hoesten ze? (Z) Ja / Nee

a. Hoeveel kalveren? (AA) <10% - 20% - 30% - >30%

B. Hebben ze diarree? (AB) Ja / Nee

a. Hoeveel kalveren? (AC) <10% - 20% - 30% - >30%

C. Zijn er kalveren met dikke gewrichten (ontsteking)? (AD) Ja / Nee

a. Hoeveel kalveren hebben dat: (AE) <10% - 20% - 30% - >30%

❖ Melkkoeien:

1) **Huisvesting:**

- A. Hoeveel melkkoeien zijn er op het bedrijf aanwezig? (E).....
- B. Ras koeien:  Zwarte Holstein Frisian (F)
- Rode Holstein Frisian (G)
- Blaarkop (H)
- Jersey (I)
- C. Melkkoeien: (J) potstal / ligboxenstal / grupstal / .....
- D. Diercontact:
- a. Is er contact met de kalveren mogelijk? (K) Ja / Nee
- E. Drinkbakken:
- a. Hoeveel zijn er bij de melkgevende koeien?(M).....
- b. Wat voor type drinkbak is aanwezig?  Sneldrinker (N)
- Betonbak (O)
- Snelafvoer drinkbak (P)
- c. Zijn de drinkbakken schoon?(R) *Vies* 1 – 2 – 3 – 4 – 5 *Schoon*
- d. Staan de koeien te dringen bij de drinkbak? (S) Ja / Nee
- e. Is er voor de koeien de mogelijkheid om uit de sloot te drinken? (T) Ja / Nee
- F. Vloer:
- a. Zijn het:  Roosters (U)
- Dichte vloer (V)
- b. Schoonmaken d.m.v.:  (Automatische) handschuif (W)
- Mestkettingschuif (X)
- Mestrobot (Y)
- c. Hoeveel mest ligt erop de roosters? (AA) *Weinig* 1 – 2 – 3 – 4 – 5 *Veel*
- G. Boxen:
- a. Welk type box is er: (AC)
- ligbox met beton / ligbox met matras / ligbox met rubbermat / potstal
- b. Ligt er strooisel in de boxen? (AD) Ja / Nee
- c. Welk strooisel ligt erin?  Zaagsel (AE)
- Gehakseld stro (AF)
- Anders (AG), nl.....
- d. Hoeveel zaagsel ligt erin de boxen? (AI) *Weinig* 1 – 2 – 3 – 4 – 5 *Veel*

❖ Erf:

1) **Bedrijfshygiëne:**

- A. Is er een hygiëne sluis? (E) Ja / Nee
- a. Waar?: (G) op de voergang / in tanklokaal / sluis / garage of schuur
- b. Ja, hoe schoon is de hygiëne sluis? (I) *Vies* 1 – 2 – 3 – 4 – 5 *Schoon*
- B. Zijn er bedrijfskleding en laarzen? (J) Ja / Nee
- C. Is er een ontsmettingsbak of borstel voor de laarzen (K) Ja / Nee

2) **Ongedierte:**

- A. Vogels (stal):
- a. Welke soorten vogels zitten er in de stal?  Mus (M)
- Spreeuw (N)
- Kraai (O)
- Duif(P)
- b. Is dit voor deze stal: (R) *Weinig* 1 – 2 – 3 – 4 – 5 *Veel*
- c. Is dit aantal vogels vergelijkbaar met normaal (andere boeren)? (S) Ja / Nee
- d. Zitten de vogels vooral op het voer?(T) Ja / Nee
- ➔ Nee, waar wel? (V).....
- e. Ligt er vogelpoep in het voer? (W) Ja / Nee
- B. Vogels (kuil)
- a. Is de mais/gras kuil afgedekt?(X) Ja / Nee
- b. Zitten er vogels op de kuil? (Y) Ja / Nee
- ➔ Zijn het er: (AA) *Weinig* 1 – 2 – 3 – 4 – 5 *Veel*
- c. Ligt er vogelpoep op het voer in de kuil? (AB) Ja / Nee
- C. Ratten/muizen:
- a. Zijn er sporen van ratten en muizen te zien? (AC) Ja / Nee
- ➔ Wat is de mate van overlast / schade? (AE)
- Weinig* 1 – 2 – 3 – 4 – 5 *Veel*
- ➔ Vooral in:  Koeienstal (AF)
- Jongveeststal (AG)
- Voeropslag (AH)
- Voersleufsilo (AI)