

Longworm-Tankmelk ELISA

Validatie voor het aantonen van longworminfecties bij melkvee.



Drs. C.W.H. Dekkers
Studentnr. 3154742
Augustus – november 2010

Begeleiders:
Dr. H.W. Ploeger
Drs. M. Uiterwijk

Departement Infectieziekten en Immunologie
Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Utrecht

Inhoud

| | Blz. |
|---|------|
| 1. Samenvatting | 3 |
| <i>Abstract</i> | 3 |
| <i>Keywords</i> | 3 |
| 2. Inleiding | 4 |
| 3. Materiaal & methoden | 8 |
| 3.1 <i>Opzet</i> | 8 |
| 3.2 <i>Dierenartspraktijken</i> | 8 |
| 3.3 <i>Uitbraak bedrijven</i> | 9 |
| 3.4 <i>Controle bedrijven</i> | 9 |
| 3.5 <i>Baermann</i> | 9 |
| 3.6 <i>ELISA serum</i> | 10 |
| 3.7 <i>ELISA tankmelk</i> | 11 |
| 3.8 <i>Statistische analyses</i> | 12 |
| 4. Resultaten | 13 |
| 4.1 <i>Overzicht bemonsterde bedrijven en individuele dieren</i> | 13 |
| 4.2 <i>Zero-grazing bedrijven</i> | 13 |
| 4.3 <i>Overzicht Baermann en ELISA serum uitslagen</i> | 14 |
| 4.4 <i>Overzicht aantal gevonden larven bij een positieve Baermann</i> | 15 |
| 4.5 <i>Mate van het voorkomen van longworm op bedrijven</i> | 17 |
| 4.6 <i>Overzicht tankmelk ELISA uitslagen op controle en uitbraak bedrijven</i> | 19 |
| 4.7 <i>Aandeel positieve individuen bij positieve tankmelkuitslag</i> | 22 |
| 4.8 <i>Bijdrage van vaarzen en koeien aan een positieve tankmelkuitslag</i> | 25 |
| 5. Discussie | 27 |
| 6. Conclusie | 31 |
| 7. Referenties | 32 |
| Bijlage 1 | 34 |
| Bijlage 2 | 35 |

1. Samenvatting

De laatste jaren worden klinische klachten door infecties met *Dictyocaulus viviparus* regelmatig waargenomen in melkveekoppels. Deze longworminfecties leiden voornamelijk tot respiratoire verschijnselen, productiedaling en conditieverlies. Dit leidt tot hoge kosten op besmette bedrijven. Een goede en praktische diagnostische test om longworminfecties aan te tonen is dan ook gewenst. Een tankmelk ELISA zou hier zeer geschikt voor kunnen zijn.

In dit onderzoek wordt de validatie van de ontwikkelde tankmelk ELISA besproken. Het onderzoek bevat meerdere doelen. Er is onder andere gekeken naar het voorkomen van een positieve tankmelkuitslag op controle en uitbraak bedrijven. Daarnaast is bepaald hoeveel individuele dieren een positieve ELISA moeten hebben voordat de tankmelk ELISA een positieve uitslag geeft. Het derde doel van het onderzoek was bepalen of met name vaarzen of meerdere pariteit koeien zorgen voor een positieve tankmelk ELISA. Om dit te realiseren zijn er op verschillende bedrijven mest- en bloedmonsters bij individuele dieren en tankmelkmonsters genomen. De monsters zijn onderzocht met behulp van de Baermann en een ELISA voor serum en tankmelk.

Aan de hand van de onderzoeksresultaten kan geconcludeerd worden dat de tankmelk ELISA zoals hier gebruikt, goed te gebruiken is om echte uitbraken van longworm aan te tonen, maar niet als prevalentie parameter of om beginnende infecties in een koppel melkvee aan te tonen. Daarnaast is gebleken dat er nog vele onbekenden zijn in de infectiedynamiek van *Dictyocaulus viviparus* bij melkveekoppels.

Abstract

In recent years many farms experience outbreaks due to lungworm infection in dairy cows. Outbreaks are accompanied by respiratory distress, reduced production and loss in body condition as well as some deaths. This can lead to high economic losses. Therefore a good and easy to use diagnostic assay would be most welcome. For this purpose a bulk milk ELISA would be most useful. In the present study 37 farms were visited. Of these were 21 control farms and 16 were farms with a reported lungworm outbreak. On each farm up to 20 first-calving heifers and up to 20 older cows were sampled for faeces and blood. The faeces was used to detect lungworm larvae, while the blood samples were used in an ELISA based on the Ceditest®- Lelystad assay. In addition, on each farm a bulk milk sample was collected, which was also tested in an ELISA using the same antigen as in the Ceditest®- Lelystad assay. Data were used to evaluate the bulk milk ELISA as a diagnostic assay. Results showed that farms with a serious lungworm outbreak had a highly positive bulk milk ELISA. But not all farms with a high positive bulk milk ELISA also had a lungworm outbreak. Furthermore, not all lungworm infections as detected in the individual Baermanns and ELISAs were detected with the bulk milk ELISA. Interestingly, many older cows were found shedding lungworm larvae, which was to some extent unexpected in view of the re-infection syndrome. The latter indicates that there remains unresolved aspects on the infection dynamics of *Dictyocaulus viviparus* in adult cow-herds.

Keywords

Dictyocaulus viviparus, tank milk ELISA, bulk milk, Baermann, Outbreak, Re-infection syndrome, diagnosis, assay validation, adult cows

2. Introductie

Een longworminfectie is een veel voorkomende aandoening bij runderen wereldwijd. Longworminfecties worden veroorzaakt door de parasiet *Dictyocaulus viviparus*. In Noordwest Europa is *Dictyocaulus viviparus* de enige longworm soort en een van de meest pathogene en economisch belangrijke wormsoorten.

Voorheen veroorzaakte deze worm vooral dictyocaulose bij jongvee in het eerste weideseizoen. De laatste jaren zien we ook regelmatig ziekteverschijnselen bij volwassen koeien (Holzhauer et al 2003, Ploeger 2002, van Dijk 2004, Wapenaar et al 2007).

Cyclus

Dictyocaulus viviparus heeft een directe levenscyclus. Een infectie met *Dictyocaulus viviparus* start met de opname van infectieuze L3 larven samen met het gras uit de weide. De larven komen in de maag-darmtractus terecht. Eenmaal aangekomen in de dunne darm penetreren de larven de wand van de dunne darm en migreren via het lymfestelsel en de circulatie naar de longen. Deze trektocht duurt gemiddeld zeven tot negen dagen. In de longen trekken de larven door het longweefsel richting de kleine en grotere bronchiën. Ten tijde van deze trektocht door het longweefsel kunnen er al verschijnselen optreden bij het dier. In de grotere bronchiën zullen de larven uitgroeien tot volwassen wormen. De volwassen wormen produceren geembryoneerde eieren. Uit deze eieren komen eerst stadium larven (L1). Het uitkomen van de eieren kan al in de longen gebeuren of in de maag-darmtractus. De eieren of L1 larven in de longen worden opgehoest en doorgeslikt en komen op deze wijze in de maag-darmtractus terecht. Uiteindelijk worden de L1 larven met de feces uitgescheiden en komen op het weiland terecht. De ontwikkeling van L1 larven tot infectieuze L3 larven duurt ongeveer een week. De larven migreren passief vanuit de feces naar het gras door middel van de schimmel *Pilobolus* spp. De infectieuze L3 larven kunnen dan met het gras worden opgenomen.

De prepatente periode is 24-25 dagen. De patente periode bevat meer variatie maar duurt gemiddeld één tot anderhalve maand.

Runderen ontwikkelen immuniteit tegen longworm. Deze immuniteit ontwikkeld op twee niveaus. Als eerst wordt er afweer op darmniveau ontwikkeld tegen de larvale stadia. Deze afweer is gebaseerd op glycoproteïnen en zal jaarlijks opnieuw getriggerd moeten worden. Daarnaast wordt er op longniveau ook afweer opgebouwd. Deze afweer is gebaseerd op eiwitten en blijft dan ook vele jaren op niveau (Eysker 1994).

Epidemiologie

Uitbraken van longworminfecties worden vaak in de tweede helft van het weideseizoen, augustus en later gezien, maar kunnen soms ook al eerder voorkomen. Dit is afhankelijk van de opbouw van een weide-infectie. Longwormlarven overleven slecht op het weiland gedurende de zomer, minder dan zes weken (Eysker 1994).

Overwintering van L3's op het weiland is wel mogelijk, maar komt in Nederland weinig voor. Door management maatregelen en het Nederlandse klimaat wordt er pas later in het voorjaar beweïd, waardoor de overwinterde larven op de weide afsterven (Eysker 1994). Nieuwe infecties tijdens een weideseizoen hebben hun bron dan ook doorgaans in 'carriers', dit zijn oudere dragerdieren (Eysker et al 1994, Holzhauer et al 2003, Oakley 1982). Op de meeste veehouderijen waar koeien weidegang hebben,

komen enige dragerkoeien voor. Deze koeien zorgen voor een jaarlijkse herinfectie, die van belang is voor het onderhouden van de immuniteit tegen longworm in de koppel koeien. Als drager koeien worden geweid op percelen waar gevoelige dieren lopen, kan een eerste infectie bij die gevoelige dieren ontstaan. Deze gevoelige dieren zorgen voor de opbouw van generaties larven op het weiland.

Ook de schimmel *Pilobolus* spp. kan zorgen voor besmetting van de weide met larven afkomstig van een naburig perceel, doordat sporendosjes met meeliftende larven zorgen voor verspreiding van de larven en vele meters kunnen overbruggen (Wapenaar et al 2007).

Uitbraken

Uitbraken zoals die de laatste jaren steeds meer gezien worden bij koeien die vaak al eerdere longworminfecties hebben doorgemaakt, zijn vooral als volgt te verklaren. Door een gebrek aan infectie tijdens de opfok kunnen een aantal infectiegevoelige vaarzen in de koppel komen. Daar doen ze alsnog infectie op, omdat er 'carriers' zijn. Deze infectiegevoelige vaarzen zorgen vervolgens voor een opbouw van de weidebesmetting, waarna na één, twee of drie generaties er een massale weidebesmetting ontstaat (van Dijk 2004). Bij de vaarzen ontstaan dan klinische problemen met patente infecties (dus met L1-uitscheiding in de mest), terwijl bij veel koeien de massale binnenkomst van larven kan leiden tot respiratoire verschijnselen met voornamelijk hoestproblemen, maar die niet tot een patente infectie lijken te leiden. Hierbij moet bedacht worden dat de meeste koeien een redelijke tot goede immuniteit bezitten, waardoor de larven in de longen afsterven. Deze problemen bij de koeien wordt wel het 'larvale herinfectiesyndroom' genoemd (Wapenaar et al 2007). Hierbij spelen ook overgevoeligheidsreacties op larvale invasie een rol. De aanwezigheid van larven die tot in de longen zijn gekomen geeft een irritatie van de luchtwegen.

De uitbraken bij melkvee hangen dus sterk samen met de mate van wormbestrijding tijdens de opfokperiode. Als er geen gevoelige vaarzen in de koppel aanwezig zijn kunnen er ook geen grote aantallen infectieuze larven op het weiland voorkomen. Andere mogelijkheden waardoor een uitbraak van longworm in een melkveekoppel kan ontstaan is door overbrengen van larven op het weiland vanaf naburige percelen via de schimmel *Pilobolus* spp., introductie van aangekochte dieren in een koppel die vrij is van longworm (Holzhauer et al 2003), of door het verplaatsen van een koppel naar een ander gebied waar longworm in grotere mate voorkomt.

Klinische verschijnselen

Dictyocaulus viviparus is dus een belangrijke en veel voorkomende parasiet. Klinische verschijnselen van een longworminfectie uiteten zich vooral in respiratoire verschijnselen zoals hoesten eventueel met gestrekte hals, tachypneu en dyspneu, daarnaast treedt ook conditieverlies en een daling van de melkproductie op. Longworminfecties zorgen elk jaar opnieuw voor ernstige uitbraken op tientallen melkveebedrijven in ons land. Na persoonlijke communicatie met M. Holzhauer en H.W. Ploeger blijkt dat kosten van longworminfecties kunnen oplopen tot €200,- per koe per uitbraak. Daarnaast komen nog de gezondheids- en welzijnsproblemen voor de dieren zelf. Het zou dan ook een goede ontwikkeling zijn als er een diagnostische test zou bestaan om deze infectie snel en gemakkelijk te diagnosticeren.

Diagnostiek

Tot op heden zijn er verschillende gangbare diagnostische methoden die gebruikt worden om longworminfecties aan te tonen. Er wordt gebruik gemaakt van de klinische symptomen die een dier laat zien, de Baermann om mestmonsters te onderzoeken op de aanwezigheid van longwormlarven en van een ELISA om serum van individuele dieren te onderzoeken op antilichamen tegen longworm. Het klinische beeld van een rund met een longworminfectie is vrij uitgesproken, maar aan de hand hiervan kan niet met zekerheid de diagnose gesteld worden. Een infectie met longworm kan wel zeer waarschijnlijk zijn, zeker als er respiratoire klachten zijn in combinatie met het seizoen en toepassing van weidegang. Met de Baermann methode wordt een mestmonster onderzocht op aanwezigheid van longwormlarven. Een onderdeel waar rekening mee gehouden dient te worden is de prepatente periode van longworm. Deze is vrij lang, namelijk 24-25 dagen. Binnen deze periode zal een mestmonster altijd negatief zijn. Daarnaast beweert men dat de Baermann een lage sensitiviteit en reproduceerbaarheid heeft bij mestonderzoek van volwassen runderen, dit zou met name komen door de verdunning van het aantal larven in de grote hoeveelheid mest die geproduceerd wordt door volwassen dieren (Fiedor et al 2009, Rode et al 1989). Eysker beweert in tegenstelling tot het voorgaande dat de sensitiviteit van de Baermann wel hoog is (Eysker 1997). Vooral bij kalveren is deze methode erg gevoelig, maar gezien het aantal eieren wat door een volwassen vrouwelijke longworm wordt geproduceerd zal de sensitiviteit van de Baermann bij volwassen runderen ook redelijk zijn. Van de ELISA op serum is wel bekend dat deze een hoge sensitiviteit en specificiteit heeft. De precieze waarden hiervan verschillen in de literatuur, maar liggen allen in de buurt van respectievelijk 93-100% en 99,2- >99% (Cedi diagnostics B.V., Cornelissen et al 1997, Fiedor et al 2009, von Holtum 2008). Een nadeel van de ELISA is dat deze ook pas positief wordt bij een patente infectie. Dit komt doordat de ELISA is gebaseerd op het major sperm protein (MPS) van de volwassen mannelijke longworm. Met beide testen zoals hiervoor genoemd worden individuele dieren bemonsterd. Om een goed beeld van de infectie in een koppel te krijgen zullen er meerdere monsters genomen moeten worden. Naarmate een melkveekoppel groter is zullen er ook meer dieren bemonsterd moeten worden. Een test op basis van tankmelkonderzoek zou hiervoor een praktische, kostenbesparende en simpele uitkomst zijn. Daarnaast is monitoring van de infectiestatus van de koppel met betrekking tot longworm ook gemakkelijk mogelijk.

Achtergrond

Recent is er in Hannover te Duitsland een tankmelk ELISA ontwikkeld voor het aantonen van een longworminfectie bij melkvee (Fiedor et al. 2009). Deze ELISA is, net als de hierboven beschreven ELISA voor individueel bloedonderzoek, gebaseerd op het major sperm protein (MPS) van de volwassen mannelijke longworm. Het is dan ook interessant de uitslagen van tankmelkmonsters te vergelijken met de uitslagen van het bloedonderzoek op bemonsterde bedrijven. Van deze tankmelk ELISA is aangetoond dat deze erg specifiek is en positieve uitslagen geeft bij patente infecties. Het is niet bekend bij welk aantal positieve dieren, varzen en of meerdere pariteit dieren, de tankmelk positief wordt. Wel mag verwacht worden dat dit het resultaat is van een redelijk aantal dieren met echte patente infecties. Er wordt aangenomen dat carriers aangetoond kunnen worden met deze test. Het is de vraag of dit een reële aanname is. Waarschijnlijk hebben carriers een licht positieve of negatieve ELISA uitslag van het serum, aangezien deze dieren kleine aantallen larven uitscheiden en

relatief weinig volwassen longwormen in de longen aanwezig zullen zijn (Eysker et al 1994). De kans is groot dat een tankmelk ELISA hierbij negatief is doordat men te maken heeft met enkele mogelijk licht positieve carriers en een behoorlijke verdunning van de antilichamen in de melk door de andere dieren in de koppel. Deze test is echter niet gevalideerd bij koeien met een herinfectiesyndroom. Omdat de test alleen positief wordt bij patente infecties is het dus de vraag in hoeverre de test te gebruiken is in de praktijk op bedrijven waar de meeste dieren het herinfectiesyndroom zullen tonen. Er zijn dus nog een aantal punten uit te zoeken. Vandaar dit onderzoek ter nadere validatie van de praktische toepasbaarheid van deze tankmelk ELISA.

Doel

Met dit onderzoek is getracht meerdere doelen te bereiken.

1. Bepalen of een positieve tankmelk ELISA alleen voorkomt als er ook een longworm uitbraak is, of dat ook subklinische infecties kunnen leiden tot een positieve tankmelkuitslag.
2. Bepalen hoeveel individuele dieren positief moeten zijn om een positieve tankmelkuitslag te verkrijgen. Hierbij het vaststellen van een ODR cut-off waarde.
3. Bepalen in hoeverre het eerste pariteit vaarzen of juist oudere meerdere pariteit koeien zijn die de tankmelk positief maken.

Hypothese

Er werd verwacht dat vooral bedrijven met een klinische uitbraak tankmelk positief zouden zijn en dat op tankmelk positieve bedrijven vooral de vaarzen, dieren met een primaire infectie, positief zijn met uitzondering van een enkele positieve koe. Dit omdat verwacht werd dat vaarzen de grootste kans hebben nog niet eerder met longworm in contact te zijn geweest en daardoor nog gevoelig zijn voor een infectie met longworm. Koeien zouden naar verwachting met name last hebben van het herinfectiesyndroom. Een enkele positieve koe zou hierbij verklaard kunnen worden met het feit dat er carriers voor kunnen komen binnen koppels rundvee of dat een dier mogelijk nog niet eerder met longworm in aanraking is gekomen.

Op bedrijven met een negatief tankmelk monster zouden naar verwachting bijna uitsluitend vaarzen positief scoren, als hier toch positieve individuele scores van serum of mestmonsters gevonden worden, om dezelfde reden als hierboven genoemd. Als wordt aangenomen dat longworm op de meeste bedrijven voorkomt, zou je mogen verwachten dat op vrijwel elk bedrijf tenminste één dier, waarschijnlijk een vaars, positief wordt bevonden met de individuele ELISA op serum. De individuele ELISA is namelijk zeer gevoelig, zodra er een aantal volwassen reproducerende wormen aanwezig zijn of zijn geweest.

3. Materiaal & Methoden

3.1 Opzet

De opzet van het onderzoek is als volgt:

1. Het verzamelen van de volgende monsters op bedrijven met een longworm uitbraak, dat wil zeggen, klinische problemen op het bedrijf:
 - Een tankmelkmonster (2 tankmelkbuisen van 10 ml.)
 - Een fecesmonster van 20 vaarzen die tenminste 1 maand meegeweid zijn met de koppel melkvee
 - Een fecesmonster van 20 koeien, tweede pariteit of ouder
 - Een bloedmonster van dezelfde 20 koeien en 20 vaarzen

De bemonsterde runderen werden ad random uit de groep gekozen. Op de feces- en bloedmonsters van ieder individueel dier werd het diernummer aangegeven en met een plus of min de eventuele klachten van het dier met betrekking tot longworm geconstateerd door de veehouder. Het streven was om minimaal 20 en maximaal 30 bedrijven te monstereen, dit in verband met het realiseren van een voldoende grootte van het onderzoek en het beperkt houden van de kosten. De monsters zijn verzameld in de periode augustus tot en met oktober van het jaar 2010 op verschillende bedrijven in een ruime cirkel in het midden van het land (zie bijlage 1).

2. Dezelfde soorten en aantallen monsters verzamelen als bij punt 1 genoemd, van bedrijven zonder uitbraak en zonder (preventieve) behandeling binnen minimaal tien weken voor monsternamen. Tien weken vanwege het residueel effect van moxidectine (zes weken) plus de prepatentperiode (vier weken). Het streven was om dit op minstens evenveel bedrijven uit te voeren als bij punt 1 genoemd. De monsters zijn ook genomen in een ruime cirkel in het midden van het land (zie bijlage 1).
3. Van elk bemonsterd bedrijf zijn een aantal gegevens verzameld zoals: aantal aanwezige vaarzen en oudere kalfs koeien, productieniveau, beweidingstrategie, ontwormbeleid enz. Voor de gehele vragenlijst zie bijlage 2. Deze gegevens kunnen de analyse verduidelijken en zijn vooral van belang met betrekking tot het aantal koeien en vaarzen die aanwezig zijn op het bedrijf. Daarnaast geven de gegevens een indicatie dat het gaat om bedrijven representatief voor de Nederlandse rundveehouderij. Op ieder bedrijf is een inventarisatie gemaakt van de eventuele aanwezige waargenomen klinische klachten met betrekking tot longworm. Dit werd op de vragenlijst genoteerd. Een gedeelte van de vragenlijst is gebruikt bij de analyses in dit onderzoek. De overige informatie zal bij een vervolg onderzoek gebruikt worden.

3.2 Dierenartspraktijken

Al ruim voor de start van de onderzoeksperiode was begonnen met het aanschrijven van verschillende dierenartspraktijken in een ruime cirkel rond het midden van het land. De praktijken die mee wilden werken aan het onderzoek werden gevraagd hoeveel uitbraken van longworm zij verwachten bij melkveebedrijven uit hun praktijkgebied op basis van ervaringen uit voorgaande jaren. Op basis van deze verwachting werd bepaald of de streefwaarden van het aantal te bemonstereen bedrijven ruim gehaald zou kunnen worden, of dat er nog meer praktijk aangeschreven moesten worden. De praktijken die meewerkten aan het onderzoek is

ook gevraagd of zij melkveebedrijven binnen hun praktijk hadden die mee zouden willen werken aan dit onderzoek als controle bedrijf.

3.3 Uitbraak bedrijven

Voor het verzamelen van de monsters is een tweedeling gemaakt in de bedrijven op basis van uitbraak en controle bedrijf. De status uitbraak bedrijf werd toegekend aan een bedrijf indien er klachten van hoesten, benauwdheid en/ of productiedaling zijn waargenomen bij de koppel melkvee en in zodanige mate dat deze door de veehouder en/of dierenarts als een probleem werden gezien. Deze klachten werden door de veehouder aangegeven en met tussenkomst van de eigen dierenarts bevestigd. Wij ontvingen hierna een bericht van de dierenarts. Een andere mogelijkheid waardoor een bedrijf als uitbraakbedrijf werd weergegeven is nadat wij de gegevens van de betreffende veehouder via de GD hadden gekregen, telefonisch contact met de veehouder opnamen en deze kon bevestigen dat er klachten met betrekking tot longworm aanwezig waren bij de koppel melkvee. Via Veekijker van de GD wordt er informatie verzameld van problemen en ziektes die voorkomen op bedrijven, hier kunnen veehouders onder andere kenbaar maken of zij problemen hebben met betrekking tot longworm.

Uiteindelijk zijn er in totaal 16 uitbraak bedrijven bemonsterd. In het begin van de onderzoeksperiode bleef het erg rustig met aanmeldingen van uitbraakbedrijven. Vanaf half september kwamen er meer aanmeldingen van uitbraakbedrijven.

3.4 Controle bedrijven

De status controle bedrijf wordt op de volgende manier toegekend. De dierenartsenpraktijken die meewerkten aan het onderzoek is gevraagd of zij ons konden helpen aan een aantal willekeurig gekozen bedrijven uit hun praktijkgebied die mee wilden werken aan het onderzoek. Dit betrof bedrijven met weidegang en zonder specifieke klachten met betrekking tot longworm in de koppel melkvee. Ook mocht er op deze bedrijven niet ontwornd zijn in de periode van tien weken voor monsternamen. Verder zijn er geen overige eisen gesteld aan deze bedrijven. In totaal zijn er 21 controle bedrijven bemonsterd.

Drie bedrijven van deze 21 bedrijven zijn bedrijven die geen weidegang van de koppel melkvee toepasten. Deze zijn bemonsterd ter controle en als mogelijke nulmeting voor de tankmelk ELISA, omdat je op dit soort bedrijven geen longwormbesmetting verwacht.

Eén van deze drie bedrijven paste zomerstalvoeding toe. Dit houdt in dat op dit bedrijf het vers gemaaid gras direct van het land aan de koeien werd gevoerd. Hierbij bestaat de mogelijkheid dat er toch een longworminfectie aanwezig is in de koppel, vanwege de opname van longwormlarven met het verse gras.

3.5 Baermann

De fecesmonsters zijn gebruikt voor een Baermann om longwormlarven te detecteren, ofwel patente infecties te vinden. Van deze test is aangetoond dat deze zeer sensitief is bij geïnfecteerde jonge dieren na 3,5 tot 4 weken. Bij oudere dieren is de sensitiviteit wat lager vanwege de verdunning van de larven door de grotere hoeveelheid mest (Eysker 1994). Hoeveel lager de sensitiviteit werkelijk is, is niet bekend. De prepatente periode van *Dictyocaulus viviparus* is 24-25 dagen. Vandaar het criterium bij de monsternamen dat de dieren minimaal één maand mee geweid moeten zijn. In een periode korter dan één maand is de kans klein dat een dier L1 larven met

de mest zal uitscheiden en deze met de Baermann aangetoond zullen worden. Er wordt van ieder fecesmonster 30 gram gebruikt voor de Baermann. Er is gekozen voor 30 gram mest, omdat grotere hoeveelheden mest praktisch niet te verwerken zijn en er in deze periode van het jaar de meeste actieve infecties gevonden worden met daarbij in verhouding grote hoeveelheden longwormlarven. De ingezette fecesmonsters worden minimaal 18 uur later afgelezen. Hierdoor krijgen de larven ruim de tijd om door de mest en het zeefje te migreren (Rode et al 1989). Tijdens de incubatieperiode staan de monsters in een ruimte bij kamertemperatuur (15-20°C). Na de incubatietijd wordt er met een pipet 1 ml opgezogen uit de punt van het Baermannglas. Hier bevinden zich de larven. Onder een microscoop wordt het verkregen monster uit het Baermannglas bekeken om de aanwezige longwormlarven te detecteren. De larven kunnen met het blote oog niet waargenomen worden.

3.6 ELISA serum

De bloed en melkmonsters werden onderzocht met een ELISA die antilichamen tegen longworm detecteert zoals gebruikt in de onderzoeken van de Leeuw en Cornelissen (1991, 1993), Cornelissen et al (1997), von Holtum et al (2008), Fiedor et al (2009) en Bennema et al (2009). De bloedmonsters werden na overnachting in de koelkast bij 4°C minimaal één uur in een stoof bij 37°C geplaatst en daarna afgedraaid door middel van 10 minuten centrifugeren bij 1000 RCF (3000 rpm). Van ieder monster werd het serum in duplo ingezet. Het serum is ingevroren en bewaard bij een temperatuur van -20°C tot een groter aantal monsters verkregen is. De serummonsters zijn onderzocht bij de Gezondheidsdienst voor Dieren (GD) in Deventer met een ELISA ontwikkeld voor individuele dieren, genaamd Ceditest® (Cedi Diagnostics B.V., Cornelissen et al 1997, de Leeuw et al 1991, de Leeuw et al 1993, von Holtum et al 2008). De ELISA toont antilichamen tegen longworm aan. Deze ELISA is gebaseerd op een kleine moleculaire antigeen fractie geïsoleerd uit somatisch antigeen van de volwassen longworm en bevat het 17-kDa proteïne (Cedi Diagnostics B.V., Cornelissen et al 1997, de Leeuw et al 1991, de Leeuw et al 1993). Uit het onderzoek van von Holtum et al (2008) kan geconcludeerd worden dat de Ceditest® en een nieuwere ELISA gebaseerd op het recombinant major sperm proteïne (MSP) van de volwassen mannelijke longworm vergelijkbare uitslagen geven. De ELISA gebaseerd op het MSP kan in de toekomst in Nederland een goed alternatief zijn als de Ceditest® niet meer te verkrijgen is (von Holtum et al 2008). Een positieve uitslag van de ELISA duidt op een infectie van longworm met volwassen (mannelijke) longwormen en dus een patente infectie, of op een patente infectie in de afgelopen 24 weken (Cornelissen et al 1997). De ELISA heeft zowel een hoge sensitiviteit en specificiteit als positieve en negatieve voorspellende waarde (Cedi Diagnostics B.V., Cornelissen et al 1997, von Holtum et al 2008). Deze ELISA blijkt zeer bruikbaar te zijn als diagnostische methode bij dictyocaulose bij individuele dieren (Cornelissen et al 1997, Tender et al 1993, von Holtum et al 2008).

De ELISA gebaseerd op het 17-kDa proteïne is gebruikt zoals beschreven in het artikel van Cornelissen et al (1997) en de folder van Cedi Diagnostics B.V.. Op iedere plaat worden een aantal positieve en negatieve controle monsters meegenomen om de test tot test variatie te checken (Cedi Diagnostics B.V.). De test uitslagen worden uitgedrukt in een optische dichtheid. Het percentage kleur ten opzichte van de positieve controle sera geeft de ODR waarde van het geteste monster. Van sera met een ODR waarde groter dan een vooraf bepaalde cut-off waarde wordt aangenomen dat zij specifieke antilichamen voor *Dictyocaulus viviparus* bevatten. Van sera met

een ODR waarde kleiner dan een vooraf bepaalde cut-off waarde wordt aangenomen dat zij geen specifieke antilichamen voor *Dictyocaulus viviparus* bevatten. Afhankelijk van de test kan deze cut-off waarde wat variëren. De test zoals momenteel gebruikt bij de GD gaat uit van een cut-off waarde van 30% (Cedi Diagnostics B.V., Cornelissen et al 1997).

Van de laatste vier bemonsterde bedrijven waren ten tijde van het schrijven van deze scriptie de kwantitatieve uitslagen van de individuele ODR waarden van het serum nog niet ontvangen, de kwalitatieve uitslagen (wel of geen antilichamen aangetoond) waren wel bekend. Deze vier bedrijven waren alle uitbraak bedrijven. In alle analyses is wat betreft het percentage positieve ELISA's gebruik gemaakt van 37 bedrijven en wat betreft de ODR waarden van serummonsters van 33 bedrijven.

3.7 ELISA tankmelk

De melkmonsters werden verzameld in afzonderlijke melkbuizen met Na-Azide (conserveermiddel). Per bedrijf werden twee melkmonsters genomen. Deze monsters werden ingevroren en bewaard bij een temperatuur van -20°C tot een groter aantal monsters verkregen is. Alle melkmonsters zijn onderzocht met een tankmelk-ELISA bij de GD in Deventer op basis van de ELISA zoals ontwikkeld in Hannover. Het belangrijkste verschil is dat het gebruikte antigeen bij de GD hetzelfde is als gebruikt in de hiervoor beschreven Ceditest® en in Hannover de ELISA is gebaseerd op het recombinant MSP eiwit (Fiedor et al 2009). Vanwege de onverwacht benodigde tijd bij de GD om de melkmonsters te onderzoeken en de periode van dit onderzoek is ervoor gekozen om alle tweede melkmonsters van ieder bedrijf naar Hannover te verzenden om hier de tankmelk ELISA van Hannover op uit te voeren. Dit om ervan verzekerd te zijn voor het eind van de onderzoeksperiode een uitslag van de tankmelkmonsters in handen te hebben. Van één uitbraak bedrijf was geen tweede tankmelkmonster genomen. In totaal zijn er dus 21 tankmelkuitslagen van controle bedrijven en 15 van uitbraak bedrijven. Voor een exacte beschrijving van de uitvoering van de tankmelk ELISA wordt verwezen naar het artikel van Fiedor et al (2009). Er wordt gebruik gemaakt van een cut-off waarde van 0.493 deze is bepaald met behulp van de gemiddelde ODR waarde van de negatieve melkmonsters plus drie maal de bijbehorende standaard deviatie.

In eerste instantie waren de uitslagen van de tankmelkmonsters nog niet bekend. Om toch enige uitspraak te kunnen doen over de bruikbaarheid van de tankmelk ELISA is er een fictieve tankmelkuitslag voor ieder bedrijf berekend. Deze uitslag wordt de bedrijfswaarde genoemd en is berekend op de volgende manier:

Bedrijfswaarde = ((Gemiddelde ODR waarde van vaarzen x aantal vaarzen in de koppel x 0,75) + (Gemiddelde ODR waarde van koeien x aantal koeien in de koppel x 1)) / Totaal aantal aanwezige dieren in de koppel.

Omdat vaarzen minder liters melk produceren in vergelijking met oudere pariteit koeien werden de vaarzen gecorrigeerd met een waarde van 0,75. Er is gekozen voor een correctie van 0,75 omdat vanuit ervaring uit de praktijk blijkt dat vaarzen een kwart minder melk produceren in vergelijking met oudere pariteit koeien.

Uiteindelijk is de tankmelkuitslag wel gekomen en konden de werkelijke waarden vergeleken worden met de bedrijfswaarde. Van de tankmelk ELISA kan de sensitiviteit en specificiteit berekend worden. De berekeningen hiervoor zijn als volgt:

Algemene berekening:

Sensitiviteit = $\text{Aantal ware positieven} / (\text{Aantal ware positieven} + \text{Aantal vals negatieven}) \times 100$

Specificiteit = $\text{Aantal ware negatieven} / (\text{Aantal ware negatieven} + \text{Aantal vals positieven}) \times 100$

Berekening met aanduiding zoals in dit onderzoek is toegepast:

Sensitiviteit = $\text{Aantal uitbraak bedrijven met positieve tankmelkuitslag} / \text{Totaal aantal uitbraak bedrijven} \times 100$

Specificiteit = $\text{Aantal controle bedrijven met negatieve tankmelkuitslag} / \text{Totaal aantal controle bedrijven} \times 100$

3.8 Statistische analyses

De meeste data resulteren in een vergelijking van positieve of negatieve uitslagen met twee technieken, dit zijn de Baermann en de ELISA. De ELISA is daarnaast nog onder te verdelen in een ELISA op serum en op tankmelk. Ook zijn er vergelijkingen gemaakt tussen twee groepen dieren, vaars en koe. Er zijn daarnaast vergelijkingen gemaakt binnen en tussen uitbraak en controle bedrijven. Ook is er gekeken naar het gegeven wel of geen klachten bij het individuele dier. Combinaties van de genoemde vergelijkingen zijn ook uitgevoerd. De hierbij gebruikte toets is de Chi-kwadraat toets.

De kwantitatieve uitslagen zoals: ODR waarden en de percentages positieve Baermannen en ELISA's in verschillende groepen zijn geanalyseerd met behulp van van correlatie en regressie.

Daarnaast is er gebruik gemaakt van *t*-toetsen, met name de two-sample *t*-test om gemiddelden met elkaar te vergelijken. Er zijn gemiddelden berekend van ODR waarden bij controle en uitbraak bedrijven en vaarzen en koeien.

4. Resultaten

4.1 Overzicht bemonsterde bedrijven en individuele dieren

In Tabel 4.1. is een overzicht te zien van de bemonsterde bedrijven tijdens de onderzoeksperiode. In totaal zijn er 37 bedrijven bemonsterd. In de tabel is de gemiddelde bedrijfsgrootte aangegeven met erachter tussen haakjes de range van het minimum en maximum aantal dieren op de bemonsterde bedrijven. Bij het gemiddeld aantal vaarzen en koeien op het bedrijf is tussen haakjes de range van het minimum en maximum aantal vaarzen en koeien aangegeven aanwezig op de bemonsterde bedrijven.

Tabel 4.1. Overzicht van het aantal en indicatie van de aanwezige dieren met tussen haakjes de range van min. - max. aanwezige dieren en het productieniveau op bemonsterde bedrijven.

| | |
|--|-------------|
| Aantal controle bedrijven | 21 |
| Aantal uitbraak bedrijven | 16 |
| Gemiddelde bedrijfsgrootte (stuks melkvee) | 74 (22-145) |
| Gemiddeld aantal vaarzen op bedrijf | 19 (6-33) |
| Gemiddeld aantal koeien op bedrijf | 55 (16-120) |
| Gemiddeld productieniveau (liters/ dier/ jaar) | 8615 |

In Tabel 4.2. is het aantal individueel bemonsterde dieren weergegeven. Er is een uitsplitsing weergegeven van het aantal vaarzen en koeien en het aantal vaarzen en koeien op controle en uitbraak bedrijven.

Tabel 4.2. Overzicht aantal bemonsterde individuele dieren.

| | |
|---|------|
| Totaal aantal dieren bemonsterd | 1289 |
| Totaal aantal vaarzen bemonsterd | 560 |
| Totaal aantal koeien bemonsterd | 729 |
| Aantal vaarzen bemonsterd op controle bedrijven | 330 |
| Aantal koeien bemonsterd op controle bedrijven | 419 |
| Aantal vaarzen bemonsterd op uitbraak bedrijven | 230 |
| Aantal koeien bemonsterd op uitbraak bedrijven | 310 |

4.2 Zero-grazing bedrijven

Er zijn drie controlebedrijven bemonsterd die geen weidegang toepasten. Voor de uitslagen van de monsters genomen op deze bedrijven wordt verwezen naar Tabel 4.3. Op bedrijf 1 wordt zomerstalvoeding toegepast. Het verse gras wat gevoerd werd was afkomstig van percelen waar jongvee op gelopen had. Dit seizoen was er ook een longwormuitbraak bij het jongvee waargenomen. Op dit bedrijf werden geen dieren positief getest in de Baermann. In de uitslag van de ELISA van het serum van de individuele dieren bleek 1 vaars positief te zijn met een ODR van 87,5. Op bedrijven 2 en 3 wordt geen vers gras gevoerd, hier krijgen de dieren een winterrantsoen bestaande uit een mengsel van kuilgras, mais en eventueel andere bijproducten. Op bedrijf 2 werden ook geen positieve Baermannen aangetoond. Wel zijn er enkele positieve bloedmonsters aangetoond (2 vaarzen en 1 koe). Op bedrijf 3 zijn wel positieve Baermannen waargenomen, alhoewel de uitslag waarschijnlijk vals positief is doordat er zeer waarschijnlijk contaminatie is opgetreden bij het inzetten van de monsters. Er waren zeefjes gebruikt die nog niet opgedroogd waren van de

voorgaande test. Dit voorgaande bedrijf was sterk positief, met grote aantallen larven in de monsters. Hierdoor achten wij de kans groot dat er nog enkele larven zijn achtergebleven aan de zeefjes en terecht zijn gekomen in de monsters van bedrijf 3. Het was opvallend dat op bedrijf 3 een behoorlijk aantal dieren, 11 van de 14 vaarzen, positief uit de ELISA van het bloed kwamen, bij de koeien op dit bedrijf kwamen geen positieve ELISA's voor. De ODR waarden varieerden van ruim tot zeer ruim boven de cut-off waarde. Deze dieren, allen vaarzen kwamen niet overeen met de dieren die positief uit de Baermann kwamen, want dat waren allen koeien.

De berekende bedrijfswaarde uitslag van deze bedrijven en de werkelijke tankmelkuitslag zijn ook in Tabel 4.3. te zien. Bedrijf 3 komt zelfs boven de gemiddelde bedrijfswaarde van alle controle bedrijven uit (15,0057). Alle drie de bedrijven zijn negatief wat betreft de tankmelk ELISA.

Bij de bemonsterde bedrijven is geen navraag gedaan naar de geschiedenis van positief bevonden dieren.

Bij alle drie de bedrijven wordt het jongvee op het bedrijf zelf opgefokt en wordt het jongvee beweid vanaf respectievelijk 12, 6 en 12 maanden leeftijd. Ook wordt op alle drie de bedrijven ontwormd bij opstallen. Van bedrijf 1 is niet bekend of de droge koeien beweid worden. Op bedrijven 2 en 3 komen de droge koeien tijdens het weideseizoen wel buiten.

Gezien de uitslagen komt op alle drie de bedrijven longworm voor. Ook wordt op deze bedrijven het jongvee en/of de droge koeien beweid. Daarom is ervoor gekozen om deze bedrijven mee te nemen in de verdere analyses als controle bedrijven.

Tabel 4.3. Overzicht mest-, bloed-, bedrijfswaarde en tankmelkuitslagen van bemonsterde zero-grazing bedrijven. Voor berekening bedrijfswaarde zie materiaal en methode.

| Bedrijf | % positieve Baermann | % positieve ELISA serum | Bedrijfswaarde (ODR) | ODR tankmelk Hannover |
|---------|----------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------|
| 1. | 0,00% | 2,56% (1 dier) | 8,27 | 0,214 (Negatief) |
| 2. | 0,00% | 9,68% (3 dieren) | 13,88 | 0,223 (Negatief) |
| 3. | 18,00% (6 dieren) | 32,35% (11 dieren) | 16,45 | 0.206 (Negatief) |

4.3 Overzicht Baermann en ELISA serum uitslagen

In Tabel 4.4. zijn de Baermann en ELISA uitslagen te zien van alle individuele dieren die bemonsterd zijn. Er was een significant verband tussen de uitslag van de Baermann en de ELISA serum ($\chi^2 = 174,9$; $P < 0,001$). De meeste dieren met een negatieve Baermann hebben ook een negatieve ELISA. Ook de meeste dieren met een positieve Baermann hebben een positieve ELISA, alhoewel dit veel minder dieren zijn.

Tabel 4.4. Overzicht Baermann en ELISA serum uitslagen (positief versus negatief) van alle individuen. De percentages tussen haakjes zijn de rijpercentages.

| | ELISA - | ELISA + | Totaal |
|------------|-------------|-------------|-------------|
| Baermann - | 913 (85,2%) | 159 (14,8%) | 1072 (100%) |
| Baermann + | 67 (40,4%) | 99 (59,6%) | 166 (100%) |
| Totaal | 980 | 258 | 1238 |

Longworm-Tankmelk ELISA
Validatie voor het aantonen van longworminfecties bij melkvee

In Tabel 4.5. zijn de Baermann en ELISA uitslagen te zien van alleen de bemonsterde vaarzen. Er was een significant verband tussen de uitslag van de Baermann en de ELISA serum bij vaarzen ($\chi^2 = 27,33$; $P < 0,001$). In Tabel 4.5. is te zien dat dit verband vooral veroorzaakt werd door het hoge percentage dieren met een negatieve Baermann en daarbij ook een negatieve ELISA. Van de bemonsterde vaarzen bleken evenveel vaarzen met een positieve Baermann, een positieve dan wel negatieve ELISA te hebben.

Tabel 4.5. Overzicht Baermann en ELISA serum uitslagen (positief versus negatief) van vaarzen. De percentages tussen haakjes zijn de rijpercentages.

| | ELISA - | ELISA + | Totaal |
|------------|-------------|-------------|------------|
| Baermann - | 345 (77,4%) | 101 (22,6%) | 446 (100%) |
| Baermann + | 43 (50,0%) | 43 (50,0%) | 86 (100%) |
| Totaal | 388 | 144 | 532 |

In Tabel 4.6. zijn de Baermann en ELISA uitslagen te zien van alleen de bemonsterde koeien. Ook hier was een significant verband tussen de uitslag van de Baermann en de ELISA serum bij koeien ($\chi^2 = 193,2$; $P < 0,001$). In Tabel 4.6. is te zien dat de meeste dieren met een negatieve Baermann een negatieve ELISA hadden en dieren met een positieve Baermann ook vaker een positieve ELISA.

Tabel 4.6. Overzicht Baermann en ELISA serum uitslagen (positief versus negatief) van koeien. De percentages tussen haakjes zijn de rijpercentages.

| | ELISA - | ELISA + | Totaal |
|------------|-------------|------------|------------|
| Baermann - | 568 (90,7%) | 58 (9,3%) | 626 (100%) |
| Baermann + | 24 (30,0%) | 56 (70,0%) | 80 (100%) |
| Totaal | 592 | 114 | 706 |

4.4 Overzicht aantal gevonden larven bij een positieve Baermann

In Fig. 4.1. is een weergave te zien van het aantal larven gevonden in 30 gram mest met de Baermann-methode. De aantallen larven werden vergeleken met de uitslag van de ELISA bij deze individuele dieren. Uit Fig. 4.1. bleek dat dieren met een positieve ELISA ook vaker grotere aantallen larven uitscheiden, op een aantal dieren met een negatieve ELISA uitgezonderd. Toch komt bij de meeste dieren, maar liefst 80,6 procent van alle dieren met een positieve Baermann, een larve uitscheiding van minder dan 50 larven per 30 gram mest voor.

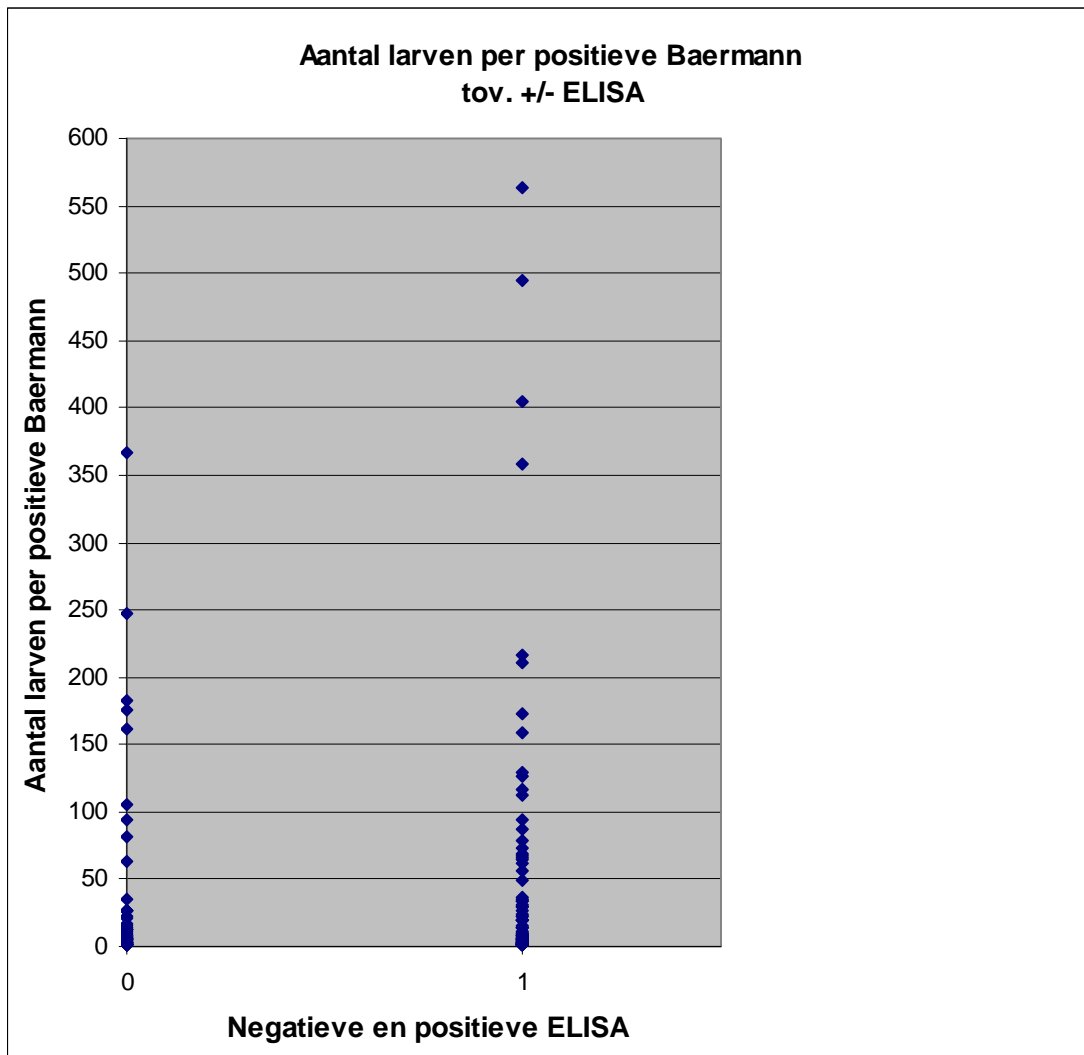


Fig 4.1. Overzicht aantal larven per positieve Baermann uit 30 gram mest weergegeven ten opzichte van een positieve of negatieve ELISA. Drie individuele uitslagen zijn niet weergegeven vanwege de schaalverdeling in de figuur. De hierbij behorende gevonden aantallen larven in de Baermann uit 30 gram mest zijn als volgt: 940, 3000 en 5000 larven. Deze drie dieren hadden ook ieder een positieve ELISA.

Fig. 4.2. is ook een weergave van het aantal larven gevonden in 30 gram mest met de Baermann-methode, alleen is er nu een indeling in categorieën gemaakt. In de groepen één tot tien larven was het verschil tussen dieren met positieve en negatieve uitslag van de ELISA niet zo groot. Het verschil tussen dieren met meer dan tien larven per 30 gram mest en de uitslag van de ELISA was veel groter. De meeste dieren in de categorie meer dan tien larven hadden hierbij een positieve ELISA. Er was ook te zien dat de meeste dieren zich bevonden in de categorie één tot tien larven met een positieve ELISA.

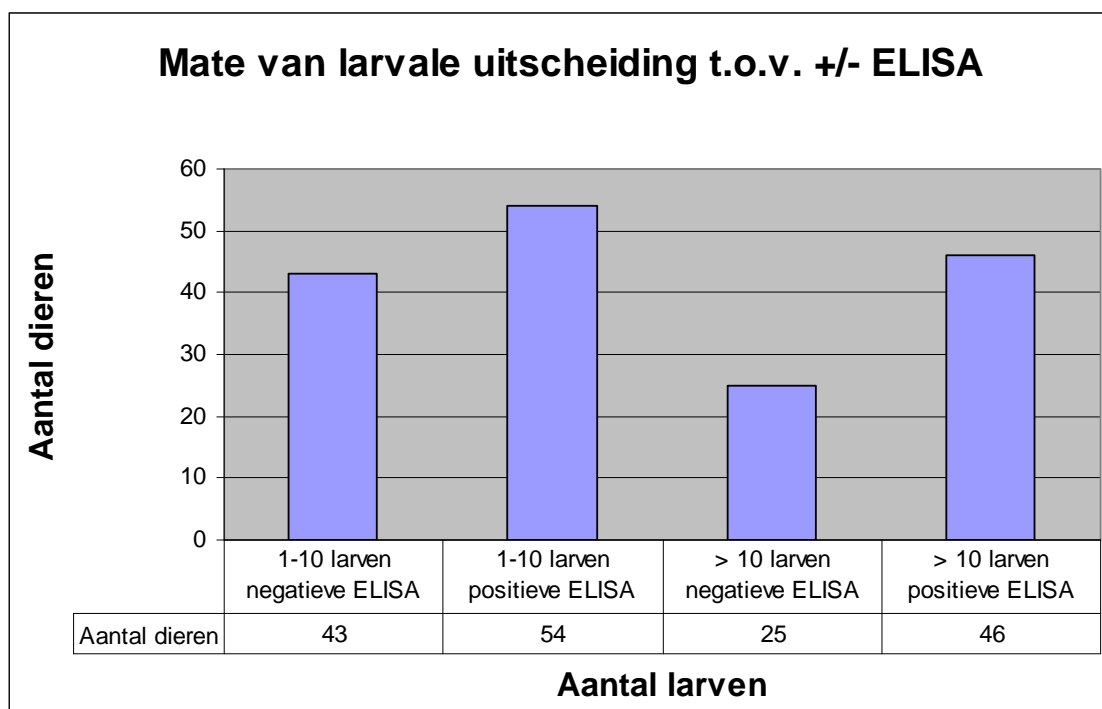


Fig 4.2. Overzicht van de mate van larvale uitscheiding ingedeeld in twee categorieën vergeleken met een positieve of negatieve ELISA.

4.5 Mate van voorkomen van longworm op bedrijven

Tabel 4.7. en 4.8. geven een overzicht van het percentage positieve individuele ELISA's en Baermannen op controle en uitbraak bedrijven weer. Uit de eerste kolom, waarin de percentages positieve ELISA's van alle individuen zijn weergegeven, is af te lezen dat op de meeste bedrijven minimaal één dier met een positieve ELISA voorkwam, maar dat op zes van de bemonsterde bedrijven geen dieren met een positieve ELISA voorkwamen.

In de tweede en derde kolom is een overzicht van de percentages positieve individuele ELISA's van respectievelijk varzen en koeien op controle en uitbraak bedrijven weergegeven. Uit deze kolommen blijkt dat het percentage positieve ELISA's bij varzen over het algemeen hoger lag in vergelijking met het percentage positieve ELISA's bij koeien. Ook is te zien dat het aantal bedrijven zonder positieve ELISA's bij koeien groter was dan bij varzen. Toch geeft de tabel ook weer dat op veel bedrijven ook veel koeien positief zijn bevonden in de ELISA op serum.

In de vierde kolom zijn de percentage positieve Baermannen van alle individuen weergegeven en in de vijfde en zesde kolom de percentages positieve Baermannen bij respectievelijk varzen en koeien. Er zijn 16 bedrijven waar geen dieren met een positieve Baermannen voorkwamen. Onder aan iedere kolom is cursief het gemiddeld percentage positieve ELISA's of Baermannen van de bijbehorende kolom weergegeven.

Longworm-Tankmelk ELISA
Validatie voor het aantonen van longworminfecties bij melkvee

Tabel 4.7. Overzicht percentage positieve ELISA's van alle individuen, vaarzen en koeien en percentage positieve Baermannen van alle individuen, vaarzen en koeien op bemonsterde controle bedrijven. Dit zijn percentages van het totaal aantal bemonsterde dieren, vaarzen of koeien. Er is geen omrekening naar de aanwezige dieren in de koppel gemaakt. In de tabel zijn de uitslagen van zero-grazing bedrijven met een sterretje aangegeven. Onder aan iedere kolom is cursief het gemiddeld percentage positieve ELISA's of Baermannen weergegeven.

| % pos. ELISA's van alle individuen | % pos. ELISA's van vaarzen | % pos. ELISA's van koeien | % pos. Baermannen van alle individuen | % pos. Baermannen van vaarzen | % pos. Baermannen van koeien |
|------------------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,12 | 0,25 | 0,00 |
| 0,03 * | 0,06 * | 0,00 * | 0,00 * | 0,00 * | 0,00 * |
| 0,03 | 0,06 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 0,03 | 0,08 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 0,03 | 0,11 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 0,05 | 0,10 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 0,09 | 0,00 | 0,15 | 0,03 | 0,00 | 0,05 |
| 0,10 | 0,15 | 0,05 | 0,08 | 0,15 | 0,00 |
| 0,10 * | 0,18 * | 0,05 * | 0,00 * | 0,00 * | 0,00 * |
| 0,11 | 0,12 | 0,10 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 0,11 | 0,17 | 0,05 | 0,10 | 0,21 | 0,00 |
| 0,13 | 0,27 | 0,00 | 0,13 | 0,27 | 0,00 |
| 0,15 | 0,36 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 0,17 | 0,40 | 0,05 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 0,30 | 0,35 | 0,25 | 0,55 | 0,75 | 0,35 |
| 0,32 * | 0,79 * | 0,00 * | 0,18 * | 0,00 * | 0,30 * |
| 0,41 | 0,67 | 0,30 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 0,52 | 0,62 | 0,45 | 0,49 | 0,46 | 0,50 |
| <i>0,13</i> | <i>0,21</i> | <i>0,07</i> | <i>0,08</i> | <i>0,10</i> | <i>0,06</i> |

Longworm-Tankmelk ELISA
Validatie voor het aantonen van longworminfecties bij melkvee

Tabel 4.7. Overzicht percentage positieve ELISA's van alle individuen, vaarzen en koeien en percentage positieve Baermannen van alle individuen, vaarzen en koeien op bemonsterde uitbraak bedrijven. Dit zijn percentages van het totaal aantal bemonsterde dieren, vaarzen of koeien. Er is geen omrekening naar de aanwezige dieren in de koppel gemaakt. In de tabel is onder aan iedere kolom cursief het gemiddeld percentage positieve ELISA's of Baermannen weergegeven.

| % pos. ELISA's van alle individuen | % pos. ELISA's van vaarzen | % pos. ELISA's van koeien | % pos. Baermannen van alle individuen | % pos. Baermannen van vaarzen | % pos. Baermannen van koeien |
|------------------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,19 | 0,35 | 0,00 |
| 0,03 | 0,06 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 0,04 | 0,00 | 0,05 | 0,07 | 0,33 | 0,00 |
| 0,15 | 0,15 | 0,15 | 0,03 | 0,00 | 0,05 |
| 0,20 | 0,25 | 0,15 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 0,20 | 0,38 | 0,00 | 0,04 | 0,08 | 0,00 |
| 0,24 | 0,67 | 0,07 | 0,10 | 0,00 | 0,13 |
| 0,31 | 0,50 | 0,15 | 0,17 | 0,38 | 0,00 |
| 0,32 | 0,10 | 0,43 | 0,29 | 0,40 | 0,24 |
| 0,33 | 0,39 | 0,27 | 0,25 | 0,28 | 0,23 |
| 0,49 | 0,74 | 0,20 | 0,14 | 0,27 | 0,00 |
| 0,50 | 0,63 | 0,40 | 0,50 | 0,63 | 0,40 |
| 0,64 | 0,88 | 0,55 | 0,39 | 0,38 | 0,40 |
| 0,87 | 1,00 | 0,80 | 0,68 | 0,55 | 0,75 |
| 0,93 | 0,75 | 1,00 | 0,62 | 0,75 | 0,57 |
| 0,33 | 0,41 | 0,26 | 0,22 | 0,28 | 0,17 |

4.6 Overzicht tankmelk ELISA uitslagen op controle en uitbraak bedrijven

Om te weten wanneer een tankmelkuitslag positief genoemd mag worden is een cut-off waarde nodig. Tabel 4.9. laat de gemiddelde bedrijfswaarden van controle en uitbraak bedrijven zien met de bijbehorende standaard deviaties. De bedrijfswaarde is een afspiegeling van de gemiddelde ODR waarde per bedrijf gecorrigeerd voor het aantal vaarzen en koeien in de koppel en de verschillen in melkproductie bij vaarzen en koeien zoals eerder beschreven in materiaal en methoden. Met de two-sample *t*-test werd berekend dat er een significant verschil bestaat tussen de gemiddelde bedrijfswaarde van controle en uitbraak bedrijven ($t = 2,250$; $P = 0,032$).

Tabel 4.9. Overzicht aantal bemonsterde controle en uitbraak bedrijven en gemiddelde bedrijfswaarde en standaard deviatie van controle en uitbraak bedrijven.

| | Aantal bedrijven | Gemiddelde bedrijfswaarde (ODR) | Standaard deviatie |
|--------------------|------------------|---------------------------------|--------------------|
| Controle bedrijven | 21 | 15,01 | 7,05 |
| Uitbraak bedrijven | 12 | 22,49 | 12,17 |

De cut-off waarden werden op de volgende manier berekend:

Cut-off waarde = Gemiddelde bedrijfswaarde van controle bedrijven + 1, 2 of 3 x standaard deviatie

De cut-off waarde zijn dan respectievelijk 22,06, 29,11 en 36,16. Een cut-off waarde berekend met een hoger aantal maal de standaard deviatie geeft een groter betrouwbaarheidsinterval.

Fig. 4.3. geeft een overzicht van alle bedrijfswaarden van alle bemonsterde bedrijven. In de grafiek zijn de uitbraak en controle bedrijven naast elkaar weergegeven met verschillende kleuren. Ook is in de grafiek met een horizontale stippellijn de cut-off waarde weergegeven, berekend met twee maal de standaard deviatie. Hierbij hoort een betrouwbaarheidsinterval van 95 procent. Er is gekozen voor een cut-off waarde berekend met twee maal de standaard deviatie, omdat $P < 0,05$ en dit zorgt voor een voldoende betrouwbaarheid, de mate van fouten die hierbij voorkomen worden algemeen geaccepteerd. Een betrouwbaarheidsinterval van 99 procent behorende bij een cut-off waarde berekend met drie maal de standaard deviatie zou niet nodig zijn gezien de aannames in de berekening van de bedrijfswaarde. Een andere reden was dat de gemiddelde bedrijfswaarde van uitbraakbedrijven zelfs onder de cut-off waarde berekend met twee maal de standaard deviatie ligt. Als er een cut-off waarde berekend met drie maal de standaard deviatie gebruikt zou worden, zou de specificiteit wel omhoog gaan, maar de sensitiviteit juist omlaag, waardoor minder bedrijven als positief aangetoond zouden worden.

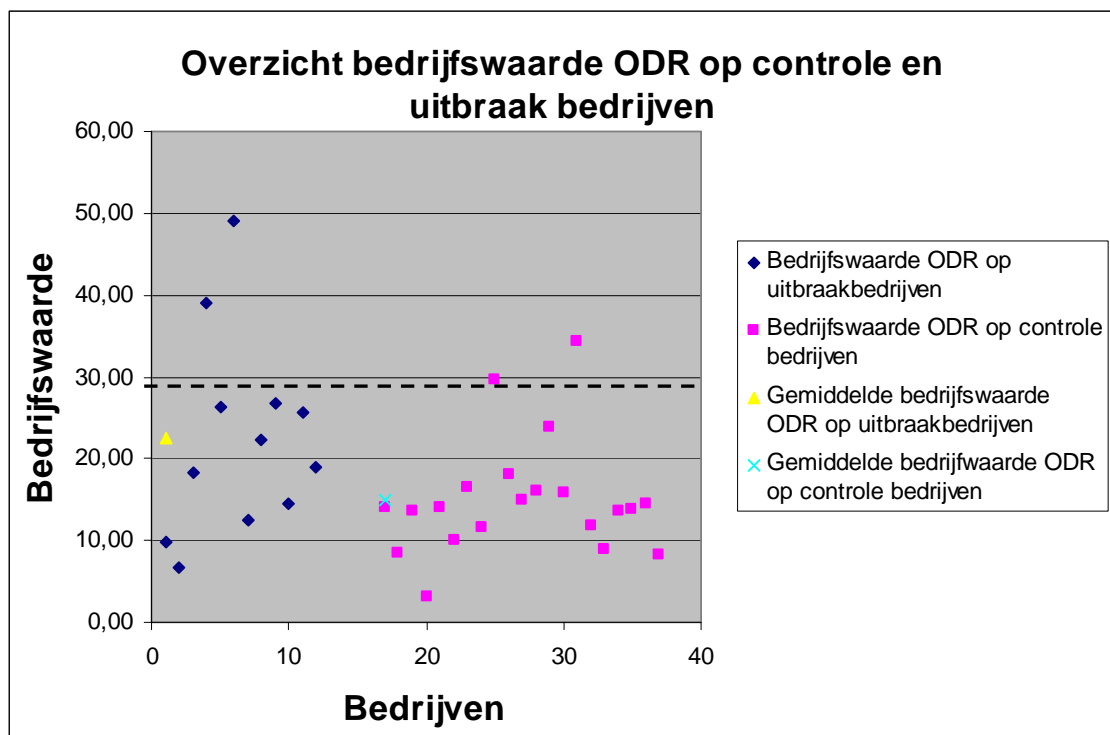


Fig 4.3. Bedrijfswaarden van uitbraak en controle bedrijven. Horizontale stippellijn geeft de cut-off waarde weer. Cut-off waarde bepaald met behulp van de gemiddelde bedrijfswaarde ODR plus twee maal de standaard deviatie.

Om te bekijken of een bedrijfswaarde boven de cut-off waarde significant vaker voorkomt op controle of uitbraak bedrijven zijn de aantallen in Tabel 4.10. gezet en werd hier een Chi-kwadraat test op uitgevoerd ($\chi^2 = 0,539$; $P = 0.25$). Hieruit bleek dat er geen significant verband is tussen de bedrijfswaarde bij een controle en uitbraak bedrijven.

Tabel 4.10. Overzicht negatieve en positieve bedrijfswaarde bij controle en uitbraak bedrijven. De percentages tussen haakjes zijn de rijpercentages.

| | Controle bedrijven | Uitbraak bedrijven | Totaal |
|------------------|--------------------|--------------------|-----------|
| Bedrijfswaarde - | 19 (65,5%) | 10 (34,5%) | 29 (100%) |
| Bedrijfswaarde + | 2 (50%) | 2 (50%) | 4 (100%) |
| Totaal | 21 | 12 | 33 |

Fig. 4.4. geeft een vergelijkbare weergave als in fig. 4.3. alleen dan voor de werkelijke ODR waarde van de tankmelkuitslag uit Hannover. De cut-off waarde van 0,493 die in deze grafiek is weergegeven met een horizontale stippellijn, is de cut-off waarde zoals die in Hannover wordt gebruikt. In vergelijking met Fig. 4.3. zijn er nu meer uitbraak bedrijven met een positieve tankmelkuitslag.

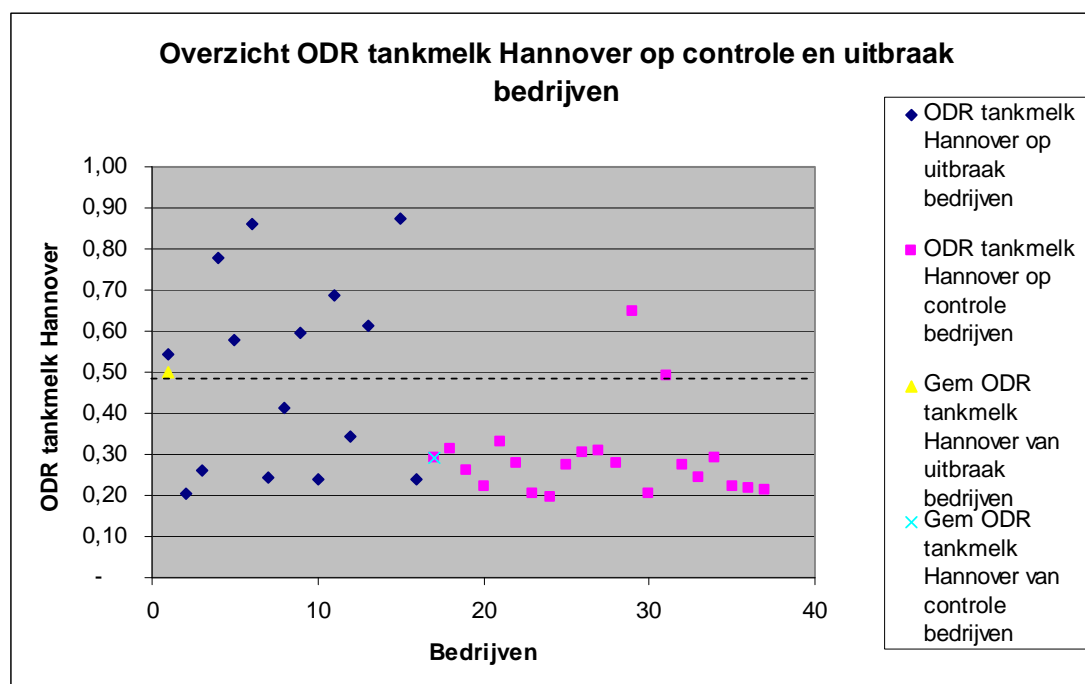


Fig. 4.4. ODR waarden van tankmelkuitslag uit Hannover op controle en uitbraak bedrijven. Horizontale stippellijn geeft de cut-off waarde van 0,493 weer.

Er is een analyse gemaakt om te bekijken of een positieve tankmelkuitslag significant vaker voorkomt bij controle of uitbraak bedrijven. Tabel 4.11. werd hierbij gebruikt. Er was een significant verband tussen de uitslag van de tankmelk en controle en uitbraak bedrijven ($\chi^2 = 57,04$; $P < 0,001$). Een negatieve tankmelkuitslag kwam vaker voor bij controle bedrijven en een positieve tankmelkuitslag vaker bij uitbraak bedrijven.

Longworm-Tankmelk ELISA
Validatie voor het aantonen van longworminfecties bij melkvee

Tabel 4.11. Overzicht negatieve en positieve tankmelkuitslag bij controle en uitbraak bedrijven. De percentages tussen haakjes zijn de rijpercentages.

| | Controle bedrijven | Uitbraak bedrijven | Totaal |
|------------|--------------------|--------------------|-----------|
| Tankmelk - | 19 (73,1%) | 7 (26,9%) | 26 (100%) |
| Tankmelk + | 2 (20,0%) | 8 (80,0%) | 10 (100%) |
| Totaal | 21 | 15 | 36 |

Met behulp van Tabel 4.11. kon de sensitiviteit en specificiteit van de tankmelk ELISA berekend worden zoals aangegeven in materiaal en methoden. De uitkomsten zijn als volgt:

$$\text{Sensitiviteit} = 8 / 15 \times 100 = 53,3\%$$

$$\text{Specificiteit} = 19 / 21 \times 100 = 90,5\%$$

4.7 Aandeel positieve individuen bij positieve tankmelkuitslag

In Fig. 4.5. is het percentage positieve individuele ELISA's in een koppel weergegeven tegenover de berekende bedrijfswaarde voor ieder bemonsterd bedrijf. Het gecorrigeerd percentage positieve ELISA's zoals weergegeven in de grafiek is als volgt berekend:

Gecorrigeerd % + ELISA's = ((% + ELISA's van vaarzen x aantal vaarzen in de koppel) + (% + ELISA's van koeien x aantal koeien in de koppel)) / Totaal aantal dieren in de koppel.

Door een cut-off waarde van twee maal de standaard deviatie te nemen met het bijbehorend betrouwbaarheidsinterval van 95 procent kan uit de grafiek van Fig. 4.5. afgelezen worden dat hierbij een percentage positieve ELISA's hoort van 40 procent. Dit wil zeggen dat 40 procent van de koppel een positieve ELISA moet hebben voordat de bedrijfswaarde boven de cut-off waarde komt en positief bevonden kan worden. Aangenomen dat de bedrijfswaarde een goede afspiegeling weergeeft van de tankmelkuitslag, kon gesteld worden dat 40 procent van de koppel een positieve ELISA moet hebben voordat de tankmelk een positieve uitslag zou geven. In Fig. 4.5. zijn verschillende cut-off waarden weergegeven met een verticale stippellijn.

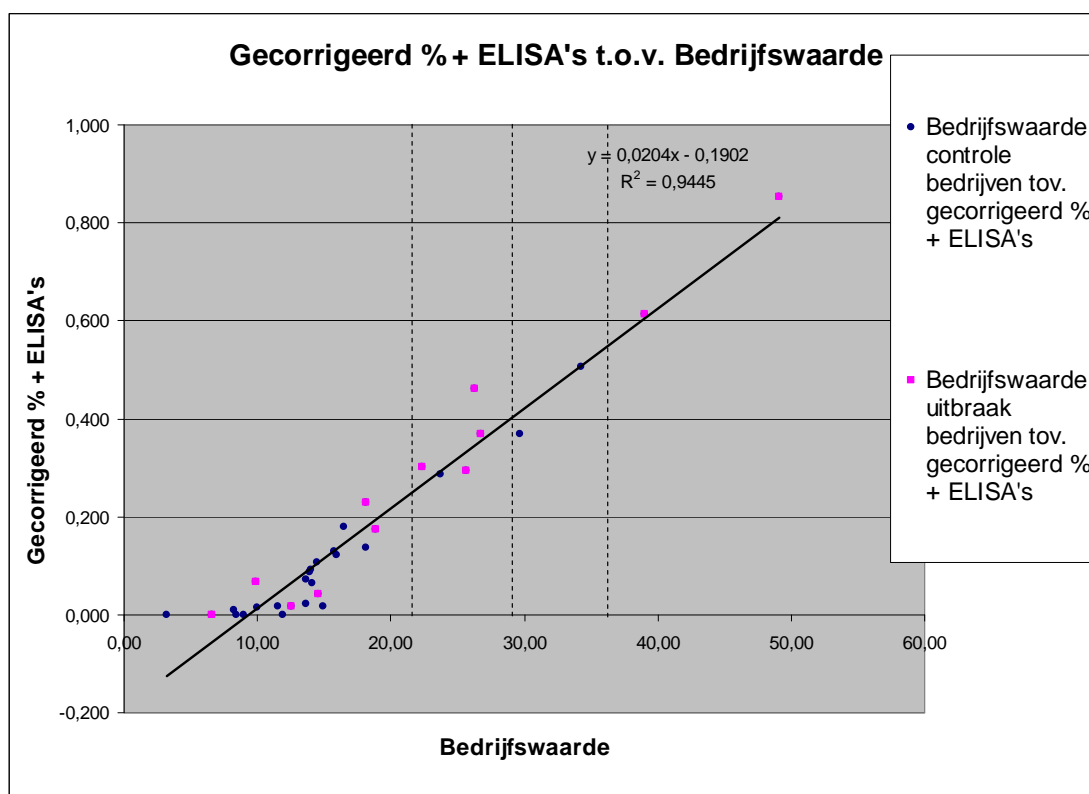


Fig 4.5. Weergave van het percentage positieve ELISA's in een koppel ten opzichte van de bedrijfswaarde, met verschillende cut-off waarden aangegeven met verticale stippellijnen in de grafiek. Zie tekst voor berekening van het aantal positieve dieren (y-as) en de cut-off waarden.

Fig. 4.6. en 4.7. gaan over de werkelijke tankmelkuitslag. In figuur 4.6. is de overeenkomst tussen de bedrijfswaarde en de werkelijke tankmelkuitslag uit Hannover weergegeven. Er bleek een vrij hoge correlatie te zijn ($r^2 = 0,636$; $r = 0,798$). Figuur 4.7. is een vergelijkbare weergave als figuur 4.5.. In figuur 4.7. is het percentage positieve ELISA's in een koppel weergegeven met het gecorrigeerd percentage positieve ELISA's, dit is uitgezet tegen de ODR waarde van de tankmelkuitslag uit Hannover. Ook is de cut-off waarde van 0,493, die behoort bij de tankmelk ELISA uit Hannover weergegeven in de grafiek. Uit figuur 4.7. is af te lezen dat gemiddeld 31 procent van de koppel een positieve ELISA moet hebben voordat de tankmelkuitslag positief zal zijn.

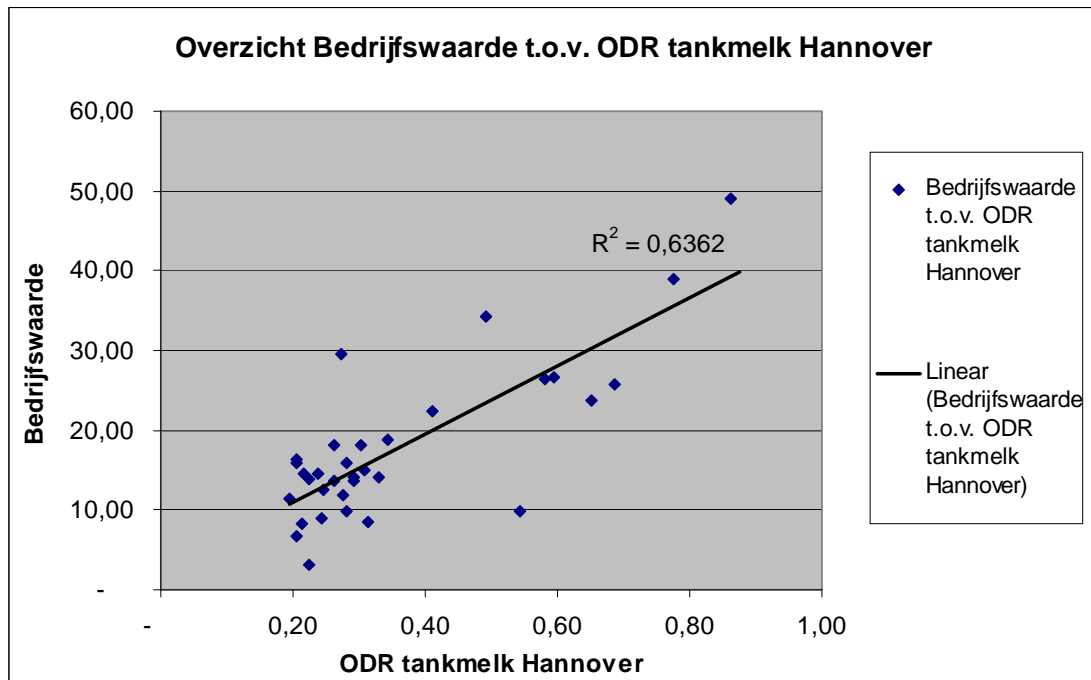


Fig 4.6. Overzicht Bedrijfswaarde ten opzichte van de ODR waarde van de tankmelkuitslag van Hannover.

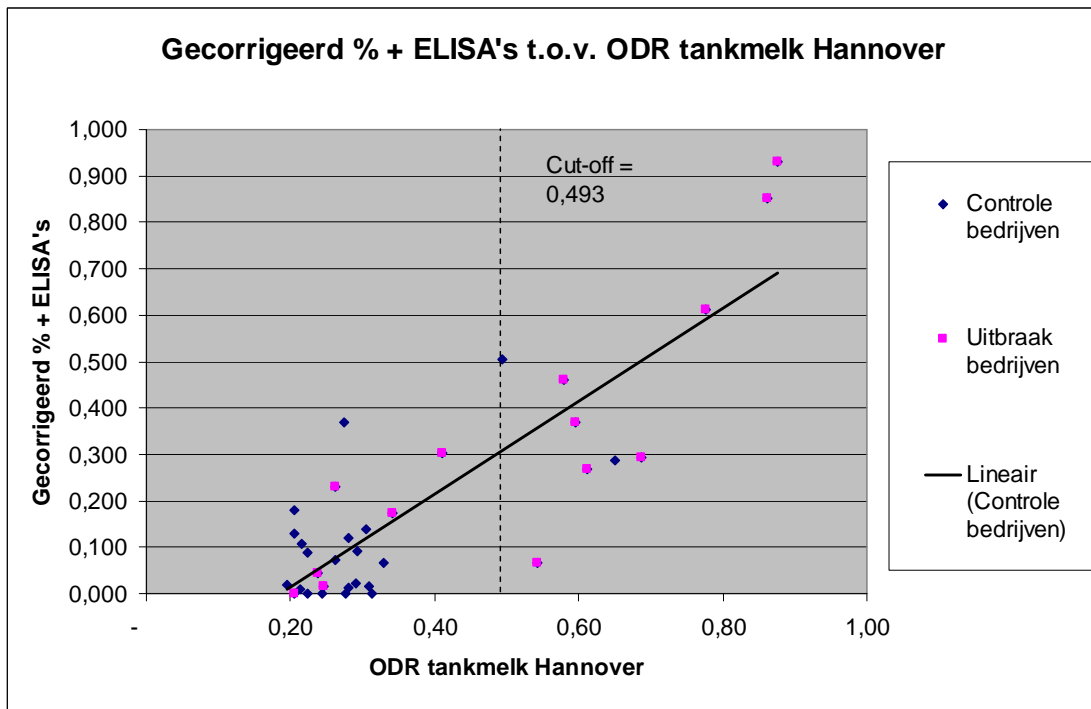


Fig. 4.7. Weergave van het percentage positieve ELISA's in een koppel ten opzichte van de ODR waarde van de tankmelkuitslag uit Hannover, met hierbij de cut-off waarde aangegeven met een verticale stippellijn in de grafiek.

4.8 Bijdrage van vaarzen en koeien aan een positieve tankmelkuitslag

Voor de beantwoording van de vraag of vaarzen of juist oudere koeien zorgen voor een positieve tankmelkuitslag is gekeken naar de gemiddelde ODR waarden van individuele vaarzen en koeien met een negatieve en positieve ELISA van serum. Omdat verwacht werd dat met name dieren met een individuele positieve ELISA bijdragen aan een positieve tankmelkuitslag is hier de indeling in de figuren op gebaseerd. In Fig. 4.8. is de gemiddelde ODR waarde van vaarzen met een negatieve ELISA vergeleken met de gemiddelde ODR van koeien met een negatieve ELISA. Met de two-sample *t*-test bleek hier geen significant verschil tussen te bestaan ($t = 1,385$; $P = 0,166$). Ook is in deze figuur te zien dat de gemiddelde ODR waarde van vaarzen met een positieve ELISA hoger ligt dan de gemiddelde ODR waarde van koeien met een positieve ELISA. Hier bestond een significant verschil tussen ($t = 2,233$; $P = 0,027$).

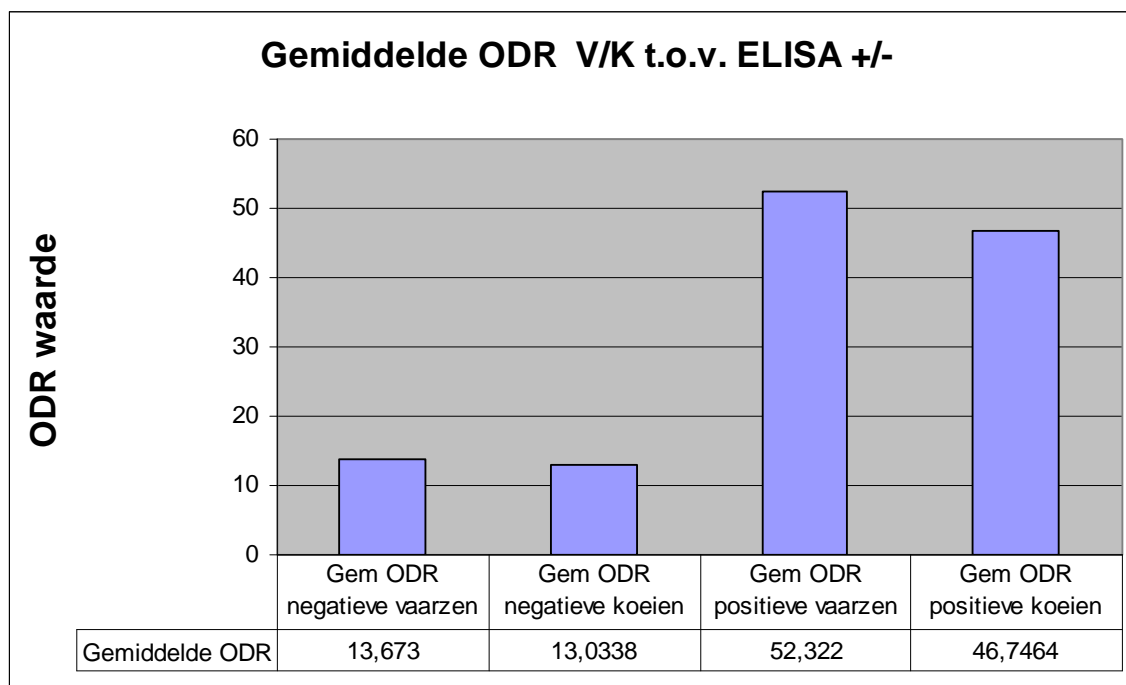


Fig. 4.8. Gemiddelde ODR waarden van negatieve en positieve vaarzen en koeien.

Om de vaarzen te corrigeren voor de mindere hoeveelheid melk die zij produceren is de ODR waarde van de vaarzen vermenigvuldigd met 0,75. Deze uitkomsten zijn in Fig. 4.9. weergegeven op dezelfde manier als in Fig. 4.8.. Na toepassing van de two-sample *t*-test bleek er een significant verschil te bestaan tussen de gemiddelde ODR waarden van vaarzen en koeien met een negatieve ELISA ($t = 6,673$; $P < 0,001$). Tussen de gemiddelde ODR waarde van vaarzen en koeien met een positieve ELISA bleek hier ook een significant verschil te bestaan, alleen hebben nu de koeien een hogere gemiddelde ODR waarde ($t = 3,621$; $P < 0,001$).

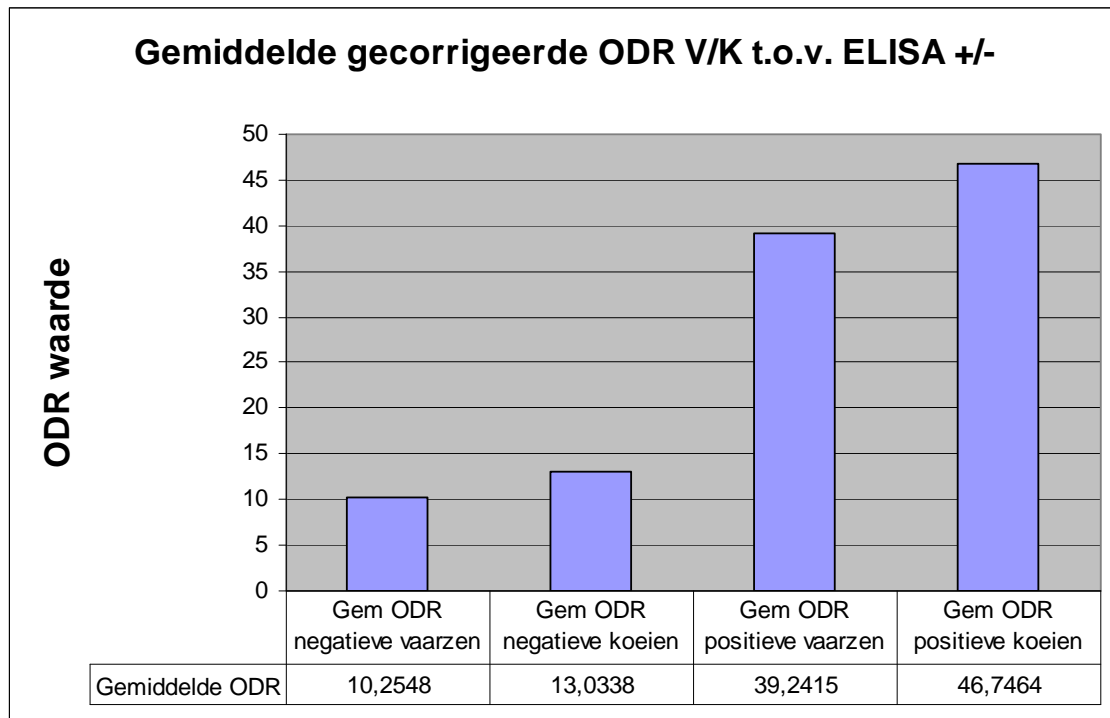


Fig 4.9. Gemiddelde ODR waarden van negatieve en positieve vaarzen en koeien na correctie voor de melkproductie van vaarzen.

5. Discussie

Met dit onderzoek is geprobeerd meerdere doelen te bereiken en deze zullen hier allen een voor een besproken worden. Het eerste doel was bepalen of een positieve tankmelk ELISA alleen voorkomt als er ook een longworm uitbraak is op een bedrijf, of dat ook subklinische infecties kunnen leiden tot een positieve tankmelkuitslag.

De eerste factor van onzekerheid was de indeling van bedrijven in controle en uitbraak bedrijven. Er werd hierbij afgegaan op de waarnemingen van verschillende veehouders en dierenartsen. Dit zorgde voor een grijs gebied. Niet alle bedrijven hadden een vergelijkbare ernst van klachten. Er is gekozen voor een indeling op basis van aanmelding. Als er door de veehouder en dierenarts klachten zijn waargenomen die konden duiden op een longworminfectie werd het bedrijf als uitbraakbedrijf ingedeeld. Later is deze indeling nog uitgebreid met de eigen waarnemingen tijdens het bemonsteren van de dieren op het bedrijf. Werd er meer dan één maal hoesten gehoord werd het bedrijf een uitbraak bedrijf en werd er geheel geen hoesten gehoord werd het een controle bedrijf. Deze aangepaste indeling bleek geen duidelijker resultaat te geven, vandaar dat er uiteindelijk gewerkt is met de eerst indeling op basis van aanmelding.

Het totaal aantal bemonsterde controle en uitbraak bedrijven was 37. Het aantal controle bedrijven voldeed aan de vooraf bepaalde streefwaarde. Met het aantal bemonsterde uitbraak bedrijven is de streefwaarde niet gehaald. Uitbraak bedrijven kwamen pas met name vanaf half september. Er is bemonsterd tot en met oktober. Daarna worden ook niet veel uitbraken van longworm meer verwacht (Eysker 1994). Daarbij komt het feit dat veel melkveekoppels rond deze tijd weer worden opgesteld en daarmee de grootste bron van larvenoverdracht, namelijk het weiland, wordt weggenomen. Mogelijk hebben weersomstandigheden ook bijgedragen aan het lagere aantal verkregen uitbraak bedrijven. Aan het begin van de zomer was het erg warm en droog, pas eind juli en begin augustus kwam er meer regen en was het minder warm. Mogelijk konden longwormlarven onder deze weersomstandigheden minder goed op het weiland overleven (van Dijk 2004).

Uit de resultaten van dit onderzoek bleek dat een positieve tankmelkuitslag significant vaker voorkomt op uitbraak bedrijven. Hiermee is de hypothese dat vooral bedrijven met een klinische uitbraak tankmelk positief zijn bevestigd. Niettemin bleken lang niet alle uitbraak bedrijven positief te scoren in de tankmelk. Ook bleken enkele controle bedrijven een positieve tankmelkuitslag te hebben. Een positieve tankmelk ELISA komt dus niet alleen voor als er ook een longwormuitbraak op het bedrijf is. De keuze voor de gebruikte indeling in controle en uitbraakbedrijven kan hiervan de oorzaak zijn.

Uit de resultaten van dit onderzoek blijkt ook dat de tankmelk ELISA met een cut-off waarde van 0,493 een sensitiviteit en specificiteit van respectievelijk 53,3 en 90,5 procent heeft. De gevoeligheid van deze tankmelk ELISA is dus laag waardoor veel uitbraken onopgemerkt blijven. Daarnaast komen er nog steeds enkele vals positieve uitslagen voor. Mogelijk kunnen deze resultaten deels veranderen als er gebruik wordt gemaakt van meerdere bedrijven en een andere indeling in controle en uitbraak bedrijven. Wel staat vast dat de gevoeligheid van de test laag is.

Voordat de tankmelkuitslag bekend was is geprobeerd met de bedrijfswaarde een beeld te creëren van wat de tankmelkuitslag zou zijn. In materiaal en methoden staat beschreven hoe de bedrijfswaarde is berekend. De uitslag van de tankmelk correleert vrij goed met de bedrijfswaarde die is berekend, bleek uit de resultaten ($r^2 = 0,636$; $r =$

0,798). Het was ook niet te verwachten dat de bedrijfswaarde exact gelijk zou zijn aan de tankmelkuitslag, wel werd verwacht dat de bedrijfswaarde een goede indruk zou geven aangezien de tankmelk ELISA gebaseerd is op het zelfde antigeen als de ELISA voor het onderzoeken van individuele serummonsters. Met behulp van de bedrijfswaarde kwam een positieve tankmelkuitslag niet significant vaker voor op uitbraakbedrijven. Dit geeft aan dat de bedrijfswaarde een grove indicatie weergeeft, maar de werkelijke tankmelkuitslag anders kan zijn. Waarschijnlijk heeft dit te maken met de manier waarop de bedrijfswaarde is berekend en de gemaakte correcties. Mogelijk komt er in een koppel meer individuele variatie voor dan verwacht.

Het tweede doel van het onderzoek was bepalen hoeveel individuele dieren positief moeten zijn om een positieve tankmelkuitslag te verkrijgen. Hierbij het vaststellen van een ODR cut-off waarde.

Bij de uitslagen van alle individuele serummonsters bleek dat 38 individuele serummonsters waren hertest. Hiervoor was gekozen omdat één van de controle monsters op de platen te laag uitviel volgens de test karakteristieken. Alle serummonsters met een ODR waarde tussen de 20 en 30 zijn hertest. Na deze hertest waren op drie monsters na alle monsters positief. Op de plaat waarop de hertest was uitgevoerd bleek een controle monster te hoog uit te vallen. Uiteindelijk is gekozen om toch de eerste uitslagen van de individuele serummonsters aan te houden en de hertest uitslagen niet te gebruiken. Als alleen gebruik gemaakt zou worden van kwalitatieve uitslagen zou er wel gewerkt kunnen worden met de uitslagen van de hertest. Omdat het hier juist van belang is om met de ODR waarde van de individuele serummonsters te werken is ervoor gekozen alleen de eerste uitslagen te gebruiken. Als de hertest wel gebruikt zou worden, zouden de overige monsters van de betreffende platen gecorrigeerd moeten worden omdat alle uitslagen wat te laag zijn uitgevallen. Tussen verschillende platen waren ook verschillen te zien. Door al deze onzuiverheden zou het kunnen zijn dat waarden rond de cut-off waarde vals positief of vals negatief zijn.

Er werd verondersteld dat er een redelijk aantal dieren met patente infecties aanwezig moet zijn voor de tankmelkuitslag positief wordt. Uit de resultaten bleek ook dat gemiddeld minstens 31 procent van de dieren in een koppel een positieve ELISA moet hebben voordat de ODR waarde van de tankmelk ELISA boven de cut-off waarde komt. Hierbij werd gebruik gemaakt van het gecorrigeerd percentage positieve ELISA's. Dit bevat enige mate van onzekerheid aangezien de uitslagen van de bemonsterde dieren in een koppel gecorrigeerd werden voor het werkelijk aantal vaarzen en koeien in de koppel. Waarschijnlijk zullen deze percentages niet veel afwijken aangezien bijna alle vaarzen uit de koppel bemonsterd zijn en een groot deel van de oudere meerdere pariteit koeien. Hieruit bleek in ieder geval dat een behoorlijk aandeel van de dieren in de koppel positief zal zijn voordat de uitslag van de tankmelk positief wordt.

Het vaststellen van een goede cut-off waarde bij de tankmelk ELISA is met dit onderzoek niet verder uitgezocht. Door de gemiddelde ODR waarde van de tankmelkuitslagen van controle bedrijven te bepalen en hier één, twee of drie maal de bijbehorende standaard deviatie bij op te tellen kan een cut-off waarde voor de tankmelk ELISA behorende bij dit onderzoek bepaald worden. Deze verkregen cut-off waarde kan vergeleken worden met de cut-off waarde die in Hannover bepaald is. Waarschijnlijk zal de cut-off waarde dan niet lager liggen als ook wordt gekozen voor een cut-off waarde bepaald met drie maal de standaard deviatie. Mogelijk is het juist

beter te kiezen voor een lagere cut-off waarde omdat infecties met longworm dan eerder aangetoond zullen worden. Het gevolg hiervan is dat er meer kans is op vals positieve uitslagen.

Een geheel andere mogelijkheid die onderzocht zou moeten worden is het gebruiken van deze melk ELISA voor individueel melkonderzoek. Waarschijnlijk zal de gevoeligheid van de test hierbij beter zijn en daarmee de sensitiviteit hoger.

Het derde doel van het onderzoek was bepalen in hoeverre het vaarzen of juist oudere meerdere pariteit koeien zijn die de tankmelk positief maken. De hypothese hierbij was dat vooral vaarzen, dieren met een primaire infectie positief zouden zijn op bedrijven met een positieve tankmelkuitslag, met uitzondering van een enkele positieve koe. De gedachte hierachter was dat vaarzen de grootste kans hebben nog niet eerder met longworm in contact te zijn geweest en daardoor gevoelig zijn voor een infectie met longworm. Van koeien werd verwacht dat ze vooral last zouden hebben van het larvale herinfectiesyndroom.

Uit de resultaten van Fig. 4.9. bleek dat juist individuele koeien met name bijdragen aan een positieve tankmelkuitslag, in tegenstelling tot de hypothese. Dit houdt in dat met alleen geïnfecteerde koeien minder positieve dieren nodig zijn in vergelijking met alleen geïnfecteerde vaarzen om een positieve tankmelkuitslag te verkrijgen.

Een kritisch punt is de gekozen waarde van 0,75 waarmee de melkproductie van vaarzen gecorrigeerd werd. Vaarzen produceren minder melk, waardoor het aandeel melk van vaarzen in de tank kleiner is dan het aandeel melk van koeien als er evenveel vaarzen en koeien in de koppel zouden zijn. De waarde van 0,75 is een ruwe maat en hoeft niet voor alle individuen gelijk te zijn. Daarnaast zou het kunnen zijn dat vaarzen of koeien zoveel antilichamen produceren dat deze in de ELISA van het serum in de plateau fase komen en daardoor niet alle gemeten kunnen worden, wat mogelijk in de melk anders kan zijn. Een andere manier van correctie kan zijn, de ODR waarde van de koeien corrigeren en daardoor ophogen, omdat koeien mogelijk zoveel melk produceren dat de antilichamen in de melk verdund worden in vergelijking met antilichamen in melk van vaarzen. Het een en ander is afhankelijk van de receptoren in de melkklier die zorgen voor het doorlaten van bepaalde stoffen naar de melk. Het is van belang te weten of antilichamen tegen longworm in het bloed en in de melk, één op één met elkaar te vergelijken zijn, of te weten wat deze verhouding zal zijn. Mogelijk kunnen deze suggesties ervoor zorgen dat toch de ODR waarden van vaarzen of juist koeien het meest bijdragen aan een positieve tankmelk. Een andere hypothese is dat verwacht werd op ieder bedrijf minstens één positief dier aan te treffen en dat dit dier waarschijnlijk een vaars zou zijn. Dit omdat aangenomen wordt dat longworm op de meeste bedrijven in Nederland voorkomt. En omdat de individuele ELISA op serum zeer gevoelig is zodra er een aantal volwassen longwormen aanwezig zijn of zijn geweest. Uit resultaten van de individuele ELISA op serum bleek dat op bijna alle bemonsterde bedrijven minstens één dier een positieve ELISA had. Bij zes bedrijven is geen enkel dier dat bemonsterd werd positief bevonden, dit waren vier controle bedrijven en twee uitbraak bedrijven. Het is opvallend dat op deze uitbraak bedrijven helemaal geen positieve ELISA's voorkomen (bij een van de twee ook geen positieve Baermannen) en dat er toch gesproken werd van een uitbraak. Uit deze resultaten bleek dat longworm op de meeste bedrijven voorkomt, ook op controle bedrijven, met uitzondering van enkele bedrijven. De hypothese kan hiermee dus niet bevestigd worden, maar er is wel een trend (op 83,8% van de bemonsterde bedrijven is minstens één dier ELISA positief).

Uit de resultaten bleek ook dat er meer vaarzen dan koeien positief scoren in de individuele ELISA op serum. Hieruit bleek dat met name vaarzen positief zijn op bedrijven en dit de hypothese bevestigde waarin werd verwacht dat met name vaarzen positief zijn op uitbraak en controle bedrijven. Dit wil niet zeggen dat er geen individuele positieve ELISA's zijn bij koeien, in tegenstelling juist. De hypothese was dat koeien met name last hebben van het herinfectiesyndroom en geen patente infecties ontwikkelen. Een enkele positieve koe zou verklaard worden met het feit dat er carriers voor kunnen komen in een koppel of dat dit dier mogelijk nog gevoelig is. Uit de resultaten blijkt dat er veel meer koeien positief zijn dan verwacht. De hypothese werd hiermee verworpen.

Ook werd vooraf de vraag gesteld hoe bruikbaar de tankmelk ELISA zou zijn in de praktijk op bedrijven waar de meeste dieren het herinfectiesyndroom zullen tonen. Deze vraag is achteraf gezien niet terecht gesteld omdat er dus wel een behoorlijk aantal koeien is met patente infecties en zelfs mogelijk blijkt dat individuele koeien sterker bijdragen aan een positieve tankmelkuitslag. Hieruit blijkt dat er nog behoorlijk wat kennis ontbreekt over de infectiedynamiek van *Dictyocaulus viviparus*.

Over de oorzaak van de patente infecties bij oudere pariteit koeien kan alleen gespeculeerd worden. Een aantal risicofactoren die hier mogelijk aan kunnen bijdragen zijn de volgende. De bedrijfsvoering is een belangrijk onderdeel met onder andere de opfok van jongvee, een gesloten of openbedrijfsvoering, de beweidingstrategie en het toepassen van weidegang, het ontwormbeleid, en het gebruik van entingen tegen longworm. Daarnaast kan de weerstand van het dier een rol spelen, mogelijk zijn koeien nog gevoelig doordat ze onvoldoende weerstand hebben opgebouwd. Een andere mogelijkheid is dat de afweer tegen longworm niet jarenlang op een zodanig niveau blijft, zodat er na verloop van tijd toch volwassen longwormen kunnen ontwikkelen. Er is ook niet bekend of alle dieren in een koppel jaarlijks longworm tegenkomen. De aanwezigheid en mogelijk het aantal carriers in een koppel melkvee kan ook een rol spelen. De infectiedruk van het weiland, of de mate waarin longworm voorkomt in de omgeving heeft een bijdrage. Ook moet er altijd rekening worden gehouden met enige mate van toeval, een dier moet bijvoorbeeld precies op de plaats in een weiland grazen waar net enkele larven aanwezig zijn, of het weer wat van week tot week en van jaar tot jaar enorm kan verschillen kan bijdragen aan de hoogte van de infectiedruk. Al deze factoren kunnen een verschillende bijdrage leveren. Op dit gebied is nog veel nader onderzoek nodig.

Als laatste onderdeel van de discussie de overeenkomst tussen de Baermann en ELISA op serum. Uit de resultaten bleek dat er een significant verband is tussen deze twee testen bij individuele dieren, vaarzen en koeien. Toch waren er ook veel uitslagen waarbij de uitslag van de Baermann en de ELISA niet overeen kwamen. Dit kan te maken hebben met het feit dat de Baermann wat eerder positief kan zijn in vergelijking met de ELISA. Larven kunnen vanaf 24-25 dagen na infectie in de mest gevonden worden (Eysker 1994). Daarnaast kan het ook voorkomen dat de Baermann al weer negatief is doordat de patente periode voorbij is en de ELISA een positieve uitslag geeft, de ELISA kan tot zes maanden na infectie positieve uitslagen geven (Cornelissen et al 1997, Fiedor et al 2009).

6. Conclusie

Uit dit onderzoek ter validatie van de tankmelk ELISA voor longworm zijn een aantal opvallende resultaten naar voren gekomen. Onder andere het grote aantal koeien met patente infecties dat is waargenomen. Daarnaast ook het grote aandeel positieve dieren in een koppel melkvee dat nodig is bij een positieve tankmelkuitslag.

Het blijkt dat op de meeste bedrijven *Dictyocaulus viviparus* voorkomt en dat met name vaarzen positief worden bevonden. Ondanks het feit dat er ook vele koeien zijn met patente infecties.

Over de bruikbaarheid van de tankmelk ELISA kan het volgende geconcludeerd worden. De tankmelk ELISA is prima bruikbaar om een echte uitbraak van longworm in een koppel melkvee aan te tonen of te bevestigen. De test is daarentegen niet te gebruiken als prevalentie parameter in een melkveekoppel. Daarnaast is de test ook niet te gebruiken als diagnosticum om beginnende infecties van longworm in melkveekoppels aan te tonen. Hiervoor is de gevoeligheid, de sensitiviteit te laag. De manier van monsters nemen voor nadere diagnostiek is bij deze methode tijdbesparend en simpel.

Al met al zal de tankmelk ELISA in de meeste gevallen niet veel toegevoegde waarde geven als diagnostische methode voor de opsporing van *Dictyocaulus viviparus* in melkveekoppels.

7. Referenties

1. BENNEMA, S., VERCRUYSSSE, J., CLAEREBOUT, E., SCHNIEDER, T., STRUBE, C., DUCHEYNE, E., HENDRICKX, G., CHARLIER, J. (2009) The use of bulk-tank milk ELISA's to assess the spatial distribution of *Fasciola hepatica*, *Ostertagia ostertagi* and *Dictyocaulus viviparus* in dairy cattle in Flanders (Belgium). *Veterinary Parasitology* 165(1-2): 51-7
2. 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. *The Veterinary quarterly* 6(1): 13-7.
3. CEDI DIAGNOSTICS B.V., Ceditest®, ELISA for detection of antibodies directed against *Dictyocaulus viviparus* (lungworm) in cattle.
4. 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. *Veterinary Parasitology* 70(1-3): 153-64
5. DE LEEUW, W.A., CORNELISSEN, J.B. (1991) Identification and isolation of a specific antigen with diagnostic potential from *Dictyocaulus viviparus*. *Veterinary Parasitology* 39(1-2): 137-47
6. DE LEEUW, W.A., CORNELISSEN, J.B. (1993) Comparison of three enzyme immunoassays for diagnosis of *Dictyocaulus viviparus* infection. *Veterinary Parasitology* 49(2-4): 229-41
7. EYSKER, M., CLAESSENS, E.W., LAM, T.J.G.M., MOONS, M.J., PIJPERS, A. (1994) The prevalence of patent lungworm infections in herds of dairy cows in the Netherlands. *Veterinary Parasitology* 53: 263-7
8. EYSKER, M. (1994) Epidemiology and control of lung worm infections in cattle. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* 1;119(11):322-5
9. EYSKER, M. (1997) The sensitivity of the Baermann method for the diagnosis of primary *Dictyocaulus viviparus* infections in calves. *Veterinary Parasitology* 69(1-2): 89-93
10. FIEDOR, C., STRUBE, C., FORBES, A., BUSCHBAUM, S., KLEWER, A.M., VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G., SCHNIEDER, T. (2009) Evaluation of al milk ELISA for the serodiagnosis of *Dictyocaulus viviparus* in dairy cows. *Veterinary Parasitology* 166(3-4): 255-61
11. HOLZHAUER, M., PLOEGER, H.W., VERHOEFF, J. (2003) Longwormproblemen bij melkkoeien: symptomatologie, diagnostiek en pathogenese aan de hand van een viertal cases. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* 128(6): 174-8
12. KLOOSTERMAN, A., VERHOEFF, J., PLOEGER, H.W., LAM, T.J. (1993) Antibodies against nematodes in serum, milk and bulk milk samples as possible estimators of infection in dairy cows. *Veterinary Parasitology* 47(3-4): 267-78
13. OAKLEY, G.A. (1982) Observations on the epidemiology of *Dictyocaulus viviparus* in north west England. *Research in Veterinary Science* 32(2): 163-9
14. PLOEGER, H.W., KLOOSTERMAN, A., BARGEMAN, G., VON WUIJCKHUISE, L., VAN DEN BRINK, R. (1990) Milk yield increase after anthelmintic treatment of dairy cattle related to some parameters estimating helminth infection. *Veterinary Parasitology* 35(1-2): 103-16

15. PLOEGER, H.W., BORGSTEEDE, F.H., SOL, J., MIRCK, M.H., HUYBEN, M.W., KOOYMAN, F.N., EYSKER, M. (2000) Cross-sectional serological survey on gastrointestinal and lung nematode infections in first and second-year replacement stock in the Netherlands: relation with management practices and use of anthelmintics. *Veterinary Parasitology* 4:90(4): 285-304
16. PLOEGER, H.W. (2002) *Dictyocaulus viviparus*: re-emerging or never been away? *Trends in Parasitology* 18(8): 329-32
17. RODE, B., JORGENSEN, R.J. (1989) Baermannization of *Dictyocaulus spp.* From faeces of cattle, sheep and donkeys. *Veterinary Parasitology* 30(3): 205-11
18. TENDER, A.M., BELLMER, A., SCHNIEDER, T. (1993) Evaluation of an ELISA for *Dictyocaulus viviparus*-specific antibodies in cattle. *Veterinary Parasitology* 47(3-4): 301-14
19. VAN DIJK, J. (2004) The Epidemiology and Control of Dictyocaulosis in Cattle. *Cattle Practice, British Cattle Veterinary Association* 12(2): 133-145
20. 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. *Veterinary Parasitology* 14;151(2-4): 218-26
21. WAPENAAR, W., BARKEMA, H.W., EYSKER, M., O'HANDLEY, R.M. (2007) An outbreak of dictyocaulosis in lactating cows on a dairy farm. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1;231(11):1715-8

Bijlage 1. Overzicht bemonsterde bedrijven



Zwarte stip = controle bedrijf
Rode stip = uitbraakbedrijf

Bijlage 2. 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 beweide op aparte percelen waar geen melkvee of droge koeien worden geweide? (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)

Longworm-Tankmelk ELISA
Validatie voor het aantonen van longworminfecties bij melkvee

- Wordt er gevaccineerd tegen longworm? (ja/nee) Zo ja, welke dieren? (leeftijd dieren)

Eigen waarneming: (percentage van koppel, ernst):