

Leeftijdsresistentie geitenlammeren tegen paratuberculose

Onderdeel van de publiek private samenwerking (PPS) kleine herkauwers, topsector Agri&Food

Auteurs: Karianne Lievaart-Peterson (GD), Ad Koets (CVI), Maarten Weber (GD)

Datum: Februari 2015

Inhoud

Introductie.....	1
Te onderzoeken dieren	2
Type studies.....	3
Discussie	6
Sterkte-zwakte analyse	7
Conclusie	7
Referenties	8

Introductie

In de literatuur over paratuberculose bij het rund, en in mindere mate bij kleine herkauwers, wordt vaak gesproken over leeftijdsresistentie tegen paratuberculose. Door middel van experimentele infectie is vastgesteld dat een eerste blootstelling aan de Map bij oudere koeien minder makkelijk resulteert in een chronische infectie. Daarnaast is het verloop van de infectie minder ernstig, dan wel minder progressief [1]. Een recente experimentele studie concludeerde dat ook kalveren ouder dan een jaar gevoelig waren voor infectie en dat de ernst mede afhing van de infectieuze dosis [2]. Recente meta-analyses van gepubliceerde studies over experimentele infecties bij het rund, geven aan dat blootstelling direct na de geboorte in combinatie met een gecontamineerd milieu het risico vergroot op progressieve infectie en het optreden van klinische verschijnselen [3].

De combinatie van infectieuze dosis en leeftijd van blootstelling lijkt de verklarende factor te zijn voor het verloop van de infectie na experimentele blootstelling. Jong blootgesteld worden aan een hoge dosis geeft het grootste risico om klinische paratuberculose te ontwikkelen [4]. Bij edelherten (*Cervus elaphus*) is een sterke leeftijdsresistentie tegen het ontstaan van klinische en subklinische paratuberculose waargenomen, maar niet tegen infectie [5]. Vergelijkbare conclusies werden getrokken op basis van een recent experiment in een gerandomiseerde longitudinale veldstudie met 840 merino schapen, waar zowel leeftijd van blootstelling als dosis werden gevolgd

[6]. Leeftijd van blootstelling zou bij geiten onderzocht kunnen worden door een experimentele infectie op onderzoeksinstituut.

Er zou voorzichtig geconcludeerd kunnen worden dat een goed management (waaronder strikte hygiënemaatregelen) van jonge en opgroeiende geiten van groot belang is. Er valt veel te bereiken met reductie en vertraging van blootstelling voor het optreden van klinische en subklinische paratuberculose.

Algemeen wordt aangenomen dat geitenlammeren gevoeliger zijn voor infectie met *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) dan volwassen geiten [7]. Dit is ook aangetoond in een studie waarbij gekeken is naar kweek van (darm-)monsters genomen van runderen, schapen en geiten [8]. Gevoeliger voor infectie waardoor ze sneller en gemakkelijker geïnfecteerd raken als ze nog jong zijn. Daarnaast rijst ook nog de vraag of deze sneller en gemakkelijker geïnfecteerde lammeren (op latere leeftijd) ook meer en ernstigere ziekteverschijnselen vertonen. En is er dan mogelijk ook nog een verband met uitscheiding in de mest ofwel besmettelijk zijn voor koppelgenoten? Op grond van de aannames wordt geadviseerd om geitenlammeren gescheiden van volwassen geiten te huisvesten. Er zijn echter weinig onderzoeksgegevens beschikbaar waarmee deze aanname kan worden onderbouwd.

Een literatuur review van 73 studies uitgevoerd tussen 1938 en 2006 over experimentele infectie modellen voor paratuberculose gaf aan dat factoren zoals diersoort, ras, leeftijd, infectieroute, type en dosis van invloed zijn op de uitkomst. Natuurlijke infectie voltooid zich in stadia, meestal over een periode van jaren. Hierdoor is lengte van een proef bij paratuberculose erg belangrijk. Opgemerkt wordt dat het verstandig zou zijn een geïdentificeerde stam te gebruiken om experimenten te kunnen herhalen [9]. Een internationaal comité van paratuberculose onderzoekers heeft in 2007 tevens een advies over dit onderwerp uitgebracht in een poging internationale standaarden vast te stellen. Deze modellen zijn nuttig bij het bestuderen voor dier-ziekteverwekker interacties, immuniteit (lokaal en systemisch), en vaccinatie en therapie-studies [10].

Daarom wordt in dit document een aantal project ideeën uitgewerkt waarin genoemde vraagstellingen mogelijk getoetst zou kunnen worden. De nadruk ligt bij deze scenario's op hoe de effectiviteit van een scheiding van lammeren en volwassen geiten kan worden gemeten. Een dergelijke vraagstelling zou kunnen worden beantwoord middels een experimentele infectie studie of via een veldstudie op een (zwaar) besmet bedrijf. Beide vormen hebben voor en nadelen in termen van logistieke aspecten, te verwachten uitkomsten en kosten welk hieronder toegelicht worden.

Te onderzoeken dieren

Pasgeboren vrouwelijk geitenlammeren komen in aanmerking als voldaan wordt aan de volgende selectiecriteria: (i) het moederdier is ten hoogste 30 maanden oud bij aflammeren, (ii) het geitenlam wordt direct na de geboorte weggehaald bij de moeder, en gehuisvest volledig gescheiden van volwassen geiten.

Afhankelijk van de gekozen studie (experimentele infectie op onderzoeksinstituut of veldstudie op bedrijven) zijn dit dieren van paratuberculose onverdacht bedrijven of juist van bedrijven met een hoge besmettingsgraad. Voor een experimentele infectiestudie op een

onderzoeksinstituut heeft herkomst van een paratuberculose onverdacht bedrijf de voorkeur. Bij een veldstudie zijn de selectiecriteria: (iii) hoge paratuberculose besmettingsgraad, (iv) mogelijkheid om lammeren tot een leeftijd van 12 maanden te huisvesten gescheiden van volwassen geiten, (v) bereidheid van de geitenhouder om mee te werken aan het onderzoek, (vi) bereidheid om van de geitenhouder om geitenlammeren niet te vaccineren (de moederdieren mogen zijn gevaccineerd).

Type studies

Om te onderzoeken of het verschil maakt op welke leeftijd lammeren geïnfecteerd raken zou een infectieproef kunnen worden uitgevoerd. Hierbij dienen lammeren geboren op een paratuberculose-onverdacht bedrijf naar een proeflocatie worden overgeplaatst om onder gecontroleerde omstandigheden met een vaststaande dosis experimenteel te worden besmet met paratuberculose.

A. Experimentele infectie studie

Infectieproef met pasgeboren vrouwelijke lammeren van een paratbc-onverdacht bedrijf die respectievelijk direct na geboorte, drie, zes of negen maanden worden geïnfecteerd met een gelijke gecontroleerde dosis paratuberculose bacteriën (afkomstig uit een geit).

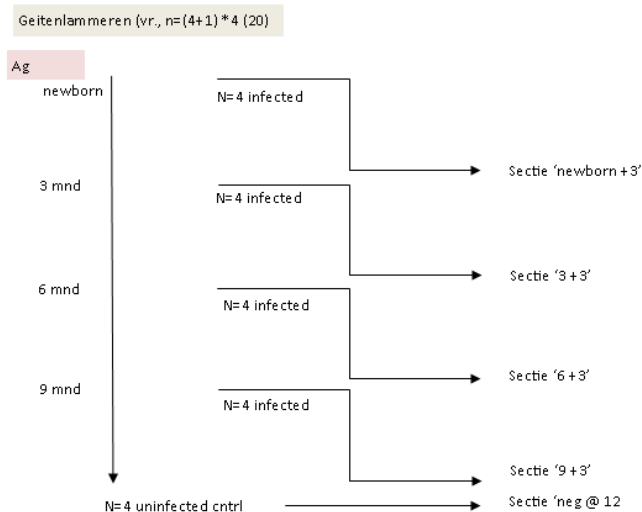
Aantallen dieren 20. Vijf groepen bestaande uit een controle groep van vier lammeren en vier experimentele groepen met eveneens vier lammeren per groep. Elke groep gaat drie maanden na infectie naar sectie; negatieve controle als laatste (en apart). Alternatief kan ervoor gekozen worden alle dieren op een leeftijd van 12 maanden ter sectie te laten gaan. Dan verschillen de groepen enkel alleen naar moment van infectie, en niet naar leeftijd van sectie. Welk van die twee factoren verklaart dan een eventueel verschil tussen de groepen?

Uitkomstmaat uit elke groep wordt bij 3 geiten op resp 3, 6, 9 en 12 maanden leeftijd sectie verricht volgens een vast protocol. Uit te lezen parameters zijn de ernst en progressie van infectie. De primaire uitkomstmaten zijn in elke groep de fractie geiten waar bij sectie een Map- infectie wordt aangetoond, als maat voor de fractie besmette geiten. Als secundaire uitkomstmaat worden uit elke nog aanwezige groep/dieren op een leeftijd van 0, 3, 6, 9 en 12 maanden telkens lammeren onderzocht door middel van serum-ELISA en interferon gamma (INFg). Dit laatste om een indruk te krijgen over de ontwikkeling van de (antistoffen = humorale en witte bloedcellen = cellulaire) afweer.

Diagnostiek

- ⇒ Sectie: macroscopisch + histologie (20x)
- ⇒ Bacteriologie: isolatie + kwantificatie (cfu/gr weefsel) + PCR: (8 monsters/dier) (20x)
- ⇒ Serologie (ELISA) + IFNg (BOVIGRAM): tappen op 0, 3, 6, 9 en 12 mnd =>
 $20+20+16+12+8+8=84$

Geraamde kosten €300.000. Proef zou plaatsvinden op het Centraal Veterinair Instituut (CVI) aangezien daar geschikte stalruimte is voor het uitvoeren van experimentele infectieproeven. Kosten lopen op i.v.m. het hoge aantal dierdagen (4340; doorloop 1 jaar, 8 dieren blijven 1 jaar).



Afbeelding 1. Grafische weergave experimentele besmetting studie naar mogelijke leeftijdsresistentie van geitenlammeren tegen paratuberculose.

B. Veld interventie studie

Om de effectiviteit van leeftijdsscheiding te onderzoeken zou als alternatief voor experimentele infectie ook een interventie studie onder praktijkomstandigheden kunnen worden aangewend.

Interventie proef middels meting effectiviteit scheiding lammeren in de praktijk. Lammeren random ingedeeld in drie groepen en deze groepen op resp. 4 (controle), 8 (interventiegroep 1) en 12 (interventiegroep 2) maanden van de opfokstal naar de melkstal verplaatsen.

Uitkomstmaat uit elke groep wordt bij n geiten op 20 maanden leeftijd een mestonderzoek gedaan met PCR, en sectie verricht volgens een vast protocol. De primaire uitkomstmaten zijn in elke groep (i) de fractie mest-PCR positieve geiten, als maat voor de fractie besmettelijke geiten, en (ii) de fractie geiten waar bij sectie een Map- infectie wordt aangetoond, als maat voor de fractie besmette geiten. Als secundaire uitkomstmaat worden uit elke groep op een leeftijd van 4, 8 en 12 maanden telkens 10 lammeren onderzocht door middel van serum-ELISA, mest-PCR en sectie. In totaal zijn hiervoor 90 lammeren nodig. Het doel van het onderzoek van deze 90 lammeren is om gedurende de studie de ontwikkeling van de infectiedruk en overdracht van de infectie te kunnen volgen. Als tertiare uitkomstmaat worden bij elke groep iedere twee maanden omgevingsmonsters (mestopslag, stofmonsters, rantsoen) onderzocht. Het doel hiervan is om de blootstelling van de geiten aan Map organismen te kunnen volgen.

Aantal dieren tussen de 398 en 3627 plus de 90 lammeren voor de secundaire uitkomstmaat. Bij de berekening van het aantal (n) geiten dat per groep moet worden onderzocht kan als uitgangspunt worden genomen dat de interventie alleen in de praktijk zal worden toegepast indien een geitenhouder van de interventie een aanzienlijke reductie van de besmettingsgraad mag verwachten. Het is daarom in deze studie niet relevant om een eventuele kleine reductie van de besmettingsgraad te kunnen meten. Wij nemen daarom aan dat een reductie met van de fractie besmette en de fractie besmettelijke geiten met meer dan de helft als gevolg van de interventie als

relevant mag worden gezien, maar dat vaststelling van een eventuele kleinere reductie niet relevant is¹.

Als drie groepen (de controlegroep, en de beide interventiegroepen) onderling vergeleken worden en er van uit wordt gegaan dat in de controle groep 5% van de geiten besmettelijk (i.e., mest-PCR positief) is, dan zijn (naast de bovengenoemde 90 geiten voor de secundaire uitkomstmaat) voor het bepalen van het effect van de interventie op de fractie besmettelijke geiten 1209 lammeren per groep nodig². Als in de controlegroep 10% van de geiten besmettelijk zijn, dan zijn 581 lammeren per groep nodig³. Als in de controlegroep 20% van de geiten besmettelijk zijn, dan zijn 266 lammeren per groep nodig⁴. Een vergelijkbare redenering geldt ook voor het effect van de interventie op de fractie besmette geiten (i.e. positief bij sectie).

Als slechts twee groepen worden vergeleken (de controlegroep, en één interventiegroep), dan zijn lagere aantallen lammeren per groep nodig voor het bepalen van de primaire uitkomstmaten. Dan zijn per groep 906, 435 en 199 lammeren nodig bij respectievelijk 5%, 10% en 20% mest-PCR positieve geiten in de controlegroep⁵.

Een pilotstudie om inzicht in de verhouding tussen enerzijds de fractie geiten met afweerstoffen tegen Map en anderzijds de fracties besmette en besmettelijke bedrijven te krijgen helpt bij het inschatten van de haalbaarheid, en bij het zoeken naar geschikte bedrijven.

Diagnostiek

- ⇒ Pilot op 10 bedrijven
- ⇒ 1. Op 20 maanden leeftijd mest PCR (n=?)
- ⇒ 2. Serologie + mest PCR + sectie op 4, 8, 12 mnd (n=90)
- ⇒ 3. Omgeving: PCR mestopslag, stof, rantsoen elke 2 mnd (n=90)

Geraamde kosten €134.420 tot €263.580 (afhankelijk van wel/niet uitvoeren pilot, aantal dieren en aantal momenten)

¹ Voor het kunnen meten van eventuele beperktere reducties zijn grotere aantallen geiten nodig.

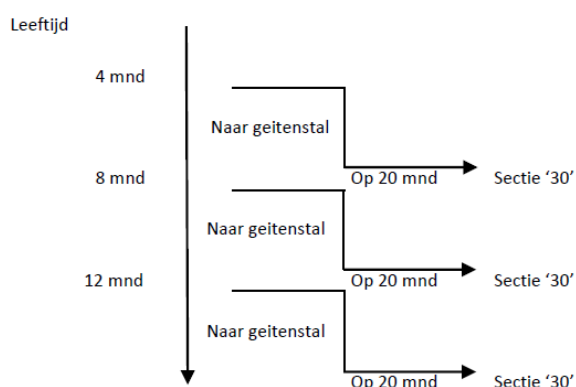
² Twee onafhankelijke proporties, $\beta = 0.20$, α na Bonferroni correctie = 0.0166, controle groep 5% test-positief, afname door interventie met tot 2.5% test-positief, tweezijdig testen.

³ Twee onafhankelijke proporties, $\beta = 0.20$, α na Bonferroni correctie = 0.0166, controle groep 10% test-positief, afname door interventie met tot 5% test-positief, tweezijdig testen.

⁴ Twee onafhankelijke proporties, $\beta = 0.20$, α na Bonferroni correctie = 0.0166, controle groep 20% test-positief, afname door interventie met tot 10% test-positief, tweezijdig testen.

⁵ In dat geval is $\alpha=0.05$.

Geitenlammeren (vr., n= 199 tot 1209 per groep)



Afbeelding 2. Grafische weergave interventie veldstudie naar mogelijke leeftijdsresistentie van geitenlammeren tegen paratuberculose.

Discussie

Bij de infectieproef zou duidelijk kunnen worden of het uitmaakt of een geitenlam direct bij geboorte, na drie, zes, negen of twaalf maanden geïnfecteerd raakt met paratuberculose. Uit te lezen parameters zijn, naast infectie, de ernst en progressie van infectie. Hypothese is dat bij latere infectie het verloop minder ernstig dan wel minder progressief is. Deze proefopzet is “lean and mean”: er zijn relatief weinig proefdieren nodig. Daarnaast zijn de omstandigheden gecontroleerd. Geïnfecteerde dieren vormen geen gevaar voor de (bedrijfs-)populatie geiten. Deze proefopzet geeft geen antwoord op de vraag of de hoogte van de infectieuze dosis van belang is omdat met een gelijke dosis gewerkt wordt.

In de voorgestelde proefopzet voor de interventie (veld) proef hangt de benodigde omvang van de proef sterk af van de fractie besmette en de fractie besmettelijke geiten dat in de controlegroep mag worden verwacht. De fractie besmette en de fractie besmettelijke geiten zijn echter op praktijkbedrijven onbekend.

Op praktijkbedrijven kan wel eenvoudig worden vastgesteld bij welke fractie van de geiten in bloed afweerstoffen tegen Map kunnen worden aangetoond met de serum-ELISA, maar nog onbekend is hoe op Nederlandse melkgeitenbedrijven de verhouding is tussen enerzijds de fractie geiten met afweerstoffen tegen Map en anderzijds de fracties besmette en besmettelijke bedrijven.

Inzicht in de verhouding tussen enerzijds de fractie geiten met afweerstoffen tegen Map en anderzijds de fracties besmette en besmettelijke bedrijven helpt daarom bij het inschatten van de haalbaarheid van het hier beschreven onderzoeksidee, en bij het zoeken naar geschikte bedrijven voor uitvoering van het onderzoeksidee. Dit inzicht kan worden verkregen in een pilotstudie.

Een pilotstudie om het benodigde inzicht te verkrijgen kan als volgt worden opgezet: Op 10 bedrijven wordt met een steekproefbloedonderzoek van 100 *random* gekozen geiten per bedrijf onderzocht bij welke fractie geiten afweerstoffen tegen Map aantoonbaar zijn. Tevens wordt door faecesonderzoek en sectie van 20 geiten per bedrijf vastgesteld welke fractie van de geiten besmettelijk respectievelijk besmet zijn.

Sterkte-zwakte analyse

Experimentele infectie studie	
Sterktes:	Zwaktes:
• Haalbaar • Gecontroleerd • “Lean and mean” (relatief weinig proefdieren) • Geen belasting herkomstbedrijf • Herkomstbedrijf loopt geen risico's	• Geen praktijksituatie • Lange duur • Geen antwoord op belang hoogte infectieuze dosis (i.v.m. gebruik gelijke dosis)
Kansen:	Bedreigingen:
• Uitleesparameters: infectie, ernst en progressie van infectie. • Oplossen vraagstuk	• Kostenplaatje

Veld interventie studie	
Sterktes:	Zwaktes:
• Haalbaar • Praktijksituatie	• Minder gecontroleerd • Lange duur • Aantal proefdieren afhankelijk van fractie besmette + fractie besmettelijke geiten (relatief veel proefdieren). • Pilot nodig om benodigd aantal dieren te bepalen
Kansen:	Bedreigingen:
• Uitleesparameters: (i) fractie besmettelijke geiten (mest PCR +), (ii) fractie besmette geiten (sectie +), (iii) omgevingsbesmetting (stof, mesthoop). • Oplossen vraagstuk • Nut van interventie bepalen	• Herkomstbedrijf loopt risico's i.v.m. jaargang niet vaccineren met Gudair. • Kostenplaatje

Conclusie

Zowel de projectgroep als de stuurgroep hebben afgewogen dat (pilot)studies zoals hierboven beschreven in principe wenselijk zijn. Er zijn echter doorslaggevende argumenten waarom dergelijke proeven haalbaar noch betaalbaar lijken te zijn. Een experimentele infectieproef is goed haalbaar maar staat vanwege experimentele infectie wat verder van de praktijk af. Bij de veldproef is een zwaarwegend argument dat participerende geitenhouders worden opgezadeld met een jaargang dieren die niet met Gudair® zijn gevaccineerd. Aangezien het bedrijven met een hoge besmettingsgraad betreft is dit een ongewenste situatie. Daarnaast is deze vorm logistiek complexer en vergt deze vorm van alle partijen langdurige commitment om niet af te wijken van het projectplan. Aan beide voorstellen hangt een dusdanig prijskaartje dat het als te ambitieus moet worden bestempeld binnen de huidige PPS-KH Paratuberculose in de melkgeitenhouderij.

Referenties

1. Larsen, A.B., R.S. Merkal, and R.C. Cutlip, *Age of cattle as related to resistance to infection with Mycobacterium paratuberculosis*. Am J Vet Res, 1975. **36**(3): p. 255-7.
2. Mortier, R.A., et al., *Evaluation of age-dependent susceptibility in calves infected with two doses of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis using pathology and tissue culture*. Vet Res, 2013. **44**: p. 94.
3. Windsor, P.A. and R.J. Whittington, *Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease*. Vet J, 2010. **184**(1): p. 37-44.
4. Mitchell, R.M., et al., *A meta-analysis of the effect of dose and age at exposure on shedding of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis (MAP) in experimentally infected calves and cows*. Epidemiol Infect, 2012. **140**(2): p. 231-46.
5. Mackintosh, C.G., et al., *Age susceptibility of red deer (Cervus elaphus) to paratuberculosis*. Vet Microbiol, 2010. **143**(2-4): p. 255-61.
6. McGregor, H., et al., *Transmission of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis: dose-response and age-based susceptibility in a sheep model*. Prev Vet Med, 2012. **107**(1-2): p. 76-84.
7. Djonje, B., *Paratuberculosis in goats--a special focus on the Nordic countries*. Acta Vet Scand, 2003. **44**(3-4): p. 257-9.
8. Stewart, D.J., et al., *A long-term bacteriological and immunological study in Holstein-Friesian cattle experimentally infected with Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis and necropsy culture results for Holstein-Friesian cattle, Merino sheep and Angora goats*. Vet Microbiol, 2007. **122**(1-2): p. 83-96.
9. Begg, D.J. and R.J. Whittington, *Experimental animal infection models for Johne's disease, an infectious enteropathy caused by Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. Vet J, 2008. **176**(2): p. 129-45.
10. Hines, M.E., 2nd, et al., *Experimental challenge models for Johne's disease: a review and proposed international guidelines*. Vet Microbiol, 2007. **122**(3-4): p. 197-222.