

2005
1-3-2013

①

Chlamydophila abortus

Een toenemend risico voor de volksgezondheid en een schadepost voor de schapen- en geitenhouderij



Rapportage van project uitgevoerd in opdracht van
Begeleidingscommissie Monitoring Dierziekten Kleine Herkauwers
Financier: Directie Voedselkwaliteit en Diergezondheid van het ministerie van LNV

Chlamydophila abortus

Een toenemend risico voor de volksgezondheid en een schadepost voor de schapen- en geitenhouderij

Inhoud

1. Samenvatting

2. Inleiding

3. Doel van het project

4. Beoogde projectresultaten

5. Uitgevoerde projectonderdelen

5.1 Inventarisatie testen

5.1.1 Materialen en methoden

5.1.2 Resultaten

5.2 Serologisch en vervolgonderzoek op schapen- en geitenbedrijven en kinderboerderijen

5.2.1 Materialen en methoden

5.2.2 Resultaten

5.2.3 Conclusies en aandachtspunten

5.2.4 Analyse van data bij een hogere afkapwaarde van de CIV-ELISA

5.3 Archiveren van verzamelde bloedmonsters voor nader onderzoek

5.4. Het formuleren van een voorstel voor een eventuele vervolgaanpak

5.4.1 Protocol voor de aanpak van Chlamydophila abortus op een besmet bedrijf.

5.4.2 Opzetten Chlamydophila abortus onverdacht programma

5.4.3 Opzetten van een prevalentieonderzoek voor Chlamydophila abortus

5.4.4 Het ontwikkelen van aangepaste of nieuwe technieken

5.5 Voorstel onderzoek Q-fever

5.6 Voorstel overig vervolgonderzoek

6. Bijlagen

6.1 Bijlage I: Abortus veroorzaakt door Chlamydophila abortus

6.2 Bijlage II: Figuren en tabellen behorend bij resultaten fase I en fase II

Dit project is uitgevoerd in opdracht van de Begeleidingscommissie Monitoring Dierziekten Kleine Herkauwers met daarin vertegenwoordigers van het ministerie van LNV, PVV, LTO en VWA/RVV. De directie Voedselkwaliteit en Diergezondheid van het ministerie van LNV was financier van dit project. Het projectteam dat het project uitvoerde bestond uit de volgende personen:

De leden van het projectteam bedanken hierbij alle deelnemende schapen- en geitenhouders en praktiserend dierenartsen er voor hun bijdrage in de uitvoering van het project.

Chlamydomphila abortus: een toenemend risico voor de volksgezondheid en een schadepost voor de schapen- en geitenhouderij

1. Samenvatting

Chlamydomphila abortus is een bacterie die grote abortusproblemen kan veroorzaken vooral bij schapen en geiten en sporadisch ook bij runderen en herten. Daarnaast staat de ziektekiem ook in de belangstelling als veroorzaker van een zoönose. Vooral bij zwangere vrouwen kunnen na infectie ernstige problemen ontstaan.

Het doel van dit project is een inventarisatie van de door Chlamydomphila abortus veroorzaakte problematiek in ons land. De concreet beoogde projectresultaten zijn:

1. het opleveren van een serologische test voor Chlamydomphila abortus in Nederland die op termijn bruikbaar is voor diagnostiek op schapen- en geitenbedrijven met abortusproblemen.
2. het verkrijgen van een eerste indicatie van de mate van voorkomen van Chlamydomphila abortus in Nederland bij schapen en geiten op bedrijven met een abortus probleem.
3. het formuleren van een voorstel voor een eventuele vervolgaanpak.

Eerste fase

In de eerste fase van dit project zijn, naast de CFT (complement fixation test) en WB (Western Blot test voor confirmatie van CFT) van SAC in het Verenigd Koninkrijk, een viertal commercieel verkrijgbare ELISA's (enzyme linked immunosorbent assay; Elisa – Pourquier ; Elisa – Bommeli ; Elisa – Cypress Diagnostics ; Elisa - CIV-test ovis Chlamydia PS-HIPRA) onderzocht op geschiktheid. Hiervoor zijn in totaal 394 sera verzameld op Chlamydomphila-vrije en -besmette schapen- en geitenbedrijven. Alle monsters waren afkomstig van vrouwelijke dieren ouder dan 1 jaar. De resultaten zijn weergegeven in de tabellen 1-4 en de figuren 1-3. Van de vijf onderzochte testen scoorden de CFT en de CIV-ELISA de beste combinaties van sensitiviteit en specificiteit. De CFT heeft daarbij als nadeel een groot dubieus gebied. In Schotland worden alle sera die dubieus scoren in de CFT nader onderzocht in de WB, hetgeen een specifieke edoch bewerkelijke en dus dure test is.

Tweede fase

In de tweede fase van dit project is nader onderzoek uitgevoerd op twee soorten bedrijven:
- op bedrijven met een historie van abortus veroorzaakt door Chlamydomphila abortus;
- op bedrijven met een al langer bestaand abortusprobleem waar geen diagnose is gesteld. Daar waar hierboven wordt gesproken van bedrijf kan ook worden ingevuld kinderboerderij. Alle verzamelde serummonsters zijn eerst opgeslagen bij -20°C. Vervolgens zijn de sera onderzocht binnen het R&D laboratorium van GD met de in fase I geselecteerde CIV-ELISA volgens instructies van de fabrikant. De resultaten zijn weergegeven in de tabellen 5-8. Op basis van de resultaten in deze tabellen zijn van alle bedrijven met positieve sera maximaal 4 sera met de hoogste ELISA waardes opgestuurd naar Schotland voor nader onderzoek in CFT en WB. De resultaten van de confirmatietest (WB) zijn opgenomen in de tabellen 6-8.

Er zijn 358 serummonsters verzameld op 6 Chlamydomphila-positieve schapenbedrijven en 311 monsters op 4 Chlamydomphila-positieve geitenbedrijven van door Chlamydomphila abortus geaborteerde dieren of van dieren uit het cohort van de geaborteerde dieren. De seroprevalenties in een cohort dieren waarin abortus heeft plaatsgevonden zijn globaal net zo hoog als in een selectie van dieren die verworpen hebben (Tabel 5). Dit duidt op een forse horizontale spreiding na abortus t.g.v. Chlamydomphila abortus en vervolgens op een over het algemeen hoge seroprevalentie in het hele cohort waarbinnen dieren verworpen hebben.

Er zijn 1170 serummonsters verzameld op 23 schapenbedrijven met een al langer bestaand abortusprobleem zonder een tot dan toe duidelijke diagnose. Op deze bedrijven werden ook variabele seroprevalenties aangetroffen, waarbij echter 12 van de 23 bedrijven minder dan

5% seropositieve dieren had (Tabel 8). Dit kan verklaard worden vanuit de specificiteit van de test (globaal 95% specificiteit leidt tot 5% fout-positieve uitslagen op niet-geïnfecteerde bedrijven). Alhoewel de selectie van positieve sera die opgestuurd zijn naar Schotland over het algemeen ook dubieus tot positief in de CFT reageerde werden 3 bedrijven bevestigd als besmet met *Chlamydomphila abortus* op basis van positieve WB resultaten.

Er zijn 1000 serummonsters verzameld op 14 geitenbedrijven met een al langer bestaand abortusprobleem zonder een tot dan toe duidelijke diagnose. Op deze bedrijven werden zeer variabele seroprevalenties aangetroffen uiteenlopend van volledig negatief (2 bedrijven) tot 27% seropositieve dieren (Tabel 7). Alhoewel de selectie van positieve sera die opgestuurd zijn naar Schotland over het algemeen ook dubieus tot positief in de CFT reageerde werden 2 bedrijven bevestigd op basis van positieve WB resultaten.

Er zijn 322 serummonsters verzameld op 20 kinderboerderijen met, over het algemeen, geen (bekende) abortus historie. Bij 4 van de 20 kinderboerderijen werden 1 of meer positieve dieren gevonden (Tabel 6). Eén van deze 4 bedrijven kon worden bevestigd op basis van een positieve WB.

Na afloop van bovengenoemd onderzoek is op basis van de verkregen uitslagen opnieuw gekeken naar de afstelling van de CIV-ELISA. Daarbij bleek dat een lichte verhoging van de afkapwaarde van de ELISA van 40% (conform instructies fabrikant) naar 50% een verhoging van de specificiteit tot gevolg heeft van 95 naar 98% voor schapen en van 91 naar 95% voor geiten. Het verlies aan gevoeligheid is daarbij beperkt en op aantoonbaar besmette bedrijven blijven de seroprevalenties nog steeds hoog. In de berekeningen voor het opzetten van een programma voor screening en certificering danwel een prevalentie-onderzoek is dan ook uitgegaan van het gebruik van deze ELISA bij de verhoogde afkapwaarde van 50%. Dit biedt tevens als voordeel dat er zo weinig mogelijk gebruik gemaakt hoeft te worden van de WB test als bevestigingstest.

Aanbevelingen

Op basis van de informatie uit dit project komen we tot een aantal aanbevelingen:

- het protocollair aanpakken van *Chlamydomphila abortus* op een besmet bedrijf; benadrukt wordt daarbij dat het besmet verklaren van een bedrijf alleen op basis van een enkel serologisch positief dier moet worden ontraden;
- de mogelijkheid om een programma op te zetten op basis waarvan een schapen- of geitenhouder of een kinderboerderij aan kan tonen dat het bedrijf vrij is van de infectie; voor kinderboerderijen zou deelname aan dit programma onderdeel van het 'Keurmerk Kinderboerderijen' kunnen zijn;
- het opzetten van een prevalentieonderzoek voor *Chlamydomphila abortus*. Op basis van de resultaten van dit project kan een goede schatting voor zo'n onderzoek worden gedaan (zie Tabel 11, 12, 13 en 14);
- het ontwikkelen van aangepaste of nieuwe technieken waarmee onvolkomenheden in bestaande technieken kunnen worden opgevangen. Daarmee is in een aantal gevallen een betere risicobeoordeling bij de mens mogelijk. Omdat de gouden standaard, de kweek, een aantal nadelen kent zou gedacht kunnen worden aan het operationeel houden van een antigeen-ELISA of Immuno Fluorescentie Test (IFT) vanwege de vaak hogere gevoeligheid. Nog meer voordelen biedt de zogenaamde Polymerase Chain Reaction (PCR). Deze techniek is snel, niet afhankelijk van levende micro-organismen en zeer gevoelig;
- op verzoek van VWA/RVV zijn de bloedmonsters die in het kader van dit onderzoeksproject zijn verzameld voorlopig bewaard, vooral met het oog op eventueel vervolgonderzoek op Q-koorts, een zoonose veroorzaakt door *Coxiella burnetii*. Binnen GD is inmiddels het validatieonderzoek van twee Q-koortstesten bij het rund bijna afgerond. Beide testen zijn geschikt voor het onderzoeken van serum, plasma en melkmonsters van kleine en grote herkauwers. Aangezien er geen goede

gouden standaard is voor de aan- en met name de afwezigheid van Q-fever op een bedrijf is het moeilijk goede data te verzamelen voor het bepalen van sensitiviteit en specificiteit van de testen. Op basis van bovenstaande is een aantal mogelijkheden nader uitgewerkt;

- op twee geitenbedrijven die een positieve serorespons vertoonden in de CIV-ELISA is later bij sectie op verworpen vruchten Q-fever vastgesteld. Het is wenselijk op deze bedrijven een aantal keren in de tijd bloedmonsters te verzamelen en te onderzoeken, niet alleen op *Chlamydomphila abortus* maar ook op *Coxiella burnetii*. De informatie die aldus wordt verkregen is van grote waarde om uitspraken te kunnen doen over de specificiteit van beide testen;
- na de vergelijking van de verschillende testen in de eerste fase van het onderzoek is in de tweede fase met deze gekozen test een eerste inventarisatie uitgevoerd op schapen- en geitenbedrijven met een abortushistorie waar de oorzaak van de abortus niet was vastgesteld en op kinderboerderijen. De positief bevonden bedrijven uit de tweede fase vertoonden een lagere serologische respons dan de positieve bedrijven uit de eerste fase. Dit roept de vraag op of de tijd tussen het optreden van abortus en het afnemen van bloedmonsters voor serologisch onderzoek van invloed is op de serologische respons. Het zou zinvol zijn om op een aantal besmette bedrijven dieren die hebben verworpen, in de tijd te volgen om aldus vast te stellen of het interval tussen abortus en bloedafname van invloed is op de serologische respons.

2. Inleiding

Chlamydomphila abortus is een bacterie die grote abortusproblemen kan veroorzaken vooral bij schapen en geiten en sporadisch ook bij runderen en herten. Daarnaast staat de ziektekiem ook in de belangstelling als veroorzaker van een zoönose. Vooral bij zwangere vrouwen kunnen na infectie ernstige problemen ontstaan.

Abortus bij schaaap en geit veroorzaakt door Chlamydomphila abortus lijkt zich in ons land uit te breiden. In 1990 werd tijdens een uitgebreide inventarisatie in de drie noordelijke provincies geen enkel geval van abortus veroorzaakt door C. abortus aangetroffen. In het midden van de jaren negentig kwamen in hetzelfde gebied sporadisch gevallen voor, vooral bij schapen, maar de laatste jaren wordt Chlamydomphila abortus regelmatig over Nederland verspreid vastgesteld als veroorzaker van abortusproblemen bij het schaaap en de geit. Er bestaat geen goede indruk van de mate van voorkomen in ons land.

Een abortusuitbraak veroorzaakt door Chlamydomphila abortus begint vaak als een abortusstorm. Daarbij kan meer dan de helft van de drachtige dieren aborteren en dus de helft van de lammeropbrengst verloren gaan. In de jaren daarna neemt het percentage abortusgevallen, en daarmee de economische schade, geleidelijk af. Op een bedrijf waar de aandoening inheems is geworden beperken de abortusgevallen zich in de regel tot de dieren die voor de eerste keer drachtig zijn. Van die groep kan jaarlijks tot 25% aborteren.

Chlamydomphila abortus is niet zonder risico voor de mens en kan vooral bij zwangere vrouwen ernstige problemen veroorzaken. Een besmetting bij de zwangere vrouw heeft niet alleen gevolgen voor de onvoldragen vrucht maar in veel gevallen ook voor de aanstaande moeder. De besmetting van dier naar mens kan niet alleen direct maar ook indirect verlopen bijvoorbeeld via materialen die in contact zijn geweest met dieren die hebben verworpen.

3. Doel van het project

Het doel van dit project is een inventarisatie van de door Chlamydomphila abortus veroorzaakte problematiek in ons land. Daarmee wordt het volgende beoogd:

- het verkrijgen van specifieke monitorinformatie over de mate van voorkomen en de problematiek op besmette bedrijven;
- het operationeel hebben van een betere serologische diagnostiek; de huidige diagnostiek is gebaseerd op vervolgonderzoek van ter sectie aangeboden verworpen vruchten en nageboorten; vaak is een nageboorte niet aanwezig en vrucht en nageboorte zijn vaak niet erg fris; dit bemoeilijkt de diagnostiek; bovendien is Chlamydomphila abortus uiterst moeilijk kweekbaar;
- het op basis van bovenstaande gerichter kunnen adviseren van besmette bedrijven. Daarmee worden niet alleen de economische gevolgen van een uitbraak beperkt maar ook het risico voor de mens. Daarmee is bovendien het imago-risico voor de sector verkleind omdat het zoönose-risico afneemt.

4. Beoogde projectresultaten

De concreet beoogde projectresultaten zijn:

1. het opleveren van een serologische test voor Chlamydomphila abortus in Nederland die op termijn bruikbaar is voor diagnostiek op schapen- en geitenbedrijven met abortusproblemen.
2. het verkrijgen van een eerste indicatie van de mate van voorkomen van Chlamydomphila abortus in Nederland bij schapen en geiten op bedrijven met een abortus probleem.
3. het formuleren van een voorstel voor een eventuele vervolgaanpak.

5. Uitgevoerde projectonderdelen

Tijdens dit project zijn de volgende onderdelen nader uitgewerkt.

5.1 Inventarisatie testen

Het doel van dit projectonderdeel was het inventariseren van de in Nederland en het buitenland beschikbare serologische testen voor geschiktheid onder Nederlandse omstandigheden en het daarna invoeren van deze test in het GD-laboratorium. Vóór de start van het project leken daarvoor twee testen in aanmerking te komen. Een nadere inventarisatie leverde naast de CFT (complement fixation test) en Western Blot test van SAC in het Verenigd Koninkrijk, een vijftal ELISA's (enzyme linked immunosorbent assay) op. Vanwege de testkarakteristieken van de bij CIDC-Lelystad gebruikte ELISA is besloten deze test verder niet mee te nemen. Daarom waren voor dit onderzoeksproject vijf testen beschikbaar die nader zijn geanalyseerd.

5.1.1. Materialen en methoden

Specificiteitspanel (n=200)

Er zijn 10 bloedmonsters per bedrijf verzameld op 10 **Chlamydomphila-vrije schapenbedrijven** en op 10 **Chlamydomphila-vrije geitenbedrijven**. Alle monsters waren afkomstig van vrouwelijke dieren ouder dan 1 jaar. Onder Chlamydomphila-vrije bedrijven worden bedrijven verstaan die de afgelopen 5 jaren geen abortus (verwerppercantage < 3%) hebben gehad en waarvan geen Chlamydomphila-positieve uitslagen bekend zijn.

Sensitiviteitspanel (n=194)

Er zijn per bedrijf ongeveer 20 monsters verzameld op 5 **Chlamydomphila-positieve schapenbedrijven** en 25 monsters per bedrijf op 4 **Chlamydomphila-positieve geitenbedrijven** van door Chlamydomphila geaborteerde dieren of van dieren uit het cohort van de geaborteerde dieren. Voor het vinden van Chlamydomphila-positieve bedrijven is eerst gezocht in de groep bedrijven met Chlamydomphila-abortus in 2004 en daarna in 2003. Als Chlamydomphila-positieve bedrijven worden die bedrijven beschouwd waar dieren lopen waar bij sectie van de verworpen vrucht(en) of nageboorte(n) Chlamydomphila is geconstateerd aan de hand van histologie en/of IFT (immuunfluorescentietest).

Alle 394 serummonsters zijn opgeslagen bij -20°C. Vervolgens heeft vergelijkend onderzoek plaatsgevonden met de volgende voor het aantonen van antistoffen tegen Chlamydomphila abortus beschikbare testen:

1. Elisa - Pourquier
2. Elisa - Bommeli
3. Elisa - Cypress Diagnostics
4. Elisa - CIV-test ovis Chlamydia PS-HIPRA
5. CFT - SAC, Edinburgh (confirmatie via Western Blot, WB)

De sera zijn onderzocht binnen het R&D laboratorium van GD volgens instructies van de fabrikant (test 1-4), danwel doorgestuurd naar het laboratorium van SAC, Edinburgh, voor onderzoek in de CFT en/of WB.

5.1.2. Resultaten

Fase I is grotendeels volgens plan verlopen en de resultaten zijn weergegeven in de tabellen 1-4 en de figuren 1-3. Er zijn namelijk maar 4 chlamydomphila positieve geitenbedrijven bereid gevonden om deel te nemen. Er waren wel 5 schapenbedrijven die voldeden aan de criteria van chlamydomphila positieve bedrijven. In totaal zijn dus 9 positieve bedrijven (4 x geit en 5 x schaap) opgenomen in het onderzoek in fase I.

Conclusies en aandachtspunten

1. Er waren duidelijke verschillen zichtbaar in de gevoeligheid en specificiteit van de verschillende ELISA's (Tabel 1 en 2). Voor vier van de vijf testen waren gevoeligheid en specificiteit ook duidelijk afhankelijk van de interpretatie van dubieuze testuitslagen. Van de vijf onderzochte testen scoorden de CFT en de CIV-ELISA de beste combinaties van sensitiviteit en specificiteit. Ook voor wat betreft het

diagnostisch potentieel (ROC analyse) kwam van de ELISA testen de CIV ELISA er als beste uit.

2. De kwantitatieve ELISA uitslagen (sterkte van het signaal) correleerden matig met elkaar, waarbij met name de Pourquier ELISA een slechte correlatie met de andere twee testen vertoonde. Voor schapen was de correlatie tussen de Bommeli ELISA en de CIV ELISA vrij hoog (Tabel 4.).
3. De CIV ELISA, maar ook de CFT, lijken bruikbare testen voor nader onderzoek. De CFT heeft daarbij als nadeel een groot dubieus gebied. In Schotland worden alle sera die dubieus scoren in de CFT nader onderzocht in de WB, hetgeen een specifieke edoch bewerkelijke en dus dure test is.
4. Ten opzichte van het Schotse systeem (CFT/WB) was de gevoeligheid van de CIV ELISA voldoende hoog.
5. De reproduceerbaarheid van de CIV ELISA lijkt ook goed (Figuur 2 en 3).
6. Een van de ELISA's (Cypress ELISA) bleek onbruikbaar te zijn door volledig negatieve resultaten zowel op besmette als op niet besmette bedrijven.
7. In de overige testen (4 ELISA's en de CFT) bleek de seroprevalentie op besmette bedrijven over het algemeen hoog tot zeer hoog te zijn (Tabellen 1-3, één besmet geitenbedrijf had een relatief lage seroprevalentie, maar dit bleek om een oude infectie van jaren her te gaan).
8. Op de onverdachte bedrijven waren er bedrijfsgebonden verschillen in seroprevalentie voor de verschillende testen (Tabel 3).
9. Een selectie van ELISA- en CFT-positieve sera afkomstig van onverdachte bedrijven bleek na nader onderzoek in de WB (in Schotland gebruikte specifieke bevestigingstest) negatief te zijn, waardoor de onverdachtstatus van deze bedrijven bevestigd werd.

5.2 Serologisch en vervolgonderzoek op schapen- en geitenbedrijven en kinderboerderijen

Na de selectie van de meest geschikte ELISA is nader onderzoek uitgevoerd op twee soorten bedrijven:

- op bedrijven met een historie van abortus veroorzaakt door *Chlamydomphila abortus*;
 - op bedrijven met een al langer bestaand abortusprobleem waar geen diagnose is gesteld.
- Daar waar hierboven wordt gesproken van bedrijf kan ook worden ingevuld kinderboerderij. Omdat de bezoekers van kinderboerderijen een verhoogd risico lopen (YOPI's: young, old, pregnant and immuno-compromised) zijn kinderboerderijen in overleg met VWA in dit onderzoek meegenomen. Hoewel aanvankelijk was afgesproken dat VWA het contact met de kinderboerderijen zou leggen en voor aanlevering van adressen daarvan zou zorgen is dat helaas niet gebeurd en heeft GD zelf een aantal kinderboerderijen benaderd met het verzoek aan dit project deel te nemen.

5.2.1. Materialen en methoden

*Schapen- en geitenbedrijven met een historie van abortus veroorzaakt door *Chlamydomphila abortus**

Er zijn 358 serummonsters verzameld op 6 *Chlamydomphila*-positieve schapenbedrijven en 311 monsters op 4 *Chlamydomphila*-positieve geitenbedrijven van door *Chlamydomphila abortus* geaborteerde dieren of van dieren uit het cohort van de geaborteerde dieren. Alle serummonsters zijn opgeslagen bij -20°C . Vervolgens zijn de sera onderzocht binnen het R&D laboratorium van GD met de in fase I geselecteerde CIV-ELISA (Elisa - CIV-test ovis *Chlamydia* PS-HIPRA) volgens instructies van de fabrikant.

Schapenbedrijven met een abortus historie zonder duidelijke diagnose

Er zijn 1170 serummonsters verzameld op 23 bedrijven met een al langer bestaand abortusprobleem. Alle serummonsters zijn opgeslagen bij -20°C . Vervolgens zijn de sera

onderzocht binnen het R&D laboratorium van GD met de in fase I geselecteerde CIV-ELISA (Elisa - CIV-test ovis Chlamydia PS-HIPRA) volgens instructies van de fabrikant.

Geitenbedrijven met een abortus historie zonder duidelijke diagnose

Er zijn 1000 serummonsters verzameld op 14 bedrijven met een al langer bestaand abortusprobleem. Alle serummonsters zijn opgeslagen bij -20°C . Vervolgens zijn de sera onderzocht binnen het R&D laboratorium van GD met de in fase I geselecteerde CIV-ELISA (Elisa - CIV-test ovis Chlamydia PS-HIPRA) volgens instructies van de fabrikant.

Kinderboerderijen

Er zijn 322 serummonsters verzameld op 20 kinderboerderijen met, over het algemeen, geen (bekende) abortus historie. Alle serummonsters zijn opgeslagen bij -20°C . Vervolgens zijn de sera onderzocht binnen het R&D laboratorium van GD met de in fase I geselecteerde CIV-ELISA (Elisa - CIV-test ovis Chlamydia PS-HIPRA) volgens instructies van de fabrikant.

te hebben gehad binnen een aangekochte en apart gehuisveste groep oaien. Binnen deze groep was de seroprevalentie 50%. Het verdient aanbeveling alle bevestigde bedrijven te classificeren naar recente of oudere infecties/abortusproblemen!

5. Verdere analyse en discussie is noodzakelijk om vast te stellen of en hoe deze ELISA inzetbaar is, al dan niet in combinatie met een ELISA voor Q-fever, voor koppeldiagnostiek en monitoring van *Chlamydomphila abortus* infecties bij kleine herkauwers. De omvang van de steekproeven, het percentage positieve monsters waarbij een bedrijf als geïnfecteerd wordt beschouwd, de meest optimale afkapwaarde van de ELISA, de noodzaak van een confirmatietest als WB etc. moeten hierbij nog worden geëvalueerd.

5.2.4 Analyse van data bij een hogere afkapwaarde van de CIV-ELISA

In fase 2 werden op schapen en geitenbedrijven met verhoogde abortuspercentages wisselende seroprevalenties gevonden, waarbij slechts een beperkt deel van de bedrijven op basis van bevestiging met WB als definitief besmet met *Chlamydomphila abortus* verklaard kon worden. Op de niet bevestigde bedrijven bleken relatief veel zwakpositieve ELISA resultaten gevonden te worden. Uit de ROC analyse blijkt, dat bij lichte verhoging van de afkapwaarde van de ELISA van 40% (conform instructies fabrikant) naar 50% de specificiteit van de ELISA verhoogd kan worden van 95 naar 98% voor schapen en van 91 naar 95% voor geiten. Het verlies aan gevoeligheid is daarbij beperkt en op aantoonbaar besmette bedrijven blijven de seroprevalenties nog steeds hoog (data in dit rapport niet getoond), terwijl met name voor schapenbedrijven de seroprevalenties op bedrijven waar de diagnose niet bevestigd kon worden over het algemeen aanzienlijk dalen (Tabel 15). Uit Tabel 15 kan bijvoorbeeld ook geconstateerd worden, dat bij een hogere afkapwaarde van de ELISA het aantal seronegatieve bedrijven toeneemt van 5 naar 8 (van de 22), terwijl ook het aantal bedrijven met een seroprevalentie van minder dan 5% toeneemt van 11 naar 15 (van de 22). Twee van de drie bevestigde bedrijven hebben echter nog steeds een seroprevalentie van meer dan 15%, waarbij voor één van deze twee bedrijven geldt dat de seroprevalentie – ook bij verhoogde afkapwaarde – in de groep aangekochte dieren waarin uitsluitend abortus optrad, nog steeds ruim 43 % was.

In de berekeningen voor het opzetten van een programma voor screening en certificering danwel een prevalentie-onderzoek is dan ook uitgegaan van het gebruik van deze ELISA bij de verhoogde afkapwaarde van 50%. Dit biedt tevens als voordeel dat er zo weinig mogelijk gebruik gemaakt hoeft te worden van de WB test als bevestigingstest.

5.3 Archiveren van verzamelde bloedmonsters voor nader onderzoek

Veel van de ziektekiemen die abortus veroorzaken bij schaaap en geit zijn voor de mens niet zonder risico. Daarbij gaat het bijvoorbeeld om de volgende ziektekiemen: *Toxoplasma gondii*, *Chlamydomphila abortus*, *Listeria monocytogenes*, *salmonella* spp., *campylobacter* spp., *brucella* spp., *Yersinia pseudotuberculosis*, *Leptospira hardjo* en *Coxiella burnetii*. Op verzoek van VWA/RVV zijn de bloedmonsters die in het kader van dit onderzoeksproject zijn verzameld voorlopig bewaard, vooral met het oog op eventueel nader onderzoek op Q-fever, een zoönose veroorzaakt door *Coxiella burnetii*. Deze ziektekiem staat in toenemende mate in de belangstelling en onderzoek naar deze kiem in relatie tot het rund is inmiddels gestart. De daar inmiddels verzamelde informatie kan een vliegende start bij schaaap en geit mogelijk maken. Na afloop van dit project moet duidelijk worden of dit of eventueel ander onderzoek ook daadwerkelijk wordt uitgevoerd.

5.4. Het formuleren van een voorstel voor een eventuele vervolgaanpak

Mede op basis van de informatie uit dit project wordt een aantal voorstellen geformuleerd. Dit betreft het schrijven van een protocol voor de aanpak van *Chlamydomphila abortus* op een besmet bedrijf en het opzetten van de contouren van een *Chlamydomphila abortus* onverdacht programma.

5.4.1 Protocol voor de aanpak van Chlamydomphila abortus op een besmet bedrijf.

Het doel van dit protocol is tweeledig. In de eerste plaats heeft zo'n protocol tot doel om de schade veroorzaakt door Chlamydomphila abortus op een besmet bedrijf zoveel mogelijk te beperken door het aantal abortusgevallen zo laag mogelijk te houden. Daarnaast moet, niet alleen op schapen- en geitenbedrijven maar vooral op kinderboerderijen, het risico voor de volksgezondheid zo veel mogelijk worden beperkt. Een protocol heeft ook als doel, indien mogelijk, om Chlamydomphila abortus op het bedrijf uit te bannen.

Bij het opstellen van dit protocol hebben we de volgende uitgangspunten gehanteerd:

- het schapen- of geitenbedrijf of de kinderboerderij heeft of heeft te maken gehad met abortusgevallen en de diagnose is bevestigd middels sectie (en specifiek vervolgonderzoek met bijvoorbeeld IFT op nageboorte of vrucht) of serologisch onderzoek;
- het protocol is dus niet bedoeld om op basis van uitslagen van serologisch onderzoek alleen, dus zonder klinische abortusproblemen, tot actie over te gaan. Daarvoor is nader onderzoek nodig. Dit heeft vooral te maken met de waarneming dat op een aantal bedrijven Chlamydomphila abortus seropositieve dieren voorkomen die op sectie niet kunnen worden bevestigd maar waarbij op sectie de diagnose Q-fever wordt gesteld en bevestigd (specifieke IPT, immunoperoxidase test) op nageboorte of vrucht). Indien op een bedrijf alleen sprake is van serologisch onderzoek met voor Chlamydomphila abortus serologisch positieve uitslagen is het aan te bevelen eerst de diagnose te bevestigen door heel gericht vruchten en nageboorte in te sturen. De diagnose op basis van placentaveranderingen en bevestiging met IFT wordt gezien als de definitieve diagnose. Mogelijk zou hier in de toekomst ook een rol weggelegd kunnen zijn voor een Chlamydomphila abortus PCR of een Coxiella burnetii PCR. In de hier beschreven situatie dient wel een waarschuwing uit te gaan voor het risico voor zwangere vrouwen (zie hierna).

Op een besmet bedrijf wordt het volgende protocol geadviseerd (lees voor schaaap ook geit):

- direct volgend op een bevestiging van een eerste uitbraak alle nog drachtige dieren tot het einde van de dracht – indien van toepassing herhaaldelijk - behandelen met oxytetracycline (20 mg/kg, parenteraal) met een interval van 10 tot 14 dagen;
- een strikte scheiding en hygiëne toepassen: tijdens de aflamperiode moeten drachtige dieren en dieren die hebben geaborteerd van elkaar worden gescheiden. Het gaat hierbij niet alleen om direct diercontact maar ook om indirect contact; in de praktijk zal hier meestal niet veel van terecht komen;
- vóór de dekperiode volgend op een abortusuitbraak **alle** dieren vaccineren (Ovilis enzovax®) volgens het schema van de fabrikant; zeker als de eerste abortusgevallen laat in het aflamseizoen optreden zal een gedeelte van de drachtige dieren wel worden geïnfecteerd maar niet aborteren. De fabrikant beveelt op de bijsluiters aan om een jaarlijkse herhalingsenting toe te dienen aan alle dieren, niet korter dan 4 weken voor de geplande dekdatum. Ovilis enzovax® is het enige in Nederland geregistreerde vaccin met de indicatie "actieve immunisatie bij de preventie van abortus veroorzaakt door Chlamydia psittaci infecties", met als doeldier schaaap. Bij geiten zijn minder gegevens bekend met betrekking tot de effectiviteit van dit vaccin, maar het kan volgens de zelfde vaccinatieschema's worden toegepast onder de "off label use" voorwaarden;
- bij voorkeur gedurende minimaal één jaar geen ooi- of geitelammeren aanhouden die geboren zijn in het jaar dat de eerste abortusuitbraak zich voordeed; hetzelfde geldt voor eenjarigen die niet hebben afgelamd (overlopers); indien de eerste uitbraak optreedt aan het eind van de aflamperiode kunnen het jaar daarop de ooiën of geiten die tijdens de eerste uitbraak niet hebben geaborteerd, alsnog verwerpen;
- aan te kopen dieren eerst vaccineren voor zij aan het koppel worden toegevoegd; geen aankoop is de beste preventieve maatregel;

- ooiën of geiten die hebben geaborteerd het dekseizoen daarop volgend apart weiden of huisvesten en laten dekken door een ram of bok die geen andere ooiën of geiten dekt; een deel van deze ooiën of geiten kan namelijk tijdens de bronst opnieuw *Chlamydomphila abortus* uitscheiden en de kans is aanwezig dat rammen of bokken deze infectie van dier naar dier overbrengen;
- tijdens de aflamperiode volgend op de eerste abortusuitbraak kan het zinvol zijn drachtige dieren vanaf 90 dagen dracht met een interval van 10 tot 14 dagen te behandelen met oxytetracycline (20 mg/kg, parenteraal), tot het einde van de dracht. Op melkleverende bedrijven kan dit een probleem zijn in verband met wachttijden.
- Zowel voor de toepassing van vaccinatie als voor het inzetten van oxytetracycline geldt dat het resultaat niet is gegarandeerd. Toepassing van antibiotica vermindert het aantal abortusgevallen en verlaagt de infectiedruk. Het inzetten van antibiotica geeft geen herstel van beschadigingen die al zijn opgetreden.
- Aanwezigheid van *Chlamydomphila abortus* op een bedrijf is een risico voor de zwangere vrouw. Zij zal direct en indirect contact met verwerpende dieren moeten vermijden. Infectie van de zwangere vrouw kan namelijk gepaard gaan met verlies van de vrucht en ernstig ziek zijn en in enkele gevallen zelfs met het overlijden van de vrouw. Mensen die assistentie verlenen bij de geboorte van een lam op een bedrijf met abortusproblemen doen er goed aan om nadien de handen goed te wassen en te ontsmetten. Daarvoor zijn gemakkelijk toe te passen goede desinfectiemiddelen voorhanden.

Als alternatief voor het bovenomschreven protocol zou de houder ook kunnen worden gewezen op de mogelijkheid alle dieren te ruimen (slachten) en het bedrijf te herbevolken met dieren afkomstig van bedrijven zonder abortusproblematiek en met uitsluitend seronegatieve dieren (CIV-chlamydomphila ELISA), dus dieren afkomstig van onverdachte bedrijven. Dit kan zeker in overweging worden genomen worden als er naast *Chlamydomphila abortus* ook nog andere aandoeningen spelen zoals zwoegerziekte, CL, CAE of scrapie.

Vraagtekens

Het is voor een besmet bedrijf niet eenvoudig om de besmetting definitief kwijt te raken. Een behandeling bestaat daarom uit een combinatie van maatregelen. Bij het communiceren over bovenstaand protocol is het goed ook de aandacht te vestigen op het volgende:

- Als een eerste abortusuitbraak begint aan het eind van de dracht – dat wil zeggen in de periode dat er dieren zijn die minder dan 5 tot 6 weken hebben te gaan tot het einde van de dracht – kan een infectie bij die dieren in de regel niet meer leiden tot een abortus. Dergelijke dieren kunnen het jaar daarop alsnog aborteren.
- Infectie van de ram of bok kan leiden tot een orchitis (testikelontsteking) en in de acute fase van de infectie kan *Chlamydomphila abortus* voorkomen in het sperma. Een ooi of geit die heeft geaborteerd kan tijdens de bronst ook *Chlamydomphila abortus* uitscheiden. Op basis hiervan raden wij aan om rammen of bokken die geaborteerde ooiën of geiten hebben gedekt geen andere groepen dieren te laten dekken. Het is de vraag of het wenselijk is dat een schapen- of geitenhouder die *Chlamydomphila abortus* op zijn bedrijf heeft mannelijke dieren verkoopt voor de dekdienst. Ondanks het feit dat in de literatuur wordt aangegeven dat mannelijke dieren een ondergeschikte rol spelen in de epidemiologie en verspreiding van de infectie tussen bedrijven lijken hieraan toch risico's te kleven zeker als het gaat om oudere rammen of bokken die op het herkomst bedrijf hebben gedekt.

5.4.2 Opzetten *Chlamydomphila abortus* onverdacht programma

Het doel van dit programma zou zodanig moeten zijn dat een schapen- of geitenhouder of een kinderboerderij met dit programma aan kan tonen dat het bedrijf vrij is van de infectie. Op basis van de karakteristieken van de hier gekozen test zou een eerste bedrijfsscreening er als volgt uit kunnen zien:

- een deelnemend bedrijf voert een serologische screening uit afhankelijk van de bedrijfsomvang (zie Tabel 10) van maximaal 29 vrouwelijke dieren. Het gaat daarbij om de volgende dieren:

- in ieder geval de dieren die hebben verworpen;
- de dieren die gedekt zijn, maar gust zijn gebleven;
- aangevuld met dieren die normaal hebben afgelamd tot een aantal van 29 dieren.

Als bovenstaande serologische screening geen positieve gevallen oplevert kunnen resterende dieren die afgelamd hebben worden onderzocht op basis van een minimale seroprevalentie van 5% en een betrouwbaarheidsinterval van 95% (zie Tabel 9). Een bedrijf zonder een abortushistorie en een volledig negatieve serologische screening zou *Chlamydophila* onverdacht kunnen worden genoemd. Op basis van deze uitgangssituatie zouden bedrijven ook gecertificeerd kunnen worden. Hiervoor worden deelnemende bedrijven jaarlijks gecontroleerd volgens bovenstaande voorwaarden middels een certificerings-screening op basis van een minimale seroprevalentie van 10% en een betrouwbaarheidsinterval van 95% (zie Tabel 9). Daarnaast is het raadzaam eventueel alle geaborteerde lammeren inclusief nageboorten voor sectie aan te bieden aan GD. Met name voor kinderboerderijen zou zo'n systeem van certificering ingepast kunnen worden in het kwaliteitssysteem dat nu wordt ontwikkeld.

5.4.3 Opzetten van een prevalentieonderzoek voor *Chlamydophila abortus*

Op basis van de testkarakteristieken en de eerste indruk van de mate van voorkomen van *Chlamydophila abortus* op de aan dit onderzoek deelnemende bedrijven kan een goede schatting worden gedaan voor een prevalentieonderzoek. Op een totaal van ongeveer 51.000 geregistreerde bedrijven met schapen en geiten zou zo'n prevalentieonderzoek er als volgt uit kunnen zien:

Voor diagnostiek op bedrijfsniveau is gekozen voor de CIV-Elisa met als testkarakteristieken een sensitiviteit van 66% en een specificiteit van 98% voor schapen en een sensitiviteit van 67% en een specificiteit van 95% voor geiten. Op basis van deze testkarakteristieken en uitgaande van een minimale seroprevalentie van 15% binnen het bedrijf wordt, afhankelijk van de koppelgrootte en het aantal reageerders, bepaald of een bedrijf positief of negatief is voor *Chlamydophila* (zie Tabel 10).

Hierbij is geen rekening gehouden om ter confirmatie in serie te testen met een tweede test (WB of PCR) met een hoge specificiteit. Hiermee wordt de grens van het aantal reageerders voor een voldoende hoge bedrijfsspecificiteit verlaagd, waardoor de bedrijfssensitiviteit zal stijgen. Uitgaande van totaal 37.000 bedrijven met schapen, 19.000 bedrijven met geiten en ca. 400 bekende kinderboerderijen (geregistreerd bij SKBN) is een globaal voorstel voor een prevalentieonderzoek beschreven (zie Tabel 11, 12, 13 en 14). Het aantal te onderzoeken bedrijven is gebaseerd op de seroprevalentie van ca. 15% *Chlamydophila* besmette schapen- en geitenbedrijven uit dit pilot-onderzoek (fase 2). Voor de kinderboerderijen zijn twee voorstellen (Tabel 13 en 14) beschreven waarbij als uitgangspunt voor de seroprevalentie besmette bedrijven 15% (variatie 5%) en 5% (variatie 2%) is genomen. Deze laatste is uitgewerkt omdat uit dit pilot-onderzoek de seroprevalentie voor *Chlamydophila* op de kinderboerderijen duidelijk lager was dan voor de schapen- en geitenbedrijven, respectievelijk 5% ten opzichte van 15%.

5.4.4 Het ontwikkelen van aangepaste of nieuwe technieken

Op basis van de resultaten van dit project zal na afloop daarvan overleg moeten plaatsvinden over de wenselijkheid bestaande technieken aan te passen of nieuwe te ontwikkelen waarmee onvolkomenheden in bestaande technieken kunnen worden opgevangen. Daarbij gaat het niet alleen om verbetering van de bestaande diagnostiek maar vooral ook om een betere risicobeoordeling bij de mens mogelijk te maken.

De gouden standaard voor het zo gevoelig mogelijk aantonen van het *Chlamydophila* agens is altijd de kweek op specifieke cellijnen of eieren geweest. Dit is echter een bewerkelijke, langdurige en niet ongevaarlijke procedure, gezien het zoönotisch potentieel van deze micro-organismen. Bovendien vereist de procedure infectieuze en dus levende micro-

organismen, waardoor verse monsters en een goede logistiek voor het monstertransport vereist zijn. Hieraan kan in de humane situatie goed voldaan worden, maar in de veterinaire situatie vaak niet. Daarom blijken in veterinaire laboratoria een antigeen-ELISA of Immuno Fluorescentie Test (IFT) vaak een hogere gevoeligheid te hebben dan de kweek (Rodolakis A, Salinas J, Papp J. Recent advances on ovine chlamydial abortion. Vet Res. 1998 May-Aug; 29(3-4): 275-88. Review). Bij GD wordt sinds jaar en dag een IFT gebruikt voor de diagnose stelling op verworpen vruchten en nageboortes.

Nog meer voordelen biedt de zogenaamde Polymerase Chain Reaction (PCR). Deze techniek is snel, niet afhankelijk van levende micro-organismen en zeer gevoelig. Ook door de internationale organisatie OIE (Office Internationale des Epizootics) wordt de PCR als beloftevol genoemd voor de diagnostiek van Chlamydomphila abortus bij schapen en runderen. De laatste jaren zijn ook diverse artikelen gepubliceerd waarin PCR's beschreven worden waarmee ofwel alle Chlamydomphila species aangetoond worden ofwel specifiek Chlamydomphila abortus aangetoond kan worden. Ook is recent een commerciële PCR op de markt gekomen (Adiagene) voor het aantonen van Chlamydomphila abortus bij herkauwers. Op zich is een PCR geen echt goedkope techniek. Door VLA in Weybridge wordt de test bijvoorbeeld aangeboden voor 25 Pond, globaal 40 Euro. Gezien de potentieel hoge gevoeligheid zou de test echter gebruikt kunnen worden voor enerzijds een verbetering van de diagnostiek op verworpen vruchten en nageboortes en anderzijds voor een snelle diagnostiek (early warning) bij de eerste gevallen van abortus door het nemen van bijvoorbeeld vaginale swabs bij ooien die verworpen hebben. Mogelijk zouden bij meerdere verwerpers swabs gepoold onderzocht kunnen worden om de kosten te drukken. Een snelle diagnose biedt de mogelijkheid snel maatregelen te treffen. Dit is zowel voor de volksgezondheid als voor de bedrijfsvoering van belang!

Tevens biedt de PCR de mogelijkheid om spermamonsters van mogelijk geïnfecteerde rammen te onderzoeken en kunnen met de PCR en aanverwante technieken stammen getypeerd worden. Dit biedt de mogelijkheid om de epidemiologie van Chlamydomphila abortus binnen en tussen bedrijven beter te bestuderen.

5.5 Voorstel onderzoek Q-fever

Op verzoek van VWA/RVV zijn de bloedmonsters die in het kader van dit onderzoeksproject zijn verzameld voorlopig bewaard, vooral met het oog op eventueel onderzoek op Q-fever, een zoönose veroorzaakt door Coxiella burnetii. In Duitsland werd bij analyse van Q-fever data over de periode 1947-1999 onder andere gerapporteerd dat schapen het vaakst betrokken leken te zijn bij transmissie van Q-fever naar mensen.

Binnen GD is inmiddels het validatieonderzoek van twee Q-fevertesten bij het rund bijna afgerond. In dit onderzoek is de seroprevalentie van Q-fever op een vrij groot aantal melkveebedrijven bepaald. Tevens zijn tankmelkmonsters van deze bedrijven onderzocht, is de relatie tussen tankmelkresultaten en seroprevalentie bestudeerd en is gekeken naar de mate van overeenkomst van beide testen. De resultaten van beide testen kwamen vrij goed overeen, er was ook een duidelijke correlatie tussen tankmelkresultaten en percentage seropositieve dieren op het bedrijf. Verder wordt hier niet op de resultaten ingegaan aangezien deze nog gerapporteerd moeten worden.

Beide ELISAs (ELISA Q Fever serum screening van de firma Pourquoi en de Chekit-Q-Fever ELISA kit van de firma Bommeli (overgenomen door IDEXX) zijn geschikt voor het onderzoeken van serum, plasma en melkmonsters van kleine en grote herkauwers, dus ook voor schapen en geiten. Aangezien er geen goede gouden standaard is voor de aan- en met name de afwezigheid van Q-fever op een bedrijf is het moeilijk goede data te verzamelen voor het bepalen van sensitiviteit en specificiteit van de testen. De "klassieke" serologische test is de CBR, die moeilijk te standaardiseren is en over het algemeen niet als erg specifiek beschouwd wordt. Pourquoi geeft een indicatie voor de specificiteit (op basis van bedrijven zonder enige aanwijzing voor Q-fever) van 98.2% en een relatieve sensitiviteit die iets hoger ligt dan de CBR. Bommeli geeft een indicatie voor de specificiteit van 100% (op slechts 44 sera getest) met een relatieve sensitiviteit die iets hoger ligt dan de CBR.

De te verwachten seroprevalenties op met Q-fever geïnfecteerde runderbedrijven (Duits overzichtartikel) die met ELISA onderzocht werden waren hoger dan 5% met hoge seroprevalenties (50-75%) op probleembedrijven. De te verwachten seroprevalenties op met Q-fever geïnfecteerde schapenbedrijven (Duits overzichtartikel) die met ELISA onderzocht waren en gerelateerd konden worden aan humane uitbraken waren 50-75%. Samenvattend zijn er dus twee ELISAs beschikbaar met vrij goede testkarakteristieken voor het onderzoeken van de seroprevalentie van Q-fever op schapen- en geitenbedrijven.

Gegeven het bovenstaande zijn er enkele mogelijkheden:

1. De verzamelde monsters uit het Chlamydomphila abortus project worden met een nader te kiezen Q-fever ELISA onderzocht. De onderzoeksresultaten zeggen dan alleen iets over deze monsters.
2. Een eventueel uit te voeren prevalentie-onderzoek op Chlamydomphila abortus (zie elders in aanbevelingen) zou gecombineerd kunnen worden met een prevalentie-onderzoek op Q-fever. De nu verzamelde monsters zouden dan kunnen worden gebruikt om de te kiezen test af te stemmen. In het kader van het laatste is het zinvol daarbij ook de monsters te onderzoeken van de beide geitenbedrijven waar Q-fever abortus is bevestigd. Op twee geitenbedrijven die een positieve serorespons vertoonden in de CIV-ELISA is later bij sectie op verworpen vruchten Q-fever vastgesteld. Het is wenselijk op deze bedrijven een aantal keren in de tijd bloedmonsters te verzamelen en te onderzoeken, niet alleen op Chlamydomphila abortus maar ook op Coxiella burnetii. De informatie die aldus wordt verkregen is van grote waarde om uitspraken te kunnen doen over de specificiteit van beide testen.
3. GD bewaart de verzamelde monsters een jaar extra en benut komend aflamseizoen om bij schapen en geiten met abortusproblemen onderzoek op Q-fever uit te voeren. Op bedrijven waarbij op sectie Q-fever wordt bevestigd wordt bloed verzameld om een echte testvalidatie uit te voeren. Pas daarna vindt vervolgonderzoek plaats op de verzamelde monsters en daarna eventueel prevalentieonderzoek.
4. GD stopt hiermee het onderzoek, gooit de verzamelde monsters weg en gebruikt de beschikbare test op Chlamydomphila abortus op bedrijven die daarom vragen. Nader onderzoek naar Q-fever vindt niet plaats.

5.6 Voorstel overig vervolgonderzoek

Na de vergelijking van de verschillende testen in de eerste fase van het onderzoek is in de tweede fase met deze gekozen test een eerste inventarisatie uitgevoerd op schapen- en geitenbedrijven met een abortushistorie waar de oorzaak van de abortus niet was vastgesteld en op kinderboerderijen. De positief bevonden bedrijven uit de tweede fase vertoonden een lagere serologische respons dan de positieve bedrijven uit de eerste fase. Dit roept de vraag op of de tijd tussen het optreden van abortus en het afnemen van bloedmonsters voor serologisch onderzoek van invloed is op de serologische respons. Het zou zinvol zijn om een aantal besmette bedrijven dieren die hebben verworpen, in de tijd te volgen om aldus vast te stellen of het interval tussen abortus en bloedafname van invloed is op de serologische respons.

6.1 Bijlage I

Abortus veroorzaakt door Chlamydomphila abortus

De naam van de veroorzakende bacterie is recentelijk veranderd. Chlamydomphila abortus werd tot voor kort Chlamydia psittaci genoemd.

Verwekker

Chlamydomphila abortus is een bacterie met een afwijkende vermeerderingscyclus. De bacteriën vermeerderen zich uitsluitend in levende cellen en vormen daar elementairlichaampjes, de infectieuze vorm van deze verwekker. Buiten het lichaam zijn de elementairlichaampjes bij lage temperaturen enkele dagen infectieus.

Verloop

De incubatietijd bedraagt in de regel minimaal 5 à 6 weken. Ook bij dieren die aan het begin van de dracht worden geïnficeerd, treedt abortus op in het laatste deel van de dracht. Veranderingen aan de placenta treden niet op voor de 90ste dag van de dracht. Vindt de infectie plaats op een later tijdstip van de dracht, dan blijft de infectie vaak verborgen in het dier aanwezig en kan de volgende dracht leiden tot abortus. Chlamydomphila abortus kan het eerste jaar na introductie op een bedrijf tot grote problemen leiden. Daarbij treden niet alleen gevallen van abortus op maar kunnen ook lammeren vroeg, maar dood of levend maar zwak worden geboren. In het eerste jaar van infectie treedt abortus op bij dieren van alle leeftijden. Daarna treedt een stabilisatie van de problemen op en vindt op termijn abortus bijna alleen plaats bij dieren die voor de eerste keer werpen en bij aangekochte dieren. De infectie blijft in het koppel bestaan maar leidt bij dieren die geaborteerd hebben tot een

die geaborteerd hebben, is daarom niet nodig. Uitscheiding van de verwekker vindt plaats met de geboorte van de vrucht en met de scheidingsvloeiing gedurende verscheidene dagen. Deze uitscheiding kan enkele dagen voor de abortus optreedt al beginnen en kan tot twaalf dagen na de abortus doorgaan. Oeien die hebben geaborteerd kunnen tijdens de bronst weer Chlamydomphila abortus uitscheiden. Het is niet bekend hoe lang dit het geval blijft.

Hoe een abortusuitbraak op een bedrijf direct na introductie verloopt, hangt af van het tijdstip waarop de infectie wordt geïntroduceerd. Als dat in een zodanig vroeg stadium van de dracht plaatsvindt dat het besmette dier niet alleen aborteert maar ook de drachtige koppelgenoten nog kan besmetten met abortus als gevolg dan kan er sprake zijn van een echte abortusstorm waarbij meer dan 50% van de dieren aborteert. Als het eerste geval van een Chlamydomphila abortus laat in het aflamseizoen optreedt, dan blijft het aantal abortusgevallen het jaar van introductie in de regel beperkt. In dat geval is het mogelijk dat een aantal schapen of geiten in het gevoelige stadium van de dracht verkeert en datzelfde jaar nog aborteert. Is dat niet het geval, dan kunnen van de dieren die dan de infectie

6.2 Bijlage II: Figuren en tabellen behorend bij resultaten fase I en fase II van dit project

Tabel 1. Sensitiviteit/specificiteit op basis van alle data, waarbij alle schapen van besmette bedrijven verondersteld worden besmet te zijn

Dubieuze resultaten voor 50 % als positief en voor 50 % als negatief geteld

<i>Schapen</i>	<i>CFT SAC</i>	<i>CIV ELISA</i>	<i>Bommeli ELISA</i>	<i>Pourquier ELISA</i>
<i>Sensitiviteit t.o.v. CFT/WB</i>	80,2%	81,0%	87,9%	78,4%
<i>Seroprevalentie besmette bedrijven</i>	59,0%	59,6%	76,1%	56,4%
<i>Specificiteit</i>	95,0%	95,0%	65,0%	84,0%

Dubieuze resultaten als negatief geteld

<i>Schapen</i>	<i>CFT SAC</i>	<i>CIV ELISA</i>	<i>Bommeli ELISA</i>	<i>Pourquier ELISA</i>
<i>Sensitiviteit t.o.v. CFT/WB</i>	69,0%	81,0%	84,5%	77,6%
<i>Seroprevalentie besmette bedrijven</i>	44,7%	59,6%	73,4%	54,3%
<i>Specificiteit</i>	99,0%	95,0%	69,0%	85,0%

Dubieuze resultaten als positief geteld

<i>Schapen</i>	<i>CFT SAC</i>	<i>CIV ELISA</i>	<i>Bommeli ELISA</i>	<i>Pourquier ELISA</i>
<i>Sensitiviteit t.o.v. CFT/WB</i>	91,4%	81,0%	91,4%	79,3%
<i>Seroprevalentie besmette bedrijven</i>	73,4%	59,6%	78,7%	58,5%
<i>Specificiteit</i>	91,0%	95,0%	61,0%	83,0%

Toelichting bij Tabel 1: de CFT, Bommeli ELISA en Pourquier ELISA kennen een dubieus gebied in de testinterpretatie. Dubieuze uitslagen zijn altijd lastig te interpreteren en kunnen bijvoorbeeld ofwel: 1) voor de helft als positief en voor de helft als negatief beoordeeld worden, 2) als negatief beoordeeld worden, 3) als positief beoordeeld worden. Wanneer dubieuze uitslagen b.v. in plaats van positief als negatief beoordeeld worden gaat dit ten koste van de gevoeligheid (sensitiviteit) van een test. Daarentegen wordt de specificiteit van de test hoger. Voor b.v. de CFT daalt de sensitiviteit van 91.4 % naar 69.0 %, terwijl de specificiteit stijgt van 91 % naar 99 %. Voor de CIV ELISA speelt deze discussie niet, omdat de test alleen een positieve dan wel negatieve uitslag kent.

Tabel 2. Sensitiviteit/specificiteit op basis van alle data, waarbij alle geiten van besmette bedrijven verondersteld worden besmet te zijn

Dubieuze resultaten voor 50 % als positief en voor 50 % als negatief geteld

<i>Geiten</i>	<i>CFT SAC</i>	<i>CIV ELISA</i>	<i>Bommeli ELISA</i>	<i>Pourquier ELISA</i>
<i>Sensitiviteit t.o.v. CFT/WB</i>	83,7%	81,6%	71,4%	88,8%
<i>Seroprevalentie besmette bedrijven</i>	51,5%	49,0%	45,0%	57,0%
<i>Specificiteit</i>	93,0%	91,0%	86,0%	88,0%

Dubieuze resultaten als negatief geteld

<i>Geiten</i>	<i>CFT SAC</i>	<i>CIV ELISA</i>	<i>Bommeli ELISA</i>	<i>Pourquier ELISA</i>
<i>Sensitiviteit t.o.v. CFT/WB</i>	71,4%	81,6%	71,4%	85,7%
<i>Seroprevalentie besmette bedrijven</i>	37,0%	49,0%	44,0%	54,0%
<i>Specificiteit</i>	100,0%	91,0%	89,0%	88,0%

Dubieuze resultaten als positief geteld

<i>Geiten</i>	<i>CFT SAC</i>	<i>CIV ELISA</i>	<i>Bommeli ELISA</i>	<i>Pourquier ELISA</i>
<i>Sensitiviteit t.o.v. CFT/WB</i>	95,9%	81,6%	71,4%	91,8%
<i>Seroprevalentie besmette bedrijven</i>	66,0%	49,0%	46,0%	60,0%
<i>Specificiteit</i>	86,0%	91,0%	83,0%	88,0%

Toelichting bij Tabel 2: de CFT, Bommeli ELISA en Pourquier ELISA kennen een dubieus gebied in de testinterpretatie. Dubieuze uitslagen zijn altijd lastig te interpreteren en kunnen bijvoorbeeld ofwel: 1) voor de helft als positief en voor de helft als negatief beoordeeld worden, 2) als negatief beoordeeld worden, 3) als positief beoordeeld worden. Wanneer dubieuze uitslagen b.v. in plaats van positief als negatief beoordeeld worden gaat dit ten koste van de gevoeligheid (sensitiviteit) van een test. Daarentegen wordt de specificiteit van de test hoger. Voor b.v. de CFT daalt de sensitiviteit van 95.9 % naar 71.4 %, terwijl de specificiteit stijgt van 86.0 % naar 100 %. Voor de CIV ELISA speelt deze discussie niet, omdat de test alleen een positieve dan wel negatieve uitslag kent.

Tabel 3. Percentages seropositieve dieren op bedrijfsniveau

Besmet Geit	EAE CFT	CIVtest	Bommeli	Pourquier
S-gb	48%	36%	56%	42%
B-gb	6%	12%	12%	30%
M-gb	64%	56%	36%	68%
D-gb	88%	92%	76%	88%
Besmet Schaap				
N-sb	83%	80%	93%	80%
vS-sb	34%	58%	74%	34%
B-sb	55%	40%	63%	30%
W-sb	58%	55%	78%	70%
V-sb	70%	70%	78%	73%
Onverdacht geit				
vT-go	10%	10%	25%	90%
K-go	10%	10%	15%	0%
L-go	5%	10%	10%	0%
S-go	30%	30%	40%	20%
v.L-go	10%	30%	30%	10%
H-go	0%	0%	5%	0%
S-go	0%	0%	5%	0%
K-go	0%	0%	5%	0%
L-go	5%	0%	5%	0%
vRgo	5%	0%	0%	0%
Onverdacht schaap				
K-os	15%	10%	35%	10%
P-os	10%	10%	45%	20%
V-os	10%	10%	50%	30%
K-os	0%	20%	30%	10%
E-os	0%	0%	5%	15%
R-os	5%	0%	20%	15%
M-os	0%	0%	55%	30%
D-os	5%	0%	70%	0%
A-os	0%	0%	20%	20%
B-os	5%	0%	20%	10%

Tabel 4. Correlatiecoëfficiënten van de testuitslagen van de ELISA's in fase I

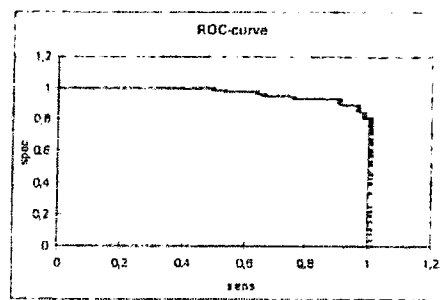
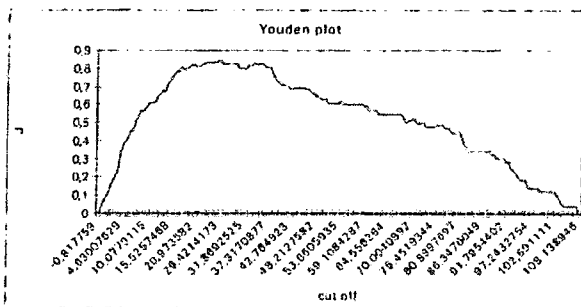
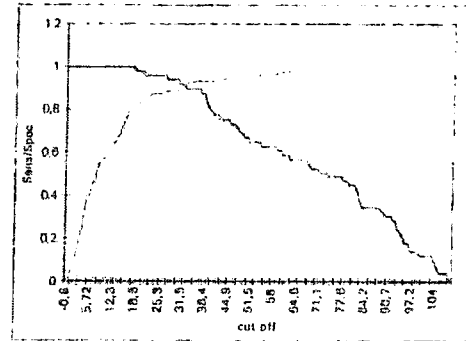
Geit	Pourquier ELISA	Bommeli ELISA
CIV ELISA	0,47	0,69
Pourquier ELISA		0,35
Schaap		
CIV ELISA	0,52	0,82
Pourquier ELISA		0,57

Een correlatiecoëfficiënt kan variëren van 0 (=geen correlatie) tot 1 (volledige correlatie). De kwantitatieve ELISA uitslagen (sterkte van het signaal) correleerden matig met elkaar, waarbij met name de Pourquier ELISA een slechte correlatie met de andere twee testen vertoonde. Voor schapen was de correlatie tussen de Bommeli ELISA en de CIV ELISA vrij hoog.

Figuur 1. Resultaten van de ROC analyse o.b.v. CFT/WB als gouden standaard

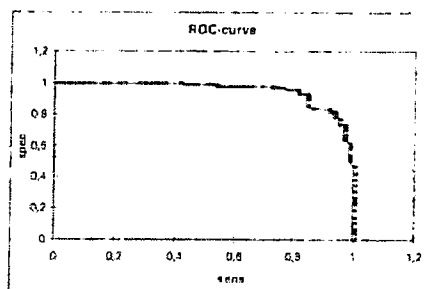
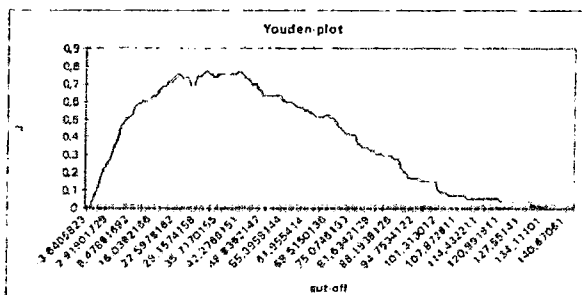
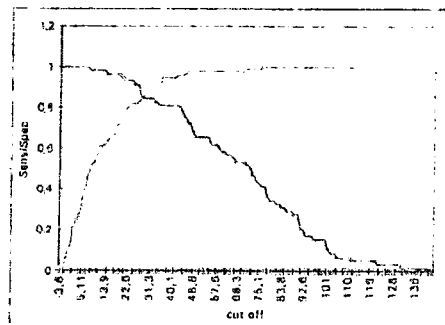
**Chlamydomphila CIV
Geit**

# of observations	139
# status =0	90
# status =1	49
Area under ROC-curve =	0.968707
standard error Area =	0.012022
P(Area > 0.5) =	9.7E-175
cutoff (Max. Youden) =	26,42142
min =	-0,27288
max =	108,8837
sens(cutoff) =	0,959184
spec(cutoff) =	0,886889



**Chlamydomphila CIV
Schaap**

# of observations	158
# status =0	100
# status =1	58
Area under ROC-curve =	0,952241379
standard error Area =	0,01562301
P(Area > 0.5) =	1,8525E-194
cutoff (Max. Youden) =	32,80163785
min =	-2,911737944
max =	142,8571429
sens(cutoff) =	0,844827586
spec(cutoff) =	0,93



Tabel 5. Vergelijking seroprevalenties Chlamydomphila abortus CIV ELISA in 1e fase en 2e fase van het project (in eerste fase alleen selectie getest).

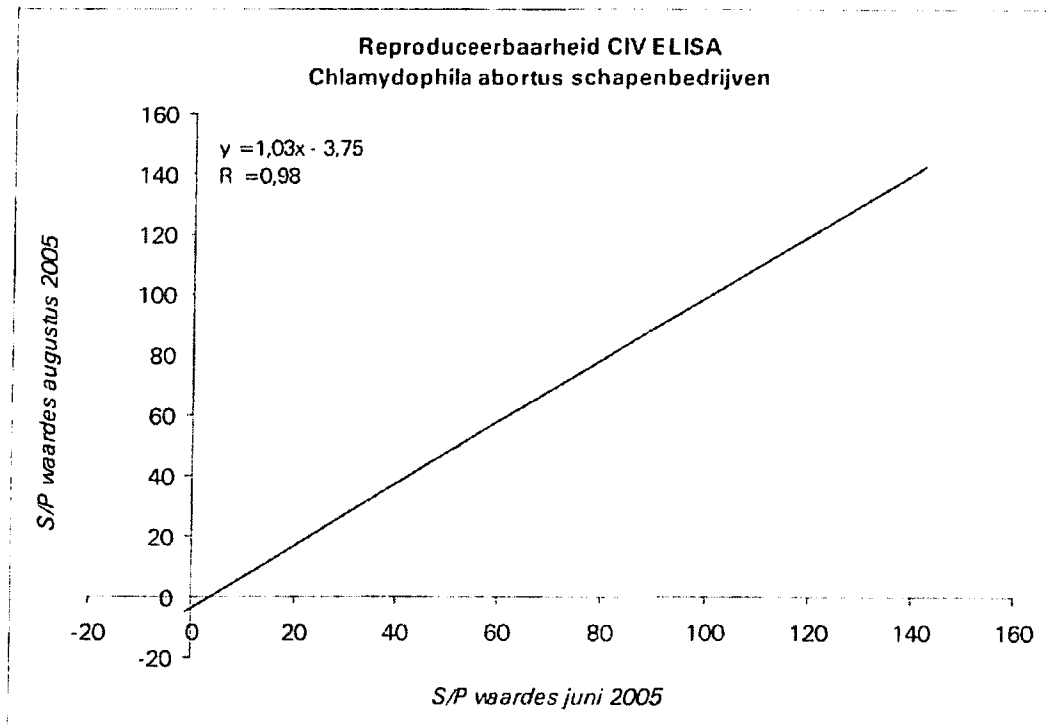
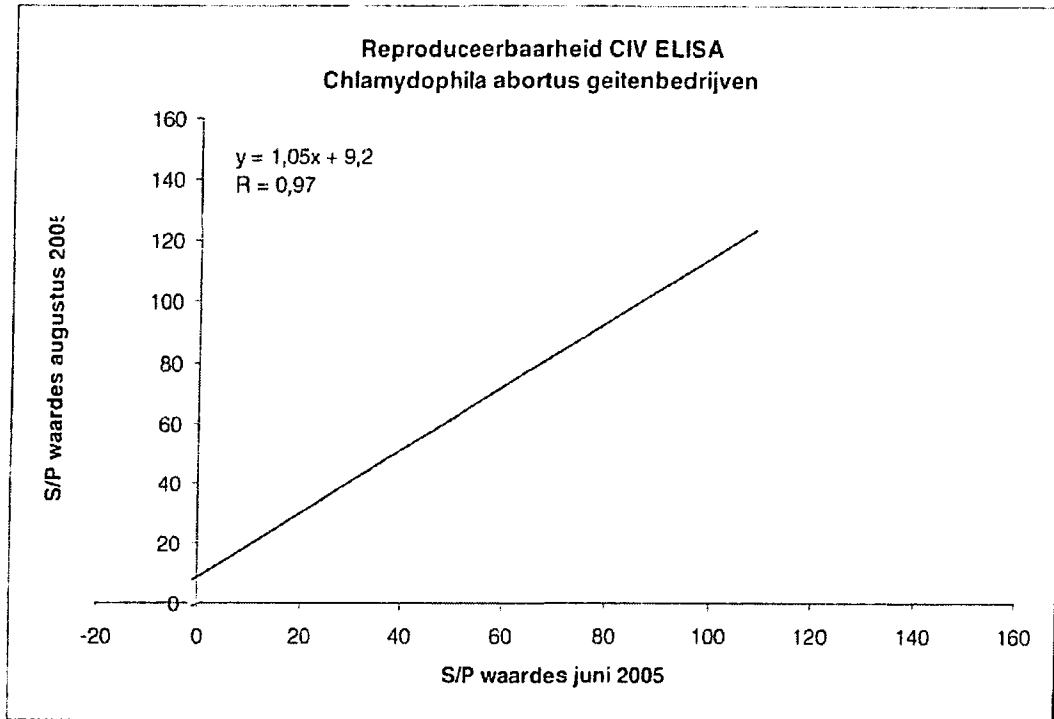
Besmette Schapenbedrijven

N-sb	Totaal	15	Aantal P	12	Seropreval.	80,0%
N-sb	Totaal	45	Aantal P	24	Seropreval.	53,3%
W-sb	Totaal	20	Aantal P	11	Seropreval.	55,0%
W-sb	Totaal	78	Aantal P	43	Seropreval.	55,1%
vS-sb	Totaal	19	Aantal P	11	Seropreval.	58,0%
vS-sb	Totaal	77	Aantal P	44	Seropreval.	57,1%
DWd-sb	Totaal		Aantal P		Seropreval.	
DWd-sb	Totaal	81	Aantal P	3	Seropreval.	3,7%
V-sb	Totaal	20	Aantal P	14	Seropreval.	70,0%
V-sb	Totaal	43	Aantal P	26	Seropreval.	60,5%
B-sb	Totaal	20	Aantal P	8	Seropreval.	40,0%
B-sb	Totaal	34	Aantal P	14	Seropreval.	41,2%

Besmette Geitenbedrijven

D-gb	Totaal	25	Aantal P	23	Seropreval.	92,0%
D-gb	Totaal	101	Aantal P	94	Seropreval.	93,0%
M-gb	Totaal	25	Aantal P	14	Seropreval.	56,0%
M-gb	Totaal	70	Aantal P	49	Seropreval.	70,0%
S-gb	Totaal	25	Aantal P	9	Seropreval.	36,0%
S-gb	Totaal	60	Aantal P	30	Seropreval.	50,0%
B-gb	Totaal	25	Aantal P	3	Seropreval.	12,0%
B-gb	Totaal	80	Aantal P	13	Seropreval.	16,3%

Figuur 2 en 3: reproduceerbaarheid van de CIV ELISA, resultaten van schapen- en geitenbedrijven met bevestigde Chlamydia abortus historie in twee verschillende testen.



Tabel 6. Overzicht testresultaten Chlamydomphila abortus CIV ELISA***Kinderboerderijen zonder bekende abortus historie***

Naam bedrijf	Totaal	Aantal P	Seroprevalentie	WB resultaten
Kb1	20	0	0,0%	n.v.t.
Kb2	20	0	0,0%	n.v.t.
Kb3	20	2	10,0%	NP
Kb4	13	0	0,0%	n.v.t.
Kb5	33	5	15,2%	NNNNN
Kb6	10	0	0,0%	n.v.t.
Kb7	20	3	15,0%	NNN
Kb8	20	0	0,0%	n.v.t.
Kb9	10	0	0,0%	n.v.t.
Kb10	9	0	0,0%	n.v.t.
Kb11	18	1	5,6%	N
Kb12	15	0	0,0%	n.v.t.
Kb13	6	0	0,0%	n.v.t.
Kb14	27	0	0,0%	n.v.t.
Kb15	21	0	0,0%	n.v.t.
Kb16	10	0	0,0%	n.v.t.
Kb17	15	0	0,0%	n.v.t.
Kb18	20	0	0,0%	n.v.t.
Kb 19	5	0	0,0%	n.v.t.
Kb20	10	0	0,0%	n.v.t.

In de kolom WB ziet u de uitslagen individueel weergegeven van de hoog positieve CIV-ELISA uitslagen die doorgestuurd zijn voor WB; N= negatief, P=positief.

Tabel 8. Overzicht testresultaten Chlamydomphila abortus CIV ELISA

Schapenbedrijven met verhoogd abortuspercentage

Naam bedrijf	Totaal	Aantal P	Seroprevalentie	WB resultaten
G-vaS	85	3	3,5%	NNN
N-vaS	44	1	2,3%	N
M-vaS	63	6	9,5%	NNNN
Z-vaS	66	6	9,1%	NNNN
W-vaS	15	0	0,0%	n.v.t.
S-vaS	14	0	0,0%	n.v.t.
vG-vaS	60	7	11,7%	NNNN
B-vaS	62	2	3,2%	NN
E-vaS	61	0	0,0%	n.v.t.
dJ-vaS	75	1	1,3%	N
K-vaS	80	16	20%	NNPP
KI-vaS	80	8	10%	NNNN
O-vaS	30	0	0,0%	n.v.t.
H-vaS	29	0	0,0%	n.v.t.
R-vaS	25	5	20,0%	NNNN
T-vaS	59	2	3,4%	NN
G-vaS	92	6	6,5%	NNNN
DvaS	76	1	1,3%	N
B-vaS	81	6	7,4%	NNNN
R-vaS	83	6	7,1%	NPPP
G-vaS	9	0	0,0%	n.v.t.
DvaBS	77	15	19,5%	PPPP
DvaBS*	30	15	50,0%	PPPP

*: Abortus alleen in aangekochte groep schapen, apart gehuisvest van oorspronkelijke bedrijfspopulatie. Seroprevalentie in deze aangekochte groep (n=30) is 50%.

**Tabel 9. Steekproefgrootte en sensitiviteit/specificiteit op bedrijfsniveau bij verschillende koppelgrootte en een betrouwbaarheidsinterval van 95%
CIV Elisa met een sensitiviteit van 66,0% en een specificiteit van 98,0%**

<i>Koppelgrootte</i>	<i>Steekproefgrootte Screening 5%</i>	<i>Steekproefgrootte Certificering 10%</i>
10	10	10
20	20	20
30	30	29
40	40	32
50	50	34
60	57	35
70	61	36
80	64	37
90	66	38
100	68	38
120	71	39
140	73	40
160	75	40
180	76	40
200	77	41
250	80	41
300	81	42
350	82	42
400	83	42
450	84	42
500	84	42
750	86	43
1000	86	43
> 1000	88	43

Tabel 10. Steekproefgrootte en sensitiviteit/specifiteit op bedrijfsniveau bij verschillende koppelgrootte bij een binnenbedrijfsprevalentie van 15%

CIV Elisa met een sensitiviteit van 66,0% en een specificiteit van 98,0% (schapen)

<i>Koppelgrootte</i>	<i>Steekproefgrootte</i>	<i>Bedrijf positief bij minimaal aantal reageerders</i>	<i>Specificiteit op bedrijfsniveau</i>	<i>Sensitiviteit op bedrijfsniveau</i>
10	10	1	100%	100%
20	18	1	100%	98%
30	21	2	100%	76%
40	23	2	100%	91%
50	24	2	100%	89%
100	26	2	93%	88%
200	27	2	91%	85%
500	29	3	98%	68%
1000	29	3	98%	67%

CIV Elisa met een sensitiviteit van 67,0% en een specificiteit van 95,0% (geiten)

<i>Koppelgrootte</i>	<i>Steekproefgrootte</i>	<i>Bedrijf positief bij minimaal aantal reageerders</i>	<i>Specificiteit op bedrijfsniveau</i>	<i>Sensitiviteit op bedrijfsniveau</i>
10	10	2	100%	
20	18	2	100%	98%
30	21	3	100%	66%
40	22	3	100%	76%
50	24	3	90%	76%
100	25	3	90%	74%
200	27	4	97%	58%
500	28	4	96%	59%
1000	28	4	95%	59%

Tabel 11. Overzicht verwachte kosten voor prevalentieonderzoek van Chlamydomphila op schapbedrijven in Nederland

Uitgangspunten:		Kosten (in euro's):	
<i>Aantal schapenbedrijven</i>	37000	<i>Aansturing en bewerking per bedrijf</i>	50
<i>Sensitiviteit</i>	66%	<i>Bloedtappen/ dier</i>	5
<i>Betrouwbaarheidsinterval</i>	95%	<i>Visite + verzendkosten</i>	35
<i>Binnenbedrijfsprevalentie</i>	15%	<i>Onderzoekskosten/monster</i>	8
<i>Verwachte prevalentie</i>	15%	<i>Inzendkosten</i>	8
<i>Variatie</i>	5%		

<i>Koppelgrootte</i>	<i>Te onderzoeken dieren</i>	<i>Verdeling populatie %</i>	<i>Te onderzoeken bedrijven</i>	<i>Kosten (in euro's)</i>
10	10	11	21	4333
20	18	15	29	8951
30	21	12	23	8073
40	23	5	10	3617
50	24	5	10	3744
100	26	16	31	12792
200	27	15	29	12373
500	29	15	29	13133
1000	29	7	14	6129
<i>rapportage</i>				7314
				Totaal
				80459

Tabel 12. Overzicht verwachte kosten voor prevalentieonderzoek van Chlamydomphila op geit bedrijven in Nederland

Uitgangspunten:		Kosten (in euro's):	
<i>Aantal schapenbedrijven</i>	19000	<i>Aansturing en bewerking per bedrijf</i>	50
<i>Sensitiviteit</i>	67%	<i>Bloedtappen/ dier</i>	5
<i>Betrouwbaarheidsinterval</i>	95%	<i>Visite + verzendkosten</i>	35
<i>Binnenbedrijfsprevalentie</i>	15%	<i>Onderzoekskosten/monster</i>	8
<i>Verwachte prevalentie</i>	15%	<i>Inzendkosten</i>	8
<i>Variatie</i>	5%		

<i>Koppelgrootte</i>	<i>Te onderzoeken dieren</i>	<i>Verdeling populatie %</i>	<i>Te onderzoeken bedrijven</i>	<i>Kosten (in euro's)</i>	
10	10	22	43	8621	
20	18	2	4	1036	
30	21	0.5	1	297	
40	22	0.5	1	322	
50	24	0.5	1	335	
100	25	2	4	1490	
200	27	5	10	3977	
500	28	35	68	28722	
1000	28	32.5	63	27490	
					<i>Totaal</i>
<i>rapportage</i>				72289	79518

Tabel 13. Overzicht verwachte kosten voor prevalentieonderzoek van Chlamydomphila kinderboerderijen in Nederland

Uitgangspunten:		Kosten (in euro's):	
<i>Aantal schapenbedrijven</i>	400	<i>Aansturing en bewerking per bedrijf</i>	50
<i>Sensitiviteit</i>	66%	<i>Bloedtappen/ dier</i>	5
<i>Betrouwbaarheidsinterval</i>	95%	<i>Visite + verzendkosten</i>	35
<i>Binnenbedrijfsprevalentie</i>	15%	<i>Onderzoekskosten/monster</i>	8
<i>Verwachte prevalentie</i>	15%	<i>Inzendkosten</i>	8
<i>Variatie</i>	5%		

<i>Koppelgrootte</i>	<i>Te onderzoeken dieren</i>	<i>Verdeling populatie %</i>	<i>Te onderzoeken bedrijven</i>	<i>Kosten (in euro's)</i>	
10	10	75	99	20988	
20	18	20	26	7313	
30	21	5	7	2086	
					Totaal
<i>rapportage</i>				3039	33425

Tabel 14. Overzicht verwachte kosten voor prevalentieonderzoek van Chlamydomphila kinderboerderijen in Nederland

Uitgangspunten:		Kosten (in euro's):	
<i>Aantal schapenbedrijven</i>	400	<i>Aansturing en bewerking per bedrijf</i>	50
<i>Sensitiviteit</i>	66%	<i>Bloedtappen/ dier</i>	5
<i>Betrouwbaarheidsinterval</i>	95%	<i>Visite + verzendkosten</i>	35
<i>Binnenbedrijfsprevalentie</i>	15%	<i>Onderzoekskosten/monster</i>	8
<i>Verwachte prevalentie</i>	5%	<i>Inzendkosten</i>	8
<i>Variatie</i>	2%		

<i>Koppelgrootte</i>	<i>Te onderzoeken dieren</i>	<i>Verdeling populatie %</i>	<i>Te onderzoeken bedrijven</i>	<i>Kosten (in euro's)</i>	
10	10	75	161	32421	
20	18	20	43	11428	
30	21	5	11	3274	
<i>rapportage</i>				4712	Totaal 51835

**Tabel 15. Overzicht testresultaten Chlamydomphila abortus CIV ELISA
bij verhoogde afkapwaarde van CIV-ELISA (50 % S/P waarde)
*Schapenbedrijven met verhoogd abortuspercentage***

Naam bedrijf	Totaal	Seroprevalentie Afkapwaarde 40 %	Seroprevalentie Afkapwaarde 50 %	WB resultaten
G-vaS	85	3,5%	1,2%	NNN
N-vaS	44	2,3%	0,0%	N
M-vaS	63	9,5%	6,3%	NNNN
Z-vaS	66	9,1%	3,0%	NNNN
W-vaS	15	0,0%	0,0%	n.v.t.
S-vaS	14	0,0%	0,0%	n.v.t.
vG-vaS	60	11,7%	6,7%	NNNN
B-vaS	62	3,2%	1,6%	NN
E-vaS	61	0,0%	0,0%	n.v.t.
dJ-vaS	75	1,3%	0,0%	N
K-vaS	80	20%	17,3%	NNPP
KI-vaS	80	10%	3,7%	NNNN
O-vaS	30	0,0%	0,0%	n.v.t.
H-vaS	29	0,0%	0,0%	n.v.t.
R-vaS	25	20,0%	12,0%	NNNN
T-vaS	59	3,4%	1,7%	NN
G-vaS	92	6,5%	1,1%	NNNN
DvaS	76	1,3%	0,0%	N
B-vaS	81	7,4%	4,9%	NNNN
R-vaS	83	7,1%	3,6%	NPPP
G-vaS	9	0,0%	0,0%	n.v.t.
DvaBS	77	19,5%	16,9%	PPPP
DvaBS*	30	50,0%	43,3%	PPPP