

Praktijkwaarneming: mycoplasma arthritis bij vleeskalveren, diagnostiek en behandelopties

KISSELS, W.P.M.L.¹, BOMERS, R.B.M.², MEERKERK, A.T.³, TIMMER, C.⁴, VERHOEVEN, G.⁵ EN HOLZHAUER, M.⁶

Inleiding

Artritis bij vleeskalveren is een geregeld voorkomende aandoening op vijf tot tien weken na opleg, vaak in aansluiting op eerder doorge maakte luchtwegproblemen. De aandoening is lastig te genezen met bestaande therapie (antibioticum per injectie gedurende drie tot vijf dagen plus één of twee maal NSAID per injectie afhankelijk van het product) en indien genezing optreedt, vraagt dat lange tijd (één tot twee maanden, persoonlijke mededeling participerende dierenartsen). Artritis treedt bij kalveren voornamelijk op aan het carpale gewricht en aan de achterpoten in het ischio-femorale en femoro-tibiaal en tarsale gewricht (persoonlijke mededeling participerende dierenartsen). Artritis is ook in het buitenland erkend als een erg pijnlijke en bedrijfseconomisch schadelijke aandoening en in het verleden werden veel dieren om reden van dierenwelzijn en slechte reactie op ingestelde therapie geëuthanaseerd (1).

Onderzoek in Canada liet zien dat tot 47 procent van de kalveren met pneumonie een arthritis hadden en dat alle kalveren met arthritis een (resistant-)pneumonie hadden (1). In Nederland wordt overigens het secundair voorkomen van arthritis als gevolg van een pneumonie door de deelnemende practici geschat op 5 tot 10 procent. Er kan incidenteel in een koppel sprake zijn van een toename van het aantal gevallen van enkele individuele dieren naar enkele tientallen.

Genezing van arthritis vraagt meestal langere tijd (maanden), waarbij het soms noodzakelijk is het aangetaste gewricht te ondersteunen middels een immobiliserend verband. Dit is uiteraard niet mogelijk indien het femorotibiaal gewricht is aangetast. Omdat de dieren vaak ernstig belastingskreupel zijn, wordt de voeropname belemmerd en gaan de voedingstoestand en conditie achteruit. Hierdoor komt ook het dierenwelzijn in het geding. Regelmatig is dit reden om alsnog over te gaan op euthanasie.

De belangrijkste oorzaak van de arthritis bij vleeskalveren is een mycoplasma-infectie, waarbij na typering bijna altijd *Mycoplasma bovis* wordt aangetoond (GD, eigen onderzoek 2013). *M. bovis* is een van de belangrijke luchtwegpathogenen van met name vleeskalveren, maar kan ook otitis, orchitis en arthritis bij kalveren geven en pneumonie, mastitis en arthritis bij melkkoeien (6; monitoring GD). In Europa is mycoplasma verantwoordelijk voor meer dan een kwart van alle longontstekingen bij kalveren (7). Vanwege de afwezigheid van een

1 **ECOstyle**, Appelscha. Corresponderend auteur: w.kissels@ecostyle.nl.

2 **D.A.P. Vaassen**, Vaassen.

3 **Vallei en Wetering dierenartsen**, Renswoude.

4 **D.A.P. V.U.G.**, Voorhuizen.

5 **Dierenartsen Animal Care**, Putten.

6 **Gezondheidsdienst voor Dieren**, Deventer.

celwand is het aantal antibiotica dat hiertegen ingezet kan worden beperkt, bovendien neemt de resistentie tegen veel eerste keus middelen als tetracycline, tilmicosin en spectinomycin toe en zijn geen effectieve vaccins beschikbaar (7,6,9).

Kalveren worden vaak besmet op het vleeskalverbedrijf aangevoerd (5). De initiële infectie heeft dan al plaatsgevonden op het melkveebedrijf van oorsprong. *M. bovis* is een natuurlijke bewoner van de bovenste luchtwegen van gezonde runderen. Besmette melk kan een bron van infectie zijn voor kalveren (3). Verdere verspreiding op het bedrijf van aankomst kan vervolgens optreden door aerosoltransmissie. *M. bovis* kan de bovenste luchtwegen koloniseren zonder voor problemen te zorgen. Problemen ontstaan door gewijzigde omstandigheden van de gastheer of aanwezigheid van andere pathogenen waarna verspreiding naar diepere luchtwegen plaatsvindt (5).

In lijn met de Richtlijn Reductie Antibioticagebruik (KNMvD, 2013), streeft de kalversector naar een reductie van het totale antibioticagebruik. Om als alternatief acceptabel te zijn bij een pijnlijke aandoening als de gebruikelijke behandeling van artritis, dient de behandeling vergelijkbaar of beter effect te hebben en bij voorkeur vergelijkbaar qua behandelwijze. Daarnaast dienen de toegepaste middelen geregistreerd en gekanaliseerd te zijn.

In dit manuscript worden de resultaten gepresenteerd van uitkomsten van de verschillende diagnostische laboratoriumtechnieken van GD voor mycoplasma en een vergelijkend onderzoek naar het effect van een bestaande protocolaire behandeling (antibiotica gecombineerd met een NSAID) met een alternatieve behandeling (homeopathisch diergeneesmiddel met een uitwendige lotion) bij een bacteriologisch bevestigde mycoplasma artritis.

Materiaal en methode

In de periode november 2014 tot maart 2015 zijn in samenwerking met de GD en vier getrainde praktici uit vier verschillende praktijken een protocol en een onderzoeksopzet samengesteld en uitgevoerd. Er werd gewerkt met een standaard beoordelingsformulier (figuur 1). Met de uitvoerende praktici werden in een gezamenlijke training vooraf de te hantieren begrippen en bijbehorende criteria afgestemd.

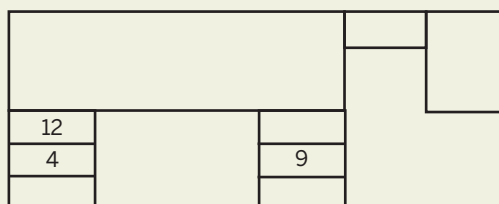
Kalveren met artritis werden verkregen middels de reguliere consultatieve praktijkvoering en bedrijfsbegeleiding. Inclusie in de patiëntengroep vond plaats op basis van acute artritis in het

Beoordeling Artritis Kalvr: datum:				
kreupelheid	niet kreupel 0	belast kreupel 1	ontlast 2	belast niet 3
aspect gewricht	normaal 0	licht gezwollen 1	sterk gezwollen 2	zeer gezwollen 3
temp. gewricht	normaal 0	iets warmer 1	warmer 2	warm 3
pijnlijkheid	niet pijnlijk 0	bij diepe palpatie 1	bij lichte palpatie 2	zeer pijnlijk 3
bewegelijkheid	normaal 0	minder 1	stijf 2	volledig stijf 3
conditie	normaal 0	vermagerd 1	sterk vermagerd 2	cachectisch 3
voeropname	normaal 0	met moeite 1	moet geholpen 2	niet 3
totaal = ...				

Figuur 1: Standaardbeoordelingsformulier voor beoordeling van individuele kalveren met artritis, gebruikt in het onderzoek naar het effect van twee verschillend toegepaste behandelingsstrategieën (December 2014 tot april 2015). Het totaal is de optelling van de subtotaal per kolom.

carpaal, ischio-femoro, femoro-tibiaal, of tarsaal-gewricht, verdacht van een mogelijke mycoplasma-infectie op basis van klinische verschijnselen (dolor, calor en rubor) en een historie van een luchtweginfectie. Alle zieke dieren zijn protocolair klinisch onderzocht door de begeleidende dierenarts. Op vier momenten (D0, 7, 14 en 28) zijn de criteria aspect, temperatuur, beweeglijkheid en pijnlijkheid van het gewricht, kreupelheid, algehele conditie en voedselopname gescoord. Onder 'hersteld' werd in dit onderzoek verstaan herstel op basis van klinisch onderzoek door de begeleidend dierenarts dan wel score '0' per onderzoeksparameter (figuur 1).

Van de overblijvende dieren werden per groep de gemiddelde scores per bovengenoemd criterium vergeleken. Op D0 werden voor bevestiging van de waarschijnlijkheidsdiagnose mycoplasma artritis, op aseptische wijze een punctaat (1-3 ml) en een serummonster



Figuur 2: Schematische verdeling van aangetaste gewrichten met aangetoonde mycoplasma-infectie, waarvan zestien in de achterpoten (12x femoro-tarsaal en 4x tarsaal) en negen in de voorpoten (9x carpaal) (n=25, nov. 2014-maart 2015).

Kalf	behandeling TN/PP	GD-uitslagen			scores			
		Elisa	Myc. kweek	M. bovis PCR	D1	D7	D14	D28
1*	PP	2+	N		13	14	13	6
2	TN	4+	P	P	10	9	4	1
3	PP	2+	P	P	8	6	2	1
4*	TN	1+	N	N	8	6	2	1
5*	PP	0			6	6	5	2
6	PP	0	P	P	8	4	hersteld	
7	TN	0	P	P	9	10	6	3
8	TN	1+	P	P	17	15	11	hersteld
9	TN	2+	P		7	7	5	1
10	PP	1+	P	P	6	7	8	6
11***	PP	0	P	P	15	17	0	hersteld
12*	PP	0	N	N	12			
13	PP	0	P	P	12	11	10	4
14*	PP	4+	N	N	9	13	14	8
15	TN	1+	N	P	12	10	9	5
16	TN	0	N	P	3	4	2	0
17	TN	5+	P	N	7	8	1	1
18**	PP	4+	P	P	9	dood		
19***	PP	0	P	P	10	10	10	8
20	PP	1+	P	P	15	15	8	5
21	TN	1+	P	P	12	12	14	5
22	PP	0	P	P	13	11	9	5
23	PP	4+	P	P	11	9	8	1
24	TN	0	P	P	11	11	9	10
25	PP	0	P	P	11	11	12	12
26	PP	0	P		7	6	9	6
27	TN	0	P		9	6	8	8
28	TN	0	P	P	7	3	5	6
29*	PP	2+	N	N	11	11	8	0
30**	TN	0	P	P	9	11	dood	
31	TN	5+		P	11	5	4	6
32*	TN	0	N	N	9	3	3	0

Tabel 1: Overzicht van alle kalveren meegenomen in het onderzoek naar het effect van de behandeling van door mycoplasma veroorzaakte artritis en de uitslagen van puncties (PCR en kweek) de *M. bovis* ELISA en het effect behandeling (PP = Pyrogenium, Promotion; TN = tylosine, NSAID; N= niets aangetoond, P= aangetoond). De met * gemarkeerde kalveren werden niet meegenomen in de beoordeling van het effect met als reden: *niets aangetoond, **dood of ***geïmmobiliseerd

genomen. Dit monster werd direct gekoeld opgestuurd naar GD voor respectievelijk kweek mycoplasma (PPLO-selective agar), PCR *M. bovis* (inhouse test GD) en antistoftiter *M. bovis* (Bio-X, Diagnostics, Jemelle, België). Voor de serologie werd de uitslag 0, + of ++ als niet aangetoond en \geq +++ als aangetoond beschouwd. De specificiteit van de test was bij de gebruikte ++ uitslag 99,6 procent (8). Dieren werden niet meegenomen in het onderzoek indien door veehouders reeds een behandeling voor deze artritis was ingezet.

Als inclusiecriteria voor verdacht van mycoplasma artritis werden bij de inzending genomen: zwelling en kreupelheid van carpaal, knie of tarsaalgewricht, aansluitend op of

gelijktijdig met luchtweginfectie en een punctaat dat veelal troebel en visceus en snel stollend was. Behalve een volledige dataset van klinische gegevens was het aantonen van mycoplasma in gewrichtsvloeistof door middel van kweek of PCR voorwaarde voor definitieve inclusie.

Bij de behandeling werd gebruik gemaakt van geregistreerde en toegelaten diergeneesmiddelen, een verzorgingsproduct en advies aanpassing huisvesting (op stro of rubbermat). De keus van het antibioticum was gebaseerd op het formularium vleeskalveren. Dieren met artritis werden op basis van een even of oneven oornummer ingedeeld in een behandelingsgroep (PP) (Pyrogenium compositum (5 ml, s.c.) en tegelijkertijd

werd de huid van het gewricht vochtig gemaakt door sprayen met de lotion Promotion; beiden volgens voorschrift gedurende vijf dagen) en een controlegroep (TN) (tylosine (200 mg/kg, i.m.; volgens voorschrift gedurende vijf dagen) en een NSAID (meloxicam 20 mg/ml, s.c., een maal bij aanvang, of tolfenamzuur 40 mg/ml, s.c., twee maal bij aanvang en na 48 uur). De behandelingen op dagen D2 tot D5 werden uitgevoerd door de veehouder.

De data werd statistisch getoetst, rekening houdend met herhaalde waarnemingen, met behulp van de mixed ANOVA toets in SPSS (versie 2.0, IBM).

Resultaten

Van 32 dieren, afkomstig van 24 bedrijven, werden monsters en een gegevensset ontvangen. Deze werd gecontroleerd op volledigheid en inclusiecriteria, waarna 21 dieren overbleven. Van één dier gingen monsters verloren en uitgesloten zijn tien dieren die overleden, geëuthanaseerd of geïmmobiliseerd waren, inclusief een dier waarbij gelijktijdige behandeling met antibioticum tegen longontsteking nodig was. Dit wordt weergegeven in tabel 1.

Van de aangetaste gewrichten kwamen er negentien voor in de achterpoten (13x femoro-tarsaal en 6x tarsaal) en dertien in de voorpoten (13x carpaal). Bij gewrichten met bevestigde mycoplasma-infectie waren dit respectievelijk zestien (12 en 4) en negen (9) gevallen (zie figuur 2). Het punctaat van de aangetaste gewrichten was veelal troebel, visceus en snel stollend.

Op 32 serummonsters werd ELISA uitgevoerd, hiervan werden 26 negatief (score <+++) en 6 positief (score ≥+++) beoordeeld. Van 31 punctaten werd een kweek op mycoplasma ingezet, waarvan 22 maal aangetoond. Op 29 gewrichtsmonsters werd een PCR uitgevoerd, hiervan werd 21 keer *M. bovis* aangetoond, 6 keer niet aangetoond en 2 zonder resultaat. Van achttien punctaten waren zowel de kweek als PCR positief. In zeven gevallen was wel sprake van een arthritis, maar werd geen mycoplasma aangetoond. In één geval was hierbij verlies van het gewrichtsmonster de oorzaak. Slechts in één geval was er sprake van een hoge ELISA-uitslag. De uitkomsten van de scores op de eerder genoemde uitkomstparameters zijn weergegeven in tabel 1.

Op D28 was er een significante verbetering voor alle afzonderlijke criteria ($P < 0,001$), behalve voor conditie, waarbij geen verschil werd aangetoond tussen D28 en D0. Voor de beoordelingscriteria aspect, beweeglijkheid, temperatuur en pijnlijkheid van gewricht, kreupelheid en conditie was

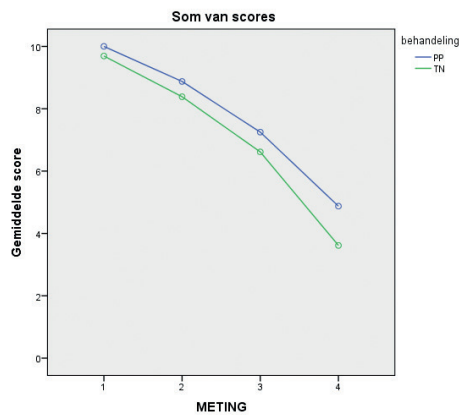
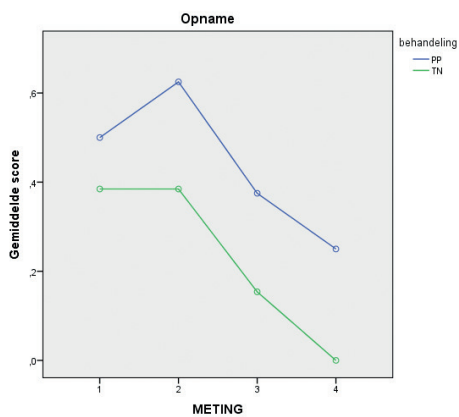
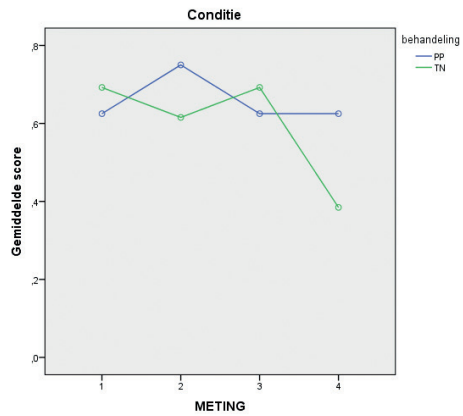
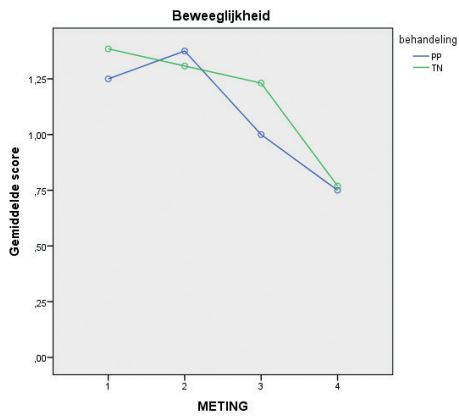
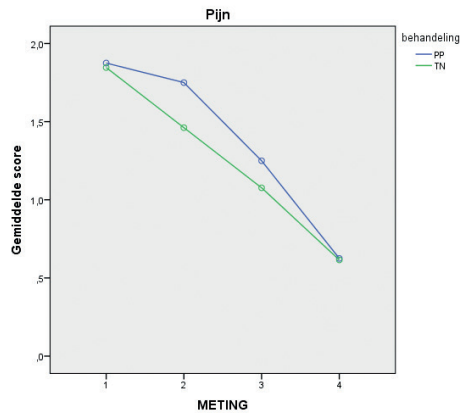
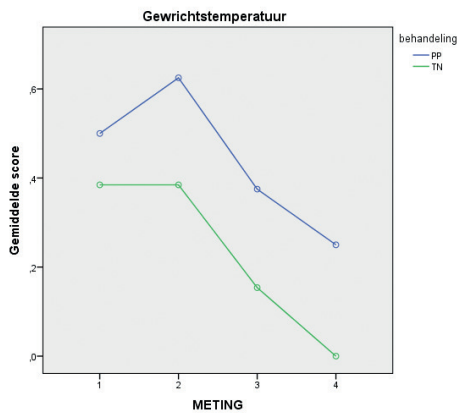
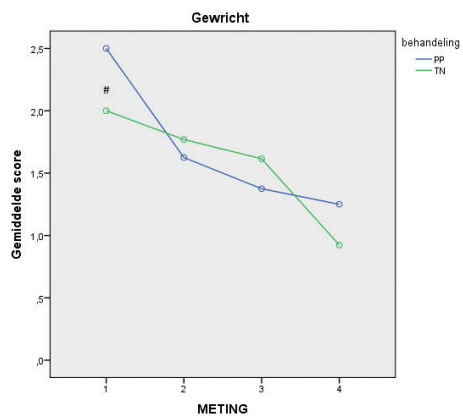
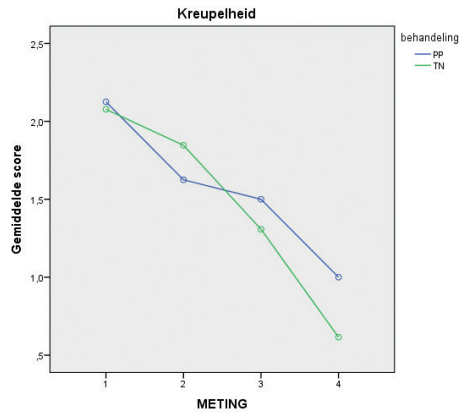
er nagenoeg geen verschil tussen beide groepen op D28 ($p > 0,6$). Ook voor de som der criteria, die het totaalbeeld van de gezondheid en welzijnstatus weergeeft, was er op D28 een significante verbetering ($P < 0,005$), waarbij geen verschil werd aangetoond tussen beide behandelgroepen, zoals weergegeven in figuur 3a-h.

Discussie

In dit verkennende onderzoek, waarbij op 24 bedrijven vleeskalveren met een aangetoonde mycoplasma arthritis volgens een alternatieve benadering met *Pyrogenium compositum* gecombineerd met Promotion zijn behandeld of met een therapie van antibiotica ondersteund met een NSAID, werd op D28 na de start van de behandeling in beide groepen een significante verbetering gezien. Bovendien kon in dit onderzoek geen significant verschil worden aangetoond tussen de traditionele behandeling met antibiotica en de alternatieve behandeling zonder antibiotica. Uit de resultaten kwam ook naar voren dat in een periode van 28 dagen sprake was van voortschrijdend herstel, maar dat voor veel patiënten nog geen plateau in het herstel is bereikt. Het langer vervolgen na 28 dagen lijkt bij een volgende studie nuttig. Het was al bekend dat herstel van deze aandoening lang duurt en dat restloos herstel maar in een beperkt aantal gevallen optreedt (practici schatten dit op slechts 10 procent). Veelal wordt wel functioneel of klinisch herstel verkregen (door praktici geschat op 60 tot 75 procent van de gevallen) (voor de individuele criteria zou dit overeen komen met een beoordeling van 0 of 1 uit figuur 1).

Bij de opzet van dit praktijkonderzoek werd bewust gekozen voor gebruik van een positieve controle. Alleen een behandelgroep met *Pyrogenium* en negatieve controle zou geen optie zijn vanwege het aantasten van dierenwelzijn bij een controlegroep zonder behandeling en een bestaande geaccepteerde handelwijze.

Gezien mycoplasma arthritis in de praktijk slecht reageert op de ingestelde antibacteriële therapie, en dit mogelijk komt door bijvoorbeeld antimicrobiële resistentie, zou alternatieve therapie op basis van deze resultaten de voorkeur verdienen boven een therapie op basis van antibiotica. De incidentie van mycoplasma gerelateerde arthritis is bij vleeskalveren aan de achterpoten hoger dan aan de voorpoten. Bij fokkalveren komt deze vorm van arthritis veel minder voor. Bij melkkoeien mist een duidelijk voorafgaande fase met (broncho-)pneumonie en wordt de aandoening voornamelijk aan de kogel van de voorpoten gezien (Holzhauer, persoonlijke communicatie).



Het verschil in optreden aan de poten wordt mogelijk veroorzaakt door verschillen in belasting en/of zijn het gevolg van verschil in huisvesting tussen vleeskalveren en melkkoeien. MLVA-typering (Multiple Loci VNTR Analysis is een werkwijze toegepast voor de genetische analyse van bepaalde micro-organismen, zoals pathogene bacteriën, die gebruikmaakt van het polymorfisme van gekoppelde herhaalde DNA-sequenties) van de verschillende *M. bovis*-isolaten heeft overigens aangetoond dat er geen verschil is tussen die gevonden bij melkkoeien en die bij de vleeskalveren (Holzhauer et al. artikel in voorbereiding). Bij het aantonen van mycoplasma in de gewrichtsvloeistof werd zowel selectieve kweek op mycoplasma (PPLO-agar) als een selectieve PCR op *M. bovis* toegepast. In twee punctaten werd de *M. bovis* aangetoond met PCR terwijl mycoplasma met de kweek niet werd aangetoond. In één enkel geval was dit andersom (kweek aangetoond, PCR niet aangetoond). In dit onderzoek leek er weinig tot geen correlatie te zijn tussen de ELISA-uitslagen en kweek of PCR. Eventuele positieve ELISA-uitslagen gingen zowel gepaard met een positieve kweek en/of PCR, maar ook met een negatief resultaat. Positieve kweek en/of PCR gingen in meerderheid niet gepaard met een positieve ELISA. Een klinische diagnose mycoplasma artritis dient dus in het (per-)acute stadium met gewrichtsvloeistof bij voorkeur bevestigd te worden en bovendien dienen dan zowel selectieve kweek als PCR te worden toegepast. De lage uitslagen op basis van antilichamen kunnen samenhangen met het immunosuppressieve

Figures 3 a-h. Grafische weergaven naar beoordelingscriterium en de som der criteria van gemiddelde scores per behandeling (stippel = PP, doorgetrokken = TN). Voor alle criteria geldt hoe lager de score (0-3) hoe gunstiger dit is voor het dier (n=21, december 2014-maart 2015). Op D28 was er een significante verbetering voor alle afzonderlijke criteria ($P < 0,001$), behalve voor conditie, waarbij geen verschil werd aangetoond tussen D28 en D0. Voor de beoordelingscriteria aspect, beweeglijkheid, temperatuur en pijnlijkheid van gewricht, kreupelheid en conditie was er nagenoeg geen verschil tussen beide groepen op D28 ($p > 0,6$). Ook voor de som der criteria, die het totaalbeeld van de gezondheid en welzijnstatus weergeeft, was er op D28 een significante verbetering ($P < 0,005$), waarbij geen verschil werd aangetoond tussen beide behandelgroepen.

effect van een mycoplasma-infectie. *M. bovis* stimuleert enerzijds het immuunsysteem, maar remt anderzijds de proliferatie van immuuncellen (met name lymfocyten) terwijl daarbij de capaciteit tot gamma interferon- en cytokinenproductie overeind blijft. Mycoplasma wordt intracellulair terug gevonden in diverse witte bloedcellen (B-cellen, diverse T-cellen en dendritische cellen) en ook erythrocyten. De invasie van circulerende immuuncellen en erythrocyten kan een belangrijke rol spelen in de pathogenese van de ziekte door hulp aan het vervoer van *M. bovis* van de longen naar andere sites (10). Een andere reden voor lage afweerstoffenproductie zou kunnen worden veroorzaakt door de lokalisatie van de aandoening (gesloten gewricht). Bij een aantal gevallen kon mycoplasma niet als oorzaak worden aangewezen voor de aanwezige artritis. Als andere oorzaken voor artritis bij vleeskalveren kan gedacht worden aan andere pathogenen als gevolg van sepsis door *Salmonella*, *Pasteurella*, *Escherichia coli* en *Trueperella pyogenes*, maar worden zelden gevonden. Bij het onderzoek is algemene kweek achterwege gelaten. De reden hiervoor is dat onder andere in eerder onderzoek door de GD steeds mycoplasma als enige kiem werd gevonden en het aantonen van mycoplasma en daarna de reactie op de ingestelde therapie, het doel van deze pilotstudie was. Ook kan een rol spelen dat de PCR specifiek is voor *M. bovis*. Er zou dus een andere subspecies van mycoplasma een rol gespeeld kunnen hebben. Dit laatste zou in deze studie drie keer het geval kunnen zijn. Ten slotte: in deze pilotstudie naar de etiologie en het effect van behandeling van door mycoplasma veroorzaakte artritis is een vergelijkbaar effect aangetoond voor beide therapieën. Bij een eventuele herhaling van deze studie zouden grotere aantallen patiënten en een langer vervolg dan 28 dagen tot grotere waarde van de resultaten leiden. Overwogen kan worden algemene kweek van het punctaat op te nemen, om eventuele mycoplasmanegatieve monsters alsnog te kunnen duiden en de *M. bovis* ELISA-test achterwege te laten.

Dankbetuiging

De samenvattingen (Nederlands en Engels) en de literatuurlijst staan op de TvD-website. De auteurs bedanken alle deelnemende veehouders voor hun welwillende medewerking. ●