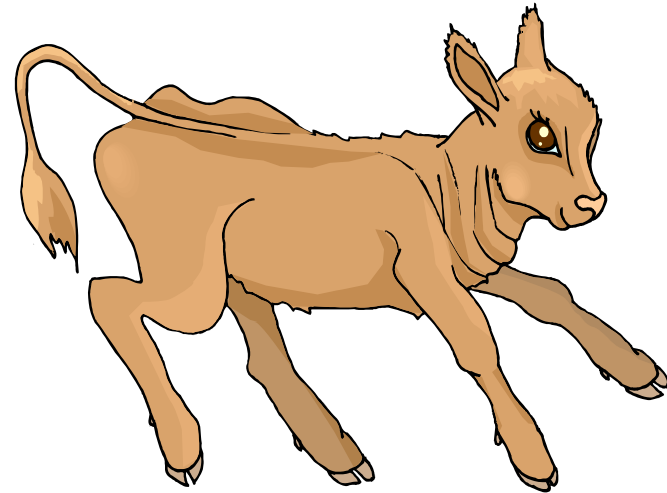


Respirationsvejslidelser - kalve

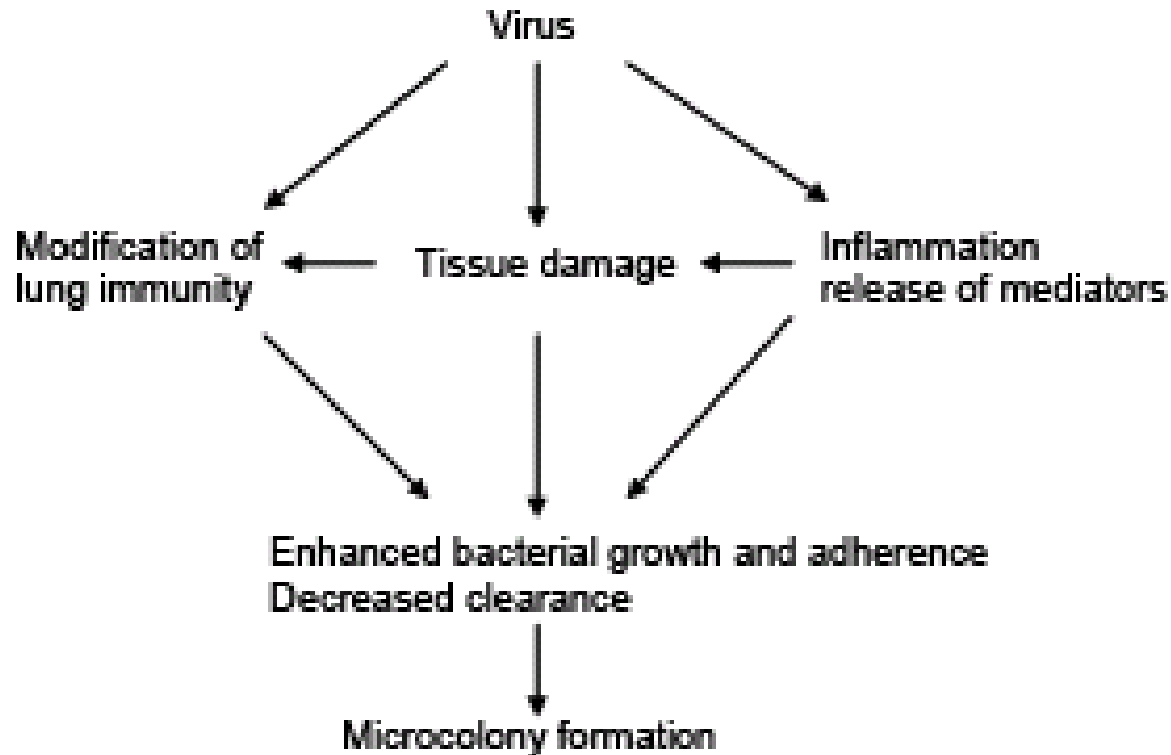


Kvægkursus Kjellerup 22-23. Oktober 2015

Lars Erik Larsen

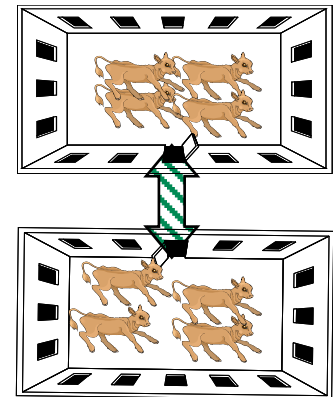
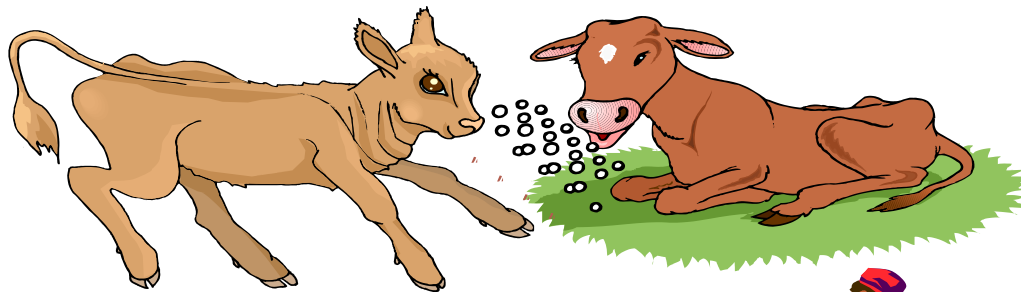
Veterinærinstituttet DTU

Respirationsvejslidelser er multifaktorielle!



Luftvejs smitstofferne egenskaber og smitte

- Generelt ikke særlig robuste
- Kan godt li varme, fugtige og neutrale omgivelser
- Smittepres afhænger af: mængde der udskilles, luftfugtighed, temperatur, belægningsgrad
- Direkte og indirekte kontakt formodentligt vigtig, men også via luft og aerosoler



Diagnostik af luftvejs patogener på DTU VET

- Virus – påvisning ved PCR
 - BRSV – **435 Kr.** på svaber/svaber pools eller skyl; **559 Kr.** på væv
 - Bovint Corona virus **X**
 - Parainfluenza 3 virus **X**

} NB kommer måske snart – pris?
- Bakterier – PCR og/eller dyrkning og serologi
 - M. haemolytica
 - H. somni
 - P. multocida

} BU uden typning: **527 Kr.**

 - Mycoplasma dispar/bovis: Dyrkning organer: **1.245 Kr.**
- Bakterier - typning
 - MALDI-TOFF på isolat: **240 Kr.**

Serologi til diagnostik af luftvejs patogener

- **Serologi fordele og ulemper**
 - Overvågning / sygdomsstatusstatus 
 - Hæmning af præeksisterende antistoffer 
 - Parrede prøver – kræver lang tid 
 - Vaccinations kontrol 
- **Serologiske analyser der tilbydes pt fra Veterinærinstituttet**
 - Virus 
 - Bakterier – salmonella..... Ellers ikke 
 - Mycoplasma Bovis – ELISA på serum og mælk: **233 Kr.** 

Eksempel på serologisk analyser BRSV

Før	eft 1vacc	Ef 2. vacc	Minus Vacc
0	320	640	UA
80	320	160	0
20	320	640	0
0	320	320	0
40	1280	320	0
160	320	320	0
40	320	640	0
160	160	160	0
40	160	160	0
20	640	320	0
20	160	640	0
40	640	320	0
80	320	160	0
80	640	640	0
20	320	160	0

Diagnostik - udfordringer

- Påvisning contra kvantitativ?
- Prøvemateriale – nedre contra øvre luftveje
- Hvilken dyr – og hvor mange?
- Tolkning af resultater?

Case: Kalve med hoste – 10 min

I en større malkebesætning (350 årskøer) flyttes kalvene fra enkeltbokse efter 2-3 uger og sættes i fællesbokse 6-8 kalve sammen. Kalvene fravænnenes, når de er 13 uger, og kviekalvene overflyttes til større bokse med 25-30 kalve i en gammel kostald på nabogården indtil de skal kælte første gang. Flere kalve begynder at hoste allerede i de små fællesbokse, men især 7-14 dage efter fravænning udvikler 15-20% behandlingskrævende lungeproblemer. Problemet er specielt udtalt hos kalve fra kvier. Tyrekalvene sælges fra til en specialiseret fedekalveproducent inden overflytning til fællesboksene.

- Overvej mulige agens, der kan have betydning for den observerede sygdom hos kalvene
- Angiv forslag til relevant diagnostiske undersøgelser – analyse, prøvemateriale, fra hvilke kalve, hvor mange
- Der blev udtaget prøver fra 5 kalve: resultatet var at i 1 kalv fandt man Coronavirus, i 2 kalve *Pasteurella multocida*, i 3 kalve *Mycoplasma dispar*
- Hvilke konklusioner kan drages af resultatet af laboratorie analyserne vedr. årsag?

Prøvemateriale - muligheder

- **Blod / serum** – kun til serologi!!
- **Næsesvabere**
 - Fordele
 - Mulighed for pooling (flere dyr testes for samme udgift)
 - Lette at udtage
 - Ulemper
 - Afspejler det hvad der findes i lungerne?
 - Kontamination fra omgivelserne
 - Lavere sensitivitet ift lungevæv og trachealskyl

Prøvemateriale - muligheder

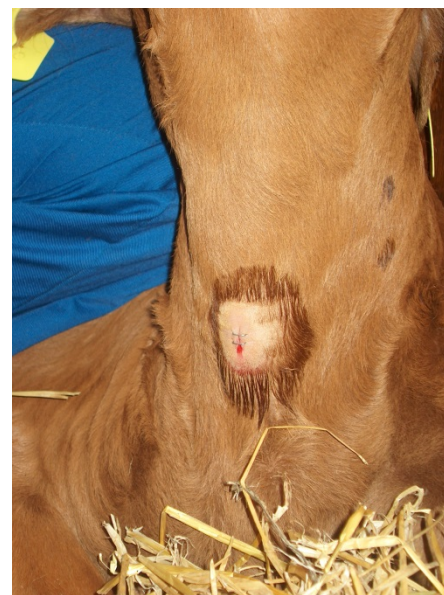
- **Svælgsvaber**
 - Fordele
 - Mulighed for pooling (flere dyr testes for samme udgift)
 - Lettere at udtage end tracheal skyl
 - Ulemper
 - Afspejler det hvad der findes i lungerne?
 - Kontamination fra omgivelserne (dog mindre end ved næsesvaber)
 - Lavere sensitivitet ift lungevæv og trachealskyl
 - Mere besværlig at udtage end næsesvaber

Prøvemateriale - muligheder

- **Trachealskyl – ikke invasivt**
 - Fordele
 - Mulighed for pooling (flere dyr testes for samme udgift)
 - Afspejler hvad der sker i de nedre luftveje
 - Mindre kontamination fra omgivelserne
 - Ulemper
 - Kontamination fra øvre luftveje via katetret
 - Mere besværlig at udtage end svabere
 - Kræver sedation?
 - Gene for dyret (dyrevelfærd?)
 - Kræver øvelse?

Prøvetagning ved trans-tracheal aspiration





Prøvemateriale - muligheder

- **Trachealskyl - invasivt**
 - Fordele
 - Mulighed for pooling (flere dyr testes for samme udgift)
 - Afspejler hvad der sker i de nedre luftveje
 - Ingen kontamination fra omgivelserne / katetre
 - Ulemper
 - Mere besværlig at udtage end svabere
 - Gene for dyret (dyrevelfærd?)
 - Kræver øvelse og bedøvelse
 - Infektion i såret?

Prøvemateriale - muligheder

- **Lunger**
 - Fordele
 - Kan udtages fra forandrede område
 - Afspejler hvad der sker i de nedre luftveje
 - Ingen kontamination fra omgivelserne / katetre
 - Ulemper
 - Mere besværlig at udtage end svabere
 - Ikke velegnet til pooling
 - Besværligt at sende ind og håndtering af kroppen efterfølgende
 - Analyse ofte lidt dyrere

Kvantitativt contra kvalitativt

- De fleste analyser pt er kvalitative – dvs plus – minus svar
- Specielt PCR er ekstremt følsom – fanger ned til en virus partikel
- Kan den prædikative værdi øges ved at give svaret som mængde isf plus – minus?
- Specielt relevant for svabere
- Ingen data på luftvejs patogener under danske forhold

Diagnose af årsager til diarre hos kalve

- Formål
 - At undersøge den kliniske betydning af fund af patogener hos kalve med darre
 - Undersøge om niveauet af virus I fæces I er korreleret til kliniske symptomer

**Larsen and Karpinski, in preparation*



Materiale og Metoder

- Besætninger og dyr
 - 13 malkekvægsbesætninger, i alt 174 kalve, 0-85 dage gamle
 - Besætninger og kalve med eller uden diarre
 - Forsøgsperiode september-oktober
- Kliniske observationer
 - Beskrivelse af fæces, almenbefindende, rektal temperatur

Materialer og Metoder

- Prøver
 - Fæces fra rectum
- Laboratorie undersøgelser
 - Rota og Corona virus
 - Semi-kvantitative ELISA
 - 4-fold fortyndinger
 - Andre patogener
 - C.parvum, Salmonella og E.Coli (kalve < 2 uger)
 - C.parvum, Salmonella og Eimeria (kalve 2-12 uger)
 - Salmonella og Eimeria (kalve > 12 uger gamle)



Resultater

Table 1

Pathogen	Calves			Herds		
	No.	Pos.	% Pos.	No.	Pos.	% Pos.
BRV	174	29	16,7	13	10	76,9
BCV	174	5	2,9	13	2	15,4
<i>C. parvum</i>	159	27	17,0	13	10	76,9
<i>Eimeria spp.</i>	135	30	22,2	13	9	69,2
<i>Salmonella spp.</i>	174	0	0	13	0	0
<i>E. coli</i>	32	0	0	13	0	0

Results

Forekomst i forhold til klinisk diarre

Pathogens				Diarrhoea		p-values
BRV	BCV	<i>C. parvum</i>	<i>Eimeria</i>	Yes (n=76)	No (n=98)	
+	-	-	-	14 (18,4%)	7 (7,1%)	**
+	-	+	-	5 (6,6%)	1 (1,0%)	NS
+	-	-	+	2 (2,6%)	0	NS
-	+	-	-	3 (3,9%)	0	NS
-	+	+	-	2 (2,6%)	0	NS
-	-	+	-	11 (14,5%)	8 (10,5%)	*
-	-	-	+	7 (9,2%)	21 (21,4%)	NS
-	-	-	-	32 (42,1%)	62 (63,6%)	

Resultater

Risiko af diarre ift. mængde af rotavirus i fæces

BRV		Diarrhoea		Logistic regression		
Titer	Log-titer	Yes	No	$P_{(\text{Diarrhoea} \text{Titer})}$	%	OR
0	0	55	90	0,3378	33,8	NA
4	0,6	0	1	0,4258	42,6	1,002
16	1,2	3	0	0,5187	51,9	1,007
64	1,81	1	1	0,6119	61,2	1,028
256	2,41	5	2	0,6962	69,6	1,109
1024	3,01	6	4	0,7691	76,9	1,395
4096	3,61	6	0	0,8288	82,9	2,133

Diskussion og konklusion

- Rota og corona virus og C.Parvum signifikant relateret til diarre
- Store mængder af rotavirus signifikant korreleret til diarre
- Rotavirus oftest i kalve mellem 8-14 days, C.Parvum i kalve >21 days (ikke bestemt for corona og Eimeria)
- Selvom der ikke er diarre kan der være patologiske forandringer i tarmen – dvs. subklinisk infektion
- Kbvantitativ diagnostik anvendes nu for et nogle svine infektioner (PCV2 og Lawsonia)

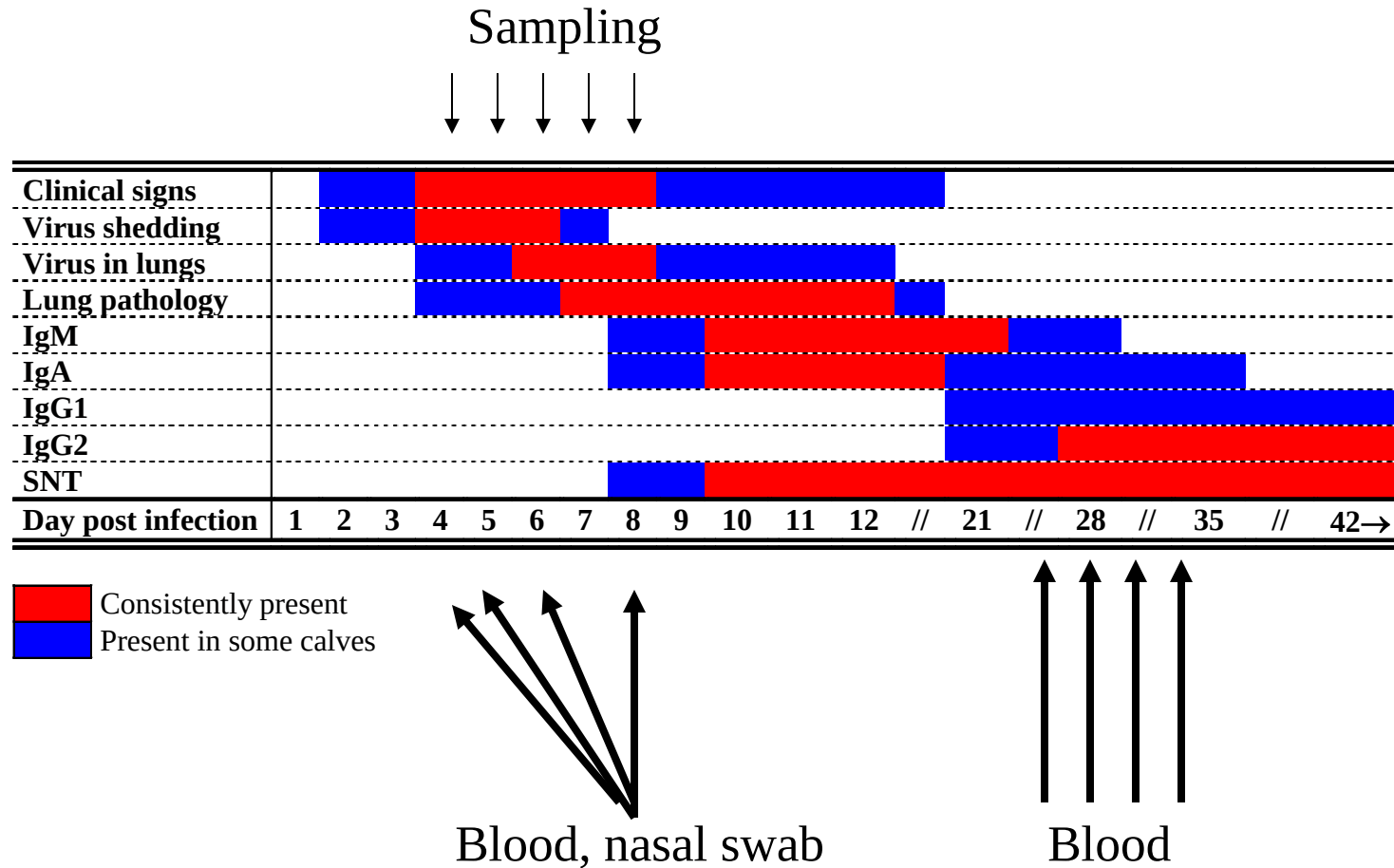
Forsendelse

- Lunger: pakket godt ind – vandtæt beholder – på køl
- Skyl: indsendes på køl
- Diverse rør, materialer, forsendelseskasser mm kan købes via dianova – se dianova.dk
- Specifikt for Mycoplasma
 - M-rør 22 kr pr sæt
- Specifikt for bakterier – rør med gel kan IKKE bruges til virus
- Svabere: PBS eller saltvand – indsend hurtigt og på køl

Fra hvilke dyr skal der udtages prøver



Fra hvilke dyr skal der udtages prøver – BRSV som eksempel



Fra hvilke dyr skal der udtages prøver

- Udtag fra dyr som kun har haft erkendelige symptomer i kort tid – rectal temperatur over 40 en god indikator
- Pooling af f.eks. næsesvabere for virus er en mulighed for at holde udgifterne nede
- Dyrene skal være ubehandlede
- Tag fra flere dyr – minimum 3 helst 5....det er under alle omstændigheder en besætningsdiagnose



Respiratory disease in calves: Microbiological investigations on trans-tracheally aspirated bronchoalveolar fluid and acute phase protein response

Øystein Angen^{a,*}, John Thomsen^a, Lars Erik Larsen^a, Jesper Larsen^b,
Branko Kokotovic^a, Peter M.H. Heegaard^a, Jörg M.D. Enemark^b

Seks mælkekvægsbesætninger

To besøg (September og November 2002)

Første besøg

10 prøver fra klinisk normale kalve (6 besætninger)

(<39,5°C, ingen næseflod eller hoste, resp.frekv. < 40/min)

• Andet besøg

5-13 prøver fra kalve med respiratorisk sygdom (4 besætninger)

• Parrede blodprøver (3 ugers interval) fra syge kalve

Bakteriologiske undersøgelser af trans-tracheal aspireret bronchoalveolar væske fra klinisk normale kalve (n=56) og kalve med pneumoni (n=36) fra 6 danske besætninger

	Klinisk normale kalve (% positive)			Syge kalve (% positive)		
1	Dyrkning eller PCR	Dyrkning	PCR	Dyrkning eller PCR	Dyrkning	PCR
<i>Pasteurella multocida</i>	48	45	32	81	78	67
<i>Histophilus somni</i>	21	5	20**	39	28	37**
<i>Mannheimia haemolytica</i>	23	16	23**	31	6	31**
<i>Archanobacterium pyogenes</i>	5	5	2	6	6	3
<i>Moraxella spp.</i>	2	2	nd	3	3	nd
<i>Mycoplasma dispar</i>	nd	nd	21	nd	nd	79
<i>Mycoplasma bovirhinis</i>	nd	nd	14	nd	nd	79
<i>Mycoplasma bovis</i>	nd	nd	0	nd	nd	0
Antal positive prøver	68	59	41	100	100	97

Fra 32% af kalvene kunne det dyrkes bakterier i renkultur i store mængder

Table 2. Herd prevalences (%) of pathogenic microorganisms found in trans-tracheal aspirated bronchoalveolar fluid from clinically normal calves (N) and calves with pneumonia (P) from 6 Danish herds.

Microorganism present	Herd 1		Herd 2 ^a	Herd 3		Herd 4 ^a	Herd 5		Herd 6	
	N n=10	P n=10	N n=9	N n=10	P n=13	N n=10	N n=7	P n=6	N n=10	P n=5
<i>Pasteurella multocida</i>	60	40	44	50	100	50	29	100	50	100
<i>Histophilus somni</i>	30	90	11	0	0	30	0	50	40	40
<i>Mannheimia haemolytica</i>	10	30	11	20	31	20	14	17	60	40
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	0	10	22	0	0	0	0	17	10	0
<i>Moraxella sp.</i>	0	0	0	0	0	0	14	0	0	0
<i>Mycoplasma dispar</i>	0	50	44	0	92	20	14	83	50	20
<i>Mycoplasma bovirhinitis</i>	0	70	11	10	85	10	29	67	30	80
<i>Mycoplasma bovis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
No bacteria detected	30	0	22	50	0	20	71	0	10	0
BRSV antigen	0	60	0	0	100	0	0	0 ^b	0	0 ^b
PI-3 antigen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Coronavirus antigen	0	40	0	0	0	0	14	0	0	0

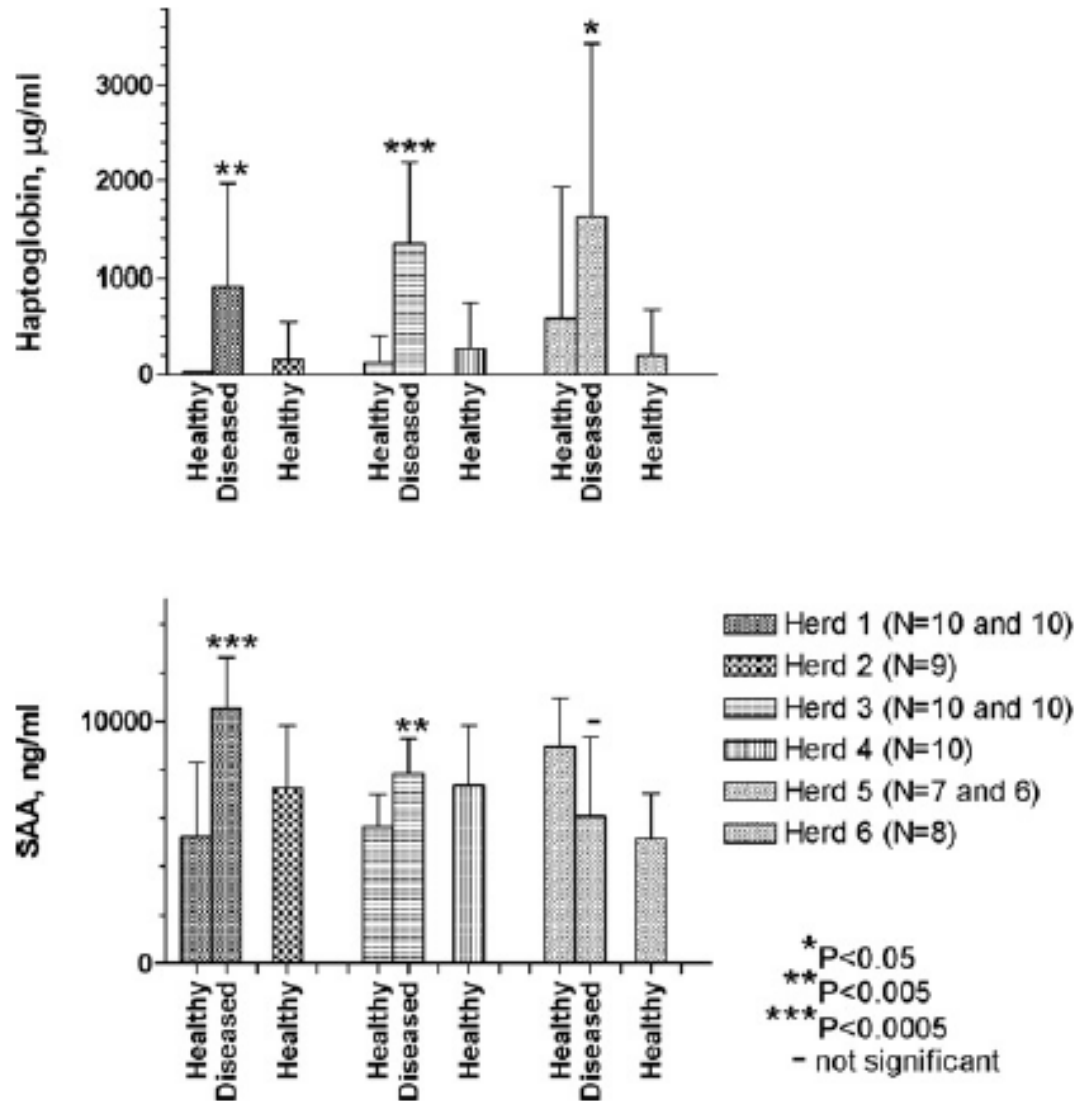
^a: Pneumonic disease not observed during study period.

^b: No seroconversion to BRSV detected in herds 5 and 6.

Ø. Angen et al., Veterinary Microbiology, In Press

Virus primær årsag i besætning 1 og 3?
Bakterier primær årsag i besætning 5 og 6?

Acute phase protein – sygdoms markør?



Opsummering (engelsk – fra artiklen)

- For *H. somni* and *M. haemolytica*, a higher percentage of the samples were found positive by PCR than by cultivation, whereas the opposite result was found for *P. multocida*.
- Surprisingly, 63% of the apparently healthy calves harbored potentially pathogenic bacteria in the lower respiratory tract, 60% of these samples contained either pure cultures or many pathogenic bacteria in mixed culture.
- Detection of *P. multocida* by PCR or cultivation was found to be significantly associated with the disease status of the calves.
- For *H. somni* a similar association with disease status was only observed for cultivation and not for PCR.
- BRSV was detected in diseased calves in two herds but not in the clinically healthy animals.

Konklusioner

- BRD er en multifaktoriel lidelse
- Virus er ikke den primære årsag til BRD i alle besætninger
- Vanskeligt at bestemme primær årsag til BRD eller hvilken rækkefølge de forskellige agens har betydning
- Feltundersøgelser giver et uklart billede da infektionstidspunktet oftest ikke er kendt
- Haptoglobin øger både ved virus og bakterieinfektioner

Take home's

- Anvend diagnostik!
- Udtag prøver fra flere, ubehandlede dyr i den akutte fase
- Prøvemateriale lidt op til temperament men vær opmærksom på fordele og ulemper ved de forskellige materialer
- Tolkning af svar ofte en udfordring men klø på – du får mere og mere erfaring!