

Karakteristik af luftvejslidelser samt udfordringer i forhold til diagnostik i fire danske slagtekalvebesætninger med fokus på *Mycoplasma bovis*



Veterinært kandidatspeciale

Annie Nielsen, cgw252

Hovedvejleder:

Liza Rosenbaum Nielsen

Professor MSO

Institut for Produktionsdyr og Heste

STØTTET AF

kvægafgiftsfonden

Institutnavn: Institut for Produktionsdyr og Heste

Fakultet: Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet

Forfatter: Annie Nielsen

Projekttype: Veterinært speciale, 30 ECTS point

Titel og evt. undertitel: Karakteristik af luftvejslidelser samt udfordringer i forhold til diagnostik i fire danske slagtekalvebesætninger med fokus på *Mycoplasma bovis*

Title/Subtitle: Characteristics of respiratory problems and challenges regarding diagnostics in four Danish veal calf herds with focus on *Mycoplasma bovis*

Hovedvejleder: Liza Rosenbaum Nielsen, Professor MSO, Institut for Produktionsdyr og Heste. Det sundhedsvidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet.

Medvejleder: Mikkel Bruun Svendsen, Ph.d. stud., Institut for Produktionsdyr og Heste. Det sundhedsvidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet.

Afleveret d. 15 januar 2016

Frederiksberg d. 15. januar 2016

Annie Nielsen, cgw252

Forside: Billeder fra besætningsbesøg i forbindelse med specialet. Fotografer: Ulla Torpe

Forord

Dette veterinære speciale er udarbejdet som en del af projektet ”*Mycoplasma bovis* i danske slagtekalvebesætninger”, som er et projekt finansieret af Kvægafgiftsfonden. Projektet er et samarbejde mellem Institut for Produktionsdyr og Heste ved Københavns universitet og SEGES med Henrik Læssøe Martin, som projektansvarlig. Specialet er udarbejdet fra september 2015 til januar 2016. Det svarer til 30 ECTS og er afslutningen på min kandidatuddannelse i veterinærmedicin.

En stor tak til min vejleder Liza Rosenbaum Nielsen, Institut for Produktionsdyr og Heste, for stort engagement, inspiration samt god og konstruktiv vejledning. Tak til Henrik Læssøe Martin for hjælp til udvælgelse af besætninger, gode råd og hjælp ved besætningsbesøg. Tak til Kvægafgiftsfonden for finansiering af udgifter til projektet.

Tak til Ulla Torpe for at have kontakten til slagtekalvebesætningerne, stå for prøveudtagningen og tak for godt samarbejde ved besætningsbesøgene. Tak til Katja Mikkelsen, MSD Animal Health Danmark for hjælp til trachealskyl.

Tak til DTU-Veterinærinstituttet, Frederiksberg, for analyse af prøver samt besvarelse af spørgsmål i forbindelse med metoder. Ligeledes tak til GD Animal Health, Deventer, Holland, for analyse af prøver samt besvarelse af spørgsmål. Tak til medvejleder Mikkel Bruun Svendsen for god hjælp med statistik. Tak til Mette Bisgaard Petersen for hjælp og inspiration til statistiske modeller. Tak til Matt Denwood, Københavns universitet, for hjælp til statistik.

Der skal lyde en stor tak til de fire slagtekalvebesætninger for deltagelse og hjælpsomhed ved besætningsbesøgene.

Tak til Per Nielsen for gennemlæsning.

Tak til Troels Løwig Larsen, Boehringer Ingelheim for trykning af specialet.

Sammendrag

Formålet med dette speciale var at karakterisere luftvejslidelser i fire danske slagtekalvebesætninger med hensyn til både kliniske og diagnostiske parametre samt at identificere risikofaktorer på enkeltdyrsniveau. Specialet er skrevet med fokus på *Mycoplasma bovis* og er udarbejdet som en del af projektet ”*Mycoplasma bovis* i danske slagtekalvebesætninger”.

Data til dette speciale er indsamlet i et feltstudie i fire danske slagtekalvebesætninger i perioden fra september 2015 til januar 2016. Slagtekalvebesætningerne bestod af to besætninger med opstaldning i mindre hold af omkring 6 kalve og to besætninger med opstaldning i store hold af 20-25 kalve. Ved indsættelse blev en kohorte på 20-25 kalve udvalgt bestående af 5-6 kalve fra fire leverandører i hver besætning. Kalvene blev besøgt 0, 1, 2, 4, 6 og 10 uger efter indsættelse. Kalvenes kliniske symptomer blev evalueret ved hvert besøg, og blodprøver blev udtaget ved indsættelse samt 2, 6 og 10 uger efter indsættelse. Trachealskyl blev foretaget på syge kalve ved besøgene, dog maksimalt et trachealskyl per kalv i studieperioden.

Blodprøverne blev analyseret ved hjælp af ELISA for antistoffer mod *M. bovis*. Trachealskylene blev analyseret via PCR for *M. bovis*, BCoV, BRSV og PI-3 samt bakteriologisk undersøgt for *P. multocida*, *M. haemolytica*, *H. somni* og *Mycoplasma subspecies*. Ud fra den kliniske evaluering og antistofmålingerne blev udviklingerne i klinisk sygdom og serologi beskrevet. Påvisningen af agens i trachealskylene blev anvendt til at estimere prævalensen af de forskellige agens samt give indblik i, hvilke patogener der var tilstede i besætningerne hos syge kalve.

I studies sås en kulmination i kliniske symptomer 14-21 dage efter indsættelse i nogle besætninger, mens der i andre besætninger sås et mere jævnt niveau af symptomer gennem studieperioden. Alder, 0-14 dages kalvedødelighed hos leverandører og en af besætningerne blev identificeret som signifikante risikofaktorer for udvikling af klinisk sygdom. I studiet blev der ikke fundet nogle materielle antistoffer eller sammenhæng mellem stigning i antistoffer og kliniske symptomer. Der sås et forsinket antistofrespons mod *M. bovis* hos nogle kalve ved en alder på 50-75 dage. Studiet viste en sammenhæng mellem et højt antal klinisk syge kalve og påvisning af høje prævalenser af *M. bovis*, *P. multocida* og BCoV.

Resultaterne kan give et indblik i kliniske symptomer, patogener og risikofaktorer på enkeltdyrsniveau associeret med luftvejsinfektioner i fire danske slagtekalvebesætninger. Disse resultater kan anvendes til opstilling af nye hypoteser og bidrage med overvejelser til nye studier.

Abstract

The aims of this thesis were to characterize respiratory disorders in Danish veal calves' herds with different housing conditions, regarding both clinical and diagnostic parameters and try to identify risk factors of importance for development of respiratory disorders in veal calves in animal-level. The thesis is a part of the project "*Mycoplasma bovis* in Danish veal calves".

The data is collected in a field study in four Danish veal calves' herds from September 2015 until January 2016. The four herds involved two herds with housing in small groups (6 calves) and two herds with housing in big groups (20-25 calves). A cohort of 20-24 calves was selected on each farm, consisting of 5-6 calves from four different suppliers. The calves were visited 0, 1, 2, 6 and 10 weeks after arrival. All calves in the cohort were clinically scored on each visit. A calf was defined as sick with a score ≥ 4 . Blood tests were done 0, 2, 6 and 10 weeks after arrival. BALs (bronchoalveolar lavage) were done on calves with a score of 4 or more, but only one BAL on each calf during the study.

The blood samples were analyzed by ELISA for antibodies against *M. bovis*. The BALs were analyzed by PCR for *M. bovis*, BCoV, BRSV and PI-3 and cultured for *P. multocida*, *M. haemolytica*, *H. somni* and *Mycoplasma subspecies*. The antibodies and clinical scores were used to describe the development in antibodies and clinical disease. The pathogens in the BALs were used to describe the presence of pathogens in the lungs of sick calves and their prevalence.

Some of the farms show peak of symptoms between 14-21 days after arrival like we see it in the literature, but some of the farms show a more even level of symptoms. Age, the percent of dead calves in the supplier herd by 14 days and a certain herd was identified as significant risk factors for development of clinical disease. We did not see any maternal antibodies against *M. bovis* among the cohort calves and no associations were found between increase in antibodies against *M. bovis* and clinical symptoms in calves during the study. We saw a delayed antibody response with a rise in antibodies around 75 days of age. The study showed high number of calves with respiratory symptoms on the farms with higher numbers of *M. bovis*, *P. multocida* and BCoV found in the BALs.

The results give an insight into the clinical symptoms, pathogens and risk factors on animal-level associated with respiratory infections in four Danish veal calf herds. The results can be used to help to develop new hypothesis and help with considerations for new studies.

Indholdsfortegnelse

FORORD	2
SAMMENDRAG	3
ABSTRACT	5
1 INTRODUKTION	10
2 TEORI	12
2.1 Karakteristika for <i>Mycoplasma bovis</i>	12
2.2 Patogenese	12
2.2.1 Transmission og inkubationstid	12
2.2.2 Immunrespons: eksperimentel og naturlig infektion	13
2.2.3 Kliniske symptomer og patologiske fund hos kalve	15
3 MATERIALE OG METODER	16
3.1 Udvalgelse af slagtekalvebesætninger	16
3.2 Studiedesign	16
3.3 Klinisk scoring	17
3.4 Blodprøver	17
3.5 Trachealskyl	17
3.6 ELISA	19
3.7 Påvisning af bakterier og virus i trachealskyl	19
3.7.1 PCR <i>M. bovis</i>	19
3.7.2 PCR BPIV-3, BRSV og BCoV	20
3.7.3 Bakteriologisk dyrkning.....	21
3.8 Obduktion af kalve på Kjellerup Laboratorium	21
3.9 Datahåndtering og statistiske analyser	22
3.9.1 Deskriptiv statistik	22
3.9.2 Multivariabel analyse	23
3.9.2.1 Seropositivitet for antistoffer mod <i>M. bovis</i>	23

3.9.2.2 Slagtekalvebesætning	23
3.9.2.3 Alder.....	23
3.9.2.4 Leverandørernes 0-14 dages kalvedødelighed	24
4 RESULTATER.....	25
4.1 Beskrivelse af slagtekalvebesætningerne	25
4.1.1 Besætning A.....	25
4.1.2 Besætning B	26
4.1.3 Besætning C.....	27
4.1.4 Besætning D.....	27
4.2 Deskriptiv statistik.....	27
4.2.1 Udvikling i klinisk sygdom.....	27
4.2.2 Udvikling i serologi	30
4.2.3 Påvisning af agens i trachealskyl	34
4.3 Obduktion af kalve	37
4.3.1 Kalv nummer 66	37
4.3.2 Kalv nummer 68	38
4.4 Multivariable analyser	39
5 DISKUSSION	44
5.1 Resultater	44
5.1.1 Beskrivelse af slagtekalvebesætningerne	44
5.1.2 Udvikling i klinisk scoring.....	44
5.1.3 Udvikling i serologi	46
5.1.4 Agens i trachealskyl.....	48
5.1.5 Obduktion af kalve.....	51
5.1.6 Multivariabel analyse.....	51
6 KONKLUSION	55
7 PERSPEKTIVERING	56
8 LITTERATURLISTE	58
BILAGSSAMLING	62

BILAG 1: OVERSIGT OVER PÅVISTE PATOGENER I TRACHEALSKYL.....	63
BILAG 2: OVERSIGT OVER KLINISK SCORE VED DE FORSKELLIGE BESØG.....	65
BILAG 3: OBDUKTIONSRAPPORT, KALV NUMMER 66.....	67
BILAG 4: TRACHEALSKYLLEVEJLEDNING	68
BILAG 5: OBDUKTIONSRAPPORT, KALV NUMMER 68.....	69
BILAG 6: SKEMA TIL KLINISK SCORING AF KALVE	70

1 Introduktion

Mycoplasma bovis (*M. bovis*) betragtes i USA, Canada og Europa som en væsentlig årsag til sygdom hos slagtekalve (Castillo-Alcala et al. 2012). De hyppigste manifestationer af infektion med *M. bovis* hos unge kalve er led-, mellemøre- og lungebetændelse (Maunsell & Donovan 2009). *M. bovis* omtales i litteraturen især som en bidragende faktor til udviklingen af Bovine Respiratory Disease (BRD) hos slagtekalve (Wiggins et al. 2007). BRD anses for at være et af de sygdomskomplekser, som forårsager de største økonomiske tab i den amerikanske slagtekalveindustri (Soehnlén et al. 2012).

Selvom flere studier viser, at *M. bovis* eksperimentelt er i stand til at forårsage akut lungebetændelse hos kvæg, gør flere udfordringer omkring bakteriens komplekse patogenese, diffuse spredningsmønstre og kliniske symptomer det svært at estimere *M. bovis* rolle i udviklingen af respiratorisk sygdom hos kvæg (Caswell and Archambault 2007). Blandt disse udfordringer er hele kompleksiteten af luftvejssygdom hos slagtekalve, som er en multifaktoriel sygdom, hvor management, miljøfaktorer, belægningsgrad, opstaldning i nye grupper, støv, foderskift og transport spiller en rolle i forhold til prædisponering for udvikling af sygdom. En række både virale- og bakterielle patogener, deriblandt *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica* og Parainfluenza-3, er sammen med *M. bovis* associeret med udviklingen af luftvejssygdom hos kalve, og det kan derfor være svært at afgøre *M. bovis* bidrag til patogenesen (M.-A. Arcangioli et al. 2008). Desuden viser en række studier, at *M. bovis* kan isoleres i høje prævalenser fra lunger og nasalsvab hos klinisk raske kalve, og at der er dårlig korrelation mellem antistoffer mod *M. bovis* og klinisk sygdom (Castillo-Alcala et al. 2012; Hanzlicek et al. 2011; Arcangioli et al. 2008; Horwood et al. 2014). Selvom *M. bovis* og andre luftvejspatogener kan isoleres fra klinisk raske kalve, indikerer påvisning fra kalve med kliniske relevante symptomer eller patologiske læsioner, at de isolerede patogener spiller en rolle i patogenesen (Wiggins et al. 2007).

Sygdom forbundet med *M. bovis* har de seneste år også givet grobund for stigende interesse og bekymring i det danske kvægbrug. Dette har resulteret i en række forskningsprojekter omkring *M. bovis* i Danmark. Dette speciale er udarbejdet i forbindelse med forskningsprojektet ”*Mycoplasma bovis* i slagtekalvebesætninger”, som er et projekt finansieret af Kvægafgiftsfonden. Projektet er udarbejdet i et samarbejde mellem Institut for Produktionsdyr og Heste ved Københavns Universitet og SEGES med Henrik Læssøe Martin som projektansvarlig.

Formålet med specialet er at karakterisere luftvejslidelser i fire danske slagtekalvebesætninger med forskellige opstaldningsforhold med hensyn til både kliniske og diagnostiske parametre samt at forsøge at identificere risikofaktorer for udvikling af luftvejssygdom på enkeltdyrniveau. Fokus i specialet er *M. bovis*, men for at vurdere betydningen af *M. bovis* og mulighederne for diagnostik heraf, var det nødvendigt også at undersøge forekomsten af andre luftvejspatogener, som kan have betydning for udvikling af sygdom enten i form af forudgående infektion, som kan prædisponere for sekundær infektion, eller co-infektion med *M. bovis* eller andre patogener.

Specialets første del er et kort teoretisk afsnit omkring *M. bovis*. Det teoretiske afsnit er begrænset til de emner, som er relevante for specialets problemstillinger. I det efterfølgende afsnit, materiale og metode, vil dataindsamling og analyser blive beskrevet, hvorefter resultatafsnittet følger. Her er data beskrevet, behandlet og analyseret. På grund af mængden af indsamlet data, er det ikke alle indsamlede data, som vil fremgå af resultatafsnittet. De resterende data kan findes under bilag. Efter resultatafsnittet følger en diskussion af de indsamlede data og resultaterne, som vil blive sammenholdt med andre studier. Til sidst findes en konklusion og en perspektivering.

2 Teori

2.1 Karakteristika for *Mycoplasma bovis*

M. bovis tilhører familien Mycoplasmataceae, som er en gruppe af mikroorganismer karakteriseret ved deres meget begrænsede genom og mangel på cellevæg (Razin et al. 1998). I stedet for en cellevæg er mikroorganismene i denne gruppe omgivet af en kompleks plasmamembran (Maunsell and Donovan 2009). Der er isoleret omkring 30 forskellige mycoplasma-arter hos kvæg, hvor *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides*, som forårsager oksens ondartede lungesygge, er den mest sygdomsfremkaldende. Danmark har været fri for oksens ondartede lungesygge siden 1886 (Kusiluka et al. 2000). *M. bovis* er den mycoplasma-art, som er hyppigst isoleret hos kvæg (Nicholas 2011).

M. bovis kan overleve adskillige dage i et staldmiljø, forudsat at der ikke er direkte eksponering for sollys. *M. bovis* er mest sensitiv overfor højere temperaturer og kan derfor overleve i vand og mælk i henholdsvis 2 uger og 2 måneder ved en nogenlunde konstant temperatur på 4°C, hvorefter overlevelsestiden falder ved højere temperaturer (Caswell and Archambault 2007).

Overlevelsestiden er rapporteret til at være 37 dage i gødning og 18 dage i strøelse (Ruffo et al. 1969). Varmebehandling ved 65°C i 2 min eller 70°C i 1 min dræber *M. bovis*, hvorfor pasteurisering af råmælk ved disse temperaturer vil forhindre smitte fra ko til kalv gennem mælk (Butler et al. 2000).

2.2 Patogenese

2.2.1 Transmission og inkubationstid

Det er endnu uklart præcist, hvordan infektioner med *M. bovis* overføres, men både direkte overførsel i form af kontakt med smittede køer eller indirekte overførsel ved indtagelse af inficeret mælk eller kontakt med kontaminerede omgivelser er beskrevet som mulige smitteveje (Maunsell & Donovan 2009). I slagtekalvebesætninger spiller risikofaktorer som transport, stress, håndtering m.fl. også en stor rolle i prædisponeringen for infektioner. Kontakt mellem smittede kalve fra andre besætninger betragtes som den største smittevej i slagtekalvebesætninger (Castillo-Alcala et al. 2012)

M. bovis kan isoleres fra en række forskellige organer, men invaderer typisk slimhinder i luftveje, hvorfra spredningen til andre dele af kroppen, som fx led og mellemøre, sker. *M. bovis* udskilles blandt andet i mælk fra inficerede køer og respiratoriske sekreter fra inficerede køer og kalve (Nicholas & Ayling 2003; Caswell & Archambault 2007).

Inkubationstiden fra smitte til klinisk sygdom er svær at definere, da det er uvist om udbruddet af klinisk luftvejssygdom skyldes *M. bovis* eller andre patogener. I studier med naturlig infektion ved kontakt med inficerede kalve ses en periode på mellem 8-15 dage fra kontakt med smittede kalve til symptomer (Castillo-Alcala et al. 2012; Wiggins et al. 2007; Gagea et al. 2006). I et studie med eksperimentel infektion af kalve ses en periode på 5-6 dage fra inficering til kliniske symptomer (Nicholas et al. 2002).

2.2.2 Immunrespons: eksperimentel og naturlig infektion

Ved luftvejsinfektion med *M. bovis* spiller det medfødte immunforsvar en vigtig rolle, hvor aktivering af de alveolære makrofager er essentielt for tidlig clearance af lungerne. Aktiveringen af de alveolære makrofager kan være uhensigtsmæssig og resultere i et excessivt inflammatorisk respons (Caswell and Archambault 2007). Aktiveringen af makrofager fører til rekruttering af neutrofile lymfocytter, som er den dominerende celletype isoleret ved infektioner i lunger, led og mellemøre hos kalve. Det er endnu ikke fuldt forstået, hvordan *M. bovis* kan overleve værtens immunforsvar. *M. bovis* beskrives i litteraturen som immunsupprimerende ved induktion af en række immunmodulatoriske processer, som nedsætter effektiviteten af værtens immunrespons. *M. bovis* besidder også en stor variation af overfladeantigener, som også er vigtige for at overleve værtens adaptive immunrespons (Rottem 2003). En af de måder, hvorpå *M. bovis* kan overleve værtens immunforsvar er ved at invadere værtens epitelceller i luftvejene. Heri kan *M. bovis* persistere og formere sig og samtidig overleve værtens forsvar samt antibiotikabehandling (Bürki et al. 2015).

Det adaptive immunforsvar består af både af et cellemedieret- og et humoralt immunrespons. Der mangler stadig en del viden omkring værtens adaptive immunrespons ved infektion ved *M. bovis*, men det adaptive immunrespons er bedst beskrevet i studier med eksperimentelle infektioner. Et studie med eksperimentel intratracheal- og nasal infektion af en gruppe kalve på 12 uger, hvor Th1- og Th2-cytokinproduktion blev brugt til at monitorere det cellulære immunrespons, indikerer en skrævvridning af et Th2-immunrespons. I studiet blev det humorale respons monitoreret ved

identifikation af antigen-isotyperne IgG1 og IgG2 over tid. Studiet viser, at der hos alle 8 kalve blev produceret høje niveauer af IgG1, som steg gennem studieperioden, mens niveauet af IgG2 var lavt og stort set uændret gennem studieperioden (Vanden Bush and Rosenbusch 2003). Et ældre studie fra 1984 foreslår, at den lave mængde IgG2 er én af årsagerne til den ofte kroniske natur af infektioner med *M. bovis*, da både IgG1 og IgG2 er i stand til at fremme drab af *M. bovis* gennem alveolære makrofager, men kun IgG2 er i stand til at fremme drab ved hjælp af neutrofile lymfocytter (Howard 1984). Et studie fra 2000 angiver, at der ses et stærkt humoralt respons ved eksperimentelle infektioner med *M. bovis* med høje niveauer af IgG1 og lave niveauer af IgG2, mens det humorale respons ved naturligt erhvervede infektioner varierer mere (Virtala et al. 2000).

I det før omtalte studie fra 2003 serokonverterede de 12 uger gamle kalve 7 dage efter eksperimentel infektion med *M. bovis* (Vanden Bush and Rosenbusch 2003), mens der i et andet studie fra 2002 ikke ses serokonvertering før 12 dage efter inficering. I sidstnævnte studie kan det have betydning, at kalvene kun er 3-4 uger ved eksponering (Nicholas et al. 2002). I et review fra 2011 estimeres serokonvertering ved eksperimentelle infektioner på baggrund af flere studier til at finde sted 5-12 dage efter inficering.

Serokonvertering ved naturligt erhvervede *M. bovis*-infektioner er sværere at estimere, da eksponeringstidspunktet kan være sværere at fastsætte, og høje niveauer af antistoffer kan måles hos kliniske raske kalve (Pardon et al. 2011; Wiggins et al. 2007; Castillo-Alcala et al. 2012). Desuden kan maternelle antistoffer spille en rolle hos helt unge kalve, da antistoffer mod *M. bovis* rapporteres at have en halveringstid på 20 dage (Caswell and Archambault 2007). I studier beskrives måling af maternelle antistoffer rettet mod *M. bovis* ved kalve ned til 2 dage gamle (Virtala et al. 2000). Et japansk studie fra 1996 viste, at seronegative kalve på 2-3 uger forblev seronegative i 29-35 dage, efter de var introduceret i en besætning med endemisk luftvejsinfektion med *M. bovis*, men steg i antistoffer 59-63 dage efter eksponering (Nagatomo et. al., 1996). Dette antyder, at der forekommer et forsinket antistofrespons ved naturlige infektioner med *M. bovis* i forhold til ved eksperimentelle infektioner eller at immunforsvaret hos kalve ikke er i stand til at producere antistoffer, før kalvene er omkring 75 dage gamle. Et studie på *Salmonella* Dublin viste at kalvene i studiet ikke var i stand til at producere IgG1 før, de var omkring 75 dage gamle (Da Roden et al. 1992).

2.2.3 Kliniske symptomer og patologiske fund hos kalve

De hyppigste manifestationer af infektion med *M. bovis* hos kalve er led-, mellemøre- og lungebetændelse. For alle 3 manifestationer gælder det, at symptomerne er uspecifikke i forhold til agens, da flere agens kan give samme symptomer (Wiggins et al. 2007). Desuden varierer symptomerne ofte mellem besætningerne. De kliniske symptomer for luftvejsinfektioner forårsaget af *M. bovis* omfatter feber, hyperpnø, anorexi, utrivelighed, øjen- og næseflåd samt vægttab. Samtidige symptomer som halthed og manglende respondering på antibiotikabehandling, kan indikere infektion med *M. bovis*, men andre patogener som fx *Histophilus somni* kan forårsage lignende symptomer (Caswell and Archambault 2007). Ledbændelse forårsaget af *M. bovis* resulterer ofte i klinisk halthed samt smerte og hævelse i et eller flere led. De hyppigst afficerede led er knæ, has, skulder og albue (Caswell and Archambault 2007; Maunsell & Donovan 2009). Ved mellemørebetændelse forårsaget af *M. bovis* kan ses uni- eller bilateralt hængende ører, som skyldes tabt nervefunktion for nervus facialis. Desuden kan øjeflåd, hovedrysten og gnutben opad inventar som følge af smerte samt skæv hovedholdning ses. Der kan også ses andre mere uspecifikke symptomer som feber, utrivelighed og vægttab. De forskellige manifestationer kan både optræde parvist eller alle 3 samtidigt hos kalve (Sykes et al. 2011).

De patologiske fund hos kalve med pneumoni som følge af *M. bovis* kan variere fra kalv til kalv, bl.a. pga. samtidig eller tidligere infektion med andre patogener. Det er oftest de cranioventrale lungelapper, som er afficerede i større eller mindre grad. De afficerede områder kan være højrøde, konsoliderede og udfyldt af caseøse noduli og abcesser med varierende diameter. Der kan ses akkumulering af fibrin på den pleurale overflade samt forstørrelse af de bronchiale og mediastinale lymfeknuder (Gagea et al. 2006; Caswell & Archambault 2007). De patologiske fund ved arthritis forårsaget af *M. bovis* omfatter excessiv ledvæske, fibrin samt hyperplastisk synovialmembran. I alvorlige tilfælde kan ses store mængder hvidgult fibrin eller caseøst materiale i leddet, erosion af ledbrusken samt fortykkelse af ledkapslen. I flere tilfælde er abcesser i seneskeder og andet periarikulært væv beskrevet (Gagea et al. 2006). Da de patologiske fund ofte er resultatet af en kompleks patogenese, hvor flere forskellige patogener er impliceret, er det ikke validt alene at stille en diagnose på baggrund af de patologiske fund, men de kan give en indikation om agens.

3 Materiale og metoder

3.1 Udvalgelse af slagtekalvebesætninger

Data stammer fra et feltstudium gennemført i fire danske slagtekalvebesætninger gennemført i perioden fra september 2015 til januar 2016. Besætningerne blev udvalgt på baggrund af opstaldningstype, størrelse og afstand fra prøveudtagere. Feltstudiet var opsat til at skulle omfatte to besætninger med sektioneret opstaldning i mindre grupper samt to besætninger med opstaldning i større grupper for at repræsentere de mest almindeligt brugte systemer. Slagtekalvebesætningerne blev også udvalgt på baggrund af størrelse, da feltstudiets opsætning krævede, at besætningerne modtog minimum fem kalve fra hver af fire forskellige leverandører omkring studiets opstart i september 2015. Derudover var en køretid på maksimalt én time fra Rødding i Sønderjylland til besætning også medtaget som kriterium for valg af besætning, da en minimering af køretid for prøveudtagere var vigtig for den praktiske gennemførelse og økonomien i studiet. Der er derfor ikke tale om tilfældig udvælgelse af besætninger, men derimod ”convenience sampling”.

Med hensyn til opstaldning så var målet med studiet at kunne følge grupper af kalve, som var opstaldet i samme sektion eller boks i hele perioden. Opstaldningsforholdene er beskrevet nærmere under afsnit 4.1 Beskrivelse af slagtekalvebesætningerne.

Som specialestuderende deltog jeg selv ved besætningsbesøgene i de to første måneder af feltstudiet, hvor jeg udtog prøver og foretog den kliniske scoring i samarbejde med Ulla Torpe. Ved besøgene fik vi en rundvisning i besætningerne samt en snak med ejer eller driftsleder. Derudover er der indhentet tilladelse til at trække data omkring de fire besætninger fra Kvægdatabasen, hvor vi også har indhentet data omkring dødelighed i leverandørbesætningerne. Dette vil blive gennemgået nærmere under afsnittet ”Resultater”, hvor en beskrivelse af de fire besætninger også findes.

3.2 Studiedesign

Ved indsættelse i de fire slagtekalvebesætninger udvalgte en kohorte på 20-24 kalve, det vil sige 5-6 kalve fra fire forskellige leverandører. Alle kalve i kohorten blev scoret klinisk efter skema (se afsnit 3.3), og blodprøve blev udtaget ved indsættelse. Under studieperioden blev kohortekalvene behandlet som de resterende kalve i besætningen, også med hensyn til medicinering.

I studieperioden blev alle kalvene i kohorten fulgt og scoret klinisk ved seks besøg, som fandt sted henholdsvis 0, 1, 2, 4, 6 og 10 uger efter indsættelse. Der blev udtaget blodprøver 0, 2, 6 og 10 uger

efter indsættelse. På kalve inden for kohorten med en klinisk score på 4 eller derover udførtes trachealskyl og øjensvab under sedation, såfremt kalven ikke ved tidligere besøg var blevet trachealskyllet. Ved alle besøg blev behandlinger noteret inden for kohorten med præparat og varighed.

3.3 Klinisk scoring

Ved alle seks besøg i slagtekalvebesætningerne blev kalvene klinisk scoret efter skemaet, som ses i Bilag 6. Skemaet er modificeret efter inspiration fra et skema over scoring af luftvejsslidelser hos kalve uddelt af MSD Animal Health Danmark, Ballerup. Det oprindelige skema er udarbejdet af Professor Sheila McGuirk, University of Wisconsin & Madison (McGuirk and Peek 2014).

Kriterier for scoring omfatter vurdering af øjenflåd, næseflåd, hoved- og ørestilling, hævelse af led, halthed, hoste, respiration og temperatur. Temperaturen blev målt ved høj score (≤ 4) eller mistanke om feber på baggrund af den kliniske scoring. Den kliniske scoring blev ved alle besøg foretaget af dyrlæge Ulla Torpe og/eller undertegnede.

3.4 Blodprøver

Der blev udtaget blodprøver fra kalvene i kohorterne ved indsættelse samt 2, 6 og 10 uger efter indsættelse. Blodprøverne blev enten udtaget fra vena jugularis eller coccygeal-venen alt efter, hvordan kalven var lettest at håndtere. Blodprøverne blev primært udtaget af dyrlæge Ulla Torpe og sendt til Eurofins Steins Laboratorium i Vejen for analyse for antistoffer mod *Mycoplasma bovis*.

3.5 Trachealskyl

Trachealskyl blev foretaget på kalve, som ved den kliniske scoring lå på 4 eller derover, såfremt trachealskyl ikke tidligere var udført på den pågældende kalv. Der blev maksimalt skyllet seks kalve i hver besætning per besøg.

Trachealskylene blev udført, som det er beskrevet af kvægdyrlæge Niels Peter Jensen, se Bilag 4, og demonstreret af dyrlæge Katja Hornbæk Mikkelsen fra MSD Animal Health Danmark, Ballerup. Forud for trachealskylningerne blev kalvene sederet med Rompun Vet intravenøst doseret efter estimeret vægt. Kalvekateter fra KRUUSE, Langeskov blev klargjort, og 50 mL isotont NaCl blev optrukket. Den afrundede ende af kateteret blev anvendt til indførsel i trachea for så vidt som muligt at undgå læsioner i trachea. Før fiksering af kalven målte vi op på kalven cirka hvor bifurkaturen vurderedes at være og tegnede en sort streg på kateteret, så vi havde en ide om, hvor langt vi skulle have kateteret ind.

Herefter fikserede hjælpere kalven i det ene øre og under den modsatte kæbegren. Ved nogle kalve var det en god hjælp at trække op i overkæben, så det var nemmere at se, hvor kateret skulle føres ned. En engangsklud blev brugt til at holde om tungen og trække tungen ud til siden, så tungen blev ikke revet på siden eller undersiden af fortænderne i undermundens. Efter ca. 20-30 sekunder ”overgav” kalven sig, hvilket ofte resulterede i et eller flere brøl. Herefter var det muligt at føre kateteret ned i trachea. Oftest var det nemmest at føre kateteret i trachea, imens kalven brølede, da det gav fri passage.

I nogle tilfælde var det muligt at se ned i svælget på kalven. Kateteret blev ført ind i munden, tæt ned over tungeroden til larynx. Ved korrekt placering i trachea gav kalven ofte et eller gentagne små host. Ved videre indførelse i trachea kunne trachealringene tydeligt fornemmes. Ved modstand blev kalvens hoved strakt ud og kateteret kunne føres lidt længere ned. Herefter blev de 50 mL isotonisk saltvand i sprøjten infunderet, hvorefter stemplet på sprøjten blev trukket tilbage lige efter infundering for at få mest muligt skyllevæske med op igen. Der blev genopsuget omkring 30-35 mL ved hver kalv.

Den genopsugede skyllevæske blev fordelt i to sterile glas, som på køl blev afleveret/sendt til analyse for virus og bakterier ved henholdsvis DTU Veterinærinstituttet, Frederiksberg og GD Animal Health Service Deventer i Holland.



Foto: Ulla Torpe
Demonstration af indførelse af kateter i sederet kalv.



Foto: Liza Rosenbaum Nielsen
Dyrlæge Ulla Torpe og medhjælper indfører kateter i sederet kalv.

3.6 ELISA

Blodprøver udtaget i slagtekalvebesætningerne blev analyseret for antistoffer mod *Mycoplasma bovis* ved brug af indirekte serum ELISA på Eurofins Steins laboratorium i Vejen. Til formålet anvendtes ELISA-kittet ”BioK302”, som er et diagnostisk test-kit udviklet til at detektere antistoffer mod *M. bovis* hos kvæg i serum og mælk. Ved denne metode anvendes mikrotiterplader coated med et rekombinant protein udviklet i en *E. coli* kultur, som udtrykker et antigen fra *M. bovis*. Hvis antistoffer mod *M. bovis* er til stede i det testede serum, vil det bindes til brønde indeholdende det udtrykte antigen samt et enzym, som katalyserer omdannelsen af det farveløse chromogen til farve. Intensiteten af farven er proportionel med titeren for de specifikke antistoffer i serummet. Herefter kan pladernes optiske densitet (OD) aflæses, og prøvens antistofværdi ODC% (Optical Density Calibrated) bestemmes ud fra prøvens OD samt de negative og positive referencer (Bio-X 2011). Der henvises til referencen Bio-X (2011) for yderligere detaljer omkring denne metode. ODC% beskriver således niveauet af antistoffer i blodprøven i forhold til den positive kontrol og beregnes på baggrund af forskellen i den optiske densitet (OD) mellem en positiv og negativ reference, som det ses i nedenstående formel:

$$ODC\% = \frac{OD_{prøve} - OD_{negativ\ serum}}{OD_{positivt\ serum} - OD_{negativt\ serum}} \times 100$$

En prøve blev vurderet som negativ, hvis ODC% var mindre end 37. Prøven blev vurderet som positiv, hvis ODC% var 37 eller derover ifølge producentens anbefalinger.

ELISA blev i dette projekt primært brugt til at beskrive udviklingen i antistoffer fra indsættelse og 10 uger frem med henblik på at identificere mulige sammenhænge mellem kliniske symptomer og antistoffer samt identificere smittespredning mellem kalvene.

3.7 Påvisning af bakterier og virus i trachealskyl

Prøverne fra de udførte trachealskyl på klinisk syge kalve blev analyseret for *M. bovis*, *M. haemolytica*, *H. somnus*, *P. multocida* samt bovint coronavirus (BCoV), bovine respiratory syncytial virus (BRSV) og bovin parainfluenza-virus type 3 (BPIV-3) med forskellige analysemetoder som angivet nedenfor.

3.7.1 PCR *M. bovis*

På Animal Health Service i Deventer i Holland blev trachealskylprøverne undersøgt for *M. bovis* ved brug af en in-house udviklet og valideret real-time PCR, som har *oppD*-genet som target.

3.7.2 PCR BPIV-3, BRSV og BCoV

En real-time RT-PCR (reverse transcription PCR) for henholdsvis BPIV-3, BRSV og BCoV blev kørt på trachealskylleprøverne på DTU-Vet. Ved ankomst til DTU-Vet blev RNA udvundet fra prøverne og opbevaret ved -80°C til prøverne blev kørt i november. Resten af prøverne blev kørt senere, men de er ikke med i denne rapport.

Prøverne blev analyseret individuelt for de tre virale agens, men primere og prober til de forskellige agens er justerede, så de matcher den samme temperaturprofil og på sigt kan køres som en multiplex real-time RT-PCR, hvor kvantificering af flere RNA-mål kan foretages i ét enkelt rør. Principperne for udførelsen af de tre analyser er derfor de samme og beskrives samlet. Primere og prober blev designet ud fra forskellige BPIV-3-, BRSV- og BCoV-isolater, hvorefter justeringer i forhold til andre kendte isolater og stammer blev foretaget. Til analyserne blev TagMan®-prober anvendt.

TagMan®-prober består af et sekvensspecifikt oligonukleotid alt efter RNA-mål med henholdsvis 6-carboxyfluorescein bundet ved 5'enden og et ikke-fluorescerende farvestof ved 3'enden. I analyserne i dette studie er Black Hole Quencher Dye anvendt til dette formål. Det ikke-fluorescerende farvestofs funktion er at forhindre fluorescering af fluorescein, så længe der er forbindelse mellem disse. Fluorescein-delen bliver fraspaltet under "annealing-trinnet", som ved anvendelse af TagMan®-prober er forlænget. Fraspaltningen resulterer i et fluorescerende signal, som er proportionel med mængden af akkumuleret DNA i prøven.

RT-PCR analyserne blev kørt i individuelle rør efter justerede temperaturprofiler, bestående af forskellige faser med forskellig temperatur og varighed. I alle tre analyser bestod selve PCR-reaktionen med amplifikation af DNA'et af 40 cyklusser, inddelt i tre forskellige faser. Den første fase var opvarmningsfasen, hvor DNA'et blev denatureret. Herefter fulgte nedkølingsfasen, hvor primeren bandt sig til DNA'et. Den sidste fase var elongeringsfasen, hvor de nye, komplementære DNA-strengs blev dannet.

Detektionsgrænsen var fastsat ved at teste 9 trin i 10 ganges fortyndingsserie med henholdsvis BPIV-3-, BRSV- og BCoV-stammer. Der henvises til følgende referencer (Horwood & Mahony 2011; Hakhverdyan et al. 2005; Decaro et al. 2008) for yderligere detaljer om PCR-metoderne.

PCR-analyserne for BPIV-3, BRSV og BCoV blev i dette projekt primært anvendt til at vurdere, om virus spiller en rolle hos de klinisk syge kalve med henblik på at vurdere, hvorvidt samtidig infektion med andre patogener end *M. bovis* kan tænkes at spille en rolle.

3.7.3 Bakteriologisk dyrkning

Trachealskylleprøver blev undersøgt for følgende bakterielle luftvejsagens ved standard bakteriologisk dyrkning på Animal Health Service i Deventer i Holland: *M. haemolytica*, *P. multocida*, *H. somnus*, *Mycoplasma spp.*.

Dyrkningerne for *M. haemolytica* og *P. multocida* blev udført på en agar bestående af blod fra får. Efter inkubation blev agarpladerne analyseret for kolonier, som lignede *M. haemolytica* eller *P. multocida*. Hvis sådanne kolonier var til stede, blev de testet ved brug af MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight), som bruges til at identificere bakterier. Hvis kolonier, helt forskellige fra ovenstående agens, blev identificeret, ignoreredes disse, medmindre der var så mange, at det kunne betegnes som en renkultur. Hvis resultatet af dyrkningerne var en blandingsflora med tre eller flere forskellige agens, uden ovenstående agens iblandt, vurderedes prøven som kontamineret.

Dyrkningerne for *H. somni* blev foretaget på chokoladeagar, da *H. somni* kræver et vækstmedie med højt indhold af næringsstoffer.

Dyrkningerne for *Mycoplasma spp.* blev foretaget på PPLO-agar, som er et selektivt medie for mycoplasma. På nuværende tidspunkt kan *M. bovis* ikke identificeres ved hjælp af MALDI-TOF. *M. bovis* blev derfor identificeret via PCR, som beskrevet tidligere.

3.8 Obduktion af kalve på Kjellerup Laboratorium

Ved studiestart blev besætningsejerne oplyst om, at projektet meget gerne ville have døde eller aflivede kalve i kohorten obduceret med henblik på at se de patologiske forandringer samt muligheden for at dyrke og isolere patogener direkte fra eventuelle læsioner i lunger-, led- og mellemører.

En besætning mistede to kalve i kohorten i studieperioden. Den første kalv valgte de at aflive grundet manglende effekt af gentagen antibiotikabehandling, og den anden kalv døde af sig selv.

Begge kalve havde ved de forudgående besætningsbesøg scoret over 4 i den kliniske scoring og var derfor vurderet som syge under forløbet.

Kalvene blev begge transporteret til Kjellerup, et laboratorium for svinesygdomme, som i efteråret 2015 også er begyndt at modtage kalve til undersøgelse. På laboratoriet blev begge kalve obduceret og alle organsystemer gennemgået for forandringer. Alle led blev opskåret og undersøgt, kraniet blev flækket, og mellemøret blev også undersøgt for forandringer. Der blev udtaget prøver fra lungerne til en luftvejspakke, som indebærer analyse af væv og evt. ekssudat fra lunger for en række luftvejsagens. Derudover blev der udtaget prøver fra mellemøre og led til undersøgelse for *M. bovis* og andre agens. Efter endt obduktion og analyse af de udtagede prøver modtog vi en obduktionsrapport med prøvesvar på begge kalve.

3.9 Datahåndtering og statistiske analyser

De kliniske scoringer indhentet på besætningsbesøgene blev indtastet i Microsoft Excel. I samme dataark blev typen af prøve udtaget på den pågældende dag, henholdsvis blod- og/eller trachealskyl, angivet. Observationer fra besøg samt udtalelser fra besætningsejere blev noteret og sammenfattet i en beskrivelse af den enkelte besætning med henblik på at klarlægge mulige risikofaktorer på enkeltdyrniveau for at udvikle sygdom. Registreringer fra Kvægdatabasen omkring antal leverandører og kalvedødelighed i leverandørbesætningerne i perioden 1/10-2014 – 1/10-2015 blev indhentet og noteret med henblik på at vurdere om kalvedødeligheden i leverandørbesætningerne havde betydning for den enkelte kalvs risiko for at blive syg.

Blodprøvesvar samt fund af agens i trachealskylprøverne blev noteret i et Excelark ud for hver kalv for at skabe et overblik over fundene samt klargøre datasæt til statistiske analyser. Både den deskriptive statistik og den multivariable analyse blev udført i RStudio version 3.2.2.

3.9.1 Deskriptiv statistik

Gennemsnittet af de kliniske scoringer på de forskellige besøg blev beregnet og angivet med konfidensinterval med det formål at beskrive udviklingen i klinisk sygdom i de fire besætninger gennem studieperioden. Gennemsnittet de kliniske scoringer blev beregnet på baggrund af de fem første besøg, da der ikke var gennemført seks besøg i alle besætningerne på afleveringstidspunktet. Der er taget højde for om såkaldte ”outliers” trækker gennemsnittet skævt ved at beregne medianen, men dette var ikke tilfældet for nogle af besætningerne.

Resultaterne af blodprøverne blev analyseret ved hjælp af deskriptiv statistik og anvendt til at visualisere og beskrive udviklingen i antistoffer mod *M. bovis* fra indsættelse og 10 uger frem. Endvidere blev resultaterne af blodprøverne brugt i den multivariable analyse. Da der var meget få serologiske reaktioner, der kunne betragtes som positive i de prøver, som var til rådighed ved afleveringsfrist for specialet, var de serologiske resultater ikke egnede til videre statistiske analyser.

3.9.2 Multivariabel analyse

For at klarlægge, hvorvidt en række risikofaktorer havde signifikant betydning for sandsynligheden for, at en kalv blev syg i studieperioden, blev der anvendt en generaliseret mixed model, som er en logistisk regressionsmodel, hvor der tages højde for korrelation mellem kalve fra samme leverandørbesætning og samme slagtekalvebesætning.

Væsentlige faktorer, der menes at have betydning for udvikling af luftvejssygdom hos kalvene på enkeltdyrsniveau, blev udvalgt. Grundet den begrænsede stikprøve og af besætninger, var det ikke muligt at vurdere risikofaktorer på besætningsniveau.

*3.9.2.1 Seropositivitet for antistoffer mod *M. bovis**

Testpositivitet for antistoffer mod *M. bovis* blev udvalgt for at klarlægge, om der var en sammenhæng mellem klinisk sygdom og antistoffer mod *M. bovis*. Kun kalve testet positive indenfor seks uger efter indsættelse blev medtaget i den statistiske model, så sammenligningsgrundlaget for alle besætninger var det samme. ODC% blev omskrevet til en dikotom skala, hvor $ODC\% < 37$ blev givet værdien 0 og $ODC\% \geq 37$ blev givet værdien 1.

3.9.2.2 Slagtekalvebesætning

Slagtekalvebesætningen, som kalven blev indsat i, blev medtaget som risikofaktor for at se, hvilken effekt slagtekalvebesætningerne havde på sandsynligheden for, at kalvene udviklede klinisk sygdom.

3.9.2.3 Alder

Kalvenes alder blev også medtaget som risikofaktor for udvikling af klinisk sygdom. Kalvenes alder ved hvert besøg blev beregnet og medtaget i den statistiske model som en kontinuert skala. Alderen blev i beregningerne centreret omkring 0 ved at trække den gennemsnitlige alder fra i datasættet. Alderen indgik i to led i den endelige logistiske model, da sammenhængen mellem sandsynlighed for sygdom og alder ikke var en lineær sammenhæng. Derfor indgik $alder * alder$ centreret omkring 0

ved at trække gennemsnittet fra også som en variabel. De to led blev i den endelige logistiske model kaldt henholdsvis agecent og agecent2.

3.9.2.4 Leverandørernes 0-14 dages kalvedødelighed

Leverandørernes procent døde kalve indenfor de første 14 levedage i løbet af det seneste år blev medtaget som en risikofaktor for at vurdere, om kalve fra leverandørbesætninger med høj kalvedødelighed indenfor de første 14 levedage havde en større sandsynlighed for at blive klinisk syg i studieperioden.

Der blev taget højde for korrelation på besætnings- og leverandørniveau. Det var ikke muligt at tage højde for korrelation på dyreniveau (gentagne målinger på dyr) grundet det begrænsede datasæt. Flere modeller blev opstillet og den bedst tilpassede model blev fundet ved at sammenligne de forskellige modeller på baggrund af deres AIC, som er udtryk for, hvor godt modellen passer. Parameterestimer, standardfejl, odds ratio (OR), 95% konfidensinterval (95% KI) til odds ratio samt den tilhørende p-værdi fra analysen blev angivet i en tabel. Alle variabler med en p-værdi < 0,05 blev betegnet som signifikante.

4 Resultater

De fire slagtekalvebesætninger er betegnet som besætning A, B, C, D og alle kalve i de fire kohorter har fået et individuelt nummer fra 1-87. I hver slagtekalvebesætning er der testet og fulgt kalve fra fire forskellige leverandørbesætninger. De 16 forskellige leverandørbesætninger betegnes som leverandør 1-16, hvor leverandør 1-4 leverer til besætning A, leverandør 5-8 leverede til besætning B, leverandør 9-12 leverede til besætning C og leverandør 13-16 leverede til besætning D. Med disse betegnelser kan slagtekalvebesætninger, kohortekalve og leverandørbesætninger følges gennem rapporten.

4.1 Beskrivelse af slagtekalvebesætningerne

Ud fra samtale med besætningsejer/driftsleder samt observationerne er følgende skema og den korte beskrivelse af hver besætning under skemaet udarbejdet.

Tabel 1: Beskrivelse af de fire slagtekalvebesætninger.

Besætning	Besætning A	Besætning B	Besætning C	Besætning D
Opstaldning	2x3 bokse i 1 sektion. 6 kalve i hver boks	20-25 kalve sammen i 1 boks	6 kalve i 1 boks uden kontakt til andre	20-25 kalve sammen i 1 boks
Indsættelse	36 kalve hver 7.-14. dag.	100-150 kalve hver 3. uge.	Større antal kalve hver 7. dag.	Ca. 50 kalve ind hver 14. dag
Gennemsnitlig alder ved indsættelse	29 dage	24 dage	33 dage	31 dage
Mælkefodring	Fælles trug i boks	Sutteautomat	1 skål pr kalv	Sutteautomat
Medicinering	Draxxin til alle kalve 4-5 dage efter indsættelse	Enkelte dyr behandles individuelt ved sygdom.	Draxxin til alle kalve 4-5 dage efter indsættelse	Enkelte dyr behandles individuelt ved sygdom. Ved ca. 1/3 syge i én boks, behandles alle
Leverandører i 2015	26 forskellige	50 forskellige	63 forskellige	13 forskellige
Kohorte	24 kalve	20 kalve	20 kalve	23 kalve
Klinisk syge i perioden 23/09 – 20/12 2015	15 kalve	19 kalve	15 kalve	11 kalve

4.1.1 Besætning A

På besætning A slagtes, inden de er 10 måneder gamle, da Dansk Kalv er aftagere. Kalvene afhentes ude ved leverandører hver 14. dag i større besætninger eller én gang månedligt i mindre besætninger. Kalvene sorteres efter vægt ved indsættelse, hvor de er mellem 14 dage og 1,5 måned

gamle. De indsættes i rengjorte sektioner bestående af 2x3 bokse med helvægs-adskillelse ind til næste sektion. Imens kalvene stod i indsætterstalden, blev flere kalve flyttet individuelt mellem boksene på baggrund af vægt fra besøg til besøg, og ved et af besøgene var nyligt hentede kalve indsat i én af boksene i sektionen. Boksene i sektionerne er adskilt af tremmegitter, mens hver sektion er adskilt af en mur. Alle kalvene behandles med Draxxin 4-5 dage efter indsættelse. Dette er en strategi, der følges på nuværende tidspunkt jævnfør aftale med besætningsdyrlægen for at minimere sygdomsforekomsten. Herefter behandles individuelle kalve efter behov. Kalvene går i indsætterstalden til de er 3-4 måneder gamle, hvorefter de flyttes til mellemstalden i hold af 21 kalve. Besætningsejer beskriver, at de typisk ser problemer med sygdom 2-4 uger efter flytning til mellemstalden. Kalvene flyttes fra mellemstalden til sengestalden, hvor de fedes færdige. I besætningen findes flytbare sygebokse og en sygestald, hvor meget syge og behandlingskrævende kalve flyttes op. Når en kalv først er flyttet til sygestalden, kommer den ikke tilbage til sit oprindelige hold. Kalvene flyttes fra mellemstalden til sengestalden, hvor de fedes færdige.

4.1.2 Besætning B

På besætning B indsættes 100-150 kalve hver 3. mandag. Besætningsejeren sorterer i kalve ude hos leverandørerne på baggrund af snit, øjenflåd og hængende ører. I besætning B findes flere forskellige opstaldningssystemer, men fælles for dem alle er, at kalvene går i bokse med 20-25 kalve i hver, dybstrøelse og sutteautomater anvendes til mælkefodring. Boksene adskilles hovedsagligt af tremmegitter.

Kalvene vejes ved ankomst og sorteres i hold af 20-25 efter vægt. Alle kalve gives et skud vitaminer ved ankomst. Desuden blandes elektrolytter i lunkent vand, da besætningen har døjet med diarré hos kalvene efter indsættelse. Kalvene behandles stort set aldrig i flok, men individuelt. Tre gange ugentligt scores kalvene efter et skema, som ligner det skema, som anvendes til klinisk scoring i dette projekt. Kalvene behandles individuelt efter, hvordan de scores, med forskellige præparater. Ved hver boks forefindes skema, så personale kan følge med i, hvor mange gange hver enkelt kalv bliver behandlet. Lungebetændelse bekrives som det største problem blandt kalvene. Kalvene bliver i den boks, hvor de indsættes med de samme 20-25 kalve fra indsættelse til de er ca. 4-4½ måned gamle. Herefter bliver de flyttet til en anden ejendom med sengebåse og spaltegulv, hvor de fedes færdige. Boksene muges mellem hvert nyt hold kalve.

I besætningen er en række frasorteringsbokse indenfor og en række plastikhytter udenfor. Begge dele anvendes til sygebokse.

4.1.3 Besætning C

I besætning C indsættes et større antal kalve i starterstalden hver 7. dag. Ved indsættelse sorteres de efter vægt og fordeles i bokse med seks kalve i hver boks. I starterstalden findes i alt 116 bokse i to rækker med et bredt betonråde imellem. Boksene er adskilt af mure, og der er ikke kontakt mellem kalvene i nabobokse. Kalvene bliver i den boks, de er indsat i, indtil de er ca. 4 måneder gamle og flyttes til en anden stald, hvor de fedes færdig. I boksene mælkefodres kalvene i skåle – én skål pr kalv, hvorefter skålene rengøres før næste fodring.

Alle kalvene behandles med Draxxin 4-5 dage efter indsættelse. Dette er en strategi, der følges på nuværende tidspunkt jævnfør aftale med besætningsdyrlægen for at minimere sygdomsforekomsten

4.1.4 Besætning D

I Besætning D indsættes kalve hver 14. dag efter afhentning ved leverandør. Kalvene er cirka tre til fire uger gamle ved indsættelse. Besætningsejeren sorterer ikke i kalvene ved afhentning og medgiver, at han til tider afhenter kalve med tydeligt hængende ører. Kalvene indsættes i hold af ca. 20 kalve i starterstalden, hvor de går i samme hold i ca. 16 uger. Boksene i starterstalden er opdelt i sektioner adskilt af vægge. Hver sektion indeholder to bokse med tremmegitter imellem. Kalvene fodres med mælk i sutteautomat og afvænnedes ved en alder på ca. 50 dage. Kalvene behandles enkeltvist ved kliniske tegn. Hvis omkring 1/3 af kalvene i én boks udviser symptomer, behandles alle kalvene i boksen med antibiotika. Besætningen har primært problemer med luftvejsinfektioner i starterstalden, men besætningsejer fortæller også, at de har haft problemer med hævede led i perioder.

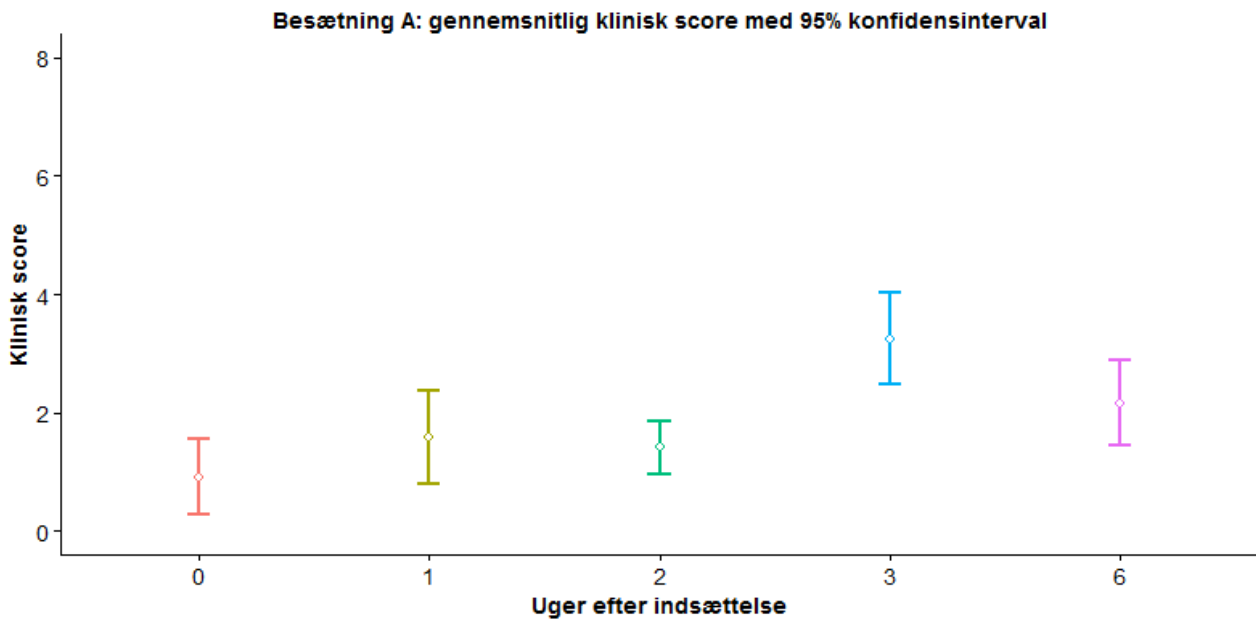
Kalvene flyttes efter 16 uger over i spaltestalden i samme hold, hvor de kontrolvejes hver uge.

I besætningen findes sygebokse, som anvendes, hvis en kalv er blevet behandlet gentagne gange.

4.2 Deskriptiv statistik

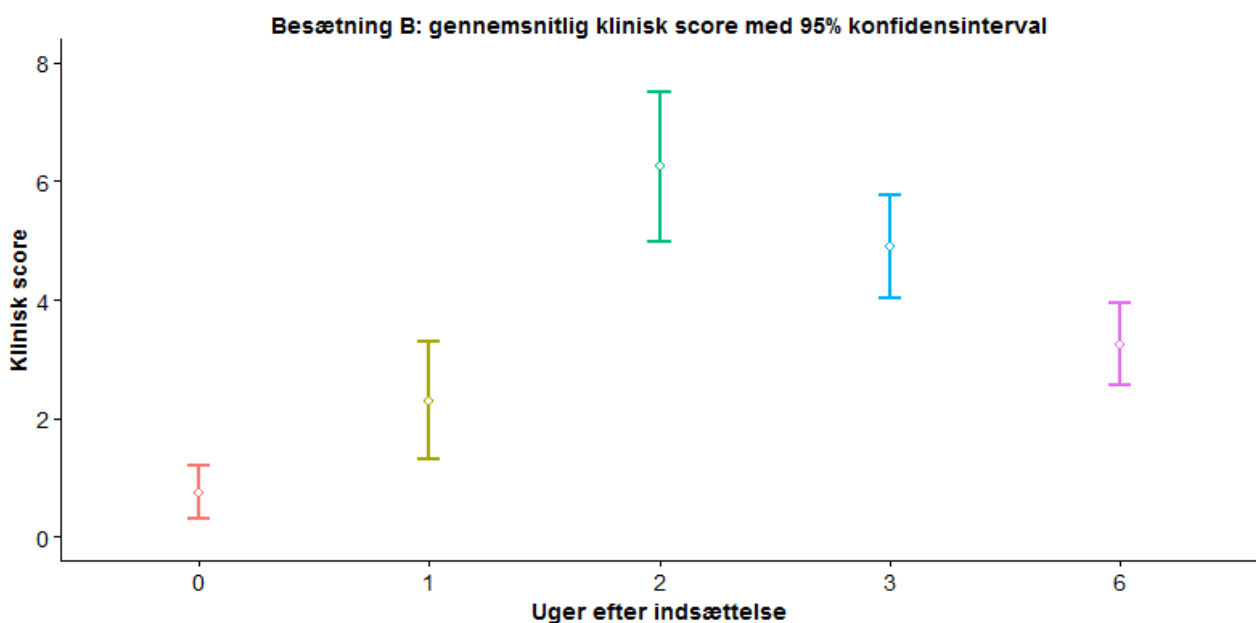
4.2.1 Udvikling i klinisk sygdom

Udviklingen i klinisk sygdom hos slagtekalvene i de 4 besætninger blev beskrevet ud fra kalvenes scoringsværdier ved de første 5 besøg, alle foretaget i oktober-december 2015. I alle besætninger var næse-og øjenflåd, hængende ører, hoste og feber ved en temperatur $>39,5^{\circ}\text{C}$ de hyppigste symptomer. Der er kun rapporteret om to halte kalve i studieperioden, og årsagen til disse haltheder vurderedes at være klovbrandbylder. Den gode effekt af antibiotikabehandling underbygger denne vurdering.



Figur 1: Gennemsnit klinisk score med 95% konfidensinterval fra fem besøg, besætning A. Besøgene er foretaget september-november 2015.

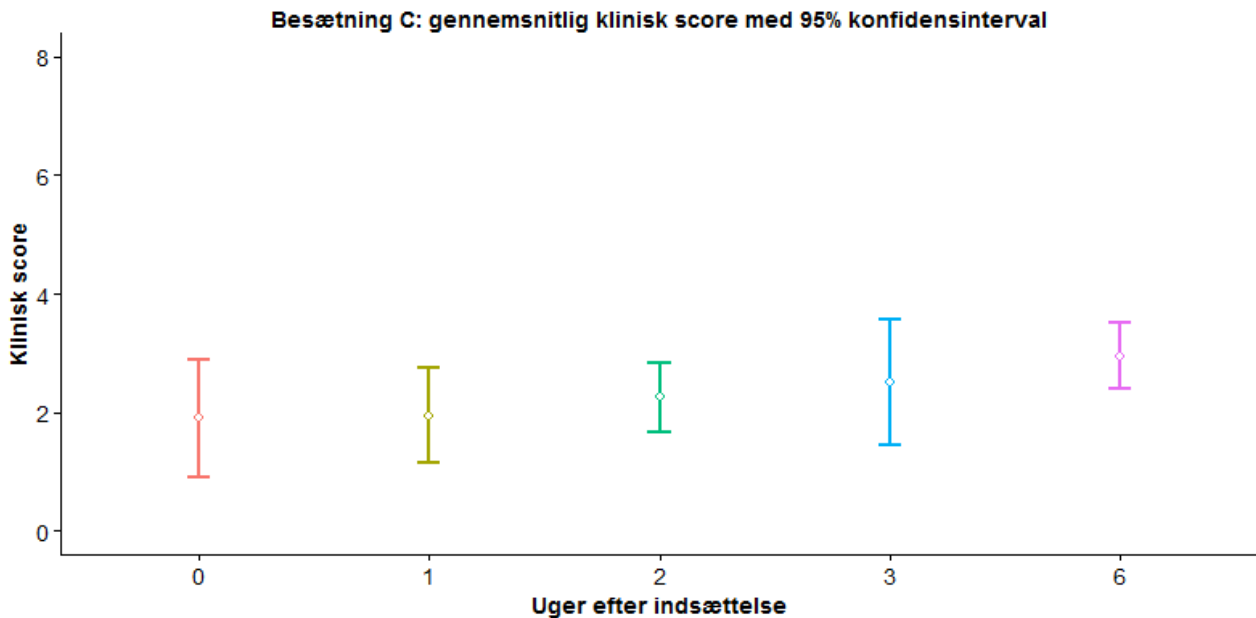
På Figur 1 ses det, at den gennemsnitlige kliniske score i besætning A var lav ved indsættelse, hvor der var en markant stigning i klinisk sygdom fra uge to til tre uger efter indsættelse.



Figur 2: Gennemsnit klinisk score med 95% konfidensinterval fra fem besøg, besætning B. Besøgene er foretaget september-november 2015.

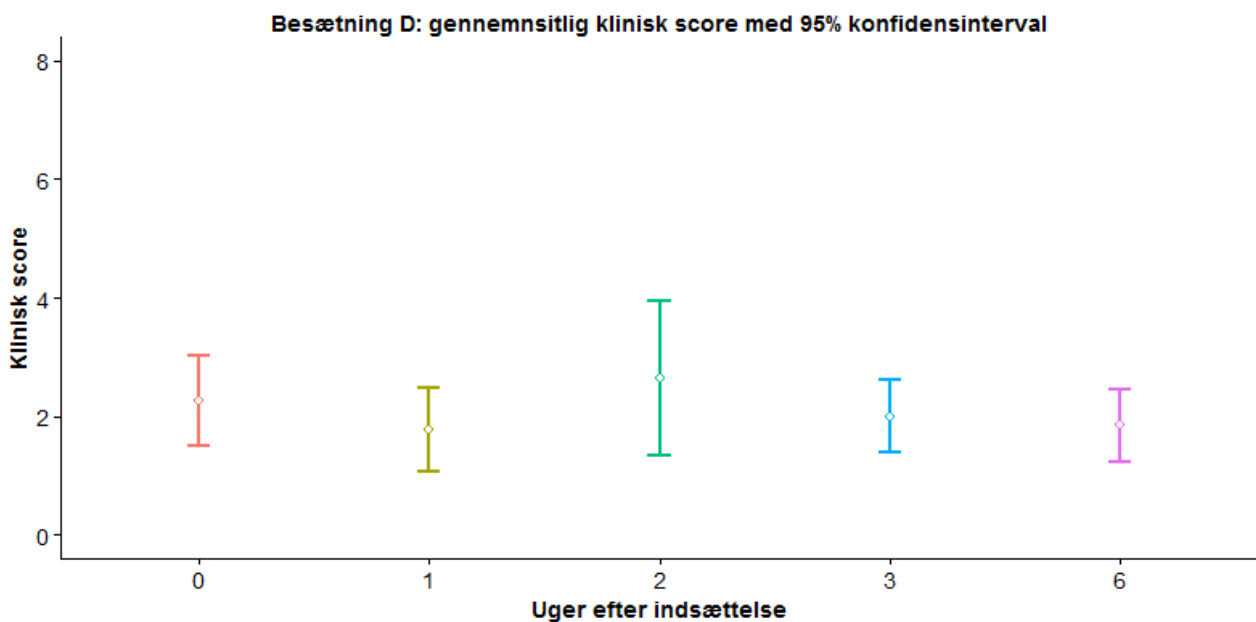
I besætning B sås den højeste gennemsnitlige kliniske score ved besøget to uger efter indsættelse (Figur 2). Som det kan ses på konfidensintervallet, havde 95% af kohorten to uger efter indsættelse en klinisk score på mellem 5 og 7½. Da en kalv i dette studie blev betegnet som klinisk syg ved en

score på ≥ 4 , var mindst 95% af kalvene i kohorten i besætning B klinisk syge 14 dage efter indsættelse.



Figur 3: Gennemsnit klinisk score med 95% konfidensinterval fra fem besøg, besætning C. Besøgene er foretaget oktober-november 2015.

Som det ses på Figur 3 adskilte udviklingen i klinisk sygdom i besætning C sig fra besætning A og B ved at starte lidt højere og holde et mere konstant niveau gennem studieperioden. Der var kun en lille stigning i gennemsnitlig klinisk score fra indsættelse til 6 uger efter, men til gengæld fremgår det af 95% konfidensintervallet, at kalvene inden for kohorten lå tættere på hinanden i klinisk score efter 6 uger end ved indsættelse.



Figur 4: Gennemsnit klinisk score med 95% konfidensinterval fra fem besøg, besætning D. Besøgene er foretaget oktober-november 2015.

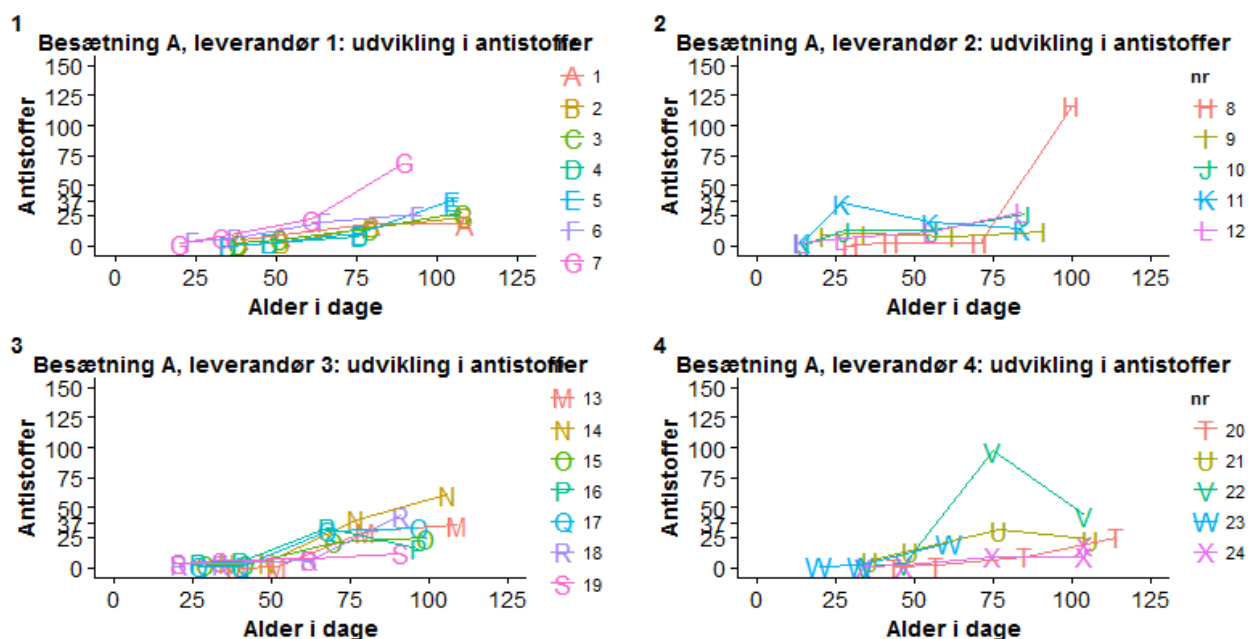
For besætning D på Figur 4 ses lidt den samme udvikling som for besætning C. Den gennemsnitlige kliniske score lå højere end for besætning A og B ved start, men lå til gengæld nogenlunde konstant igennem studieperioden. I studieperioden er to kalve døde/aflivede i besætning grundet sygdom. Begge kalve havde ved de forudgående besøg kliniske scorere > 4 . Selvom den gennemsnitlige score i besætning C og D ikke overstiger 4, som var kriteriet for at en kalv klassificeres som syg, så var der ved alle besøg i besætning C og D et par syge kalve, som også var med til at trække gennemsnittet op.

Ved sammenfatning af Figur 1-4 kan det ses, at der i besætning A og B var en stigning i klinisk score frem til 14-21 dage efter ankomst, hvorefter gennemsnittet i klinisk score var faldende. Anderledes så det ud for besætning C og D, hvor den gennemsnitlige kliniske score lå lidt højere ved indsættelse, men derimod holdt et nogenlunde konstant niveau indtil 6 uger efter indsættelse.

4.2.2 Udvikling i serologi

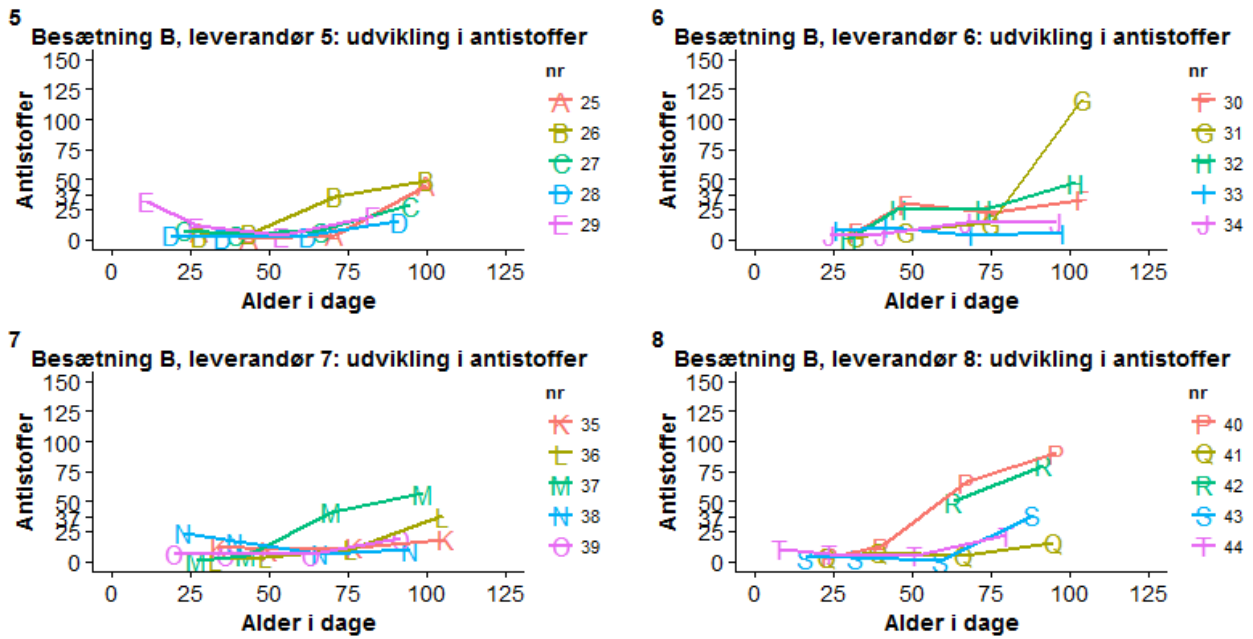
Kalvene i de fire kohortegrupper fra besætning A, B, C og D har gennem studiet fået taget fire blodprøver, henholdsvis 0, 1, 2 og 6 uger efter indsættelse. Grundet senere opstart med besøg i besætning C og D, var det ikke praktisk muligt inden for tidsrammen på mit speciale at få blodprøvesvaret på den 4. blodprøve i disse besætninger. Jeg har valgt at medtage den 4. blodprøve

i besætning A og B, da det er interessant at se, hvad der sker med antistofudviklingen, når kalvene bliver ældre. Blodprøverne er udelukkende blevet undersøgt for antistoffer mod *M. bovis*.



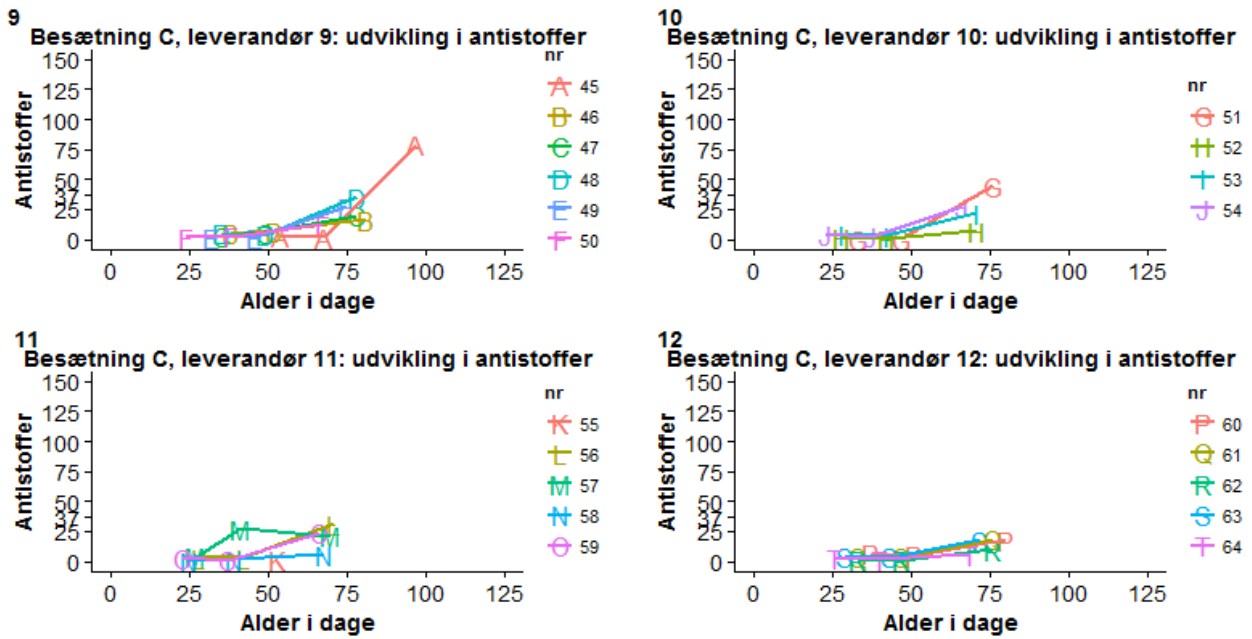
Figur 5: Udvikling i antistoffer fra indsætning i besætning A og 10 uger frem. Blodprøverne er taget ved indsættelse og 2, 6 og 10 uger efter. A-X angiver kurverne for kalvene fra nummer 1-24.

På Figur 5 ses udviklingen i antistoffer for kalvene i kohorten på besætning A. De fire grafer er grupperet efter leverandørbesætninger. I databehandlingens gruppering er der også blevet arbejdet med gruppering efter, hvilken boks kalvene har stået i for at se, om der var sammenhæng mellem for eksempel høje niveauer af antistoffer og boksnummer, men data har ikke vist en sådan sammenhæng. For kalvene fra leverandør 1 kan vi se, at der er meget lave antistoffer ved indsættelse. Der var en lille stigning i antistoffer ved en alder omkring 60-75 dage, hvor to af kalvene nåede at blive seropositive (ODC% på ≥ 37). For leverandør 2 var det samme gældende, kun kalv nummer 11, symboliseret med K, havde en lille stigning i starten for derefter at falde igen. Der sås kun én høj stigning ved én af kalvene omkring 75 dage. For kalvene fra leverandør 3 forløb udviklingen i antistoffer nogenlunde samlet med lave antistoffer ved indsættelse og en lille stigning omkring 75 dage, hvor 2 kalve serokonverterede. Kalvene fra leverandør 4 lå generelt lavt i studieperioden med undtagelse af kalv nummer 22, som toppede i antistoffer omkring 75 dage for derefter at falde igen.



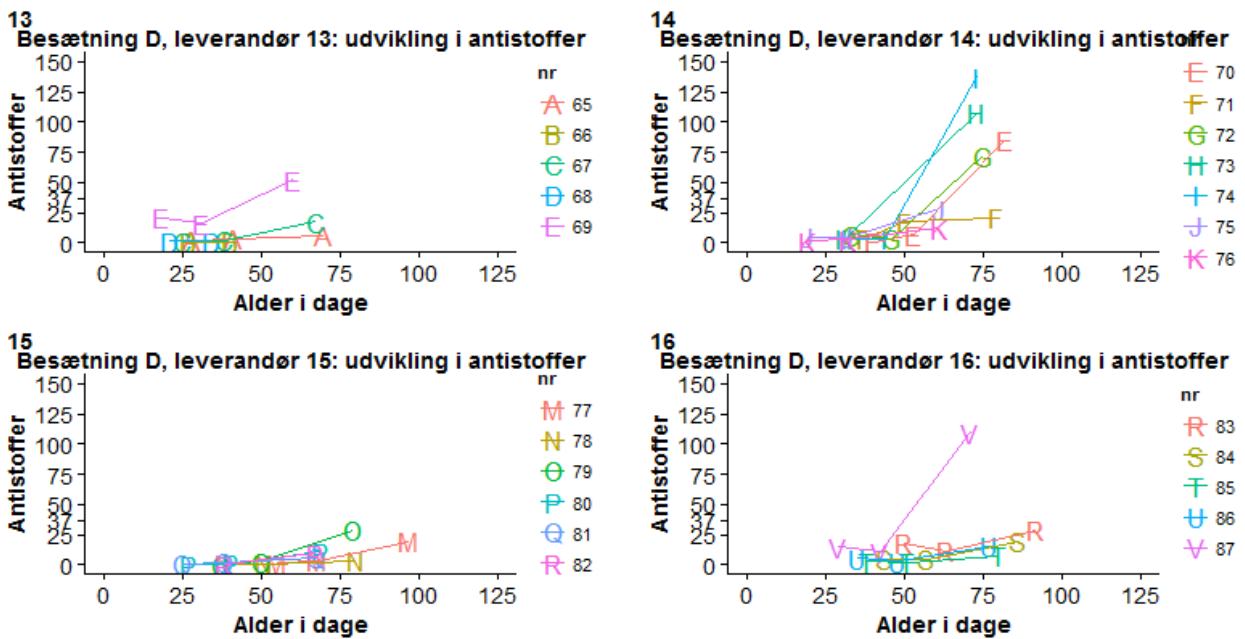
Figur 6: Udvikling i antistoffer fra indsættelse i besætning B og 10 uger frem. Blodprøverne er taget ved indsættelse og 2, 6 og 10 uger efter. A-X angiver kurverne for kalvene fra nummer 25-44.

Kalvene i besætning B går alle i samme boks. I alt nåede 7 at blive seropositive i besætning B inden for 10 uger efter indsættelse (Figur 6). Som ved besætning A havde de fleste kalve lave antistoffer ved indsættelse, undtagen kalv nummer 29, illustreret med et E ved leverandør 5. Kalv nummer 29 var også meget ung ved indsættelse. Ifølge den registrerede fødselsdagsdato var kalven kun 8 dage ved indsættelse. En forklaring på de højere antistoffer ved indsættelse kunne være maternelle antistoffer, hvilket vil blive diskuteret nærmere under diskussionen. Udviklingen i antistoffer forløb forskelligt mellem kalvene, men generelt sås et forløb med lave antistoffer gennem hele studieperioden, samt et par forløb, hvor der var en stigning omkring 50-75 dage.



Figur 7: Udvikling i antistoffer fra indsætning i besætning C og 6 uger frem. Blodprøverne er taget ved indsættelse, 2 og 6 uger efter. A-X angiver kurverne for kalvene fra nummer 45-64.

For besætning C har vi kun blodprøver til og med seks uger efter indsættelse. Generelt for alle forløb på besætning C var, at de generelt lå lavt i antistoffer, indtil 6 uger efter indsættelse, undtagen kalv nummer 45 fra leverandør 9 og kalv nummer 51 fra leverandør 10, som stiger markant i antistoffer omkring 60-70 dage (Figur 7).



Figur 8: Udvikling i antistoffer fra indsætning i besætning D og 6 uger frem. Blodprøverne er taget ved indsættelse, 2 og 6 uger efter. A-X angiver kurverne for kalvene fra nummer 65-87.

I besætning D ses på Figur 8, at seks kalve i kohorten blev seropositive for *M. bovis* indenfor seks uger efter indsættelse, mens resten af kalvene lå generelt lavt. Generelt ses det for besætning D, at markante stigninger i antistoffer skete ved en lavere alder end i de andre besætninger.

Sammenholdes Figur 5-8 kan det ses, at stort set alle kalvene kom ind med et lavt niveau af antistoffer uden antydning af maternelle antistoffer mod *M. bovis*. Generelt var der få markante stigninger i antistoffer mod *M. bovis*, og de markante stigninger der forekom, sås omkring 50-75 dage, undtagen for besætning D, hvor der også var markante stigninger omkring 30-40 dage.

4.2.3 Påvisning af agens i trachealskyl

Kalve med en score på ≥ 4 ved et besøg fik foretaget en trachealskylning, såfremt de ikke havde fået foretaget en ved et tidligere besøg. Antallet af prøver med fundne agens i den genopsugede skyllevæske fremgår af Tabel 2. Længst ude til højre i tabellen ses antal kalve, der blev testet positive for *M. bovis*. Antal antistof-test-positive kalve er kun beregnet på de tre første blodprøver, således at sammenligningsgrundlaget for alle besætninger er det samme.

Tabel 2: Bakteriologiske, virale og serologiske resultater i forbindelse med respiratorisk sygdom i 4 slagtekalvebesætninger

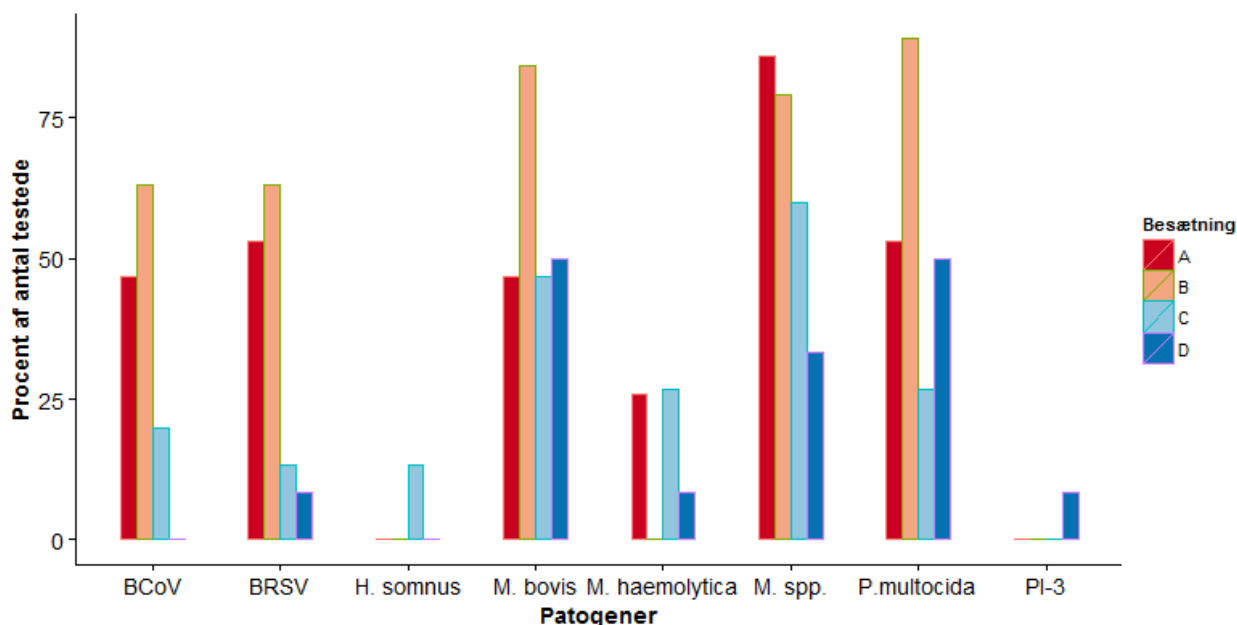
Bakteriologiske, virale og serologiske resultater i forbindelse med respiratorisk sygdom i de 4 slagtekalvebesætninger									
Besætning	A. Bakteriologiske og virale resultater						B. Serologiske resultater		
	Bakteriologiske dyrkninger og PCR på BAL (antal testede)					Virale PCR på BAL			Serokonversion hos kohortekalve (n(N))
(antal testede)	<i>P. multocida</i>	<i>M. haemolytica</i>	<i>H. somni</i>	<i>M. spp.</i>	<i>M. bovis</i>	PI-3	BRSV	BCV	<i>M. bovis</i>
A (15)	8	4	0	13	7	0	7	7	2 (24) ~ 8 %
B (19)	17	0	0	15	16	0	3	11	3 (20) ~ 15 %
C (15)	4	3	2	9	7	0	2	4	2 (20) ~ 10 %
D (11)	5	1	0	4	5	1	1	2	6 (23) ~ 26 %

A. Bakteriologiske og virale fund i trachealskyl (BAL) ved henholdsvis dyrkninger og PCR hos kalve indenfor kohorten i de 4 besætninger, som udviste kliniske symptomer og havde en klinisk score på ≥ 4 .

B. Serologisk konversion for *M. bovis* hos kohortekalvene. Serologisk konversion er i dette tilfælde defineret ved ODC% ≥ 37 ved 2. eller 3. blodprøve.

Som det fremgår af Tabel 2, er der stor variation mellem antallet af de isolerede patogener besætningerne imellem. I besætning B sås en stor del *M. bovis* og *P. multocida* isoleret fra de syge kalve, men disse agens blev kun isoleret fra cirka halvdelen af de skyllede i besætning A. For besætning B og C er antallet af isolerede agens i prøverne generelt lavere end for besætning A og B. Selvom seks kalve på besætning D blev testet antistofpositive for *M. bovis* indenfor seks uger efter indsættelse, har vi kun isoleret *M. bovis* fra fem prøver.

Nedenfor ses et søjlediagram, som giver et bedre overblik over, hvor stor en procentdel af antal testede i de forskellige besætninger, som er testet positive for de forskellige patogener (Figur 9).



Figur 9: Oversigt over procentdelen af de testede kalve i hver besætning, som er testet positive for de forskellige agens. Y-aksen angiver, hvor mange procent af de testede indenfor hver besætning, som testede positivt for de givne patogener. X-aksen angiver de forskellige patogener.

Som det fremgår af Figur 9 lå besætning B generelt højt i procent positive inden for mange patogener (undtagen *H. somni*, *M. haemolytica* og PI-3). Besætning B lå højest i procent positive for patogenerne BCoV, BRSV, *M. bovis* og *P. multocida*, derimod er *M. haemolytica*, *H. somni* eller PI-3 ikke isoleret på besætning B. Besætning B toppede i antallet procent prøver testet positive for *M. bovis*, hvor de andre besætninger lå meget tæt. Der blev kun isoleret *H. somni* i besætning C og PI-3 i besætning D, men ellers blev BRSV, *M. bovis* og *P. multocida* isoleret i større eller mindre grad i alle fire besætninger.

Nedenfor ses en tabel over prævalensen af de respiratoriske patogener hos de testede kalve. Tabellen giver et overblik over, hvilke patogener der blev isoleret flest af hos de testede kalve.

Tabel 3: Prævalensen af respiratoriske patogener hos slagtekalve i de fire besætninger med 20-24 testede kohortekalve i hver. Antal testede i alt var 61 kalve.

Prøve	Agens	Procent af positive prøver (antal positive/ antal testede i alt)
BAL	<i>P. multocida</i>	55,7 %
	<i>M. haemolytica</i>	13,1 %
	<i>H. somnus</i>	3,3 %
	<i>M. spp.</i>	67,2 %
	<i>M. bovis</i>	57,4 %
	PI-3	1,6 %
	BRSV	21,3 %
	BCoV	39,3 %
SERUM	<i>M. bovis</i>	14,9 %

Ud fra Tabel 3 kan vi se, at *Mycoplasma spp.* er den gruppe respiratoriske patogener, som er isoleret i størst frekvens. I denne gruppe indgår *M. bovis*, som er påvist hos 57,4 % af de testede kalve.

Herefter kommer *P. multocida*, som er påvist hos 55,7 % af de testede kalve.

Hvis vi ser på de virale agens, er BCoV påvist hos fleste kalve med 39,3 %, hvorefter BRSV fulgte med 21,13%. PI-3 blev kun fundet hos 1,6 % af kalvene.

Tabel 4: *M. spp.*- BU og *M. bovis* PCR-resultater listet i tabel.

		<i>Mycoplasma subspecies</i> BU		
		1	0	
<i>M. bovis</i> PCR	1	32	3	35
	0	10	16	22
		42	19	61

Mycoplasma spp. dækker også *M. bovis*, da dette resultat stammer fra dyrkning på PPLO-agaren, som er selektiv for *Mycoplasma spp.*, hvori *M. bovis* blandt andet indgår. Nogle af prøverne var dog negative på *Mycoplasma spp.* dyrkning og positive for *M. bovis* ved PCR. I Tabel 4 ses det, at der ikke er 100% overlap mellem *M. spp.*-BU og *M. bovis*-PCR-resultaterne fra skyllene.

På Bilag 1, ses en oversigt over de påviste patogener hos hver kalv. Herudfra fremgår det, at der kun hos 10 af kalvene er fundet/dyrket et enkeltstående patogen. Hos fem kalve blev *M. bovis* påvist som det eneste patogen, mens BCoV blev påvist som det eneste patogen hos tre kalve. Generelt set

blev der hos langt størstedelen af de klinisk syge kalve påvist to eller flere luftvejspatogener samtidig.

4.3 Obduktion af kalve

To kalve fra besætning D blev under studieperioden obduceret på Kjellerup Laboratorium. Den første kalv, kalv nummer 66, blev aflivet grundet manglende effekt af behandling, og kalv nummer 68 blev fundet selvdød. Begge kalve stammer fra leverandør nummer 13.

Som det fremgår af bilag 2 har begge kalve været klinisk syge i studieperioden.

4.3.1 Kalv nummer 66

Kalv nummer 66 var allerede ved indsættelse utrivelig, havde feber, bilateralt hængende ører, næse- og øjenflåd samt hoste. Ved indsættelse scorede den, som det fremgår af Bilag 2 7. En og to uger efter indsættelse henholdsvis 8 og 12. Herefter blev kalven aflivet efter besætningsejers ønske, da gentagen antibiotikabehandling ikke havde nogen effekt. Kalven blev trachealskyllet ved indsættelse, hvor *M. bovis* blev påvist som eneste patogen i prøven ved PCR.

Ved obduktionen fandtes kalvens ernæringstilstand under middel. Kalven havde flere hårløse områder på kroppen. Det fremgik af lungesættet, at kalven havde en mucopurulent bronchopneumoni i de craniale lapper, hvor ca. 18 % af lungevævet vurderedes afficeret. På lungerne fandtes en overliggende fibrøs, adhæsiv pleuritis. Bronchiallymfeknuderne var forstørrede. Der fandtes en let forøget mængde synovi i flere led. Ved mellemørerne fandtes bilateral purulent otitis media. Desuden fandtes meninges let ødematøse, som ifølge den obducerende dyrlæge kunne skyldes aflivning med pentobarbital. Den fulde obduktionsrapport kan findes i Bilag 3.

Der blev udtaget prøver fra lunger, pleura, mellemøre og hjernevæv, hvor en svag uspecifik blandingsflora med bl.a. *Streptococcus spp.* og *Trueperella pyogenes* fandtes.

Fra lunger og mellemøre blev *M. bovis* påvist ved PCR.

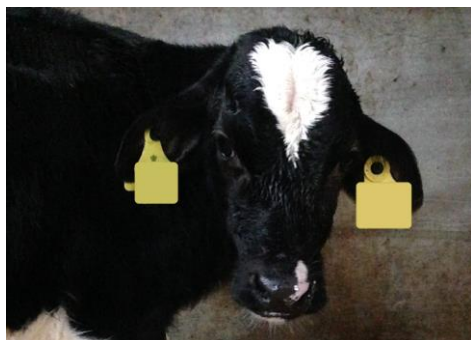


Foto: Ulla Torpe
Kalv nummer 66 et par dage før aflivning. Der ses tydeligt bilateralt hængende ører.



Foto: Annie Nielsen
Mellemøre med gulligt pus.



Foto: Annie Nielsen
Lunger med overliggende fibrøs, adhæsiv pleuritis.



Foto: Annie Nielsen
Lungesæt, hvor afficering af craniale lungelapper ses.

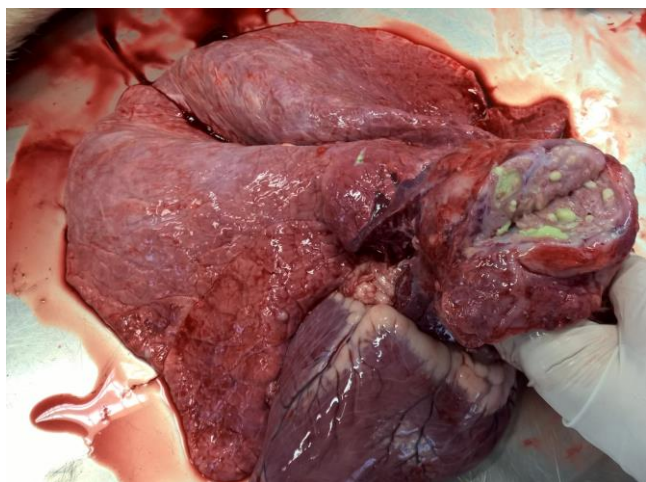


Foto: Annie Nielsen
Ved gennemskæring af afficerede lungevæv ses talrige abscesser med mucopurulent indhold.

4.3.2 Kalv nummer 68

Kalv nummer 68 havde ved indsættelse unilateralt hængende ører, feber og øjenflåd, hvilket fortsatte indtil 4 uger efter indsættelse, hvor kalven døde.

Kalven blev trachealskyllet ved indsættelse, hvor *P. multocida*, *M. haemolytica*, *Mycoplasma spp.* og PI-3 blev isoleret. Kalven er den eneste kalv, hvorfra PI-3 er isoleret fra i dette studie.

Kalven var nedstemt, havde serøst næseflåd og var oppustet. Luften forsøgtes evakueret umiddelbart inden kalven døde.

Ved obduktionen fandtes kalvens foderstand under middel. Ved inspektion af pleura fandtes en fokalt udbredt pleuritis med gult fibrin cranio-ventralt, som omfattede ca. 20% af pleura. Leveren fandtes kraftigt svullen, og der blev konstateret en voldsom fibrinøs peritonitis med tykt gult fibrin

og nekroser samt blødninger i krøs og diffust i bughulen. I vommen fandtes sparsomt tyndt indhold, og der sås multiple blødninger i løbe-slimhinden.

I albueled ses fibrinøs arthritis.

Kalvens diagnose ud fra obduktionsfund blev dermed: sepsis samt fibrinøs peritonitis og pleuritis.

Ved bakteriologisk undersøgelse af udsæd fra lever, lunge, pleura og led fandtes uspecifik blandingsflora. Ledvæske og lungevæv blev sendt til undersøgelse for *M. bovis* ved PCR, men resultaterne er ikke med i dette speciale, da de ikke var tilgængelige på afleveringstidspunktet.

Se Bilag 5 for den fulde obduktionsrapport.

4.4 Multivariable analyser

I tabellen nedenfor ses procent døde indenfor de første 14 dage for de forskellige leverandørbesætninger.

Tablet 5: Procent døde kalve ved 14 og 180 levedage for de 16 leverandører igennem det sidste år. Procentsatserne er udtrukket fra Kvægdatabasen.

Leverandør nummer	Procent kalve døde fra 0-14 dage gamle	Procent kalve døde fra 0-180 dage gamle
1	1	3
2	5	6
3	4	7
4	11	16
5	4	10
6	0	0
7	2	5
8	3	5
9	1	5
10	5	7
11	1	3
12	1	1
13	3	6
14	0	4
15	3	23
16	4	5

Leverandørernes kalvedødelighed fra 0-180 dage er også blevet testet i den multivariable model og fundet ikke signifikant for sandsynligheden for at kalvene blev syge. Den endelige logistiske regressionsmodel indeholdt "sandsynligheden for at blive syg i studieperioden" som den afhængige variabel, og alder*alder, *M. bovis* serologi, leverandør-kalvedødelighed og slagtekalvebesætning som forklarende variabler. For hvert besøg blev den kliniske score omskrevet til en dikotom skala, hvor en klinisk score på < 4 blev givet værdien 0, mens en klinisk score ≥ 4 blev givet værdien 1, således at den multivariable model kunne beregne sandsynligheden for at være syg ved hvert af de

fem første besøg. Det 6. besøg er ikke medtaget i den statistiske model, da ikke alle besætninger havde haft seks besøg indenfor dette speciales rammer.

I en generaliseret mixed model kan der tages højde for random effects. Et eksempel for en ”random effect” kunne være ”herd effect”, som tager højde for, at dyrene inden for en besætning til en vis grad er påvirket af hinanden. I den endelige model blev slagtekalvebesætning og leverandør medtaget som random effects.

Tabel 6: Forklarende variabler i den generaliserede mixed model, som beskriver sandsynligheden for at blive syg i fire slagtekalvebesætninger. Parameterestimat (β), standard error (SE), odds ratio (OR), 95% konfidensinterval for odds ratio og p-værdien for de forklarende variabler er angivet i tabellen

Variabel	β	SE	OR	95% KI for OR	p-værdi
Intercept	-2,36	0,41			
Serologi-positiv	-0,67	0,49	0,5	[0; 1,3]	0,18
Alder i dage	0,16	0,05	1,2	[1; 1,3]	0,0003*
Alder*alder	-0,13	0,04	0,9	[0,8; 1,0]	0,0002*
Dødelighed ved 14 dage (per % stigning)	0,10	0,05	1,1	[1,0; 1,3]	0,03*
Besætning D**	0,57	0,40	1,8	[0,8; 3,8]	0,43
Besætning C	0,87	0,41	2,4	[1,1; 5,3]	0,06
Besætning B	2,37	0,40	10,7	[4,9; 23,4]	< 0,0001*
Besætning A	0	-	1	-	-

*Alle p-værdier angivet med en * er signifikante. P-værdier er angivet som signifikante ved en p-værdi < 0,05.

** To kalve der blev aflivet pga. sygdom i besætning D er medtaget i modellen som syge fra det besøg, de blev syge.

Da der er både kvalitative og kvantitative variabler i vores model, er den logistiske regressionsmodel givet ved (Houe et al. 2004):

$$\text{logit}(p_{ij}) = \alpha + \beta_i + \gamma x_{ij} + yx_1$$

α	intercept
β_i	effekten af en dikotom variabel
Y	er hældningen af den kontinuerte variabel
X_{ij}	er den kontinuerte variabel

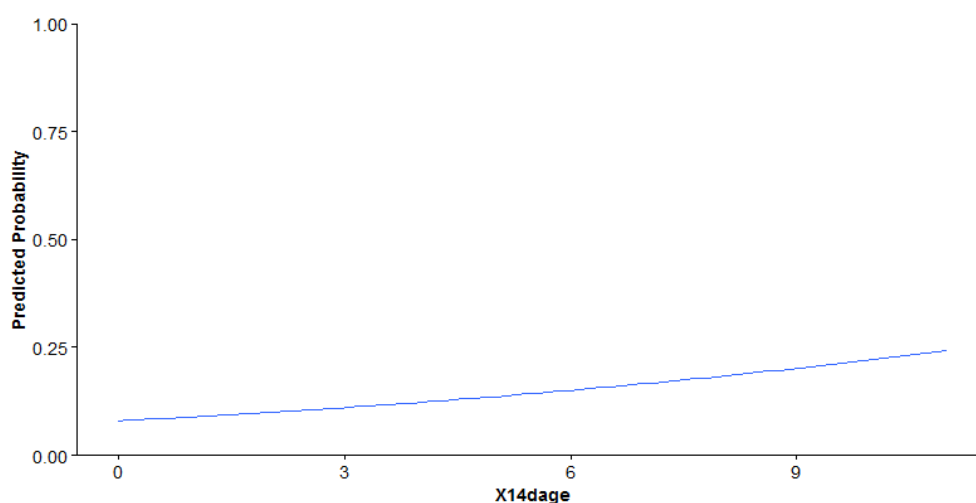
Den logistiske regressionsmodel er til dette formål omskrevet til en generaliseret mixed model, men principperne i den er de samme, der indgår dog flere led samt random effects, og modellen er tilpasset til vores data. I vores model indgår de fire omtalte risikofaktorer som led.

Tabel 6 viser resultaterne for den generaliserede mixed model. Det ses, at alder, 0-14 dages kalvedødeligheden hos leverandørerne samt slagtekalvebesætning havde en signifikant betydning

for sandsynligheden for at blive syg. For risikofaktorerne alder og kalvedødelighed gælder det, at sandsynligheden for, at en kalv bliver syg, stiger når de stiger, hvilket ses ud fra det positive estimat og den høje odds ratio.

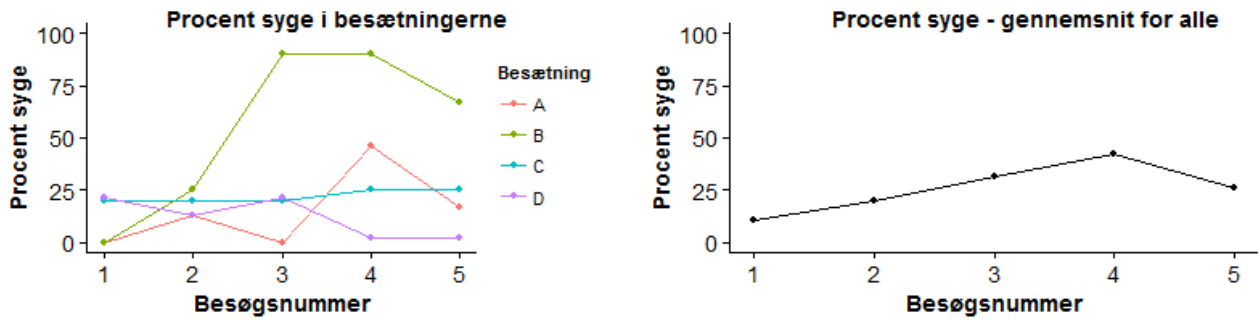
Modellen antyder, at seropositivitet kunne være associeret med reduceret sandsynlighed for at kalvene bliver syge, men denne sammenhæng er ikke signifikant.

Ud fra odds ratio for besætning B, ses det at oddsene for at blive syg i besætning B er 10 gange (95% KI: 4,9-23,4) større end i de andre besætninger.



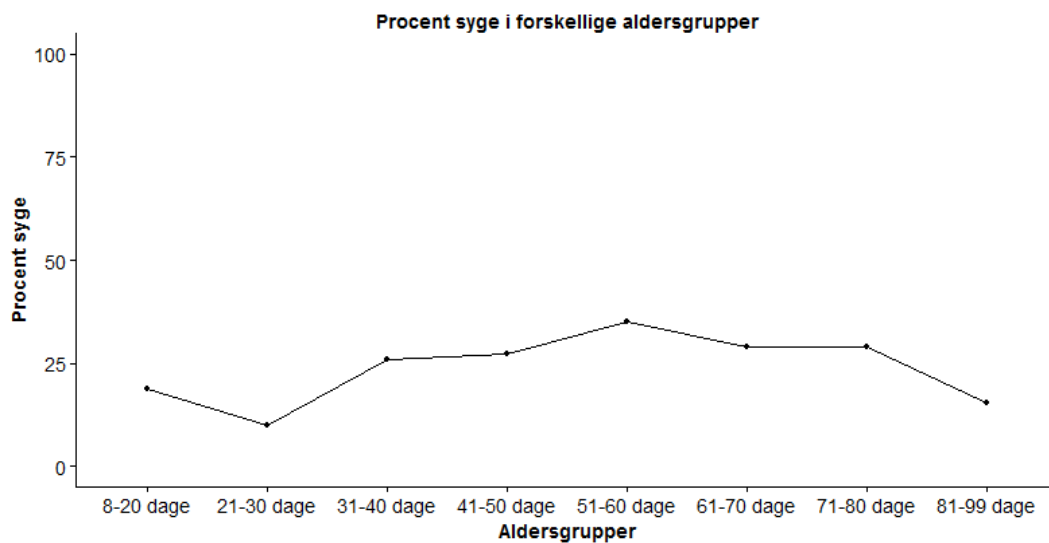
Figur 10: Den prædikterede sammenhæng mellem antal døde kalve ved 14 dage i leverandørbesætningen og sandsynligheden for at blive klinisk syg for en kalv. På Y-aksen ses den prædikterede sandsynlighed. På X-aksen ses procent døde kalve ved 14 dage i leverandørbesætningen.

Figur 10 viser, at den prædikterede sandsynlighed for, at en kalv bliver syg indenfor seks uger efter indsættelse, stiger med 0-14 dages kalvedødeligheden i leverandørbesætningen. I Tabel 6 kan vi se, at denne sammenhæng er signifikant. Der er altså signifikant større sandsynlighed for, at en kalv bliver klinisk syg, hvis den kommer fra en leverandørbesætning med høj dødelighed blandt kalvene i løbet af de første 14 levedøgn.



Figur 11: Procent syge i besætningerne ved de forskellige besøg, hvor besøg 1, 2, 3, 4, og 5 er henholdsvis 0, 1, 2, 4 og 6 uger efter indsættelse. Til venstre ses udviklingen i procent syge ved de forskellige besøg for hver besætning. Til højre ses de samlede udvikling i procent syge for alle 4 besætninger.

Figur 11 viser udviklingen i klinisk sygdom ved de forskellige besøg efter indsættelse. Som det ses på grafen til højre, varierer udviklingen en del fra besætning til besætning. Fælles for besætning A, B og D kan vi se, at der sker en stigning i procent syge, hvorefter procentdelen igen falder. For besætning C kan vi se, at procent syge stort set er konstant under forløbet. Den samlede udvikling i procent syge for alle 4 besætninger ses til højre. Her ses det, at procent syge kalve toppede ved besøg fire, som er fire uger efter indsættelse, hvorefter procent syge falder igen. De to døde/aflivede kalve i besætning D blev medtaget i modellen, som syge i resten af studieperioden, da det formodes at kalvene, hvis de havde overlevet, var forblevet syge resten af perioden.



Figur 12: Sammenhæng mellem forskellige aldre og procent syge. Y-aksen viser procent syge. X-aksen viser de forskellige aldersgrupperinger. Procentsatsen er beregnet på baggrund af antal kalve indenfor den angivne aldersgrupper og antal syge kalve indenfor denne aldersgruppe.

Figur 12 illustrerer sammenhængen mellem procent syge og kalvenes alder. Hvor Figur 11 viser udviklingen i procent syge kalve på baggrund af uger efter indsættelse, viser Figur 12 udviklingen i procent syge kalve ud fra kalvenes alder. Figur 12 tager dermed højde for, at kalvene har forskellig alder ved indsættelse, og kan dermed vise, om kalvene har en større tendens til at blive syge. På Figur 12 ses det, at procent syge blandt de helt unge kalve på 8-20 dage er lidt højere end hos kalvene, som er 21-30 dage. Derudover ses det, at procent syge kalve er stigende med alder, indtil kalvene har en alder på 51-60 dage, hvorefter procent syge kalve falder med stigende alder

Sammenholdes Figur 11 og Figur 12 kan vi se, at de to figurer viser stort set den samme udvikling mellem alder og sygdom. Da den gennemsnitlige alder blandt kalvene ved indsættelse er 25-30 dage, som det ses i Tabel 1, vil kalvene 4 uger efter indsættelse være i aldersgruppen 51-60 dage gamle, hvor begge figurer har deres toppunkt i procent syge kalve.

Både Figur 11 og Figur 12 illustrerer godt, at sammenhængen mellem alder og sygdom ikke er lineær.

5 Diskussion

Formålet med dette speciale var at karakterisere luftvejslidelser i fire danske slagtekalvebesætninger med forskellige opstaldningsforhold med hensyn til både kliniske og diagnostiske parametre samt at forsøge at identificere risikofaktorer for udviklingen af luftvejssygdom på enkeltdyrsniveau. De forskellige aspekter i disse problemstillinger vil blive diskuteret under de forskellige afsnit i denne diskussion.

5.1 Resultater

5.1.1 Beskrivelse af slagtekalvebesætningerne

Da slagtekalvebesætningerne i dette speciale ikke er tilfældigt udvalgt, og da alle de fire besætninger ligger nogenlunde samlet i et område af midt og syd Jylland, kan besætningerne ikke siges at udgøre et repræsentativt udsnit af de danske slagtekalvebesætninger. Studiet var et feltstudium med fire besætninger og i alt 87 kalve i kohorten, hvilket er en lille stikprøve, begrænset af projektbudgettet. Dette bevirkede, at risikofaktorer på besætningsniveau ikke kan bestemmes, men risikofaktorer på enkeltdyrsniveau samt tendenser på besætningsniveau kunne undersøges og give grobund for nye hypoteser.

Beskrivelsen af de fire slagtekalvebesætninger giver et indtryk af, hvordan de forskellige besætninger fungerer med hensyn til opstaldningsforhold, leverandører samt management omkring indsættelse, fodring, medicinering og flytning af kalve. Denne viden kan antyde mulige forklaring på variation mellem i sygdomsforekomst mellem de forskellige besætninger, hvilket vil blive diskuteret nærmere under de følgende afsnit.

5.1.2 Udvikling i klinisk scoring

I studiet blev den kliniske scoring ved besætningsbesøgene foretaget af dyrlæge Ulla Torpe i samarbejde med undertegnede i den første række besøg, hvorefter Ulla Torpe udelukkende stod for den kliniske scoring ved de sidste besøg. Nogle af symptomerne på klinisk sygdom hos kalvene som for eksempel besværet vejrtrækning og forøget respiration er subjektive diagnostiske parametre, hvilket ved bedømmelse kan føre til variation i score og dermed i klassifikation af syge kalve, men da det er den samme person, som har stået for den kliniske scoring gennem hele studiet, forventes denne potentielle fejlkilde dog at være minimal.

De primære symptomer, observeret i dette studie, var luftvejssymptomer i modsætning til andre studier på både kalve i slagtekalvebesætninger og hos malkekvæg, hvor ledbetændelser også var observeret i relation til *M. bovis* (Gagea et al. 2006; Stipkovits et al. 2000). Ledbetændelser beskrives i publikationerne som et resultat af lungeinfektion med *M. bovis* og efterfølgende hæmatogen spredning til leddene.

Forekomsten af klinisk sygdom hos kalvene i besætning A og B toppede ifølge Figur 1 og Figur 2 ved henholdsvis to og tre uger efter indsættelse. Dette stemmer overens med et fransk studie fra 2008, hvor kalvene var to til tre uger gamle ved indsættelse, og der sås udbrud af luftvejssygdom cirka to uger efter indsættelse (Arcangioli et al. 2008). Hos nogle af kalvene i besætning A, C og D, sås der allerede klinisk syge kalve ved indsættelse, se bilag 2.

Der ses ikke den store udvikling i klinisk sygdom i besætning C og D, hvor den gennemsnitlige kliniske score var nogenlunde konstant omkring 2 igennem studieperioden (Figur 3 og 4). Dog lå den gennemsnitlige kliniske score ved indsættelse i disse besætninger lidt højere end i besætning A og B, hvilket også var et udtryk for, at der i besætning C og D var et par klinisk syge kalve til stede i hele studieperioden, som trak gennemsnittet op. I besætning D blev to kalve aflivet/døde i studieperioden grundet sygdom, hvorfor de ikke talte med i den gennemsnitlige kliniske score herefter, hvilket kan have påvirket gennemsnittet.

Opstaldningsforholdene i de fire besætninger var forskellige. I besætning A og C var kalvene opstaldet i hold af seks kalve, hvor de i besætning B og D var opstaldet i hold af 20-25 kalve. Hvis vi ser på forekomsten af klinisk sygdom i de fire besætninger, ser der ikke ud til at være antydningen af en sammenhæng mellem opstaldningsforhold og forekomsten af klinisk sygdom, da udviklingen i klinisk sygdom i for eksempel besætning C og D med forskellige opstaldningsforhold, var stort set ensartet. Dog døde én kalv i besætning D, mens en anden blev aflivet. Det ses også i beskrivelsen af de fire slagtekalvebesætninger, at selvom besætningerne er i den samme kategori af opstaldningsforhold, så var der flere individuelle forskelle mellem besætningerne opstaldningsforhold og management, som kan have haft betydning for sygdomsudviklingen, fx den løbende flytning af nogle af kalvene i besætning A efter indsættelse samt indsættelse af nye kalve fra andre leverandører selv en uge efter indsættelse, hvorimod der i besætning C hverken var kontakt til nabobokse eller flytning efter indsættelse. I besætning B var kalvene opstaldet i hold af 20-25 kalve med tremmegitter som adskillelse mellem boksene, hvilket tillod kontakt til kalvene i naboboksene, hvorimod der i besætning D kun var mulighed for kontakt mellem naboboksene to og

to. Resultaterne i dette studie indikerer dermed, at den laveste sygdomsforekomst var i de besætninger, hvor kalvene ikke havde mulighed for kontakt med nye kalve efter indsættelse.

5.1.3 Udvikling i serologi

Udviklingen i serologi er beskrevet på baggrund af måling af antistoffer mod *M. bovis* i blodprøver. Prøverne blev testet ved brug af ELISA-kittet BioK302. En australsk ph.d.-afhandling fra 2015 har undersøgt sensitiviteten (*se*) og specificiteten (*sp*) for dette ELISA-kit (Schibrowski 2014). I studiet estimeredes *se* kun til at være omkring 50 %, hvorfor det konkluderedes, at BioK302 ikke var effektiv til at detektere seropositivitet med *M. bovis*. Det samme konkluderede et andet studie med hensyn til ELISA som generel metode til diagnostik (Virtala et al. 2000). Det er derfor vigtigt medtage denne viden i fortolkningen af resultaterne, da der med den lave *se* er sandsynlighed for, at alle seropositive kalve ikke blev fundet, hvilket kan medføre en underestimering af antal seropositive kalve.

PCR kit. We estimated that the ELISA would have more favourable Sp and keep having a better Se, compared to the PCR, if the cut-off was increased to at least 50 ODC%, rather than using the manufacturer's recommended value suggested for animal-level diagnosis (37 ODC%). The NPV is comparable for both cut-off values, but the number of false positives would be reduced at a higher cut-off, thereby improving the PPV.

Ud fra Tabel 2 ses det, at 13 kalve blev seropositive indenfor seks uger efter indsættelse. I forhold til antal kalve, hvorfra *M. bovis* er påvist hos i trachealskylle, ses derfor forholdsvis begrænset antistofproduktion. Ud fra Figur 5-8 ses ikke de store antydning af maternelle antistoffer hos kalvene ved indsættelse. En årsag til dette kunne være, at kalvene var for gamle til at have maternelle antistoffer, da de i gennemsnit var 24-30 dage ved indsættelse. I et studie fra 2011 var 26,6 % af 2-3 uger gamle kalve positive ved indsættelse, testet med et kommercielt ELISA-kit fra BioX. Da halveringstiden for *M. bovis* antistoffer er estimeret til at være 20 dage, antages det, at de 26,6 % positive skyldtes maternelle antistoffer. På Figur 6 ses det at kalv nummer 29, som kun var otte dage ved indsættelse, var seropositiv. En mulig forklaring på dette kunne være maternelle antistoffer.

Fælles for størstedelen af antistofmålingerne ved kalvene var, at de var lave ved den første måling, men steg gradvist ved de efterfølgende målinger. Disse fund indikerer, at inficerede kalve kan sprede *M. bovis* til andre kalve, når de sammenblandes i slagtekalvebesætninger, hvilket stemmer

overens med andre studier (Castillo-Alcala et al. 2012). Dette er også beskrevet som en risikofaktor flere steder i litteraturen (Maunsell & Donovan 2009; Woolums 2010; Taylor et al. 2010).

Slagtekalvebesætningerne i dette studie modtog kalve fra mellem 13 og 63 leverandører, hvilket gav mulighed for et konstant flow af smittede og modtagelige kalve, som ikke har modtaget antistoffer mod de pågældende patogener via colostrum eller udviklet et naturligt forsvar imod dem. Et studie fra 2015 viser, at kalve som var seronegative for BRSV og BCoV ved indsættelse, var i større risiko for at udvikle luftvejssygdom indenfor de første uger (Pardon et al. 2015). Desuden understreger studiet og flere andre studier vigtigheden af tildeling af råmælk af høj kvalitet, da kalve med lave antistoffer generelt var i større risiko for blive syge (Taylor et al. 2010; Howard 1984). Det kunne have været interessant med tidlige målinger af maternelle antistoffer mod *M. bovis* i dette studie med henblik på at undersøge en mulig sammenhæng mellem maternelle antistoffer mod *M. bovis* samt andre patogener og senere udvikling af klinisk sygdom. Sådanne målinger ville også kunne belyse om tyrekalvene i leverandørbesætningerne havde fået råmælk af tilstrækkelig kvalitet og mængde, og dermed give indblik i kalvenes immunstatus før indsættelse. Ifølge flere studier påvirkes kalvenes immunforsvar også ved indsættelse som følge af stress i forbindelse med transport og sammensætning med nye kalve, hvilket også kan øge kalvenes modtagelighed for infektioner (Taylor et al. 2010; Caswell & Archambault 2007).

Trods den generelt lave antistofproduktion blandt kalvene i studiet sås de fleste stigninger omkring 50-75 dage, figur 5-8., undtagen for besætning D, hvor der ses et par stigninger omkring 30-40 dage. En potentiel forklaring på den lave antistofproduktion kunne være, at *M. bovis* ikke var tilstede i besætningerne, men dette stemmer ikke overens med fundene i trachealskylle. En anden potentiel forklaring kunne være, at kalvene var for unge til at producere målbare antistoffer mod *M. bovis* på studietidspunktet. I et japansk studie fra 1996 blev 2-3 uger gamle seronegative kalve introduceret i en slagtekalvebesætning med bekræftet gennem 3 år. Kalvene forblev seronegative i de første 29-35 dage efter indsættelse, hvorefter der sås en stigning i antistoffer hos nogle af kalvene. I studiet blev haemagglutinations test anvendt til at måle antistofferne. Ved sammenligning med studie som dette, er det vigtigt at overveje at variation i alder på tværs af studier og anvendelse af forskellige serodiagnostiske metoder kan have betydning for eventuelle forskelle og afvigelser mellem studierne. Ifølge Figur 5 og 6, blev flere kalve i besætning A og B seropositive mellem seks og ti uger, hvilket stemmer overens med det forsinkede antistofrespons, der også ses i det japanske studie.

Hos et par af kalvene i besætning D, sås dog en stigning i antistoffer omkring 30-40 dage (Figur 8), hvilket illustrerer at nogle af kalvene var i stand til at producere antistoffer før de var 50-75 dage. I studier med eksperimentel infektion af kalve, sås seropositivitet efter 7 dage hos 12 uger gamle kalve og efter 12 dage hos 3-4 uger gamle kalve (Vanden Bush & Rosenbusch 2003; Nicholas et al. 2002), hvilket også viser, kalve yngre end 50-75 dage var i stand til at producere målbare antistoffer. En forskel på eksperimentelle og naturlige infektioner er infektionsdosis, som må antages at være højere ved direkte eksperimentel intranasal- og/eller intratracheal infektion. Sammenhængen mellem infektions dosis, antistoffer og kliniske tegn er ikke fuldt forstået, men en hypotese kunne være, at der har være en høj udskillelse af *M. bovis* fra én eller flere kalve, som har udløst en stærkt humoralt respons hos nogle af kalvene. Tilstedeværelsen af flere syge dyr med uni- eller bilatrealt hængende ører ved indsættelse i besætning D, se Bilag 2, samt udtalelsen fra besætningsejer om, at der ikke blev sorteret i kalvene ved indsættelse, øger risikoen for at syge dyr har bidraget til massivt smittepres ved indsættelse.

5.1.4 Agens i trachealskyl

Et af formålene med dette speciale var at karakterisere luftvejslidelser i fire slagtekalvebesætninger med hensyn til diagnostiske parametre samt undersøge udfordringer i forhold til diagnostik heraf. Som det også beskrives i introduktionen, så er specialet skrevet med fokus på *M. bovis*, men for at vurdere betydningen af *M. bovis* og mulighederne for diagnostik heraf, så var det nødvendigt også at undersøge forekomsten af andre luftvejspatogener, som kan have betydning for patogenesen. Resultaterne for dette studie viser også, at det er vigtigt at overveje at andre patogener end *M. bovis* kan have bidraget til udvikling af luftvejsinfektion hos kalvene, da de fleste af trachealskylleprøverne resulterede i blandede bakteriekulturer ved dyrkning og flere forskellige agens isoleret ved PCR.

Trachealskyl blev i dette studie anvendt som diagnostisk metode til at belyse, hvilke agens var til stede i luftvejene hos de syge kalve. Denne metode har været anvendt i flere andre studier, og kontamination af prøven fra mund- og næsehule vurderes at være den største ulempe ved denne metode (Arcangioli et al. 2008; Allen et al. 1991). I dette studie blev *Escherichia coli* (*E. coli*) isoleret fra én af prøverne. Da *E. coli* ikke er en af del af de nedre luftvejes normalflora, må dette fund skyldes kontamination, men da det kun drejede sig om én prøve, formodes det ikke at kontamination fra mundhulen har påvirket prøvesvarene i en nævneværdig grad. Med hensyn til PCR-analyserne for *M. bovis* og de andre patogener, så er det svært at diskutere datakvaliteten grundet manglende viden. Real-time PCR for *M. bovis* blev foretaget på Animal Health Service i

Deventer i Holland med en in-house udviklet og valideret real-time PCR. PCR for PI-3, BRSV og BCV blev kørt som real-time RT-PCR på DTU-Vet, og det var første gang DTU-Veterinærinstituttet anvendte præcis denne metode, men et studie omkring udviklingen af denne metode indikerer, at metoden er både hurtig og har en høj sensitivitet og specificitet (Hakhverdyan et al. 2005).

Det kan ses i Tabel 4, at der ikke er 100% overlap mellem *M. spp*-BU og *M. bovis*-PCR-resultaterne fra skyllene. En årsag til den højere påvisning af *M. spp* kan skyldes påvisning af andre subspecies af *Mycoplasma* end *M. bovis*. Desuden kan det ses, at *M. bovis* også er isoleret fra kalve, hvor *M. spp* ikke er påvist. Dette kan skyldes, at der er forskel i metoderne. Blandt andet kan PCR både påvise levende og døde bakterier. Et studie fra 2012 viste også at *M. bovis* var påvist i lavere frekvens ved RT-PCR end ved dyrkning. Dog var alle de BU-negative prøver også negative ved RT-PCR (Castillo-Alcala et al. 2012). Dette kunne indikere, at RT-PCR havde en lavere sensitivitet end dyrkning med hensyn til *M. bovis*. Der var dog forskelle mellem prøvematerialerne i dette studie, som kan have haft indflydelse på resultaterne. I vores studie har vi anvendt resultaterne for påvisning af *M. bovis* ved PCR som antal kalve positive for *M. bovis*, da dyrkningen ikke var specifikke for *M. bovis*. I tilfælde af en lavere sensitivitet ved PCR kan det have medført en underestimering af antal *M. bovis*-positive kalve i studiet. Dog var *M. bovis* stadig det patogen, som blev påvist i højest frekvens.

I Tabel 2 kan vi se, at der stor variation i procentsatserne for de forskellige påviste agens i besætningerne. Hvis vi ser på prævalensen af de forskellige agens hos alle de testede kalve toppede *M. bovis*, som blev påvist hos 57,4% af de testede kalve, Tabel 3. Herefter følger *P. multocida* og BCoV, som blev påvist hos henholdsvis 55,7 % og 39 % af de testede kalve. Selvom *M. bovis* blev påvist hos lidt over halvdelen af de testede kalve, er det svært at definere præcis, hvilken rolle *M. bovis* har spillet i udviklingen af luftvejsinfektioner grundet høje prævalensen af andre patogener, deriblandt *P. multocida* og BCoV. Dertil kommer det, at *M. bovis* i flere studier er påvist hos tilsyneladende raske kalve i tilsvarende procentsatser (Allen et al. 1991; Gagea et al. 2006). I studierne blev dog isoleret i højere prævalenser fra syge kalve med luftvejssymptomer end fra raske kalve. Dette var dog ikke tilfældet i et studie fra 2012, hvor der ikke sås en sammenhæng mellem akut luftvejsinfektion og påvisning af *M. bovis* i trachealskyl (Castillo-Alcala et al. 2012). Et canadisk studie har påvist *M. bovis*, som det mest prævalente patogen i kroniske lungeinfektioner, hvorimod *M. haemolytica* var mest prævalent i akutte infektioner (Booker et al. 2008). Dette antyder, at påvisning af *M. bovis* måske i højere grad afhænger af infektionens stadie end af

tilstedeværelsen af kliniske symptomer. Andre publikationer karakteriserer også typiske *M. bovis* infektioner som kroniske og svære at behandle med antibiotika (Allen et al. 1991; Gagea et al. 2006). Dog responderer virale agens heller ikke på antibiotika. Hos flere af kalvene i dette studie sås også luftvejsinfektioner af kronisk karakter i besætning A, B og D, hvor flere kalve responderede dårligt på gentagen antibiotikabehandling og var syge gennem store dele af studieperioden, hvilket sammen med påvisningen af *M. bovis* i høj prævalens og som eneste patogen hos fem kalve antyder, at *M. bovis* har haft betydning for sygdomsudviklingen hos flere af kalvene.

P. multocida og BCoV blev også påvist i høje prævalenser i alle fire besætninger, hvilket også antyder, at disse patogener har haft betydning for sygdomsudviklingen. De virale agens, som BCoV, BRSV og PI-3 beskrives i flere publikationer som prædisponerende faktorer for luftvejsinfektioner, da de kan skade de naturlige clearance-mekanismer i lungerne samt påvirke immunsystemets evne til at respondere på bakterielle infektioner (Taylor et al. 2010; Martin et al. 1986). *P. multocida* og *M. haemolytica* blev også i et studie omtalt som prædisponerende faktorer, da resultaterne indikerer at *M. bovis* kan kolonisere deres læsioner i lungerne og initiere en ny infektion derfra (Gagea et al. 2006). Den lavere prævalens af *P. multocida* og *M. haemolytica* i forhold til *M. bovis* stemmer også overens med tidligere studier i slagtekalvebesætninger (Castillo-Alcala et al. 2012). Da der kun blev foretaget trachealskyl af syge kalve i dette speciale, var det ikke muligt at sige noget om sammenhængen mellem påvisning af forskellige patogener og klinisk sygdom, men det faktum at *M. bovis* i flere studier blev påvist i høj prævalens hos raske kalve samt påvisning af en række forskellige agens hos kalvene, gør det svært at estimere *M. bovis* betydning for sygdomsudviklingen. *M. bovis* kan tilsyneladende spredes og isoleres fra raske kalves lunger uden nødvendigvis at forårsage sygdom eller immunreaktion (Castillo-Alcala et al. 2012; Hanzlicek et al. 2011; Arcangioli et al. 2008). Det ses også i Tabel 3, at *M. bovis* blev hos 57,4% af de testede kalve, men kun 14,9% af kalvene i studiet blev seropositive, hvorfor der sås dårlig korrelation mellem tilstedeværelse af *M. bovis* og antistofproduktion. Disse resultater understreger den manglende viden om, hvilke faktorer, der er afgørende for om lungeinfektion med *M. bovis* medfører klinisk sygdom.

Ud fra resultaterne fra dette studie og de andre omtalte publikationer, kunne en hypotese være, at værtsfaktorer såsom samtidig eller forudgående infektion med andre virale- og/eller bakterielle agens kan være afgørende for resultatet af infektion med *M. bovis*. Der ses i dette studie også højere sygdomsforekomst i besætning A og B, hvor der også blev påvist et højere antal patogener.

5.1.5 Obduktion af kalve

Obduktionen af kalv nummer 66 med mucopurulent bronchopneumoni, pleuritis og otitis media, hvor både *M. bovis* blev isoleret fra lungevæv og purulent ekssudat fra mellemøret understøtter samt anamnesen, om dårlig respons på antibiotikabehandling, insinuerer i tråd med ovenstående resultater, at *M. bovis* har spillet en rolle for udviklingen af luftvejsinfektion i denne kalv. Ved obduktionen sås kaseøse nekrotiske områder i lungerne, som i litteraturen beskrives som karakteristiske for *M. bovis* (Gagea et al. 2006; Caswell & Archambault 2007).

Obduktionsrapporten for kalv nummer 68 ses en række fund og en dødsårsag som ikke vurderes at være associeret med *M. bovis*. Kalven er ikke beskrevet som halt ved nogle af besætningsbesøgene, men ved obduktionen fandtes en fibrinøs arthritis. Da *M. bovis* kan forårsage arthritis kan *M. bovis* ikke udelukkes som årsag til hertil ligesom det heller ikke kan udelukkes, at *M. bovis* har spillet en rolle i kalvens komplekse sygdomsbillede.

5.1.6 Multivariabel analyse

Identifikation af risikofaktorer for udvikling af luftvejssygdom på enkeltdyrniveau var et af formålene med dette speciale. Dette blev gjort via en multivariabel analyse, hvor fire risikofaktorer blev testet for deres betydning for sandsynligheden for at kalvene blev syge i studieperioden. Datasættet, som danner grundlag for den multivariabel analyse, er struktureret med en linje per besøg per dyr, således at der indgår gentagne målinger per dyr. Dette vil bevirke, at der også er korrelation på dyreniveau, ligesom der kan være korrelation mellem kalve fra de samme slagtekalvebesætninger og leverandørbesætninger. Det har været muligt at tage højde for korrelationen på besætnings- og leverandørniveau ved at køre den multivariabel analyse med disse som random effects. Grundet den lille stikprøve og dermed det forholdsvis lille datasæt, har det ikke været muligt at tage højde for korrelationen på dyreniveau i den multivariabel analyse (modellen kunne ikke konvergere). Dette kan være en fejlkilde i analysen, men det er svært at sige, om det vil give mindre eller større effekt af de testede risikofaktorer. Dog ville p-værdierne formodentlig blive højere, og dermed mindre signifikante, hvis der blev taget højde for, at der er gentagne målinger på kalvene.

I den multivariable model blev det testet om serologi, alder, leverandørernes kalvedødelighed ved 14 dage samt slagtekalvebesætning var af signifikant betydning for sandsynligheden for at blive syg i studieperioden ved et signifikansniveau på $< 0,05$. Det blev fundet at alder, leverandørens kalvedødelighed ved 14 dage (men ikke 0-180-dags kalvedødeligheden i levandørbesætningen) var af signifikant betydning for sandsynligheden for at kalvene blev syge i studieperioden. Desuden så det ud til, at kalve i besætning B havde væsentligt højere risiko for at blive syge end kalvene i de andre tre besætninger.

Som det ses i Tabel 6 blev der ikke fundet en signifikant sammenhæng mellem seropositivitet for *M. bovis* og klinisk sygdom. Dette er i overensstemmelse med tidligere studier, som heller ikke har fundet en sammenhæng mellem *M. bovis* antistoffer og klinisk sygdom (Castillo-Alcala et al. 2012; G. A. Hanzlicek et al. 2011; Arcangioli 2008; Virtala et al. 2000) I resultaterne for dette studie ses det også, at besætning D som havde flest seropositive kalve indenfor seks uger efter indsættelse også var den besætning med færrest syge kalve i samme periode. Dog var det også den besætning, som havde flest døde/aflivede kalve i denne periode.

Den multivariable analyse viste, at der var en signifikant sammenhæng mellem alder og sandsynligheden for at kalvene blev syge. Sammenhæng var ikke lineær, men dermed var der et toppunkt, da kalvene var 51-60 dage gamle, se Figur 12, som modellen dog ikke helt kunne eftervise på den måde, den var specificeret. Da kalvene som det ses i Tabel 1 gennemsnitligt var mellem 25 og 30 dage ved indsættelse, toppede sygdomsforekomsten omkring tre til fire uger efter indsættelse. Lignende resultater blev fundet i andre studier (Pardon et al. 2011).

Nul-14 dages kalvedødeligheden hos leverandørerne blev ligeledes fundet til at være af signifikant betydning for sandsynligheden for at kalvene blev syge. Faktisk så meget, at odds for sygdom for en kalv fra en besætning med 11 % kalvedødelighed, ville være 2.7 gange højere end en kalv fra en besætning med 1 % kalvedødelighed. Dette resultat sætter fokus på leverandørernes indflydelse på slagtekalvenes sundhedsstatus. Høj 0-14 dages kalvedødelighed i leverandørbesætningerne kunne tyde på forskellige problemer for eksempel i forhold til forskellige lidelser hos kalvene, management, hygiejne og ikke mindst råmælkskvalitet. Nogle af leverandørbesætningerne havde en kalvedødelighed på 11 % i de første 14 levedøgn, hvilket kan afspejle sygdomsproblemer, herunder infektiøse sygdomme som gør kalvene mere modtagelige, når de bliver flyttet til slagtekalvebesætningen. Da denne procentsats er baseret på det seneste års kalvedødelighed, kan det ikke udelukkes, at den skyldes et sygdomsudbrud eller lignende, som er overstået nu, og at den

aktuelle kalvedødelighed på nuværende tidspunkt derfor er lavere. Dog antyder resultaterne, at 0-14 dags kalvedødeligheden i leverandørbesætningerne havde betydning for udvikling af klinisk sygdom hos kalvene, hvilket indikerer at selektion af leverandørbesætninger ud fra kalvedødelighed dermed kan være en mulighed for at reducere forekomsten af klinisk syge kalve i slagtekalvebesætningerne.

Det blev beregnet ud fra den multivariable analyse, at oddsene for at blive syge i besætning B var 10 (95% KI 4-23) gange større end i de andre besætninger. Det var ikke muligt at definere årsagerne til den større sandsynlighed for at kalvene blev syge i besætning B ud fra dette studie. Det vil kræve et større studie på tværs af mange slagtekalvebesætninger, som vil muliggøre identifikation af risikofaktorer på besætningsniveau. Resultatet kan dog antyde, at der var forhold i besætning B, som resulterede i højere sygdomsforekomst end i de andre besætninger. Som det ses ud fra Bilag 2 var alle kalve på nær én i kohorten i besætning B syge i studieperioden. En potentiel forklaring på den høje sygdomsforekomst kunne være muligheden for direkte kontakt med kalvene i naboboksen gennem tremmegitter. Naboboksen havde tillige kontakt til næste boks og så videre, således at patogener potentielt kunne spredes ned igennem stalden. Ved et par af besøgene sås også at specielt de unge kalve kunne komme ud af gennem tremmerne til staldgangen, hvorfor de kunne hoppe ned i en anden boks og have kontakt med kalvene på den anden side af staldgangen. Som tidligere beskrevet er lige netop sammenblanding og kontakt med kalve fra andre leverandører en risikofaktor (Taylor et al. 2010;Castillo-Alcala et al. 2012). Ved besøgene observeredes også, at kalvene i nogle af boksene længere nede i stalden så mere klinisk påvirkede ud med bilateralt hængende ører, næseflåd og hosten, men grundet muligheden for kontakt mellem boksene kunne disse kalve potentielt smitte kalve i andre bokse.

Oddsene for at blive syge i besætning C og D var højere end i besætning A ifølge Tabel 6, men dog ikke signifikant. Umiddelbart kan det synes forkert i forhold til udviklingen i klinisk sygdom, at der skulle være større sandsynlighed for at blive syge i besætning C og D end i besætning A, som er referencebesætning i denne analyse. Den gennemsnitlige kliniske score ved indsættelse i besætning A var markant lavere end i besætning C. Det eneste tidspunkt den gennemsnitlige kliniske score i besætning A var højere end i besætning C var to uger efter indsættelse, så samlet set var den kliniske score lavere i besætning A, hvis man tog et gennemsnit af den kliniske score fra alle besøgene. Set i forhold til besætning C og D, så formåede besætning A ikke at holde det samme lave sygdomsniveau gennem studieperioden, som besætning C og D gjorde. En potentiel forklaring hertil kunne være den beskrevne flytning af kalve mellem boksene og introduktion af nye kalve

indenfor de første par uger. I besætning C og D blev kalve ikke flyttet eller nye introduceret efter indsættelse. En anden risikofaktor som kan have haft betydning for sygdomsudviklingen er indkøb af kalve fra leverandører med en høj 0-14 dages kalvedødelighed. I besætning A stammede fem af kalvene i kohorten fra en besætning med en 0-14 dages kalvedødelighed på 11 %, hvilket som tidligere beskrevet også øgede oddsene for at en kalv herfra blev syg.

Besætning C fandtes i den multivariable model ikke signifikant for sandsynligheden for udviklingen af klinisk sygdom, men med en p-værdi på 0,06 fandtes besætning C næsten signifikant, hvorfor det ikke kan afvises, at sandsynligheden for at blive syg for kalvene i besætning C var større end for kalvene i besætning A.

6 Konklusion

Der sås i dette studie to forskellige sygdomsudviklinger i de fire besætninger. I to af besætningerne sås en kulmination af kliniske symptomer 14-21 dage efter indsættelse, mens der i de to andre besætninger sås et jævnt niveau fra indsættelse og seks uger frem. Størstedelen af de kliniske symptomer var relateret til luftvejsinfektioner, hvor specielt uni- og/eller bilateralt hængende ører, hoste samt næse- og øjenflåd blev observeret hyppigt. Hos nogle af kalvene var infektionerne af kronisk natur og responderede dårligt på antibiotikabehandling. Alder, 0-14 dages kalvedødelighed og besætning B blev identificeret som signifikante risikofaktorer for udviklingen af sygdom på enkeltdyrsniveau, hvilket indikerer, at blandt andet selektion af leverandørbesætninger på baggrund af 0-14 dages kalvedødelighed er en mulighed for at reducere sygdomsforekomsten i slagtekalvebesætningerne.

Resultaterne viste ingen antydninger af maternelle antistoffer mod *M. bovis*, og kalvenes antistofproduktion var generelt lav. Potentielle forklaringer herpå kunne være, at kalvene var for unge til at have maternelle antistoffer ved indsættelse og for unge til at producere målbare mod *M. bovis*, før de var 50-75 dage gamle. Nogle af kalvene i besætning D var i stand til at producere antistoffer i en yngre alder. Der sås ingen sammenhæng mellem kliniske symptomer og antistoffer, men der sås et højere antal kalve med kliniske symptomer fra de besætninger, hvor høje prævalenser af *M. bovis*, *P. multocida* og BCoV blev påvist i trachealskylle. *M. bovis* blev isoleret som eneste patogen hos fem kalve, men der blev påvist mere end et patogen hos størstedelen af kalvene.

Endvidere belyste resultaterne i dette studie udfordringerne i forhold til diagnostik og vurdering af *M. bovis* rolle i udviklingen af sygdom, som var dårlig korrelation mellem antistoffer og kliniske symptomer, uspecifikke kliniske symptomer, påvisning af forskellige agens hos de syge kalve samt viden om, at *M. bovis* også kan påvises hos raske kalve. Dog blev *M. bovis* påvist i kroniske læsioner i lunger og mellemøre, i høje prævalenser i alle besætninger samt som eneste patogen hos fem af kalvene, hvilket antyder, at *M. bovis* har haft betydning for sygdomsudviklingen i besætningerne.

7 Perspektivering

Som tidligere beskrevet bliver *M. bovis* betragtet som en væsentlig årsag til sygdom hos slagtekalve i USA, Canada og Europa, men der er manglende viden omkring *M. bovis* betydning i danske slagtekalvebesætninger. Dette feltstudie har bidraget til karakteriseringen af luftvejslidelser i fire danske slagtebesætninger både med hensyn til kliniske og diagnostiske parametre samt identificering af risikofaktorer på besætningsniveau i besætningerne. Resultaterne antydede, at *M. bovis* sammen med andre patogener spillede en rolle i sygdomsforekomsten i slagtekalvebesætninger, men grundet stikprøvestørrelser og udfordringer i forhold til diagnostik og fortolkning heraf var det ikke muligt at vurdere *M. bovis* præcise betydning. Derimod kan dette studies resultater bidrage til nye hypoteser, som kan danne grobund for nye studier.

I fremtidige studier omkring luftvejslidelser og *M. bovis* i slagtekalvebesætninger kunne det være interessant at undersøge forekomsten af maternelle antistoffer hos de helt unge, kommende slagtekalve i leverandørbesætningerne. Sådanne målinger vil formodentlig kunne bidrage med viden om *M. bovis* status i leverandørbesætningerne samt give en generel viden om kalvenes immunstatus. Endvidere kunne det være interessant i fremtidige studier at analysere for antistoffer mod andre patogener end *M. bovis* for at se udviklingen heraf og undersøge eventuelle sammenhænge med klinisk sygdom.

Dette studie viste høje prævalenser af *M. bovis*, *P. multocida* og BCoV hos klinisk syge kalve i besætningerne. I fremtidige studier kunne man overveje at udvælge en gruppe indikatorkalve ved indsættelse, som man testede med trachealskyl ved indsættelse samt ved eventuel senere klinisk sygdom for at få indblik i dels forandringen i tilstedeværelsen af patogener fra indsættelse til klinisk sygdom, dels om mulige sammenhænge i dette.

Nul-14 dages kalvedødelighed i leverandørbesætninger blev i studiet identificeret som en signifikant risikofaktor for udvikling af sygdom hos kalvene, hvilket sætter fokus på kvaliteten af de leverede kalve fra leverandørbesætningerne og giver leverandørerne mulighed for at selektere i deres leverandører med henblik på at reducere sygdomsforekomst og stille krav til deres leverandører. Et større studie på tværs af flere danske slagtekalvebesætninger kunne undersøge effekten af denne risikofaktor nærmere samt undersøge andre risikofaktorer på besætningsniveau. Ud fra dette studie ser det ud til, at sygdomsforekomsten er mindst i de besætninger, der ikke har kontakt med nye kalve efter indsættelse. Et større studie ville også give mulighed for at teste denne

hypotese for eksempel ved at undersøge sammenhængen mellem sygdomsforekomst og kontakt til nabobokse.

En større viden om *M. bovis* prævalens og betydning i danske slagtekalvebesætninger samt identifikation af flere risikofaktorer på besætnings- og enkeltdyrniveau vil forhåbentligt på sigt kunne bidrage til en reduktion af luftvejslidelser i danske slagtekalvebesætninger.

8 Litteraturliste

- Allen, J. W., Viel, L., Bateman, K. G., Rosendal, S., Shewen, P.E., Physick-Sheard, P, 1999. The microbial flora of the respiratory tract in feedlot calves: associations between nasopharyngeal and bronchoalveolar lavage cultures. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 55, 341-346.
- Arcangioli, M.A., Duet, A., Meyer, G., Dernburg, A., Bézille, P., Poumarat, F.; Le Grad, D., 2008. The Role of *Mycoplasma Bovis* in Respiratory Disease Outbreaks in Veal Calfs Feedlots. *The Veterinary Journal*, 177, 89-93
- Bio-X Diagnostics, Jemelle, Belgium, 2011. *Mycoplasma Bovis* ELISA Kit.
- Booker, C. W., Sameeh, M., Morley, P.S., Jim, G.K., Pittman, T.J., Schunicht, O.C., Perret, T., Wildman, B.K., Fenton, R.K., Guichon, P.T., Janzen, E.D., 2000. Microbiological and histopathological findings in cases of fatal bovine respiratory disease of feedlot cattle in western Canada. *Canadian Veterinary Journal*, 49, 473-481
- Bürki, S., Frey, J., Pilo, P., 2015. Virulence, persistence and dissemination of *Mycoplasma bovis*. *Veterinary Microbiology*. 179, 15-22.
- Bürki, S., Gaschen, V., Stoffel, M.H., Stojiljkovic, A., Frey, J., Kuehni-Boghenbor, K., Pilo, P., 2015. Invasion and persistence of *Mycoplasma bovis* in embryonic calf turbinate cells. *Veterinary Research*. 46 (1), 53-67.
- Butler, J. A., Sickles, S.A., Johanns, C.J., Rosenbuch, R.F., 2000. Pasteurization of Discard *Mycoplasma* Mastitic Milk Used to Feed Calves: Thermal Effects on Various *Mycoplasma*. *Journal of Dairy Science*, 83, 2285-2288.
- Castillo-Alcala, F., Bateman, K.G., Cai, H.Y., Schott, C.R., Parker, L., Clark, M.E., McRaid, P., McDowall, R.M., Foster, R.A., Archambault, M., Cashwell, J.L., 2012. Prevalence and Genotype of *Mycoplasma Bovis* in Beef Cattle after Arrival at a Feedlot. *American Journal of Veterinary Research*. 73 (12), 1932-1943.
- Cashwell, J.L., Bateman, K.G., Hugh, Y., Castillo-Alcala, F., 2010. *Mycoplasma Bovis* Pneumonia in Cattle. *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases*. 8 (2), 365-379.
- Da Roden, L., Smith, R.P., Spier, S.J., Dilling, G.W., 1992. Effect of calf age and *Salmonella* bacterin type on ability to produce immunoglobulins directed against *Salmonella* whole cells or lipopolysaccharide. *American Journal of Veterinary Research*. 53 (10), 1895-1899.
- Decaro, N., Elia, G., Campolo, M., Desario, C., Mari, V., Radogna, A., Colaianni, M.L., Cirone, F., Tempesta, M., Buonavoglia, C., 2008. Detection of Bovine Coronavirus Using a TaqMan-Based Real-Time RT-PCR Assay. *Journal of virological methods*. 151 (2), 167-71.
- Gagea, M.I., Bateman, K.G., Shanahan, R., Van Dreumel, T., McEwen, B.J., Carman, S., Archambault, M., Cashwell, J.L., 2006. Naturally Occurring *Mycoplasma Bovis*-Associated Pneumonia and Polyarthritits in Feedlot Beef Calves. *Journal of veterinary diagnostic investigation*. 18, 29-40.

- Hakhverdyan, M., Hägglund, S., Larsen, L.E., Belak, S., 2005. Evaluation of a Single-Tube Fluorogenic RT-PCR Assay for Detection of Bovine Respiratory Syncytial Virus in Clinical Samples. *Journal of Virological Methods*. 123, 195-202.
- Hanzlicek, G., White, B.J., Renter, D.G., Anderson, D.E., Larson, R.L., 2011. Associations between the Prevalence of Mollicutes and Mycoplasma Bovis and Health and Performance in Stocker Calves. *The Veterinary record*. 168, 21-25.
- Horwood, P.F., Shcibrowski., Fowler, E.V., Gibson, J.S., Barnes, T.S., Mahony, T.J., 2014. Is Mycoplasma Bovis a Missing Component of the Bovine Respiratory Disease Complex in Australia? *Australian Veterinary Journal*. 92 (6), 185-191.
- Horwood, P.F. & Mahony, T.J., 2011. Multiplex Real-Time RT-PCR Detection of Three Viruses Associated with the Bovine Respiratory Disease Complex. *Journal of Virological Methods*. 171 (2), 360–363.
- Howard, C.J., 1984. Comparison of Bovine IgG1, IgG2 and IgM for ability to promote killing of *Mycoplasma bovis* by bovine alveolar macrophages and neutrophils. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 6, 321-326.
- Houe, H., Ersbøll, A.K., Toft, N., 2004. Introduction to Veterinary Epidemiology, 1. Udgave. Biofolia, Frederiksberg, Danmark.
- Kusiluka, L.J., Ojeniyi, B., Friis, N.F., 2000. Increasing prevalence of *Mycoplasma bovis* in Danish cattle. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 41 (2), 139-146.
- Martin S.W., Bateman, K.G., Shewen, P.E., Rosendal, S., Bohac, J.G., Thorburn, M., 1990. A Group Level Analysis of the Association Between Antibodies to Seven Putative Pathogens and Respiratory Disease and Weight Gain in Ontario Feedlot Calves. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 54, 337-342.
- Martin, S.W., Bohac, J.G., 1986. The association between serological titers in infectious bovine rhinotracheitis virus, bovine virus diarrhea virus, parainfluenza-3 virus, respiratory syncytial virus and treatment for respiratory disease in Ontario feedlot calves. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 50, 351-358.
- Maunsell, F.P., & Donovan, G.A., 2009. *Mycoplasma Bovis* Infections in Young Calves. *Veterinary Clinics of North America*. 25 (1), 139-177.
- McGuirk, S.M. & Peek, S.F., 2014. Timely Diagnosis of Dairy Calf Respiratory Disease Using a Standardized Scoring System. *Animal Health Research Reviews*. 15 (2), 145-147.
- Nagatomo, H., Shimizu, T., Higashiyama, Y., Yano, Y., Kuroki, H., Hamana, K., 1996. Antibody Response to Mycoplasma bovis of Calves Introduced in a Farm Contaminated with the organism. *Journal of Veterinary Medical Science*. 58 (9), 919-920.
- Nicholas, R.A.J., 2011. Bovine Mycoplasmosis: Silent and Deadly. *Veterinary Record*. 168 (17), 459–62. *Research in Veterinary Science*. 74 (2), 105–112.

Nicholas, R.A.J., & Ayling, R.D., 2003. *Mycoplasma Bovis: Disease, Diagnosis, and Control. Research in Veterinary Science.* 74 (2), 105-112.

Nicholas, R.A.J., Ayling, R.D., Stipkovits, L.P., 2002. An Experimental Vaccine for Calf Pneumonia Caused by *Mycoplasma Bovis* : Clinical , Cultural , Serological and Pathological Findings. *Vaccine.* 20, 3569-3575.

Pardon, B., Alliet, J., Boone, R., Roelandt, S., Valgaeren, B., Deprez, P., 2015. Prediction of Respiratory Disease and Diarrhea in Veal Calves Based on Immunoglobulin Levels and the Serostatus for Respiratory Pathogens Measured at Arrival. *Preventive Veterinary Medicine.* 120 (2), 169–176.

Pardon, B., De Bleecker, K., Hostens, M., Callens, J., Dewulf, J., Deprez, P., 2011. Prevalence of Respiratory Pathogens in Diseased, Non-Vaccinated, Routinely Medicated Veal Calves. *The Veterinary Record.* 169, 278.

Razin, S., Yogev, D., Naot, Y., 1998. Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 1094-1156.

Petersen, M.B., Krogh, K., Nielsen, L.R., 2015. *Mycoplasma bovis* – hvad ved vi egentlig? *Dansk Veterinaertidsskrift.* 2, 14-18.

Rottem, Schlomo., 2003. Interaction of Mycoplasmas with Host Cells. *Physiological reviews.* 83 (2), 417–432.7

Ruffo, G., Nani, S.P., Podesta, A., 1996. Survival of *Mycoplasma agalactiae* var. *bovis* in several materials and at different temperatures. *Archivo Veterinario Italiano.* 20, 459-464.

Schibrowski, M.L., 2014. *Mycoplasma Bovis* in Australian Feeder Cattle. A Thesis Submitted for the Degree of Doctor of Philosophy at The University of Queensland in 2014 Queensland Alliance for Agriculture and Food Innovation (QAAFI).

Soehlen, M.K., Aydin, A., Murthy, K.S., Lengerich, E.J., Hattel, A.L., Houser, B.A., Fenton, G.D., Lyszczek, H.R., Burns, C.M., Townsend, A.M., Brooks, J.W., Wolfgang, D.R., Jayarao, B.M., 2012. Epidemiology of *Mycoplasma Bovis* in Pennsylvania Veal Calves. *Journal of Dairy Science.* 95 (1), 247-254.

Stipkovits, L., Ripley, P., Palfi, V., Varga, J., 2011. Clinical Study of the Disease of Calves associated with *Mycoplasma bovis* Infection. *Acta Veterinaria Hungarica.* 48 (4), 673-676.

Sykes, J.E., Hartman, K., Lunn, K.F., Moore, G.E., Stoddard, R., Goldstein, R.E., 2011. *Mycoplasma Bovis* Infections in Cattle. *Journal of Veterinary Internal Medicine.* 19 (1), 1–13.

Taylor, J.D., Fulton, R.W., Lehenbauer, T.W., Step, D.L., Confer, A.W., 2010. The Epidemiology of Bovine Respiratory Disease: What Is the Evidence for Predisposing Factors? *The Canadian Veterinary Journal.* 51 (10), 1095-1102.

Vanden Bush, T.J., & Rosenbuch R.F., 2003. Characterization of the immune response to *Mycoplasma bovis* lung infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 94, 23-33.

Virtala, A.M.K., Gröhn, Y.T., Mechor, G.D., Erb, H.N., Dubovi, E.J., 2000. Association of seroconversion with isolation of agents in transtracheal wash fluids collected from pneumonic calves less than three months of age. *Bovine Practitioner*. 34 (2), 77-80.

Wiggins, M.C., Woolums, A.R., Sanchez, S., Hurley, D.J., Cole, D.J., Ensley, D.T., Pence, M.E., 2007. Prevalence of *Mycoplasma Bovis* in Backgrounding and Stocker Cattle Operations. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 230 (10), 1514–1518.

Woolums, A.R., 2010. Feedlot BRD: Is the Disease Changing? *NAVC Conference*.

Bilagssamling

Bilag 1: oversigt over påviste patogener i trachealskyl

Kalv nr	Trachealskyllet	P. multocida	M. haemolytica	H. somnus	Mycoplasma spp.	M. bovis	BCoV	BRSV	PI-3
1									
2									
3	X				1				
4									
5	X				1	1	1	1	
6									
7	X	1			1	1		1	
8	X						1		
9	X				1			1	
10	X	1			1	1	1		
11									
12									
13	X	1			1	1	1		
14	X	1	1		1	1		1	
15	X	1			1			1	
16	X								
17	X	1	1		1		1		
18									
19									
20	X				1	1		1	
21	X	1			1	1	1	1	
22									
23	X		1		1				
24	X	1			1	1	1	1	
25	X	1			1	1	1		
26	X	1			1	1			
27	X	1			1	1	1		
28	X	1				1	1		
29	X	1							
30	X	1			1	1	1		
31	X	1			1	1		1	
32	X	1			1	1			
33	X	1			1	1			
34	X	1			1	1	1		
35	X					1			
36	X				1	1	1	1	
37	X	1			1	1	1		
38	X	1			1	1	1		
39	X	1			1	1	1		
40									
41	X	1			1	1	1		
42	X	1			1	1	1		

Kalv nr	Trachealskyllet	P. multocida	M. haemolytica	H. somnus	Mycoplasma spp.	M. bovis	BCoV	BRSV	PI-3
43	X	1							
44	X				1		1		
45	X	1			1	1			
46	X				1				
47									
48	X	1			1	1			
49	X			1	1				
50	X		1		1	1	1	1	
51	X								
52	X						1		
53	X	1				1			
54	X					1			
55									
56									
57	X	1			1	1			
58	X		1		1	1			
59	X						1		
60	X		1						
61									
62	X			1	1			1	
63									
64	X				1	1			
65									
66	X				1	1			
67									
68	X	1	1		1				1
69	X				1			1	
70	X	1							
71									
72									
73	X				1	1			
74									
75									
76	X	1							
77	X	1					1		
78									
79	X	1			1	1			
80									
81									
82									
83	X				1	1			
84	X								
85									
86	X	1				1			
87	X								

Bilag 2: Oversigt over klinisk score ved de forskellige besøg

Besætning	Kalv nr	0 uger	1 uge	2 uger	3 uger	6 uger	10 uger
A	1	0	0	0	3	0	2
A	2	0	1	2	2	3	3
A	3	0	5	3	1	2	3
A	4	2	2	2	1	0	3
A	5	0	1	2	6	1	3
A	6	0	1	0	2	0	3
A	7	0	1	0	4	3	3
A	8	0	6	2	4	2	5
A	9	1	2	0	4	2	8
A	10	2	4	2	7	4	6
A	11	0	0	0	1	1	2
A	12	0	0	1	1	1	3
A	13	1	3	3	6	6	1
A	14	0	1	2	5	2	2
A	15	2	0	2	5	3	4
A	16	7	0	3	3	1	2
A	17	1	5	3	1	2	2
A	18	0	3	2	3	0	1
A	19	2	2	1	1	3	6
A	20	0	0	1	4	6	7
A	21	1	0	1	2	4	6
A	22	1	1	0	5	1	4
A	23	0	0	1	4	2	6
A	24	2	0	1	3	3	5
B	25	0	8	7	2	3	2
B	26	0	4	9	7	3	4
B	27	2	3	5	5	3	5
B	28	0	0	8	5	4	4
B	29	2	1	1	4	1	2
B	30	0	5	7	5	4	4
B	31	0	1	11	5	3	2
B	32	1	5	9	11	3	4
B	33	2	1	4	5	1	1
B	34	1	1	11	5	2	4
B	35	0	3	6	5	5	6
B	36	1	3	9	5	4	5
B	37	0	2	4	5	2	4
B	38	0	2	7	5	5	6
B	39	2	0	6	2	4	4
B	40	0	1	3	3	1	1
B	41	3	2	5	4	7	3
B	42	0	0	5	6	4	4
B	43	0	0	3	5	3	3

B	44	1	4	5	4	3	4
C	45	5	2	4	8	2	1
C	46	6	5	3	4	0	0
C	47	0	1	0	2	1	2
C	48	0	4	2	0	4	2
C	49	0	0	2	2	3	7
C	50	0	0	1	1	2	3
C	51	1	1	2	3	4	2
C	52	2	1	1	1	4	2
C	53	1	1	4	1	5	2
C	54	3	3	2	0	4	3
C	55	4	1	4	2	2	0
C	56	7	2	2	1	4	0
C	57	3	1	2	0	4	3
C	58	1	6	2	1	3	6
C	59	0	2	3	6	3	2
C	60	1	1	2	5	3	4
C	61	1	1	1	3	3	3
C	62	0	5	2	6	3	2
C	63	1	1	1	3	3	0
C	64	2	1	5	1	2	5
D	65	3	3	2	2	4	
D	66	7	6	12	Aflivet		
D	67	1	1	2	3	1	
D	68	5	2	3	2	Selvdød	
D	69	1	2	6	1	1	
D	70	4	0	2	2	1	
D	71	2	0	1	1	0	
D	72	3	0	2	1	0	
D	73	2	4	4	5	5	
D	74	0	0	0	1	1	
D	75	1	2	1	0	2	
D	76	4	3	0	2	2	
D	77	1	4	1	1	3	
D	78	1	1	1	0	3	
D	79	3	4	5	1	2	
D	80	1	2	1	2	3	
D	81	0	0	2	2	3	
D	82	1	3	1	2	0	
D	83	3	1	2	5	3	
D	84	3	1	5	4	2	
D	85	0	2	0	1	0	
D	86	2	1	1	3	4	
D	87	4	1	8	3	2	

Bilag 3: Obduktionsrapport, kalv nummer 66

Laboratoriesvar vedrørende journal nr

1

CHR adr.:	CHR nr Tlf nr
Modtaget den 19.11.15: 1 stk Kalv, dyrets vægt: 50 kg	
Anamnese:	Øremrk -- Mykoplasmaprojekt : 20-30% af kalve har næse-/øjenflåd/ hoste. Enkelte med hængende ører. Beh med Resflor 5/11. Temp. 40 i 2 uger
Diagnose:	Mucopurulent bronchopneumoni. Otitis media purulenta. Ingen specifikke bakterielle patogener blev påvist. Mycoplasma bovis påvist. - ENDELIGT SVAR.
Udført:	Obduktion
Resultat:	Ernæringstilstand under middel. Hårløse områder flere steder på kroppen. Mucopurulent bronchopneumoni i hjerte-/spidslapper (18% af lungevævet er afficeret). Overliggende fibros adhesiv pleuritis. Bronchiallymfeknuder forstørrede. Hjertet er OK. Lever, milt og nyrer uden synlige forandringer. Formaver og tarme uden synlige forandringer. Vandigt indhold i colon. Let forøget mængde synovi i flere led. Bilateral purulent otitis media. Meninges er let ødematøse.
Udført:	Bakteriologisk undersøgelse
Resultat:	Svag uspecifik blandingsflora fra lunge, pleura, mellemøre og hjernevæv.

Fortættets næste side

Laboratoriesvar vedrørende journal nr

Udført:	Diverse
Resultat:	Mycoplasma bovis påvist ved PCR i lunge og i svaber fra bulla tympani.

Prøvenr. Prøveinformation

1 Kvæg, kalv, bakteriekultur,

Anamnese:
dødsfald

Sagsbemærkninger:

Sagen blev forsinket pga. manglende signifikans af MALDI-TOF analyse, hvilket indebærer gennemførelse af supplerende analyser.
Mest sandsynligt Streptococcus mitis

Bakterieidentifikation ved MALDI-TOF

1 Bakteriekultur Streptococcus spp påvist

Prøvenr. Prøveinformation

1 Svin, slagtesvin, bakteriekultur,

Bakterieidentifikation ved MALDI-TOF

1 Bakteriekultur Trueperella pyogenes påvist

Bilag 4: Trachealskyllevejledning

Kvægfagdyrlæge Niels Peter Jensen, Nordfyns Dyreklinik, 5450 Otterup

Trachealskylleprøver på kalve

En kort, praksisorienteret gennemgang af undersøgelsesmetode fra hovedopgave udarbejdet i forbindelse med kvægfagdyrlægekursus.

Til skylningen anvendes et til formålet modificeret hoppeskyllekateter (uden sidehuller), 120 cm (vigtigt), afrundet i enden, enkeltvis steriliseret og pakket (Kruuse, Marslev, vnr. 230755, ca. 25 kr.), 50/60 ml engangssprøjte, isotonisk NaCl, engangsvaskeklud af skumgummi, sterilt venojectglas plain samt, især i starten, lidt tålmodighed.

Undersøgelse foretaget på stående, ikke sederet kalv. Hjælperen holder kalven fikseret i det ene øre og under den modsatte underkæbegren.

Med et dobbelt lag skumgummiklud fatter man om tungen og trækker den, med et fast tag, lige fremad. Pas på at undersiden af tungen ikke læderes på fortænderne i undermundten.

Det faste træk fremad fastholdes i 20 -30 sekunder til kalven slapper af.

"Kapitulationen" signaleres ofte med et lille brøl. Det er herefter muligt, efter et par forsøg, at føre kateteret ned i trachea. Det er sjældent muligt at se ned i svælget på kalven, så kateteret føres i stedet tæt ned over tungeroden til larynx. Man får et godt fingerpeg om, at man er det rigtige sted, når kalven giver et lille host fra sig.

Det er af hensyn til minimal læsion af trachea vigtigt at anvende den afrundede ende af kateteret.

Under den videre indføring af kateteret kan man mærke luften fra eksspirationen samt et andet sikkert tegn på rigtig position, nemlig følelsen af at "hoppe" ned ad den ene trachealring efter den anden. Kateteret føres forsigtigt til en anslået position ved bifurkaturen. Det er vigtigt at komme helt frem til ned i lungten for at kunne genopsuge skyllevæsken.

Ved hjælp af sprøjten infunderes, med rolig bevægelse, 50 ml isotonisk NaCl. Det vil herefter sædvanligvis være muligt at genopsuge 30 -35 ml skyllevæske, som derefter overføres til 1 - 2 venojectglas og forsendes (gerne på køl) til laboratorium. Det ene glas sedimenterer/centrifugeres og bundfaldet anvendes til egen dyrkning. Det er vigtigt at der er min. 15 ml skyllevæske i sprøjten ("residualrum" i kateter) og at der er "snot" i væsken.

Hvis man overvejer anvendelse af metoden, melder der sig en naturlig skepsis overfor sikkerheden m.h.t. eventuel overlast/død blandt undersøgte kalve. Det kan i den forbindelse nævnes at der i forbindelse med projektet er skyllet over 100 kalve uden dødsfald endsige forværring af kliniske symptomer. Andre undersøgelser med samme metode bekræfter dette.

Bilag 5: Obduktionsrapport, kalv nummer 68

Laboratoriesvar vedrørende journal nr












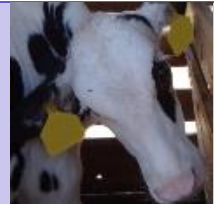
1

CHR adr.:	
Modtaget den 15.12.15: 1 stk Kalv, dyrets vægt: 70 kg	
Anamnese:	Mycoplasmaprojekt Nedstemthed, serøst næseflåd og temp mellem 38,6 og 39,1. Oppustet og luft forsøgt evakueret lige før død.
Diagnose:	Sepsis. Fibrinøs peritonitis og pleuritis. Ingen specifikke bakterielle patogener blev påvist.
Bemærkning:	FORELØBIGT SVAR. Fakturering er foretaget på dette svar, endeligt svar følger med resultat af undersøgelse for M. bovis.
Udført:	Mærkning
Resultat:	Øremærke:
Udført:	Obduktion
Resultat:	Foderstand under middel. Fokalt udbredt fibrinøs pleuritis med tykt gult fibrin cranio-ventralt, omfattende ca. 20% af pleura. Organer i thorax i øvrigt OK. Kraftigt svullen lever. Voldsom fibrinøs peritonitis med tykt gult fibrin og nekroser, blødninger og ødem i krøs diffust i bughulen. Stor mængde grumset væske med debris i bughulen. Sparsomt, tyndt indhold i vommen. Multiple blødende erosioner dissimineret i løbe-slimhinden. Tarme tilsyneladende normale. Fibrinøs arthritis i albueled. I øvrigt var led OK. Bulla tympani OK. Meninges uden synlige forandringer.

Laboratoriesvar vedrørende journal nr

Udført:	Bakteriologisk undersøgelse
Resultat:	Massiv vækst af uspecifik blandingsflora ved udsæd fra lever, lunge, pleura og led.
Udført:	Diverse undersøgelser i udlandet.
Resultat:	Ledvæske og lungevæv sendt til undersøgelse for M. bovis ved PCR.

Bilag 6: Skema til klinisk scoring af kalve

Kliniske tegn	0	1	2	3
Øjenflåd	 Normal	 Lille mængde øjenflåd	 Moderat mængde øjenflåd i begge sider	 Voldsomt øjenflåd
Næseflåd	 Normalt, serøst flåd	 Lille mængde hvidligt flåd i den ene side	 En smule hvidligt eller slimet flåd i begge sider	 Rigelige mængder hvidligt flåd i begge sider
Øre- og hovedholdning	 Normal	 Øre- eller hovedrysten	 Et øre hælder	 Skævt hoved eller begge ører hælder
Hævelse af led	Ingen hævelser			Hævelse af ét eller flere led
Halthed	Ingen halthed			Halthed på ét eller flere ben
Hoste	Ingen hoste	(Fremprovokering af enkelt host v. tryk på og rysten af strubehovedet)	Forekomst af enkelte spontane host	Gentagne spontane host
Respiration	Normal		Forøget respiration	Besværet respiration
Temperatur	37,8 – 38,7 °C	38,8 – 39,2°C	39,3-39,9 °C	≥40,0 °C

KØBENHAVNS UNIVERSITET
DET SUNDHEDSVIDENSKABELIGE FAKULTET

