

Diagnostik af infektioner i kalve 0-9 mdr.

*Professor Lars Erik Larsen, Parasitolog Heidi Huus Petersen, Dyrlæge Gitte Larsen og
Professor Karl Pedersen*

BAGGRUND

Kalve patogener under danske forhold

Når der ses bort fra kalvedødelighed i umiddelbar tilknytning til kælvning, er det overvejende to sygdomskomplekser som giver sygdom hos kalve – diarre og lungebetændelse. Der findes en række danske og udenlandske opgørelser over, hvor stort problemet er, men det er svært at sammenligne disse undersøgelser, da måleparametre, etc. er forskellige. Diarre er hyppigst forekommende den første levemåned, mens lungebetændelse ses mest hyppigt hos ældre kalve. Herudover har tidligere undersøgelser påvist, at kalve, der får diarre, har langt større risiko for at få lungebetændelse på et senere tidspunkt.

Hvilke typer af smitstof, der er involveret i infektiøse sygdomme hos kalve, har ikke kun akademisk interesse, men har stor betydning for, hvordan sygdommen opstår og spredes mellem individerne. Heraf følger, at en given ændring i opstaldning og/eller management vil have forskellige betydning for de forskellige grupper af smitstof. Basalt er der tre forskellige typer af smitstof på spil i de danske kalvestalde: bakterier, parasitter samt virus.

E. coli er den mest hyppige bakterielle årsag til diarre hos kalve og har primært betydning den første uge. *Salmonella* kan også være årsag til diarre hos kalve, men optræder mere sporadisk og ses hyppigst i alderen 2 uger- 3 mdr. Bakterierne spredes med fæces fra dyr til dyr, men staldbunden kan også være kontamineret. Colibacillose er infektion med invasive *E.coli* bakterier og forårsager septikæmi. Sygdommen optræder hos kalve i de første levedøgn og klinisk vil kalvene have nedstemthed, men der vil også kunne ses andre symptomer som arthritis, meningitis og diarre. Undersøgelse for colibacillose foretages ikke alene på fæcesprøver eller tarmindehold, da betydningen af isolater herfra ikke kan vurderes. Der skal i stedet indsendes organprøver(lunge, lever, milt og tarm), da resistensundersøgelsen vil blive foretaget på bakterieisolat fra organprøver, typisk leveren.

Cryptosporidier er den mest almindelige parasit, som giver anledning til diarre hos kalve den første levemåned – hos ældre kalve er det primært coccidier og *Giardia*, der giver problemer. Begge parasitter spredes med fæces fra dyr til dyr. Cryptosporidier er infektiøse, så snart de udskilles af værten, mens coccidier har brug for et par dages (afhænger af temperatur og fugtighed) modning i miljøet, før de er infektiøse. Parasitter er relativt modstandsdygtige i miljøet og kan derfor overleve længe i staldbunden og på kontaminerede utensilier. Rotavirus og bovint coronavirus er de virus, der oftest giver diarre hos kalve. Rotavirus rammer primært kalve under 4 uger, mens coronavirus kan give anledning til diarre hos alle aldersgrupper. Rotavirus er meget modstandsdygtigt og kan overleve længe i staldbunden og smitter med fæces via kontaminerede utensilier, staldbund og direkte kontakt med inficerede kalve. Coronavirus er mere sårbar, men kan også give anledning til respirationssvejslidelser, hvorfor dette virus også smitter gennem luften over kortere afstande.

Respirationssvejslidelser (enzootisk pneumoni) hos kalve er ætiologisk et meget komplekst syndrom. Lidelsen forekommer specielt hos kalve under 6 måneder. Følgende virus anses, under danske forhold, for at spille den største rolle for udvikling af respirationssygdomme omfatter Bovint respiratorisk syncytial (BRS) virus, parainfluenza-3- (PI-3-) virus samt bovint coronavirus. Bakterier kan optræde alene eller i forbindelse med virusinfektioner og omfatter *Pasteurella multocida*, *Mannheimia* (tidligere *Pasteurella*) *haemolytica*, *Histophilus somni* (tidligere *Haemophilus somnus*), *Trueperella* (tidligere *Arcanobacterium* eller *Actinomyces*) *pyogenes*, samt *Salmonella* Dublin.

Forskellige mycoplasma arter kan også spille en rolle hvoraf den største opmærksomhed de senere år har været rettet mod *Mycoplasma bovis*. Lungeorm (*Dictyocaulus viviparus*) spiller kun en mindre rolle for kalve i denne aldersgruppe og kun, hvis de holdes på græs.

FOREBYGGELSE OG FOREKOMST

Diarre optræder primært i den første levemåned, og de diarretilfælde, der skyldes infektioner, er oftest relateret til en suboptimal råmælkstildeling, selvom hygiejne og andre miljøfaktorer også spiller ind.

Respirationsvejslidelser er også multifaktorielle lidelser, dvs. at udbrud af klinisk sygdom kræver en eller flere faktorer udover tilstedeværelsen af patogenet. Betydningen af de enkelte faktorer er formodentlig forskellig fra besætning til besætning, fra år til år, fra sæson til sæson og fra kalv til kalv.

Det vil være optimalt, hvis luftvejsinfektioner kunne forhindres alene ved at indføre relevante forebyggende foranstaltninger, men med den nuværende produktionsform i specielt den specialiserede slagtekalveproduktion (indkøb og sammenblanding af kalve fra en lang række leverandørbesætninger) er det urealistisk helt at forhindre luftvejsproblemer. De forebyggende foranstaltninger må derfor tage sigte på at begrænse udbredelsen og konsekvenserne af infektionen. Smitteforholdene for BRSV er ikke helt klarlagt, men dette virus er så skrøbeligt, at tæt kontakt formodentligt er nødvendig for smitte. I den specialiserede slagtekalveproduktion er det mest sandsynligt, at BRSV introduceres i besætningen via ny-indsatte kalve. Coronavirus er derimod mere modstandsdygtig og kan sagtens overleve udenfor værten i længere tid. For bakteriers vedkommende er det især problematisk, at en del arter forekommer naturligt på slimhinder uden at give anledning til sygdomsproblemer. Svækkes de mekanismer, der holder bakterien under kontrol, kan bakterier kolonisere luftvejene og give anledning til klinisk sygdom.

LABORATORIEDIAGNOSTIK

Diagnostiske metoder

For påvisning af virus anvendes næsten udelukkende molekylærbiologisk påvisning ved PCR eller i nogle tilfælde også ved antigen ELISA eller hurtigtests (såkaldte snap kits), der kan laves på staldgangen. Fordelen ved PCR er, at den er meget følsom, således at meget små mængder kan påvises, og endvidere er den relativt robust forstået på den måde, at den ikke kræver, at virus er levende. PCR kan også anvendes til bakterier direkte på primærmateriale som f.eks. trachealskyl, kombineret med dyrkning af bakterier efterfulgt af nærmere karakterisering af renkulturer enten med PCR eller nyere metoder som MALDI-TOF samt efterfølgende resistensundersøgelse. For parasitter kan PCR også anvendes, men denne metode er bekostelig og tidskrævende, hvorfor mere traditionelle metoder som mikroskopi ofte anvendes.

Påvisning af antistoffer ved ELISA anvendes ofte til overvågning, men er mindre anvendelig til diagnostik af akut syge dyr.

Diagnostik af infektiøse årsager til diarre

Opstår der sygdomsproblemer i en besætning, som mistænkes at have en infektiøs årsag, kan der udtages prøver for at finde ud af, hvilke patogener, der er involveret. I tilfælde af forekomst af diarre er det mest hensigtsmæssigt at udtage enten fæcesprøver fra syge, ubehandlede kalve eller alternativt få undersøgt tarm/tarmindhold fra døde kalve. Det anbefales at undersøge prøver fra minimum 3 kalve for alle relevante patogener.

Er der mistanke om, at kalvene får for lidt råmælk, kan der udtages en blodprøve fra kalve under en uge til bestemmelse af total protein eller immunoglobulin generelt (total IgG).

Diagnostik af infektiøse årsager til luftvejslidelser

Diagnostik af luftvejsinfektioner er mere udfordrende. Der er mulighed for at udtage næsesvabere, svælgsvabere, trachealskyl via næsen/munden eller invasivt, samt ved indsendelse af lunger/lungeskyl fra døde/aflivede kalve.

Fordelen ved udtagning af svabere og trachealskyl er, at der kan udtages prøver fra flere kalve, som så efterfølgende pooles for at holde udgifter til analysen nede. Næsesvabere er lette at udtage, mens trachealskyl udtaget enten gennem næsen, munden eller invasivt kræver rutine og er til større gene for kalven. Endelig kan der udtages lunger fra døde eller aflivede kalve. Lungestykker er ikke egnede til pooling, men fordelene ved undersøgelse af lunger er, at der kan laves patologisk (makroskopisk og mikroskopisk) undersøgelse, der kan give værdifulde oplysninger om årsager til lungelidelsen. Alternativt kan der foretages skylning af lungerne efter aflivning (broncho-alveolar lavage (BAL)). Hermed er det også muligt at poole prøver fra flere dyr, og kontamination fra de øvre luftveje undgås.

Tolkning af laboratorieresultaterne - generelt

Udfordringen i veterinær diagnostik på produktionssygdommene er, at vi for langt de fleste patogener ikke ved, om påvisningen også er relateret til de kliniske symptomer, og at betydningen kan variere fra besætning til besætning, fra kalv til kalv og over tid i den enkelte besætning. Mange af de parasitter, bakterier og virus, der kan forårsage sygdomsfremkaldende infektion, findes i de fleste besætninger som harmløse kommensaler, så en +/- påvisning med en meget følsom metode er ikke nødvendigvis ensbetydende med, at patogenet bidrager til de kliniske symptomer. Vurderingen kan derfor kun foretages ved at sammenholde de diagnostiske svar med produktionsdata og kliniske symptomer, samt kendskab til besætningen. For nogle patogener – f.eks. cryptosporidier – anføres resultatet

som semikvantitativt (lav/moderat/massiv), men for bakterier og virus foreligger der ikke undersøgelser der dokumenterer at (semi)kvantitativt laboratoriesvar giver bedre positiv prædiktativ værdi. Nedenfor gives nogle forslag og input til, hvordan forskellige fund kan vurderes, men disse vurderinger er **ikke** ridset i sten!

Generelt stilles der ikke enkeltdyrsdiagnoser i kalvebesætninger, men besætningsdiagnoser, der bygger dels på fund i den enkelte kalv, dels på prævalensen af fundene – dvs. det altid anbefales at indsende prøver fra mere end et dyr til analyse.

Da følsomheden af de tests, der anvendes, generelt er gode, er det normalvis lettere at udelukke involvering af et givent patogen end at dokumentere, at det er årsagen - forudsat at prøverne er udtaget fra de rigtige dyr på det rigtige tidspunkt.

Tolkning – specifikke fund

Påvisning af **rotavirus eller coronavirus** i en eller flere kalve med klinisk diarre anses for at være en god indikation for, at virus er involveret. For rotavirus gælder dette dog kun for kalve under 1 måned, da betydningen af rotavirus i ældre dyr er tvivlsom. Da udskillelsen af virus i den kliniske fase er høj, vil en negativ test af 3-5 dyr for et af disse virus være en god indikation på, at virus ikke er årsagen til diarren. Opmærksomheden skal også rettes mod at påvisning af coronavirus i fæces kan komme fra respirationsvejene, da dette virus også kan give respirationsvejslidelse. Dette betyder også, at coronavirus lejlighedsvis påvises i næsesvabere fra kalve uden respirationsvejssymptomer, hvilket kan skyldes fækal kontamination. Derfor bør et positivt coronavirus resultat altid vurderes i forhold til de patoanatomiske fund og kliniske tegn i besætningen.

Påvisning af enterotoksigene ***E. coli*** (F5/K99 positiv) i fæcesprøver i en eller flere kalve under 10 dage kan tolkes som årsag til diarreproblemer, hvis der klinisk ses diarre, dehydrering, acidose og kollaps. Fund af F5 positive *E. coli* kan også indikere utilstrækkelig beskyttende immunitet hos kalvene, hvilket igen betyder, at der kan være grund til at revidere procedurer for råmælkstildeling eller ændre vaccinationsstrategi.

Påvisning af **cryptosporidier** i moderat eller massivt niveau hos kalve med klinisk diarre anses for en god indikator for, at cryptosporidier er årsag til diarre. Dog kan dyr godt have høj udskillelse af cryptosporidier uden klinisk diarre, afhængigt af dyrets immunstatus.

Påvisning af **coccidier** er ikke nødvendigvis ensbetydende med klinisk diarre, da dette bl.a. afhænger af coccidie-arten. Hos kvæg findes 12 forskellige coccidie (også kaldet *Eimeria*)

arter, hvoraf kun 3 er højpatogene, og 2 er mindre patogene. De resterende arter giver typisk ikke anledning til kliniske symptomer, selv ved høj udskillelse. Der er derfor kun en lille sammenhæng mellem antallet af oocyster i gødningen og diarre. Endvidere er der for en stor del af coccidie-arternes vedkommende kun en ganske kort top for udskillelsen, hvorimod de patologiske følger kan være noget mere vidtrækkende i tid. Påvisning af coccidier skal derfor holdes op i mod dyrets almene tilstand og kliniske symptomer.

Påvisning af **Giardia** er ikke nødvendigvis ensbetydende med klinisk diarre, da infektion ofte er uden symptomer, dog kan infektion med *Giardia* være årsag til klinisk diarre hos kalve.

Tolkning af fund i materiale udtaget med henblik på afklaring af årsager til respirationsvejslidelser afhænger af prøvematerialet. Ulempen ved undersøgelse af næsesvabere er, at de patogener, der påvises i næsen, ikke nødvendigvis afspejler forekomst af patogenet i de nedre luftveje. Det samme er også gældende for trachealskyl – også for skyl, der er udtaget invasivt gennem trachea. Dette er specielt et problem for påvisning af bakterier. Da lunger som udgangspunkt er sterile, vil påvisning af et specifikt virus eller bakterier i lunger eller broncho-alveolært skyl ofte være et godt tegn på, at dette patogen er involveret, men påvises en specifik bakterie i lungerne af en død kalv, der har været syg i længere tid, kan det være sekundært til en virusinfektion, der ikke længere kan påvises, men som har været den udløsende faktor.

Udtages prøver af antibiotikabehandlede kalve, skal resultatet af bakterieundersøgelser selvsagt tolkes med dette forbehold – både hvis der testes med PCR og ved dyrkning.

Påvisning af **BRSV** i næsesvabere, skyl og lunger fra klinisk syge kalve har i flere studier vist at give en god indikation for, at dette virus er involveret – BRSV påvises ikke ofte i raske dyr og påvises som udgangspunkt ikke ved screening af besætninger uden respirationsvejslidelse. Da udskillelsen af virus i den kliniske fase er høj, vil en negativ test af 3-5 dyr for et af disse virus være en god indikation på, at BRSV ikke er årsagen til de kliniske symptomer.

Selvom det er mindre veldokumenteret, gælder samme vurdering for **coronavirus** med den undtagelse, at en prøve kan teste positiv, hvis næsesvaberen kontamineres med fæces, der indeholder coronavirus.

Parainfluenza-3 virus er også beskrevet som et primært patogen hos kalve, men påvises meget sjældent i danske kalve.

En lang række andre virus kan påvises i næsen og de øvre luftveje hos både syge og raske kalve – det gælder f.eks. **rhinovirus** og **adenovirus**, men disse betragtes ikke som primærpatogene, så der undersøges ikke rutinemæssigt for disse.

Både *Pasteurella multocida* og *Mannheimia haemolytica* forekommer udbredt i kalve på slimhinden i næsehulen hos raske kalve som kommensaler. Derimod isoleres *H. somni* sjældent i næsesvaberprøver selvom den isoleres fra lungen. Resultater af bakteriologisk undersøgelse for primære patogene luftvejsbakterier på næsesvaberprøver eller trachealskyl skal derfor tolkes med forsigtighed. Alternativt kan der udtages lungevæv eller BAL fra syge kalve.

Udover de primære luftvejspatogener vil der ved den bakteriologiske undersøgelse på trachealskylprøver og lungevæv også kunne findes sekundære bakterielle agens som f.eks. *E.coli*, *Trueperella pyogenes*, *Staphylococcus* spp. og *Streptococcus* spp typisk sammen med virus eller mycoplasma infektioner.

GUIDELINE FOR UDTAGELSE AF PRØVER

Hvilke prøver, der skal udtages og fra hvilke dyr, afhænger helt af problemets karakter, besætningens type og infrastruktur samt hvilke spørgsmål, det diagnostiske svar forventes at kunne bidrage til at belyse.

Nedenfor er der skitseret nogle forslag til udtagning ved forskellige scenarier. Det skal understreges, at det anførte prøveantal m.m., ikke bygger på statistiske udregninger på baggrund af forventet prævalens, test sensitivitet, m.m. Forslagene er således stærkt baseret på, hvad der er praktisk og økonomisk muligt og erfaringsmæssigt har givet brugbare resultater.

Udbrud af diarre hos småkalve under en måned

Udtagning af minimum 3 fæcesprøver fra rectum af 3 kalve med diarre/tilsmudset bagpart. Test for alle relevante agens for den pågældende aldersgruppe (over og under 10 dage).

Er der mistanke om, at råmælksstrategien halter i besætningen, kan udtages 10-12 blodprøver fra kalve under en uge som så testes for immunoglobulin/total protein.

Udbrud af diarre hos ældre kvier og slagtekalve

Udtagning af minimum 3 fæcesprøver (helst >5 g) fra rectum af kalve med diarre/tilsmudset bagpart. Alternativt kan anvendes staldbundsprøver. Test for alle relevante parasitter for den pågældende aldersgruppe. Er der mistanke om vinterdysenteri (blodig diarre hos ældre kalve og eventuelt køer), anbefales også at undersøge prøverne for coronavirus. Salmonella er meget relevant i denne gruppe.

Akut, alvorlig luftvejsinfektion i kviekalve og tyrekalve

Ved akutte udbrud med øget dødelighed og høj prævalens anbefales at indsende BAL/lunger/lungestykker (inkluder det forandrede væv og overgangen mellem normalt og forandret væv) fra minimum 3 klinisk syge og ubehandlede kalve til test for virus, *M. bovis* og bakterier ved hhv. PCR og bakteriologisk undersøgelse og resistensbestemmelse. Dette kan eventuelt kombineres med mikro- og makroskopisk undersøgelse af lunger fra minimum 3 kalve. Alternativt kan der indsendes trachealskyl fra minimum 3 kalve

Vedvarende (kronisk) forekomst af respirationsvejslidelse i kviekalve og slagtekalve

Er der for høj forekomst af hoste, m.m. i specifikke aldersgrupper, kan der udtages næsesvabere eller trachealskyl. Det anbefales at indsende prøver fra flere dyr – f.eks. næsesvaberprøver fra 5-10 kalve og trachealskyl fra minimum 3 kalve. Test for virus, mycoplasma og bakterier ved PCR og eventuelt dyrkning og resistensbestemmelse (bakterier).

Det vil give et indtryk af prævalensen af de påviste patogener, men specielt for bakterier er tolkningen usikker (se forrige afsnit). Påvises en given bakterie i flere dyr, bør undersøgelse følges op med undersøgelse af lunger/BAL fra minimum 3 døde/aflivede syge kalve for at bekræfte fundet.

Respirationsvejslidelser i relation til indsættelse i slagtekalvebesætninger

I projektsammenhæng har der været foretaget undersøgelser af næsesvabere og trachealskyl i forbindelse med indsættelsen af nye kalve i slagtekalvebesætninger. Resultaterne viser forekomst af coronavirus og/eller *Pasteurella multocida* og andre bakterier, men det varierer fra hold til hold, så værdien af disse undersøgelser vurderes at være begrænset, selvom fundet vil give et billede af, hvad der florerer i den testede gruppe af dyr. BRSV påvises sjældent ved test af kalve i forbindelse med indsættelse, men hvis der er mistanke om, at BRSV er involveret, kan der udtages næsesvabere fra 5-10 syge kalve.

