

Årprøvning af PCR-test som et værktøj i saneringen for Salmonella i kvægbesætninger:

Årprøvningen foregik i otte besætninger, der alle er i Salmonella niveau 2. Besætningerne blev udvalgt blandt andet på baggrund af, om de i forvejen deltager i et saneringsforløb udbudt fra Seges i 2020, tankmælkstiter, størrelse og at de benytter fælles kælvningsboks.

Udgangspunktet i denne årprøvning har været miljøet i kælvningsboksen samt en andel af de dyr, der har kælvnet i den i en sammenhængende periode på 14 dage. Kælvningsområdet har været det sted i opstaldningen, hvor det har været lettest at standardisere årprøvningen på tværs af besætningerne. Det vurderes desuden, at der er større risiko for smitteudskillelse blandt køer i perioden omkring kælvning, hvilket har relevans, da tidligere undersøgelser for Salmonella Dublin, viser at kun en mindre andel af køerne udskiller bakterier og oftest i lave koncentrationer. Kælvningsområdet er desuden helt centralt i saneringen for Salmonella Dublin. Et af holdepunkterne er at undgå smitte til den nyfødte kalv.

Metode og materiale:

De otte udvalgte besætninger varierer på mange parametre blandt andet størrelse, driftsform, hvor længe de har været smittet med Salmonella og tankmælkstiter, men er ikke repræsentativt udpeget, men afspejler den diversitet, vi møder ude på bedrifterne i forbindelse med salmonella sanering.

	A	B	C	D	E	F	G	H
Årskøer	770	400	770	625	860	300	275	815
	Konv.	Konv.	Konv.	Konv.	Konv.	Øko	Konv.	Øko
Niv. 2	2002	Sept. 2019	April 2019 *	Nov. 2005	Juli 2018	Sept. 2015	Okt. 2019	Jan. 2007
Tank	122 (6/7)	80 (27/7)	35 (20/7)	30 (27/7)	58 (22/6)	39 (27/7)	34 (27/7)	43 (20/7)
Kvartalsprøver.	8 kalve 0 i antistofværdi (26/6)	15 kalve 0-50 antistofværdi (10/9)	11 kalve 0-76 i antistofværdi 3 > 50 (1/9)	8 kalve 0-4 i antistofværdi (11/9)	8 kalve 0-26 (30/6)	8 kalve 0-55 (15/9)	8 kalve 0-45 (1/4)	9 kalve 0-58 1 > 50 (8/9)
Kælvningsbokse	3 Kvier i en.	2 Kvier i en	2 Kvier i en	6 Ugehold Kvier for sig.	1	3-4 Kvier for sig.	1	1 + stor pre-kælvningsboks.
Kalveopstaldning 0-14 dage	Udendørs enkelt-hytter.	Enkelt-bokse fordelt 3 steder på ejendom.	Vogne inden-dørs.	Enkelt-bokse inden-dørs	Kalve-vogne – ude.	Kalve-vogne ude. samt fællesbokse inde.	Enkelt-kalve-vogne inde.	Hytter uden-dørs. Parvis.
Andet	Malkende køer på to ejendomme. Kælvnings og kalve kun på hovedejendom.	Kvier på anden ejendom.	Kvier på anden ejendom. * Har været i status 2 siden 2003	Kvier på anden ejendom.	Kvier på anden ejendom.			Goldkøer, kvier og stude på andre ejendomme

	Yderlig to kvie- ejendomme.		med perioder af op til 2 år i status 1.					
Tidligere dyrk- ningsre- sultater			Jan. 2020 fund af Salmonella 4,5,12,1 fra nyk- ælvede køer					

Hver besætning blev besøgt tre gange. Ved første besøg i uge 28 i juli 2020 blev der udtaget blodprøver af goldkøer og kælvekvier, der havde forventet kælving omkring vores andet besøg i august. Af ressource-mæssige hensyn blev der maksimalt taget 42 prøver i hver besætning.

Prøverne blev udtaget fra halevenen i ustabiliserede glas (Vacutainer). Samme dag blev prøverne centrifugeret, serum blev afpipetteret og frosset ned til senere analyse.

Ved første besøg blev der desuden lavet hygiejnevurdering af kælvningsboksen. Renligheden af underlaget, vandforsyning og foderbord blev scoret.

Underlaget i kælvningsboksen er sjældent jævnt snavset/fugtigt. For at kunne vurdere disse forskelle, så har vi valgt at inddele boksen i ni felter og give hvert felt sin egen score.

Foderbord/-krybber

<i>A1</i>	<i>A2</i>	<i>A3</i>
<i>B1</i>	<i>B2</i>	<i>B3</i>
<i>C1</i>	<i>C2</i>	<i>C3</i>

Renligheden i hvert felt scores ud fra nedenstående kriterier:

- 0 Ingen synlig gødning/våd strøelse
- 1 Der er synlig gødning/våd strøelse i max 10 % af arealet.
- 2 Der er synlig gødning/våd strøelse i 10-25 % af arealet
- 3 Der er synlig gødning/våd strøelse i 25-50 % af arealet
- 4 Der er synlig gødning/våd strøelse i mere end 50 % af arealet

Hver vandkar eller vandkop i boksen blev scoret ud fra følgende kriterier;

- 0 Vandet er helt rent, der er intet bundfald, der er ingen biofilm/snavs indvendigt i karet og på vandrette flader.

- 1 Vandet er klart, der er bundfald, ingen biofilm/snavs (ikke synligt gødning) indvendigt eller på vandrette flader
- 2 Vandet er klart, der er bundfald, biofilm/ snavs indvendigt og på vandrette flader
- 3 Vandet er grumset/uklar, der er bundfald, biofilm/snavs indvendigt og på vandrette flader
- + Der er synlig gødningsforurening i vandet eller på indvendige eller vandrette flader.

Foderbord eller krybber blev vurderet ud fra disse kriterier:

- 0 Foderbord er synligt ren, kun frisk foder
- 1 Foderbord er rent, foder ikke friskt (varmer, lugter, synlig forskel mellem foderet eks. både friskt og gammelt foder
- 2 Foderbord er ikke rent; men ingen synlig gødningsforurening
- 3 Foder og strøelse er ikke adskilt
- + Synlig gødningsforurening på foderbord eller foder

Ved første besøg blev besætningsejer eller ansat instrueret i, hvordan de skulle udføre sokkeprøverne op til vores næste besøg i besætningen.

Andet besøg fandt sted enten i uge 33 eller 34 i august 2020. I 14 dage op til besøget skulle besætningsejer udtage en sokkeprøve dagligt fra hver kælvningsboks, før den blev strøet. Det var det tidspunkt, hvor boksen formodes at være mest snavset. Besætningsejer var instrueret i at gå boksen rundt langs kanten ca. 0,5 m fra væg, samt at krydse boksen i hver diagonal. Sokkeprøven blev mærket og lagt i fryser. Besætningsejer blev ringet op dagen før, de skulle starte med at tage prøver. Derudover fik de dagligt en SMS som påmindelse i de to uger, hvor de skulle tage prøver.

Ved besøget i august udtog vi gødningsprøver fra rectum på de køer og kvier, der havde kælvnet i de to uger op til besøget, og som vi havde taget blodprøve af ved første besøg. Desuden tog vi gødningsprøver af kalve født af køer, som vi tog prøver af.

Vi udtog miljøprøver fra kælvningsboksen samt fra nogle af de bokse, hvor kalven, der fik taget en prøve, var opstaldet. I kælvningsboksen lavede vi en sokkeprøve efter samme metode, som besætningsejeren. Derudover udtog vi svaberprøver af henholdsvis væg og vandkar. Svaberprøverne blev udført med et stykke tube-gaze på ca. 7,5x7,5 cm, der blev fugtet med sterilt vand. Bagvæggen af kælvningsboksen blev svabret i hele dens længde i en højde på ca. 120 cm. Prøvefeltet svarede til gazens størrelse. Til vandkarrene blev der ligeledes brugt tubegaze fugtet med sterilt vand. Her blev vandrette flader afsvabret samt indvendige lodrette flader.

Såvel miljøprøver og gødningsprøver blev efter udtagelse lagt i køleboks med frostelementer. Prøverne blev sammen med de frosne sokkeprøver transporteret til laboratoriet samme dag, som de blev udtaget.

Derudover lavede vi hygiejnevurdering af kælvningsboksen som beskrevet ved første besøg.

Tredje besøg fandt sted i uge 47 i november 2020. Her blev der udtaget blodprøver af alle køer, hvor der forelå både en blodprøve fra første besøg og en gødningsprøve ved andet besøg. Desuden blev der taget blodprøver af kalve, hvor moren også blev blodprøvet. Blodprøverne blev efterfølgende centrifugeret, og serum afpipetteret og frosset ned. Efterfølgende blev alle relevante blodprøver sendt til analyse på laboratoriet og resultaterne indberettet til kvægdatabase

Resultater:

Nedenstående tabel viser resultaterne af PCR-testene.

	A	B	C	D	E	F	G	H
Årskøer	770	400	770	625	860	300	275	815
Antal kælvnin-ger i prø-veperiode	36	18	30	30	78	18	13	30
Gns. hygi-ejnevurde-ring kælvn-ingsboks	2,22 SD: 0,86	1,7 SD: 0,99	1,17 SD: 1,00	1,48 SD: 1,57	1,89 SD: 1,08	2,25 SD: 0,90	0,5 SD: 0,51	1,72 SD: 0,78
PCR – køer	20 Ingen posi-tive	14 Ingen posi-tive	26 Ingen posi-tive	25 Ingen posi-tive	21 Ingen posi-tive	14 Ingen posi-tive	9 Ingen posi-tive	18 Ingen posi-tive
PCR – kalve	16 Ingen posi-tive	13 Ingen posi-tive	22 Ingen posi-tive	26 Ingen posi-tive	22 Ingen posi-tive	16 Ingen posi-tive	5 Ingen posi-tive	18 Ingen posi-tive
Frosne sokkeprø-ver	15 udtaget 3 positive Salmonella spp.	22 udtaget 5 positive Salmonella spp.	28 udtaget 5 positive Salmonella Spp.	52 udtaget 7 positive Salmonella spp.	14 udtaget Ingen posi-tive	35 udtaget Ingen posi-tive	13 udtaget Ingen posi-tive	28 udtaget 2 positive for Salmo-nella dublin
Miljøprø-ver kælvn-ingsboks	9 udtaget 4 positive Salmonella spp.	3 udtaget 3 positive Salmonella spp.	6 udtaget Ingen posi-tive	8 udtaget Ingen posi-tive	3 udtaget ingen posi-tive	11 udtaget Ingen posi-tive	3 udtaget Ingen posi-tive	6 udtaget Én positiv for Salmo-nella dub-lin*
Miljøprø-ver kalve-opstald-ning	7 udtaget 3 positive Salmonella spp.	6 udtaget 6 positive Salmonella spp.	9 udtaget Ingen posi-tive	8 udtaget Ingen posi-tive	8 udtaget Ingen posi-tive	4 udtaget Ingen posi-tive	5 udtaget Ingen posi-tive.	8 udtaget Ingen posi-tive
Bemærk-ninger	Der er kun taget sok-keprøver fra en af kælvnings-boksene pga. misfor-ståelse.	Den ene kælvnings-boks ikke testet på besøgsda-gen. Der gik slagte-kalve i den.		Der er taget prøver i de kælvnings-bokse, hvor der var dyr. 4 dage glemt at tage sokke-prøve.		Sokkeprø-ver glemt at blive udta-get.	En sokke-prøve glemt at blive ud-taget en dag.	* Udtaget i nykælver-boks
Konklu-sion	Salmonella spp. påvist i	Salmonella spp. påvist i begge	Salmonella spp påvist i begge	Salmonella spp. påvist i	Salmonella ikke påvist.	Salmonella ikke påvist.	Salmonella ikke påvist.	Salmonella dublin på-vist i

	alle 3 kælvningsbokse.	kælvningsbokse og i kalvemiljøet.	kælvningsbokse.	flere kælvningsbokse.				kælvningsområdet.
--	------------------------	-----------------------------------	-----------------	-----------------------	--	--	--	-------------------

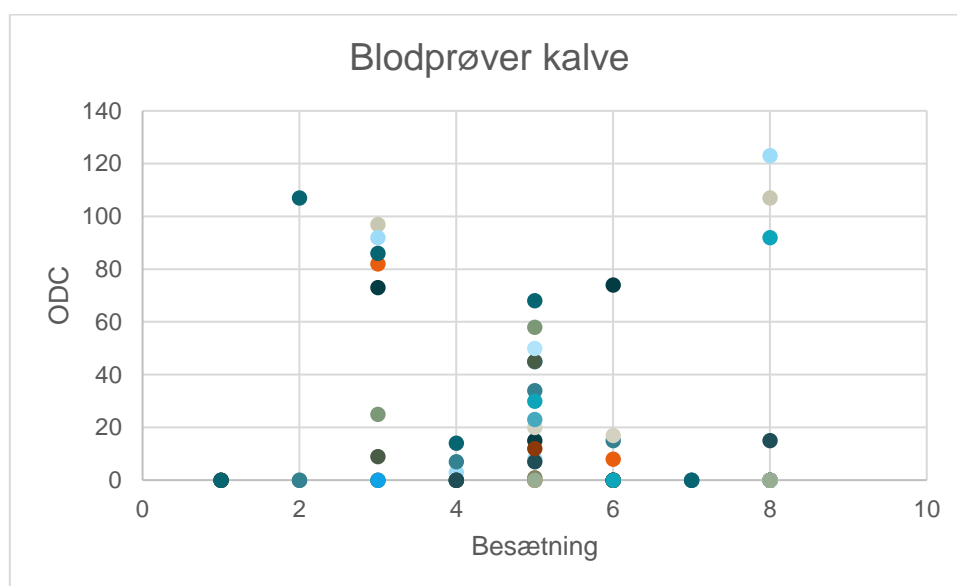
Der er lavet i alt 604 PCR-test. De 285 er lavet på gødningsprøver fra individ-dyr, der fordelte sig med 147 køer og 138 kalve 0-14 dage gamle. Der fandtes ikke Salmonella i disse prøver.

Der er udført PCR-test på i alt 319 prøver fra miljøet. De 207 af prøverne er sokkeprøver udtaget af besætningsejeren og nedfrosset indtil analysen. De øvrige 112 prøver er udtaget og afleveret til laboratoriet samme dag.

Der var ingen af individprøverne, hvor der kunne påvises Salmonella.

I 3 besætningerne fandt vi ingen Salmonella i miljøprøverne. I en besætning kunne der påvises Salmonella Dublin i to af de frosne sokkeprøver samt i en prøve fra nykælverboksen udtaget på besøgsdagen. I 4 besætninger blev der påvist Salmonella spp. i miljøprøverne. I besætninger, hvor der blev påvist Salmonella, så er det påvist på min. 3 forskellige datoer.

Nedenfor er vist resultaterne for blodprøver af kalvene. I tre af besætningerne er der lave antistofværdier (under 20 ODC) hos de prøvede kalve. Der er ikke umiddelbart tegn på smitte til dem. I de øvrige 5 besætninger er resultatet mere blandet. Dog er de kendetegnet ved mindst en kalv med antistofværdi over 50. I de 5 besætninger formodes der at være smitte til kalvene.



I besætning A blev der fundet Salmonella spp. ved PCR både i kælvningsmiljøet samt i flere af kalvehytterne. I besætning D blev der fundet Salmonella spp. i kælvningsmiljøet. Kalvene i besætning D havde alle antistofværdier under 25 ODC%.

Modsat kunne vi ikke påvise Salmonella i besætning E og F hverken i kælvningsmiljøet eller i miljøet ved småkalvene. Her har flere kalve antistofreaktioner over 25 ODC%.

Blodprøver af køerne viser et mere komplekst billede. I en del besætninger er tendensen, at køerne falder i værdi mellem de to prøver (besætning A, B, C, D og G). I andre besætninger sker der en stigning hos især de unge køer (F og H). Dog skal det bemærkes, at det er et relativt lille udsnit af køerne, der er testet. I besætning F blev der ikke påvist Salmonella ved PCR. Derimod var der Salmonella Dublin i miljøet i besætning H. Der er dog 4 måneder mellem de to blodprøver, så stigningen i antistofværdi kan ikke med sikkerhed knyttes til smitte i kælvningsmiljøet.

I alle besætninger undtagen besætning G, så var der mindst en score 3 i et af felterne ved hygiejnevurdering af kælvningsboks. Det er dog ikke muligt på baggrund af denne undersøgelse at koble hygiejnescore til fund eller ej af Salmonella ved PCR af miljøet. Ligeledes er der ikke en sammenhæng mellem hygiejnescore og risikoen for at kalvene ligger over 25 ODC ved blodprøver.

Konklusion:

PCR er prøvet af i 8 besætninger for at vurdere, om det kan bruges som et værktøj i saneringen af Salmonella Dublin.

Ud fra de erfaringer som vi har gjort os her i projektet, så er det svært at anbefale generel brug af individprøver. Ingen af de 146 prøver taget af køer, var positive. Det på trods af at flere køer har haft enten gentagne høje værdier eller stigende antistofværdier på over 80 ODC. Gødningsprøverne er udtaget 0-14 dage efter kælvning, hvor det er kendt, at køerne er immunsupprimeret og risikoen for smitteudskilles formodes at være højere.

Havde vi valgt at teste flere køer eller gentage testen, så vil sandsynligheden for at finde positive dyr sandsynligvis stige. Men ud fra en praktisk og økonomisk vinkel, så vil flere tests dels være mere besværligt og være dyrt og knapt så anvendeligt som et værktøj i besætningerne.

I fem besætninger fandt vi Salmonella spp. i miljøet. Kun i den ene besætning var der positive miljøprøver for Salmonella Dublin. Det vil sige i halvdelen af besætningerne blev der fundet Salmonella; som ikke kunne identificeres som Dublin. Der kan forekomme flere serotyper i en besætning, men det kan heller ikke afvises, om nogle af besætningerne har antistofreaktioner i dyrene, som følge af andre Salmonella subtyper der krydsreagerer til serogruppe D testen, der bruges i overvågningen. I besætning C er der f.eks. tidligere i forbindelse med intensiveret prøveudtagning, identificeret serotypen Monofasiske Salmonella Typhimurium-lignende 4,5,12:i som kan krydsreagere med serogruppe D testen. Til gengæld er der i miljøet fra besætning A tidligere fundet Salmonella Dublin, men i projektet Salmonella spp. Og i besætning B er der ved opfølgende miljøprøver i efteråret 2020 fundet Salmonella Havana. Besætningen har en meget karakteristisk Salmonella Dublin antistofprofil, det kunne tyde på et lejlighedsfund i miljøet, men at antistofreaktionerne i dyrene er forårsaget af Salmonella Dublin. Hypotese kan ikke underbygges yderligere, da der ikke er fundet positive dyrkningsprøver fra individdyr, som kunne subtypes og sammenlignes med antistofprofilerne. De fleste Salmonella spp. reaktioner er desuden i det høje område for testens cut-off værdi. Ct-værdier fra 33 til 39 kan være tvivlsomme. Resultater i det område skal derfor tolkes med forsigtighed.

Der ligger en væsentlig kommunikativ opgave i at formidle, at et negativt PCR-svar ikke nødvendigvis er ensbetydende med, at bakterien ikke er til stede. Til gengæld kan positive fund bruges til at motivere til ændringer af procedurer i besætningen. Helt konkret så vi i en besætning, hvor der blev fundet Salmonella i et vandkar, at det efterfølgende gjorde, at besætningsejer ændrede på rutinerne omkring rengøring af vandkar.

PCR-testen kan under ingen omstændigheder stå alene. Den skal kobles med serologi, hvis formålet er at udpege køer, der persisterende smitteudskillere. Testen giver kun et øjebliksbillede, og der er bestemt ingen garanti for, at alle smitteudskillere opspores. Derfor er forventningsafstemning med besætningsejer vigtig forud for testens anvendelse. Dels i forhold til ressourceforbrug men også hvad der kan forventes af resultat.

Brug af PCR til at afdække smitte i miljøet er ligeledes ikke uden faldgruber. I vores feltafprøvning, så vi at miljøet ikke nødvendigvis testede positivt konstant over en periode på 15 dage. For at øge sandsynligheden for at finde positive resultater, så kræver det gentagne tests. Skal det være realistisk i besætningen, så vil det ofte være besætningsejeren, der skal udføre dem. Her skal bemærkes, at halvdelen af de deltagende besætninger ikke fik taget alle de aftalte "sokkeprøver". Det er endda på trods af grundig instruktion og daglige påmindelser.

En risikovurdering af procedurer og hygiejne i besætningen er altafgørende for at sætte ind med de rigtige tiltag. PCR-undersøgelser af miljøprøver kan støtte den vurdering og muligvis motivere til ændringer; men prøverne kan ikke stå alene.