

Longitudinelt observationsstudie af køers *Mycoplasma bovis* antistofniveauer i fire kliniske grupper i fire danske udbrudsbesætninger ved hjælp af ELISA på parrede serum- og mælkeprøver i relation til starttidspunkt for klinisk sygdom

Veterinært kandidatspeciale

Dinah Lerdahl Holm, RXH884
Jeanette Pedersen, KXG520

Institut for Produktionsdyr og Heste

Hovedvejleder: Liza Rosenbaum Nielsen, Professor
Medvejleder: Mette Bisgaard Petersen, Ph.d.stud.
Afleveret: 16. Januar 2017

Institutnavn: Institut for Produktionsdyr og Heste

Fakultet: Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet; Københavns Universitet

Forfatter: Dinah Lerdahl Holm, RXH884
Jeanette Pedersen, KXG520

Projekttype: Veterinært Kandidatspeciale; 30 ETCS point

Titel: Longitudinelt observationsstudie af køers *Mycoplasma bovis* antistofniveauer i fire kliniske grupper i fire danske udbrudsbesætninger ved hjælp af ELISA på parrede serum- og mælkeprøver i relation til starttidspunkt for klinisk sygdom

Title: Longitudinal observational study of *Mycoplasma bovis* antibody levels in cows in four clinical groups in four Danish outbreak herds by ELISA on paired serum and milk samples in relation to onset of clinical disease

Hovedvejleder Liza Rosenbaum Nielsen, Professor, Institut for Produktionsdyr og Heste. Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet; Københavns Universitet

Medvejleder Mette Bisgaard Petersen, Ph.d. stud., Institut for Produktionsdyr og Heste. Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet; Københavns Universitet

Afleveret 16. Januar 2017

Forsidebilleder: Køer fra udbrudsbesætninger; fotograf: Ulla Torpe
Manuel BIO-X K302 ELISA; fotograf: Jeanette Pedersen
Grafer fra studiet

Abstract

Mycoplasma bovis outbreaks in dairy herds compromises animal welfare by causing different clinical diseases in cows, amongst others arthritis and mastitis. Early diagnosis of *Mycoplasma bovis* is essential in order to prevent the spread of infection. Antibody Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) have been proposed on both blood serum and on milk as an option for quick, sensitive and specific diagnostics.

This study is based on 120 individual cows from four different herds with a confirmed outbreak of *Mycoplasma bovis*. From these cows, blood and milk samples paired with specific clinical data, were repeatedly collected. The samples were tested with a commercial antibody ELISA. Milk samples were also tested with a commercial PCR.

The objective of this study was to determine temporal antibody levels around the onset of clinical disease and to clarify any differences in levels between different clinical groups. Four groups were created: “*Mycoplasma bovis* mastitis”; “*Mycoplasma bovis* systemic” (cows with arthritis); “No *Mycoplasma bovis* clinic” and “Possibly *Mycoplasma bovis* clinic”.

A Linear Mixed Model was created for serum and milk, respectively, predicting antibody levels around onset of clinical disease on a group level. The model adjusted for the hierarchical nature of the data and possible interactions between explanatory variables.

The models predicted different antibody levels in serum and in milk, especially for “*Mycoplasma bovis* systemic”. This could be interpreted as different antibody responses in cows to *Mycoplasma bovis* in blood and in milk, respectively.

The groups “No *Mycoplasma bovis* clinic” and “Possibly *Mycoplasma bovis* clinic” were never significantly different and had continuous low antibody levels. A slight increase in antibody levels early in a herd outbreak could indicate a small antibody response.

The serum model predicted antibody levels for the groups with *Mycoplasma bovis* arthritis or mastitis, which were higher and significantly different from the other groups around the onset of disease. The milk model only predicted high antibody levels for “*Mycoplasma bovis* mastitis” for a short period of time. This indicated a possible use for antibody ELISA in herd diagnostics, when testing serum, but not milk, from groups of cows with *Mycoplasma bovis* mastitis or arthritis.

The results showed large variation in antibody levels in serum between individual cows in the same group, especially cows with *Mycoplasma bovis* arthritis. This could be interpreted as different antibody responses to *Mycoplasma bovis* between cows. Due to this variation the use of serum ELISA-testing on individual cows cannot be recommended.

Key words

Mycoplasma bovis, Mycoplasma, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA, antibody, arthritis, mastitis, clinical signs, temporal

Resumé

Mycoplasma bovis udbrud i malkekvægsbesætninger kompromitterer dyrevelfærd ved at forårsage forskellig klinisk sygdom, blandt andet arthritis og mastitis. Tidlig diagnose af *Mycoplasma bovis* er essentiel for begrænsning af smittespredning. Antibody Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) er blevet foreslået som en test med hurtige, sensitive og specifikke resultater både ved test af serum og mælk.

Dette studie var baseret på 120 individuelle køer fra fire forskellige malkekvægsbesætninger med bekræftet udbrud af *Mycoplasma bovis*. For disse køer blev der lavet gentagende kliniske registreringer som blev parret med blod- og mælkeprøver. Prøverne blev testet med en kommerciel ELISA. Mælkeprøverne blev desuden testet med en kommerciel PCR

Målet i studiet var at bestemme temporale antistofniveauer omkring start af kliniske tegn og at klarlægge eventuelle forskelle mellem kliniske grupper. Der blev lavet fire grupper: "Mastitis grundet *Mycoplasma bovis*"; "Systemisk klinik grundet *Mycoplasma bovis*" (køer med arthritis); "Ingen klinik grundet *Mycoplasma bovis*" og "Klinik muligvis grundet *Mycoplasma bovis*".

Der blev udviklet en Linear Mixed Model til prædiktion af antistofniveauer omkring start af kliniske tegn på gruppeniveau for serum og mælk, respektivt. Modellen tog højde for hierarkisk struktur af data og mulige interaktioner mellem forklarende variable.

Modellerne prædikterede forskellige antistofniveauer i serum og mælk, især for "Systemisk klinik grundet *Mycoplasma bovis*". Dette kunne tolkes som forskelligt antistofrespons på *Mycoplasma bovis* i serum og mælk hos køer.

Grupperne "Ingen klinik grundet *Mycoplasma bovis*" og "Klinik muligvis grundet *Mycoplasma bovis*" var aldrig signifikant forskellige og havde kontinuert lave antistofniveauer. En svag stigning i antistofniveauer tidligt i et besætningsudbrud kunne indikere et lille antistofrespons i grupperne.

Modellen for serum prædikterede antistofniveauer for grupperne med *Mycoplasma bovis* arthritis og mastitis, som omkring start af kliniske tegn lå højere og var signifikant forskellige fra de andre gruppers antistofniveauer. Modellen for mælk prædikterede kun høje antistofniveauer for "Mastitis grundet *Mycoplasma bovis*" i en kort periode. Dette indikerede at ELISA på serum, men ikke mælk, kunne bruges til besætningsdiagnostik ved test af grupper af køer med *Mycoplasma bovis* arthritis eller mastitis.

Resultaterne viste store variationer i antistofniveauer i serum mellem individuelle køer i den samme gruppe, især køer med *Mycoplasma bovis* arthritis. Dette kunne tolkes som forskelligt antistofrespons på *Mycoplasma bovis* mellem køer. Grundet denne variation kunne serum ELISA-testning af individuelle køer ikke anbefales.

Indhold

Abstract	1
Resumé	2
Introduktion.....	5
Materialer og metoder	8
Studiets design	8
Kriterier for besætninger.....	8
Udvælgelse af køer til klinisk undersøgelse	10
Prøveudtagelse, -håndtering og testmetoder	10
Samling af klinisk- og laboratoriedata i datasæt	11
Gruppering af køerne til analyse	11
Variabel til beskrivelse af tid	13
Dannelse af model-datasæt for serum og for mælk	13
Statistisk modellering	14
Resultater	16
Rådata brugt i modellering for ELISA på serum.....	16
Resultater for Linear Mixed Model for serum.....	18
Rådata brugt i modellering for mælk	21
Resultater for Linear Mixed Model for ELISA på mælk	23
Diskussion.....	26
Generaliserbarhed og begrænsende faktorer i modelleringen.....	26
Produktionsforhold for køer i studiet.....	26
Antal køer og observationer	27
Variation i stikprøvestørrelsen mellem de kliniske grupper	27
Stor forskel mellem de enkelte køer, men kun lidt mellem besætninger.....	28
Forskel på temporalt antistofniveau i serum og mælk	29
To kliniske grupper fra udbrudsbesætninger havde ikke antistofniveauer forskellige fra niveauer fundet i kontrolbesætninger	30
Forskel på flere kliniske gruppers temporale antistofniveauer i serum.....	31
Usikkerhed om ELISA på mælk kan bruges til diagnostik på besætningsniveau.....	32
Temporalt antistofniveau varierer meget mellem køer i samme kliniske gruppe	33
Andre tendenser observeret i forbindelse med studiet.....	34
Køer med <i>Mycoplasma bovis</i> mastitis eller arthritis kan opdeles ud fra PCR.....	34
Konklusion	35

Litteraturliste.....	37
Referencer	37
Dataudtræk fra Kvægdatabasen.....	40
R software.....	40
Appendix.....	42
Appendix I: Klinisk protokol udarbejdet i forbindelse med dette studie:	42
Appendix II: PCR resultater for de oprindeligt tiltænkte analysegrupper.....	45
Appendix III: Tildeling af " <i>Falsk Dag 0</i> "	46
Appendix IV: ELISA-resultater på serum med BIO-X K302 i kontrolbesætninger fra "Intern rapport om Mycoplasma-antistofresultater i pilotprojekt 2012" af Liza Rosenbaum Nielsen	47

Introduktion

Mycoplasma bovis blev første gang isoleret i USA i 1961 (Hale et al., 1962). Siden er infektion med *Mycoplasma bovis* rapporteret i store dele af verden blandt andet i Canada, Australien og langt de fleste europæiske lande (Caswell og Archambault, 2007; Ghadersohi et. al., 1999). *Mycoplasma bovis* blev isoleret første gang i Danmark i 1981 (Friis, 1984) og forekommer nu i Danmark ved lav prævalens på besætningsniveau (Arede et. al., 2016).

Infektion med *Mycoplasma bovis* kan forårsage en række forskellige kliniske tegn hos kvæg. Hos kalve ses oftest otitis media, pneumoni og arthritis. Køerne kan få samme kliniske tegn som kalve og derudover mastitis (Aebi et. al., 2015; Maunsell et. al., 2011; Pfützner og Sachse, 1996) og reproduktionsproblemer. Desuden er *Mycoplasma bovis* rapporteret som årsag til keratokonjunktivitis (Alberti et. al., 2006). Pneumoni er rapporteret som fokal nekrotisk bronchopneumoni ofte lokaliseret cranioventralt (Caswell og Archambault, 2007). Ofte er kliniske symptomer på pneumoni milde og sygdommen opdages først, når den er for fremskreden til at behandle (Nicholas, 2011). I forbindelse med arthritis er beskrevet svær halthed og hævelse af led (Nicholas og Ayling, 2003). Som oftest ses arthritis i carpal- og tarsalleddene; polyarthritis kan forekomme (Pfützner og Sachse, 1996). Mastitis fra eksperimentel intramammær inokulation af *Mycoplasma bovis* blev beskrevet med vandig mælk, senere sero-purulent sekretioner, samt involvering af alle kirtler og et markant fald med efterfølgende ophør af mælkeproduktionen (Bennet og Jasper, 1978a). Mastitis i naturligt forekommende udbrud var rapporteret som fast hævelse af en eller flere kirtler, samt gråligt eller gulligt cremet mælkesekret, samt pludselig voldsomt fald i mælkeproduktion (Feenstra et. al., 1991). Reproduktionsproblemer manifesteres eksempelvis som irregulær brunstcyklus, kronisk suppurativ salpingitis, kronisk endometritis og ovarie-adhæsioner eventuelt med infertilitet til følge (Hartman et al., 1964; Hirth et al., 1966). Smerte som følge af de kliniske sygdomsmanifestationer giver nedsat velfærd hos dyrene. Foruden smerte ses nedsat mælkeproduktion og øget celletal (Nicholas et al., 2006).

Mycoplasma bovis har ingen cellevæg og derved virker antibiotika med virkningsmekanisme på bakteriens cellevæg ikke, dette gælder eksempelvis penicilliner. Samtidig er vist resistens mod en række andre typer af antibiotika in vitro blandt andet tetracyklin, spectinomycin og clindamycin (Francoz et. al., 2005). Blandt rapporterede årsager til resistens er den hyppigst nævnte punktmutationer (Lysnyansky og Ayling, 2016). Årsager til ringe effekt af antibiotika in vivo kan skyldes at *Mycoplasma bovis* kan undvige værtens immunsystem blandt andet ved intracellulær

overlevelse (Bürki et. al., 2015). De begrænsede behandlingsmuligheder gør forebyggelse af smittespredning til et vigtigt fokusområde.

Mycoplasma bovis er meget smitsom. Udskillelse i mælk med koncentrationer større end den infektive dosis, der går helt ned til 70 colony forming units (CFU), kan forekomme inden køerne viser kliniske tegn på mastitis (Bennet og Jasper, 1978a). Der er fundet højere risiko for smitte med *Mycoplasma bovis* med klinisk mastitis til følge i staldafsnit med andre smittede dyr (Punyapornwithaya et. al., 2010). Dette understreger behovet for tidlig og sikker diagnose med henblik på især smitteforebyggelse både internt i besætningen og eksternt.

Der findes flere muligheder for diagnosticering af *Mycoplasma bovis*. Traditionelt set har man brugt dyrkning af *Mycoplasma bovis*, men der i stigende grad kommet fokus på diagnosticering med Polymerase Chain Reaction (PCR) og Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Der findes kommercielle kits til både PCR og ELISA på markedet til diagnosticering af *Mycoplasma bovis* eller antistoffer mod denne.

Dyrkning kan laves på eksempelvis mælk, næsesvab, øjensvab eller ledvæske og vil tage minimum tre og ofte mere end ti dage inden endelig diagnose foreligger. Problemer med dyrkning er især kontamination af bouillon og plader samt overvækst med andre hurtigere voksende bakterier end *Mycoplasma bovis* (Nicholas og Baker, 1998). Blandt andet bronopol tilføjet mælkeprøver kan nedsætte mængde af levedygtige *Mycoplasma bovis* bakterier og dermed nedsætte dyrkningens sensitivitet (Pinnow et. al., 2001). Denne begrænsning har PCR ikke.

Der ses en høj grad af overensstemmelse mellem dikotomiserede resultater fra dyrkning og real time PCR (rt-PCR) ved specifikke cutoffs på mælkeprøver fra enkelt dyr (Cai et. al., 2005; Sachse et. al., 2010). PCR giver et langt hurtigere resultat end dyrkning (Cai et. al., 2005).

Intermitterende udskillelse af *Mycoplasma bovis* kan give udfordringer i diagnosticering, da dyrkning og PCR kræver tilstedeværelse af bakterien i prøvematerialet (Maunsell et. al., 2011). ELISA rettet mod detektion af antistoffer er en måde at omgå dette problem. Ved undersøgelser på køer i *Mycoplasma bovis* inficerede besætninger er vist god overensstemmelse mellem PCR resultater på mælk og ELISA resultater på serum, hvor prøverne var udtaget samme dag (Ghadersohi et. al., 2005). Det er demonstreret at ELISA kan påvise antistoffer i individuelle mælkeprøver fra køer med mastitis ni uger efter udbrud med *Mycoplasma bovis* i en besætning (Byrne et. al., 2000).

Der er os bekendt ikke studier på, hvordan ELISA-niveauer ligger temporalt omkring sygdomsudbrud med *Mycoplasma bovis*. Viden på dette område er nødvendigt for at kunne fastsætte, hvornår antistof ELISA kan anvendes til at diagnosticere sygdomsudbrud.

Der er arbejdet med ELISA og PCR på tankmælk med henblik på screening for *Mycoplasma bovis* udbrud på besætningsniveau (Nielsen et. al., 2015). Der er mistanke om, at forskellige kliniske dyregrupper vil have forskelligt antistofrespons i mælk på *Mycoplasma bovis*; eksempelvis er der usikkerhed på om køer med arthritis som følge af *Mycoplasma bovis* vil udskille antistoffer i mælk og derved kunne detekteres i tankmælken (Petersen et. al., 2016).

Der er behov for studier af antistofniveauer bestemt med ELISA i forskellige kliniske grupper af køer, for at klarlægge eventuelle forskelle, som kunne have betydning for den diagnostiske tilgangsvinkel.

Formålet med dette studie er at bidrage til viden om temporale forløb af *Mycoplasma bovis* antistofniveauer hos køer i forskellige kliniske grupper i udbrudsbesætninger.

Dette er med henblik på at få mere viden om mulighederne for optimering og forbedring af brugen af diagnostik af *Mycoplasma bovis*. Ved udbrud af *Mycoplasma bovis* vil det være vigtigt med hurtig igangsættelse af smitteforebyggende initiativer, internt og eksternt. Dermed håber vi at bidrage til at opnå bedre dyrevelfærd for køerne og nedsatte økonomiske og arbejdsmæssige omkostninger for landmanden, især i relation til forebyggelse og bekæmpelse af *Mycoplasma bovis*.

Målet i dette studie er at bestemme og sammenligne temporale *Mycoplasma bovis* antistofniveauer i forskellige kliniske grupper af køer i fire danske udbrudsbesætninger med udbrud af *Mycoplasma bovis* ved hjælp af ELISA målinger på parrede serum- og mælkeprøver i relation til starttidspunkt for klinisk sygdom.

Materialer og metoder

Studiets design

Studiet var et longitudinelt observationelt studie foretaget i fire danske malkekvægsbesætninger med udbrud af *Mycoplasma bovis*. I hver besætning blev der lavet gentagne kliniske registreringer, samt udtaget blod- og mælkeprøver på 20 udvalgte køer. Hver besætning blev besøgt fem gange med cirka tre ugers mellemrum. Ved besøgene blev der desuden lavet kliniske registreringer og udtaget blodprøver på 20 udvalgte kalve, men kun data fra køerne er brugt i vores studie.

Studiet er et samarbejde mellem Københavns Universitet, Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet (KU-SUND) og SEGES kvæg. Der var to projektdyrlæger, som udarbejdede den kliniske protokol. Data til studiet blev indsamlet af tre dyrlæger, heraf de to projektdyrlæger, minimum en af projektdyrlægerne deltog ved hvert besøg. Dataindsamling forløb i perioden fra 1/7 2015 til og med 5/4 2016.

Kriterier for besætninger

Besætningerne blev fundet ved skriftligt at kontakte udvalgte praktiserende dyrlæger i Danmark, om interessen i malkekvægsbesætninger med udbrud af *Mycoplasma bovis*. Kravene er listet i **Tabel 1**. Der var kontakt til fire andre mulige besætninger, som ikke opfyldte kriterierne for at være med i forsøget.

Krav til udbrudsbesætninger	
Placering	I Danmark
Klinik	Kliniske tegn på <i>Mycoplasma bovis</i> hos minimum 10 køer og/eller kalve
ELISA	Minimum 10 dyr med prøveresultater > 50 OCD% målt med BIO-X K 302
PCR	Positive PCR resultater er ikke et krav

Tabel 1: Tabellen oplister krav til udbrudsbesætninger i forhold til geografisk placering, kliniske tegn hos dyrene og laboratorieresultater på udtagne prøver

I de fire besætninger der blev inkluderet havde egen dyrlæge stillet diagnosen inden de henvendte sig til en projektdyrlæge. I besætning 2, 3 og 4 havde egen dyrlæge taget prøver af syge køer i besætningen og fundet ELISA OCD% over det fastsatte kriterie. I besætning 1 blev alle køer testet

med PCR, og over 50 % er blevet fundet positive for *Mycoplasma bovis*. En opsummering af udbrudsbesætningerne findes i **Tabel 2**.

Opsummering af udbrudsbesætninger				
Besætning	1	2	3	4
Dato for udtræk af besætningsdata	1/7 2015 (3. kvartal 2015)	20/7 2015 (3. kvartal 2015)	8/12 2015 (4. kvartal 2015)	20/1 2016 (1. kvartal 2016)
Antal køer i besætningen*	177	174	182	391
Ydelse pr. ko (kg/kvartal)*^A	2.200	2.302	3.212	2.710
Årlig kg. EKM pr. ko^B	_ ^C	10.564	12.561	11.400
Staldtype	Løsdrift	Løsdrift	Løsdrift med robotter	Løsdrift
Geografisk placering	Midt-/ Nordjylland	Sydjylland	Nordjylland	Midtjylland
Primære kliniske fund	Mastitis, otitis media	Arthritis, mastitis, otitis media	Arthritis	Arthritis, mastitis, otitis media
Start udbrud ifølge landmand	1/6-2015	1/7-2015	30/11 2015	Midt december 2015
Dataindsamlingsperiode	1/7 2015 til 16/9 2015	20/7 2015 til 6/10 2015	8/12 2015 til 23/2 2016	20/1 2016 til 5/4 2016
Antal køer i studiet	29	25	32	34
Antal observationer i besætningen	126	99	135	95

Tabel 2: Tabellen opsummerer generelle oplysninger om de fire udbrudsbesætninger. I hver besætning blev landmanden interviewet ved første besøg, hvor han estimerede startdato for udbruddet og beskrev den typiske klinik set hos køerne.

* Data fra Kvægdata-basen udtrukket (SEGES-KvægIT, 2016) for de angivne datoer i "Dato for udtræk af besætningsdata" for den enkelte besætning.

A: Ydelse pr. ko: Beregnet gennemsnitlig antal kg. mælk pr. ko for det pågældende kvartal. Der er tale om indvejet mælk på mejeriet.

B: Data fra Kvægdata-basen udtrukket (DMS Dyreregistrering/DLBR KvægIT, 2017). Data gælder for en 12 måneders periode før 31/1 2016.

C: Det var ikke muligt at udtrække data om EKM, for denne besætning i samme tidsperiode som for de andre besætninger (DMS Dyreregistrering/DLBR KvægIT, 2017).

Udvælgelse af køer til klinisk undersøgelse

Kliniske tegn på *Mycoplasma bovis* blev defineret som arthritis, mastitis, pneumoni og skæv hovedholdning med otitis media som mulig årsag på baggrund af Aebi et. al. (2015) og Maunsell et. al. (2011). Disse kliniske tegn indgik i en for studiet udarbejdet protokol til registrering af kliniske tegn hos køerne. Følgende fokusområder indgik i den kliniske vurdering: Generel tilstand, hoved, lunger, hjerte, led/lemmer, yver samt "andet" i form af uddybende kommentarer til de kliniske tegn observeret hos dyrene (Appendix I).

Landmanden fik beskrevet de definerede kliniske tegn på *Mycoplasma bovis* og udvalgte herefter ti køer, som han anså for klinisk syge af *Mycoplasma bovis* og ti køer som han anså for at være raske. Hvis en ko udgik af studiet ved udsætning, udvalgte landmanden i samarbejde med en projektdyrlæge en ny ko med samme sygdomsstatus. Landmanden blev opfordret til at udvælge køer, hvor der var kliniske tegn hos deres kalve, samt at undgå goldkøer eller køer som skulle afgoldes i dataindsamlingsperioden. Køerne blev ved hvert besøg klinisk undersøgt og scoret af en af de tre tidligere omtalt dyrlæger. Optimalt set skulle der i hver besætning være 20 køer, som var undersøgt og testet fem gange. Men udsætning gjorde, at dette ikke var muligt. Derfor ses et højere antal køer i studiet end de beregnede 20 køer (**Table 2**). Der var også besætninger, hvor der blev undersøgt mere end 20 køer pr. besøg grundet stor interesse for dette hos landmanden.

Første gang en ko fik konstateret kliniske tegn med *Mycoplasma bovis* som mulig årsag, jævnfør tidligere definition, blev datoen registreret og der henvises til denne dag som *Dag 0* (Appendix I).

Prøveudtagelse, -håndtering og testmetoder

Ved hvert besøg blev fra hver ko udtaget parrede blod- og mælkeprøver. Blod- og mælkeprøverne blev opbevaret så koldt som muligt efter udtagning uden brug af fryser eller køleskab. Blodprøverne blev udtaget i vacutainer serum, plain (Kruuse) og mælkeprøverne i bronopolstabiliserede glas. Prøverne blev indenfor et døgn efter udtagning indleveret til laboratoriet Eurofins (Vejen, Danmark), som udførte alle analyser på serum og mælk. Hvis egen dyrlæge udtog mælkeprøve til PCR fra en ko i studieperioden (fra første til og med femte besøg, i den givne besætning), blev resultatet af denne medtaget i studiet.

Antistofniveauer for *Mycoplasma bovis* i serum og mælk blev målt med den kommercielle ELISA test BIO-X K 302 (Bio- X Diagnostics, Belgium). Mælk blev desuden testet for *Mycoplasma bovis* med PCR test PF0914 (PathoProof Mastitis Major-3 assay, Thermo scientific, Finland).

Samling af klinisk- og laboratoriedata i datasæt

Til databehandling blev der brugt programmet R version 3.3.2 (2016-10-31). Rådata var tilgængeligt i tre forskellige Excelfiler for udbrudsbesætningerne; én for PCR-resultater, én for ELISA-resultater og én med kliniske registreringer. Filerne blev indlæst i R. Laboratoriedata blev parret med klinisk data ud fra CKR_{NR} og datoen for udtagelse af prøver og klinisk undersøgelse. Køerne skulle som minimum have ELISA-resultater for enten serum eller mælk, samt kliniske scorer på hvert besøg. Kliniske scorer behøvede ikke at være komplette, eksempelvis kunne der mangle en score for yverpalpation. Der blev lavet datatjek for fejlindtastninger, afvigende scoreværdier og datoer på rådata, før og efter samling af data.

Gruppering af køerne til analyse

I forbindelse med beskrivelse og videre analyse af data, blev køerne inddelt i kliniske grupper. Inddelingen af køerne er inspireret af Aebi et. al. (2015), der skelner mellem, pneumoni, arthritis og klinisk mastitis hos køer. Der var ikke nok kliniske tilfælde af pneumoni til at lave de samme kliniske inddelinger, derfor er køerne inddelt i følgende grupper beskrevet herunder. Opsummering af kriterier for klinisk gruppering af køerne kan ses i **Figur 1**. Ved tildeling af klinisk gruppering blev manglende registreringer, eksempelvis ingen registrering for led fortolket som at koen ikke havde klinik på led.

“Systemisk klinik grundet *Mycoplasma bovis*” (Systemisk gruppe). Køerne i denne gruppe skulle have observationer med hævelse af ét eller flere led. For hver ko med arthritis vurderedes det om ledhævelserne kunne formodes at skyldes hæmatogen spredning af *Mycoplasma bovis*. Vurdering blev foretaget af en af projektdyrlægerne, samt en studentermedhjælper under supervision, på baggrund af de kliniske scorer fra alle besøg for den enkelte ko samt billedokumentation af læsioner. Hvis der blev observeret involvering af huden nær det afficerede led eller tegn på traumer, kom koen ikke i *Systemisk gruppe*.

“Mastitis grundet *Mycoplasma bovis*” (*Mastitis gruppe*). Køerne i denne gruppe skulle have kliniske tegn foreneligt med mastitis, defineret som blød eller hård hævelse af yvervæv, visuelle forandringer på yveret og/eller mælk med forandringer (Hogan et al., 2016). Køerne i *Mastitis gruppen* skulle som minimum have én positiv PCR prøve i studieperioden. Ud fra producentens anbefalinger blev PCR ≤ 37 cycle threshold value (Ct) betragtet som et positivt resultat (Finnzymes, 2010).

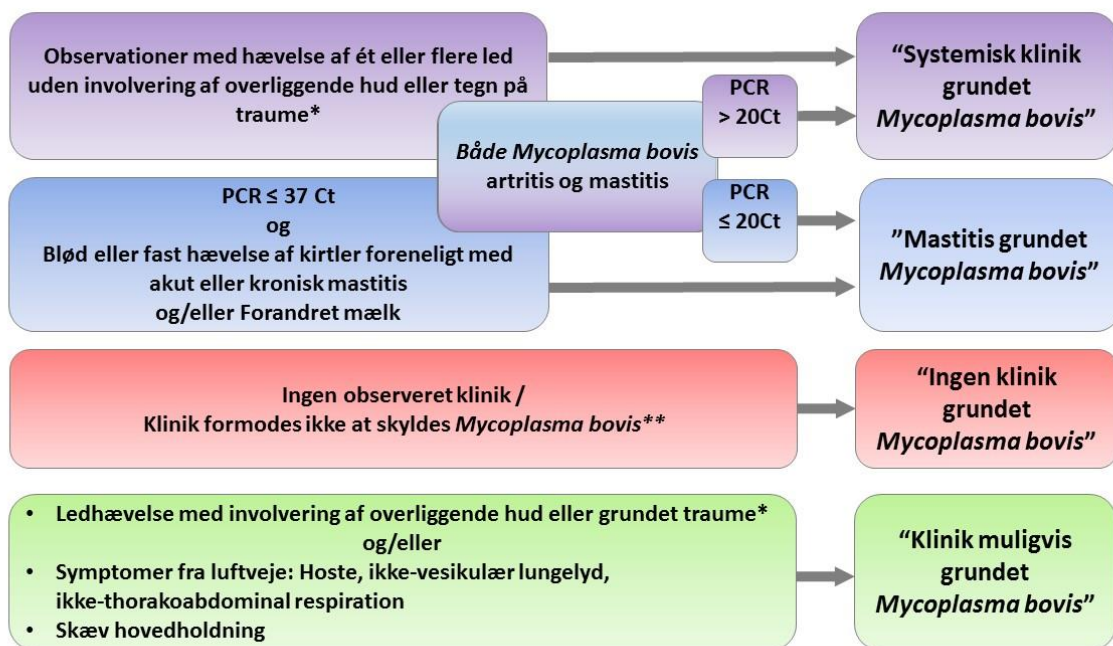
“Ingen klinik grundet *Mycoplasma bovis*” (*Ikke MB gruppe*). Hos køerne i denne gruppe fandtes ingen kliniske tegn eller også kunne de kliniske tegn ikke tilskrives *Mycoplasma bovis* jævnfør vores tidligere kliniske definition.

“Klinik muligvis grundet *Mycoplasma bovis*” (*Muligvis gruppe*). Køerne i denne gruppe havde kliniske tegn som ikke kunne udelukkes at være forårsaget af *Mycoplasma bovis*.

Gruppen indeholdt køer med arthritis som ikke opfyldte kriterierne for at komme i *Systemisk gruppe*. Samt køer med mastitis og konstant negativ PCR i studieperioden for *Mycoplasma bovis*. Gruppen kunne desuden indeholde køer med skæv hovedholdning eller luftvejssymptomer som hoste, ikke-vesikulær lungelyd eller ikke-thorakoabdominalt respirationsmønster.

Otte køer havde kliniske tegn på både *Mycoplasma bovis* arthritis og mastitis. Indledende analyse af PCR resultater viste en generel tendens til at køer i *Mastitis gruppe* havde et lavt PCR-resultat på 20 Ct eller derunder, mens køer i *Systemisk gruppe* generelt lå over 30 Ct (Appendix, II). På baggrund af dette blev de otte køer fordelt således, at køer med et PCR-resultat på eller under 20 Ct blev placeret i *Mastitis gruppe* og køer med et PCR resultat på over 20 Ct blev placeret i *Systemisk gruppe*.

Efter grupperingen blev der lavet tjek af datasættet for fejl i gruppering af køerne.



Figur 1: Opsummering af kriterier for inddeling i kliniske grupper. Køer med kliniske tegn på *Mycoplasma bovis* i både yver og led blev fordelt ud i grupper på baggrund af PCR-resultater.

* Der er vurderet på baggrund af alle kliniske scorere for koen samt billedokumentation af læsioner om ledhævelserne kunne formodes at skyldes hæmatogen spredning af *Mycoplasma bovis*, blandt andet ved at vurdere involvering af huden nær det afficerede led.

** Klinik som ikke kan betegnes som: arthritis, mastitis, pneumoni eller skæv hovedholdning med otitis media som mulig årsag

Variabel til beskrivelse af tid

Tidsdifference i dage fra *Dag 0* til de enkelte prøvedage blev udregnet. Køerne i *Ikke MB gruppen* fik tildelt en falsk *Dag 0*. Tildelingen er baseret på oplysninger på besætningsniveau om fordelingen af *Dag 0* hos køer i studiet som havde denne registrering (Appendix III).

Dannelse af model-datasæt for serum og for mælk

Fra det samlede datasæt indeholdende grupperinger blev der dannet to model-datasæt; ét for mælk med ELISA-resultater på mælk (model-datasæt-mælk) og ét for serum med ELISA-resultater på serum (model-datasæt-serum). Der udgik otte kliniske observationer uden ELISA-resultater for serum fra model-datasæt-serum og 24 observationer uden ELISA-resultater for mælk fra model-datasæt-mælk.

De to model-datasæt blev individuelt reduceret på gruppeniveau således, at der kun blev modelleret for perioder med tilstrækkelig data. Reduceringen fandt sted ved visuel vurdering af et grafisk plot

af samtlige ELISA-resultater i forhold til dage fra *Dag 0*. Kriteriet var, at der indenfor en uge efter tidligste og før sidste observation på gruppe-niveau skulle optræde data fra mindst tre køer. Disse køer skulle have endnu en observation indenfor fire uger fra yderpunkterne.

Model-datasæt-serum indeholdt 94,6% af serum ELISA-resultaterne fra det oprindelige datasæt. Størstedelen af frasorterede data stammer fra *Mastitis gruppe*, hvor 73,3% af oprindelig data er medtaget til modellering. Model-datasæt-mælk indeholdt 93,7% af data fra det oprindelige datasæt. Størstedelen af frasorterede data stammer fra *Mastitis gruppe*, hvor 60,5% af oprindelig data er medtaget til modellering.

Statistisk modellering

De multivariable modeller skulle prædiktere en gennemsnitlig ELISA-værdi på gruppeniveau for henholdsvis serum og mælk i forhold til en given dag fra *Dag 0*.

Outcome i form af ELISA-værdier var ikke normalfordelt. Ved inspektion og analyse af residualplots produceret i R for modellerne med utransformeret outcome fandtes større varians på høje ELISA-værdier i forhold til lave ELISA-værdier (heteroskedasticitet). Normalfordeling blev delvist opnået og heteroskedasticitet minimeret ved en log-transformation af outcome i modelleringen. I rådata for mælk fandtes ét ELISA-resultat med værdien 0. Nul kan ikke logtransformeres, derfor er observationen ekskluderet fra model-datasæt-mælk.

Modellen tager højde for hierarkisk struktur af rådata med et niveau, hvor der kan ses forskel mellem køer, og et niveau, hvor der kan ses forskel mellem besætninger. Dette er gjort ved at tilføje CHR_{NR} (unik ID for den individuelle besætning) og CKR_{NR} (unik ID for den individuelle ko) som 'random effects' i modelleringen.

Vores forklarende variable 'fixed effects' var dage fra *Dag 0* og klinisk gruppe. Der blev set en tendens til parabelforløb for nogle af de kliniske grupper ved plot af rådata. Derfor blev der tilføjet *Dag 0* opløftet i anden ($Dag 0^2$) som variabel for at tillade parabelforløb af de modellerede kurver for grupperne.

Alle to-vejsinteraktioner mellem de forklarende variable blev testet i modellen og blev i modellen, hvis modelfittet blev bedre af at de indgik. Modelfit blev vurderet med Akaike Information Criterion (AIC).

Modellen der blev testet var en Linear Mixed Model (LMM) med random intercept med formlen:

$$\log(y) = \beta_0 + \beta_1 + \beta_2 + \beta_3 + \beta_1 * \beta_3 + \beta_2 * \beta_3 + \mu_{CKRnr.} + \mu_{CHRnr.} + e$$

β_0 = Intercept

β_1 = Dag 0

β_2 = (Dag 0)²

β_3 = Klinisk gruppe

$\mu_{CKRnr.}$ = CKR_{NR}

$\mu_{CHRnr.}$ = CHR_{NR}

e = Residualer ikke beskrevet ved modellen efter, at der var taget højde for “random effects”

Til de prædikterede ELISA-værdier på gruppeniveau blev der tilføjet 95%-konfidensintervaller for gennemsnittet. Disse blev produceret med R-funktionen ‘bootMer’. Bootstrapping er kørt med 10.000 simuleringer for at sikre størst muligt repeterbarhed af placering af konfidensintervallerne.

Modellen og konfidensintervallerne blev produceret med R-pakkerne “Matrix” (Bates og Maechler, 2016), “lme4” (Bates et. al., 2015) samt “lmerTest” (Kuznetsova et. al., 2016).

For hver model blev marginal og konditionel R² beregnet med “r.squaredGLMM” fra R-pakken “MuMIn” (Barton, 2016). Marginal R² beskriver andelen af den totale variation i rådata som forklares af modellens ‘fixed effects’ alene. Konditionel R² beskriver andelen af den totale variation i rådata som forklares af modellens ‘fixed effects’ og ‘random effects’ tilsammen (Nakagawa og Schielzeth, 2013).

Til grafisk plot af modellerne blev tilføjet en horisontal linje, der markerede producentens anbefalede cutoff for BIO-X K302 på 37 ODC%. Værdier herunder betragter producenten som negative (Bio-X Diagnostics, 2011).

Resultater

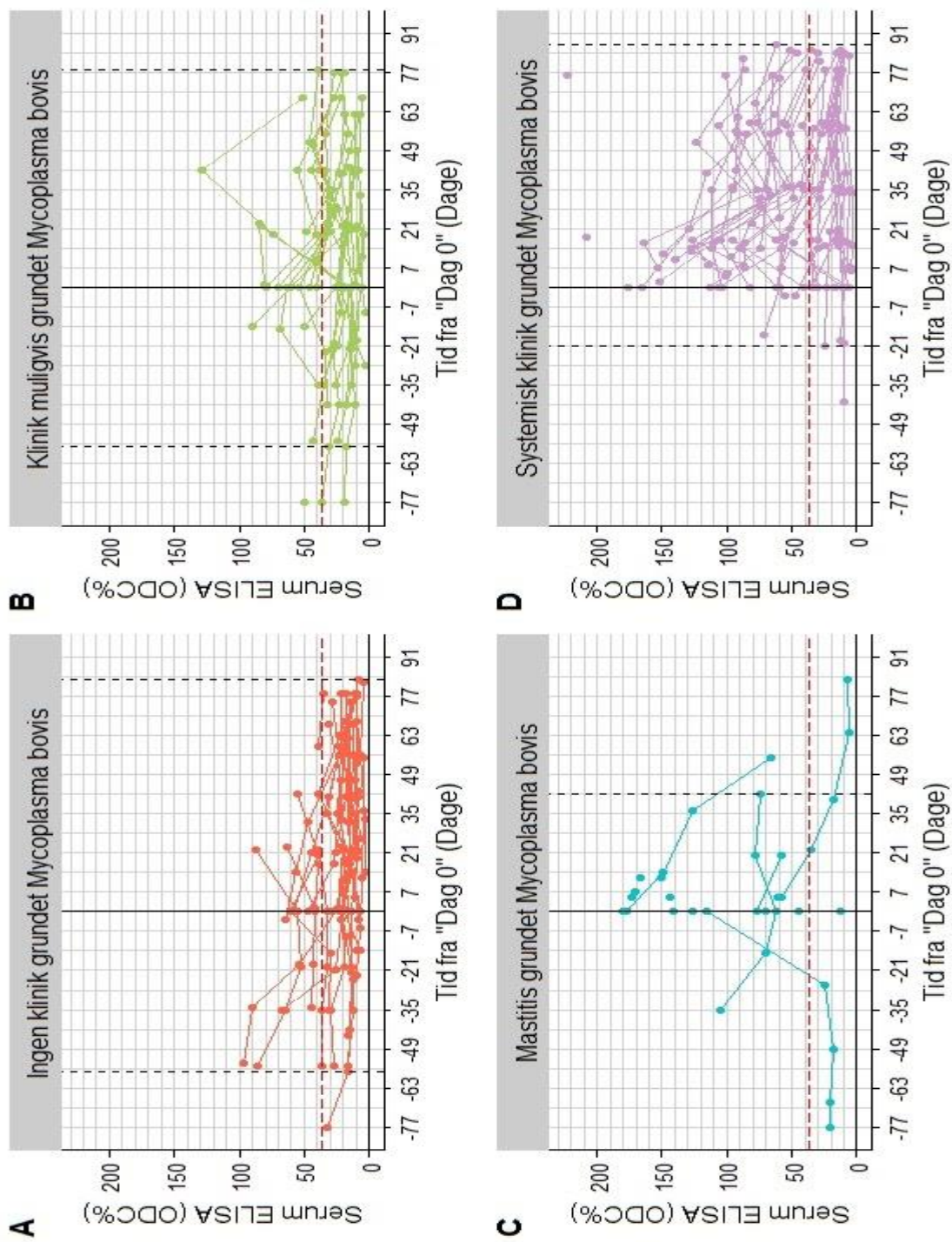
Rådata brugt i modellering for ELISA på serum

Det endelige datasæt bestod samlet af 455 observationer på i alt 120 køer fra fire besætninger, heraf var 433 observationer i model-datasæt-serum. Rådata brugt i modellering for serum er opsummeret på gruppeniveau og besætningsniveau i **Tabel 3**. I **Figur 2** ses et grafisk plot af rådata ELISA-resultater i forhold til *Dag 0*. De vertikale stiplede linjer illustrerer ydre grænser af tidsinterval med tilstrækkeligt data til modellering - punkter udenfor indgår ikke i opgørelsen i **Tabel 3**. For *Systemisk gruppe* fandtes størst spredning på ELISA-resultater. Af data medtaget i modellering lå 55% af resultater i *Systemisk gruppe* over producentens grænseværdi på 37 ODC%. For *Ikke MB gruppe* og *Muligvis gruppe* fandtes ELISA-resultater over 37 ODC%, men størstedelen af resultaterne lå under. For *Muligvis gruppe* lå størstedelen af ELISA-resultater over 37 ODC% centreret omkring -21 til 21 fra *Dag 0*.

Kliniske grupper	Min (ODC%)	1. kvar. (ODC%)	Median (ODC%)	Gns. (ODC%)	3. kvar. (ODC%)	Maks. (ODC%)	Antal Obs.*	Antal Køer	Obs.* pr. Ko
Ingen klinik grundet <i>Mycoplasma bovis</i>	2,86	12,92	19,52	25,17	31,12	96,70	133	31	4,3
Klinik muligvis grundet <i>Mycoplasma bovis</i>	2,93	14,26	23,75	28,76	37,41	129,41	114	29	3,9
Mastitis grundet <i>Mycoplasma bovis</i>	12,80	60,02	97,51	103,08	149,41	180,41	24	17	1,4
Systemisk klinik grundet <i>Mycoplasma bovis</i>	3,14	16,69	48,20	56,31	86,64	223,00	162	43	3,8
Besætning	Min (ODC%)	1. kvar. (ODC%)	Median (ODC%)	Gns. (ODC%)	3. kvar. (ODC%)	Maks. (ODC%)	Antal Obs.*	Antal Køer	Obs.* pr. Ko
Besætning 1	5,39	14,80	24,16	31,39	39,49	96,70	114	29	3,9
Besætning 2	4,03	14,87	24,98	38,39	56,73	151,17	95	25	3,8
Besætning 3	2,86	11,19	25,78	42,93	54,46	223,0	130	32	4,1
Besætning 4	7,24	18,98	39,56	57,62	77,61	180,41	94	34	2,8

Tabel 3 Opgørelse af minimum, maksimum, kvartiler og gennemsnitlige ELISA-resultater i rådata brugt i modellering for serum. Desuden ses antal observationer, køer og besøg pr. ko for kliniske grupper og besætninger

*Observationer



Figur 2 *Mycoplasma bovis* ELISA-resultater målt på serum med Bio-X K302 kit i fire kliniske grupper i forhold til tid målt i dage fra *Dag 0* (første registrering af kliniske tegn). Der er trukket streger mellem resultaterne, for at kunne se forløbet for de enkelte køer. De vertikale stiplede linjer viser afgrænsningen af datasættet, således at model-datasættet er observationer mellem de stiplede linjer. For *Mastitis gruppe* skæres datasættet i *Dag 0*, og derfor ses der kun en stiplede vertikal linje. ELISA-resultater udenfor intervallet indgår ikke i opgørelse i **Tabel 3**. Den røde, horisontale stiplede linje viser producentens grænseværdi på 37 ODC%.

Resultater for Linear Mixed Model for serum

Den endelige LMM til prædiktion af gennemsnitlig ELISA-værdi på gruppeniveau, for serum i dette studie, blev den model præsenteret i afsnit ‘Materialer og metoder’. Modellen til prædiktion af ELISA-værdier målt i serum er vist i **Tabel 4**. Prædikteret ELISA-værdi for en bestemt uge fra *Dag 0* kan udregnes ud fra model-værdier opgivet i **Tabel 4** eller aflæses på dagsniveau i **Figur 3**, som viser prædikterede ELISA-værdier på en ikke-logtransformeret skala. Det fremgår, at variansen for den ‘random effekt’, der tager højde for korrelationen mellem målinger på dyr er meget større end variansen på den ‘random effekt’, der tager højde for korrelationen mellem dyr fra samme besætning, som er lig nul. Modellen for prædikterede ELISA-værdier for serum har en marginal R^2 på 0,22 og en konditionel R^2 på 0,78.

Tabel 4 Resultater fra Linear Mixed Model for serum, som viser marginal R^2 , konditionel R^2 , ‘random effects’ og ‘fixed effect’. Estimatene er for log-transformerede *Mycoplasma bovis* antistof ELISA-værdier målt i serum.

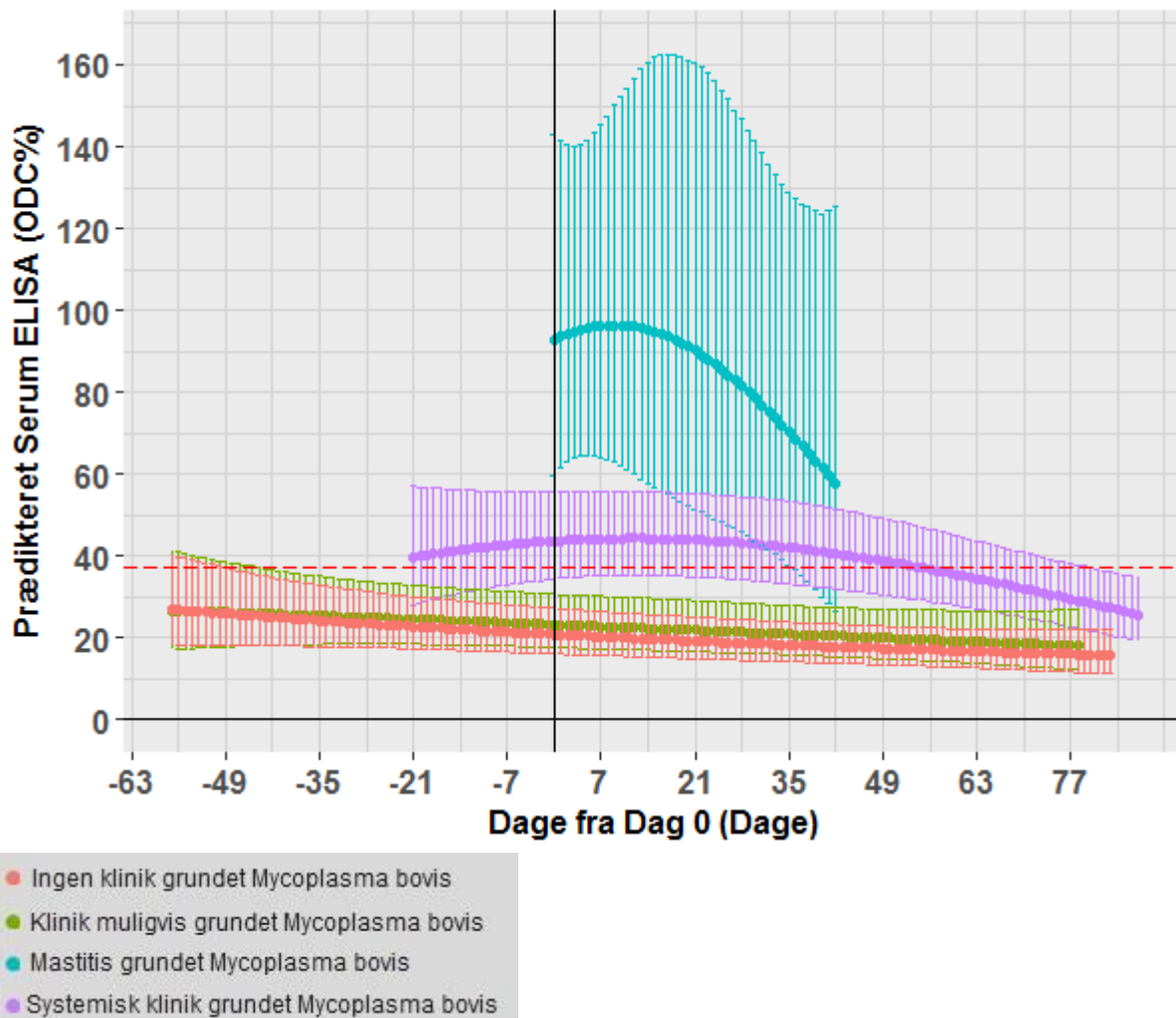
Variabler	Varians	SD	Estimat	SE
Marginal R^2	0,22			
Konditionel R^2	0,78			
Random effects				
CKR _{NR} (Intercept)	0,48	0,69		
CHR _{NR} (Intercept)	0,00	0,00		
Residuals	0,19	0,43		
Fixed effects				
Ingen klinik grundet <i>Mycoplasma bovis</i> (Intercept)			3,0	0,14
Klinik muligvis grundet <i>Mycoplasma bovis</i>			0,11	0,19
Mastitis grundet <i>Mycoplasma bovis</i>			1,5	0,26
Systemisk klinik grundet <i>Mycoplasma bovis</i>			0,74	0,18
Uger fra <i>Dag 0</i>			-0,028	0,012
(Uger fra <i>Dag 0</i>) ²			-0,00040	0,0014
Uger fra <i>Dag 0</i> * Klinik muligvis grundet <i>Mycoplasma bovis</i>			0,0089	0,018
Uger fra <i>Dag 0</i> * Mastitis grundet <i>Mycoplasma bovis</i>			0,088	0,19
Uger fra <i>Dag 0</i> * Systemisk klinik grundet <i>Mycoplasma bovis</i>			0,045	0,030
(Uger fra <i>Dag 0</i>) ² * Klinik muligvis grundet <i>Mycoplasma bovis</i>			-0,00070	0,0022
(Uger fra <i>Dag 0</i>) ² * Mastitis grundet <i>Mycoplasma bovis</i>			-0,023	0,032
(Uger fra <i>Dag 0</i>) ² * Systemisk klinik grundet <i>Mycoplasma bovis</i>			-0,0051	0,0027

Den grafiske præsentation af LMM for serum med prædikterede ELISA-værdier for de kliniske grupper, samt 95%-konfidensintervaller for gennemsnittet af prædikterede serum ELISA-værdier er illustreret i **Figur 3**.

For *Mastitis gruppe* har grafen for de prædikterede ELISA-værdier et konkavt forløb med toppunkt i 96 ODC% på dag 9 efter *Dag 0*. Denne gruppe har de højeste prædikterede ELISA-værdier. De ligger væsentligt over grænseværdien på 37 ODC% i hele kurvens forløb. Den nedre grænse af konfidensintervallet på de prædikterede ELISA-værdier ligger over 37 ODC% i de første fem uger efter første registrering af kliniske tegn hos køerne. Konfidensintervallet er bredt og spænder over et interval på ca. 70-100 ODC%. Det er smallest i den første uge efter *Dag 0*. Der ses intet overlap mellem konfidensintervaller for *Mastitis gruppe* og øvrige grupper i tidsrummet 0 til ca. 15 dage efter *Dag 0*. Herefter er der overlap med konfidensintervallet fra *Systemisk gruppe* frem til 42 dage efter *Dag 0*, hvor værdierne for *Mastitis gruppe* ophører.

Grafen for *Systemisk gruppe* har et svagt konkavt forløb. Prædikterede ELISA-værdier ligger i perioden 0 til 28 dage efter *Dag 0* omkring 43 ODC% i gennemsnit. Konfidensintervallet for prædikterede ELISA-værdier har en bredde på ca. 15 til 30 ODC% og er bredest før *Dag 0*. Den nedre grænse af konfidensintervallet på de prædikterede ELISA-værdier ligger under 37 ODC% i hele kurvens forløb. Fra 0 til 28 dage efter *Dag 0* ligger den nedre grænse af konfidensintervallet på de prædikterede ELISA-værdier over 34 ODC%. Der ses intet overlap mellem konfidensintervaller for *Systemisk gruppe*, *Ikke MB gruppe* og *Muligvis gruppe* i tidsrummet ca. -9 til 62 dage fra *Dag 0*. *Systemisk gruppe* ligger væsentligt over *Ikke MB gruppe* og *Muligvis gruppe* og væsentligt under *Mastitis gruppe*.

Graferne for *Ikke MB gruppe* og *Muligvis gruppe* har et svagt faldende næsten lineært forløb. Der ses minimum 50% overlap af de to gruppers konfidensintervaller for gennemsnittet. Den største difference mellem gruppernes prædikterede ELISA-værdier til et givent tidspunkt er under 5 ODC%. For begge grupper er bredden af konfidensintervallet ca. 10 til 25 ODC%. Fra ca. seks uger før *Dag 0* og fremefter ligger begge gruppers konfidensintervaller under 37 ODC%. Den højeste prædikterede ELISA-værdi er 27 ODC% for begge grupper.



Figur 3 Prædikterede *Mycoplasma bovis* ELISA-værdier målt på serum med Bio-X K302 kit i fire kliniske grupper i forhold til tid målt i dage fra *Dag 0* (første registrering af kliniske tegn). Graferne er afbilledet med 95%-konfidensinterval for middelværdien på prædikteret ELISA-værdi for gruppen. Den horisontale stiplede røde linje markerer producentens grænseværdi på 37 ODC%.

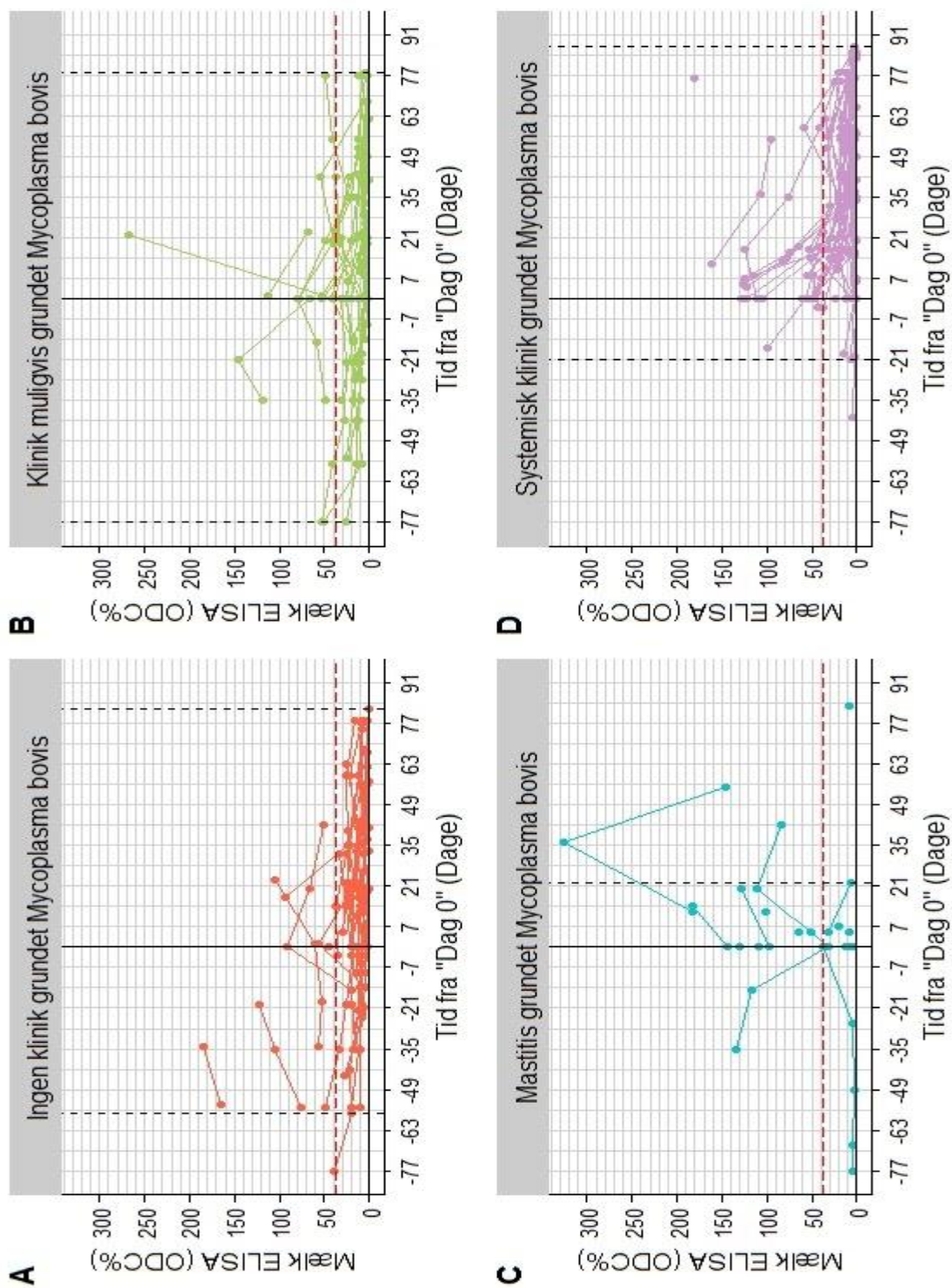
Rådata brugt i modellering for mælk

Der var 418 observationer i model-datasæt-mælk. Rådata brugt i modellering for mælk er opsummeret på gruppeniveau og besætningsniveau i **Tabel 5**. I **Figur 4** ses et grafisk plot af rådata ELISA-resultater i forhold til *Dag 0*. De vertikale stiplede linjer illustrerer ydre grænser af tidsinterval med tilstrækkeligt data til modellering - punkter udenfor indgår ikke i opgørelsen i **Tabel 5**. Af data medtaget i modellering lå 25% af resultater i *Systemisk gruppe* over producentens grænseværdi på 37 ODC%. For *Mastitis gruppe* lå 57% af de observerede ELISA-resultater over. For *Ikke MB gruppe* og *Muligvis gruppe* kunne ses ELISA-resultater over 37 ODC%, men størstedelen af resultaterne lå under.

Kliniske grupper	Min (ODC%)	1. kvar. (ODC%)	Median (ODC%)	Gns. (ODC%)	3. kvar. (ODC%)	Maks. (ODC%)	Antal Obs.*	Antal Køer	Obs.* pr. Ko
Ingen klinik grundet <i>Mycoplasma bovis</i>	0,53	6,92	12,28	22,09	23,43	183,70	124	31	4,0
Klinik muligvis grundet <i>Mycoplasma bovis</i>	0,66	4,99	12,13	23,79	31,66	268,00	118	29	4,1
Mastitis grundet <i>Mycoplasma bovis</i>	5,02	12,54	50,53	70,58	112,05	183,32	21	17	1,2
Systemisk klinik grundet <i>Mycoplasma bovis</i>	0,71	3,88	12,50	27,12	35,23	181,21	155	42	3,7
Besætning	Min (ODC%)	1. kvar. (ODC%)	Median (ODC%)	Gns. (ODC%)	3. kvar. (ODC%)	Maks. (ODC%)	Antal Obs.*	Antal Køer	Obs.* pr. Ko
Besætning 1	3,55	12,70	21,32	36,29	44,76	268,00	115	29	4
Besætning 2	4,05	10,10	20,93	33,44	37,44	183,32	84	24	3,5
Besætning 3	0,53	2,95	5,81	18,08	17,70	181,21	126	32	3,9
Besætning 4	0,66	2,07	5,37	21,20	17,48	183,11	93	34	2,7

Tabel 5 Opgørelse af minimum, maksimum, kvartiler og gennemsnitlige ELISA-resultater i rådata brugt i modellering for mælk. Desuden ses antal observationer, køer og besøg pr. ko for kliniske grupper og besætninger

*Observationer



Figur 4 *Mycoplasma bovis* ELISA-resultater målt på mælk med Bio-X K302 kit i fire kliniske grupper i forhold til tid målt i dage fra *Dag 0* (første registrering af kliniske tegn). Der er trukket sregler mellem resultaterne, for at kunne se forløbet for de enkelte køer. De vertikale stiplede linjer viser afgrænsningen af datasættet, således at model-datasættet er observationer mellem de stiplede linjer. For *Mastitis gruppe* skæres datasættet i *Dag 0*, og derfor ses der kun en stiplede vertikal linje. ELISA-resultater udenfor intervallet indgår ikke i opgørelse i **Tabel 5**. Den røde, horisontale stiplede linje viser grænseværdien på 37 ODC%.

Resultater for Linear Mixed Model for ELISA på mælk

Den endelige LMM til prædiktion af gennemsnitlig ELISA-værdi på gruppeniveau for mælk er vist i **Tabel 6**. Prædikteret ELISA-værdi for en bestemt uge fra *Dag 0* kan udregnes ud fra modelværdier opgivet i **Tabel 6** eller aflæses på dagsniveau i **Figur 5**, som viser prædikterede ELISA-værdier på ikke-logtransformeret skala. Det fremgår, at variansen for den ‘random effekt’, der tager højde for korrelationen mellem målinger på dyr er meget større end variansen på den ‘random effekt’, der tager højde for korrelationen mellem dyr fra samme besætning, som er lav. Modellen for prædikterede ELISA-værdier for mælk har en marginal R^2 på 0,18 og en konditionel R^2 på 0,77.

Tabel 6 Resultater fra Linear Mixed Model for mælk, som viser marginal R^2 , konditionel R^2 , ‘random effects’ og ‘fixed effect’. Estimatene er for log-transformerede *Mycoplasma bovis* antistof ELISA-værdier målt i mælk.

Marginale R^2	0,18			
Konditionel R^2	0,77			
Variabler	Varians	SD	Estimat	SE
Random effects				
CKR _{NR} (Intercept)	0,73	0,85		
CHR _{NR} (Intercept)	0,35	0,59		
Residuals	0,42	0,65		
Fixed effects				
Ingen klinik grundet <i>Mycoplasma bovis</i> (Intercept)			2,5	0,35
Klinik muligvis grundet <i>Mycoplasma bovis</i>			0,13	0,26
Mastitis grundet <i>Mycoplasma bovis</i>			1,1	0,37
Systemisk klinik grundet <i>Mycoplasma bovis</i>			0,92	0,26
Uger fra <i>Dag 0</i>			-0,041	0,019
(Uger fra <i>Dag 0</i>) ²			-0,0021	0,0022
Uger fra <i>Dag 0</i> * Klinik muligvis grundet <i>Mycoplasma bovis</i>			-0,026	0,025
Uger fra <i>Dag 0</i> * Mastitis grundet <i>Mycoplasma bovis</i>			1,5	0,65
Uger fra <i>Dag 0</i> * Systemisk klinik grundet <i>Mycoplasma bovis</i>			-0,092	0,046
(Uger fra <i>Dag 0</i>) ² * Klinik muligvis grundet <i>Mycoplasma bovis</i>			0,00013	0,0029
(Uger fra <i>Dag 0</i>) ² * Mastitis grundet <i>Mycoplasma bovis</i>			-0,50	0,22
(Uger fra <i>Dag 0</i>) ² * Systemisk klinik grundet <i>Mycoplasma bovis</i>			0,00097	0,0042

Den grafiske præsentation af LMM for mælk med prædikterede ELISA-værdier for de kliniske grupper samt 95%-konfidensintervaller for gennemsnittet af prædikterede serum ELISA-værdier er afbilledet i **Figur 5**.

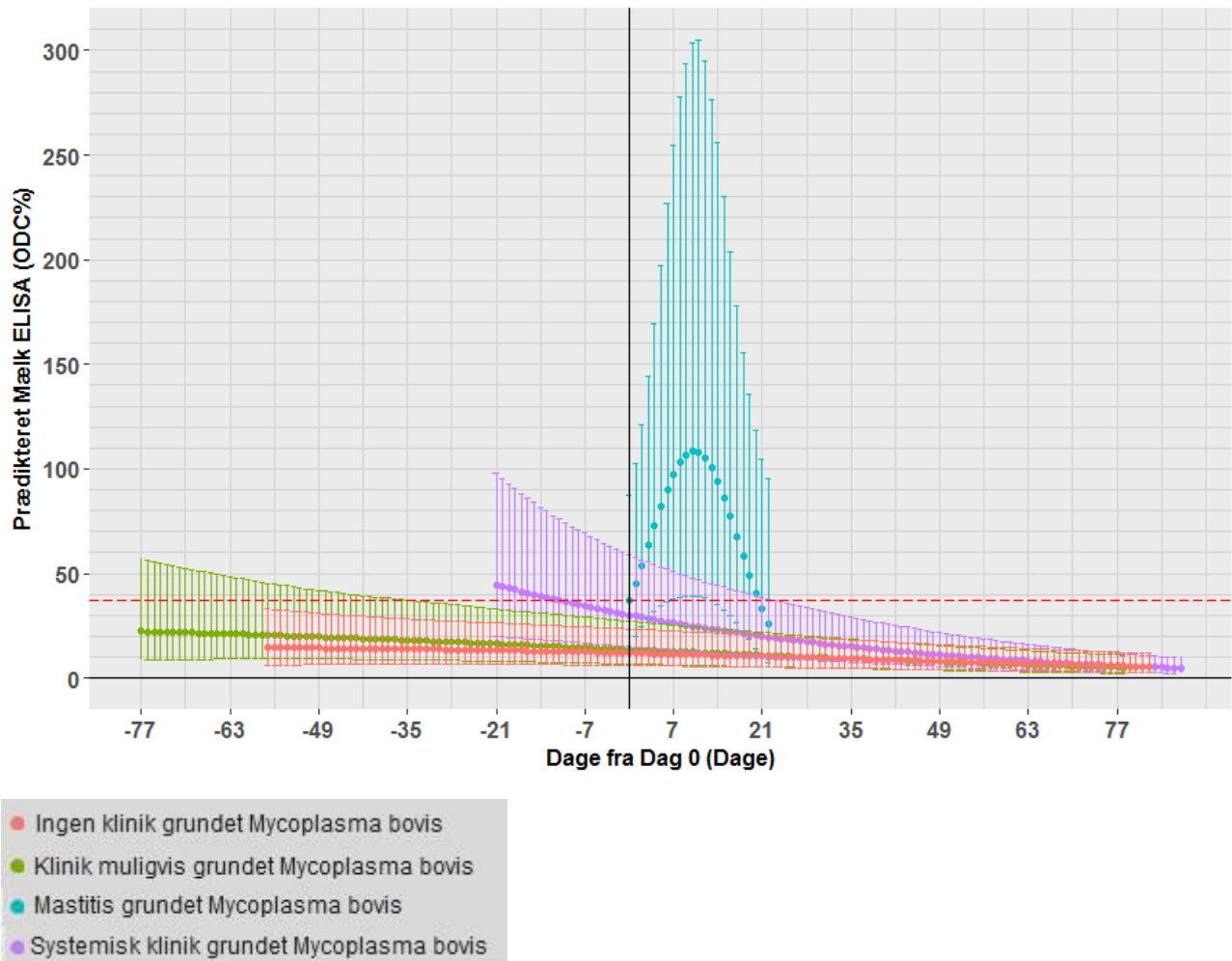
Mastitis gruppen har generelt de højeste prædikterede ELISA-værdier. Grafen for prædikterede ELISA-værdier for *Mastitis* gruppen har et konkavt forløb med toppunkt dag 10 efter *Dag 0* med en prædikteret ELISA-værdi på 108 ODC%, og laveste punkt dag 22 efter *Dag 0* med en værdi på 26 ODC%. De prædikterede ELISA-værdier ligger på *Dag 0* på 37 ODC%. I tidsintervallet dag 1 til

dag 20 efter *Dag 0* ligger prædiktionerne over 37 ODC% og dag 21 og 22 ligger de under. Konfidensintervallet har ligeledes et konkavt forløb og er bredest ved grafens toppunktet, med en bredde på ca. 270 ODC%, og smallest ved grafens laveste punkter, med en bredde på ca. 70 ODC%. Toppunktet for konfidensintervallet for middelværdien findes ved dag 10 efter *Dag 0*, med en ELISA-værdi på ca. 305 ODC%. Konfidensintervallet ligger over 37 ODC% i tidsperioden 7 til dag 13 efter *Dag 0*.

Der ses overlap af konfidensintervaller for *Mastitis gruppe* og de øvrige grupper. Overlap af konfidensintervallet med *Systemisk gruppe* findes i hele tidsperioden for *Mastitis gruppen*; *Dag 0* til dag 22 efter *Dag 0*. I tidsperioden *Dag 0* til dag 2 og dag 18 til dag 22 efter *Dag 0*, er der overlap af konfidensintervaller mellem *Mastitis gruppe* og *Ikke MB gruppe* samt *Muligvis gruppe*. I tidsperioden dag 3 til dag 17 ses intet overlap mellem *Mastitis gruppe* og *Ikke MB gruppe* samt *Muligvis gruppe*.

Grafen for *Systemisk gruppe* har et svagt faldende konvekst forløb. Prædikteret ELISA-værdi ligger i perioden -21 til -11 dage fra *Dag 0* over 37 ODC% og herefter under, frem til dag 87 fra *Dag 0*, hvor data stopper. Konfidensintervallet for prædikterede ELISA-værdier har en bredde på ca. 7 til 80 ODC%. Konfidensintervallet er bredest ved -21 dage før *Dag 0* og bliver gradvist smallere frem mod dag 87 efter *Dag 0*. Den øvre grænse af konfidensintervallet ligger over værdien 37 ODC% fra -21 til 22 dage fra *Dag 0* og herefter ligger den under 37 ODC%. Der ses konstant overlap mellem konfidensintervaller for *Systemisk gruppe*, *Ikke MB gruppe* og *Muligvis gruppe*, i de tidsintervaller hvor grupperne er præsenteret.

Graferne for *Ikke MB gruppe* og *Muligvis gruppe* har et svagt faldende næsten lineært forløb. Der ses mere end 50% overlap af gruppernes konfidensintervaller. Den største difference mellem gruppernes prædikterede ELISA-værdier til et givent tidspunkt er under 8 ODC%. Den højeste prædikterede ELISA-værdi for grupperne er henholdsvis 14 ODC% for *Ikke MB gruppe* og 22 ODC% for *Muligvis gruppe*. Begge grupperes konfidensintervaller er bredest ved tidligste prædiktion og bliver gradvist smallere frem mod seneste prædiktion. Den øvre grænse af konfidensintervallet for *Muligvis gruppe* ligger over 37 ODC% frem til ca. 5 uger før *Dag 0* og ligger herefter under. *Ikke MB gruppes* konfidensinterval har en bredde mellem ca. 10 og 30 ODC% og det ligger under værdien 37 ODC% i hele tidsintervallet for gruppen.



Figur 5 Prædikterede *Mycoplasma bovis* ELISA-værdier på mælk ved Bio-X K302 kit i fire kliniske grupper i forhold til tid målt i dage fra *Dag 0* (første registrering af kliniske tegn). Graferne er afbilledet med 95% konfidensinterval for middelværdien på prædikeret ELISA-værdi for gruppen. Den horisontale stiplede røde linje markerer producentens grænseværdi på 37 ODC%.

Diskussion

Dette studies mål var at beskrive *Mycoplasma bovis* antistoffers temporale udvikling i niveau i serum og mælk omkring sygdomsudbrud i naturligt inficerede køer, samt at klarlægge om der kunne ses forskelle mellem grupper af køer med forskellige kliniske tegn. Studiet var – så vidt vi vidste - det eneste longitudinelle observationsstudie af dette omfang med gentagne ELISA-resultater på serum og mælk, samt kliniske registreringer på enkeltdyrniveau.

Vores anvendte modeller tog højde for hierarkisk struktur af data samt interaktion mellem kliniske grupper og tid fra start af kliniske tegn.

Vores resultater tydede på, at der var forskelligt temporalt antistofniveau i serum og mælk for især grupper af køer med arthritis grundet *Mycoplasma bovis*. Antistofniveauet hos grupper uden eller med usikkerhed på tilstedeværelse af klassisk *Mycoplasma bovis* klinik var gennemsnitligt under grænseværdien på 37 ODC% og de to grupper kunne ikke signifikant skelnes. I serum kunne findes ELISA-positive antistofniveauer for grupper af køer med *Mycoplasma bovis* mastitis i en længere periode omkring start af kliniske tegn. Antistofniveauer i serum for arthritis var signifikant forskelligt fra de øvrige grupper omkring start af kliniske tegn, men lå ikke signifikant over grænseværdien. I mælk viste modellen kun antistofniveauer over grænseværdien for grupper af køer med *Mycoplasma bovis* mastitis i en kort periode. De øvrige grupper antistofniveau ikke kunne adskilles i mælk. Fund i LMM mælk var delvist i konflikt med fund i rådata. For enkeltdyr især i serum hos køer med arthritis grundet *Mycoplasma bovis*, kunne der ses store forskelle i antistofniveau mellem køerne.

Generaliserbarhed og begrænsende faktorer i modelleringen

Produktionsforhold for køer i studiet

Målpopulation for dette studie var malkekvægsbesætninger med køer i produktionssystemer med forhold lignende dansk konventionel eller økologisk drift. I Danmark i perioden 1/10-2014 til 30/9-2015 lå den gennemsnitlige mælkeydelse for Dansk Holstein på 10.552 kg. EKM pr. ko og den gennemsnitlige besætningsstørrelse var 167,8 årskøer. (Landbrugsinfo.dk, 2015). Tre af vores besætninger afveg ikke markant fra landsgennemsnittene for antal køer i besætningen, dog havde besætning 3 omkring det dobbelte antal af gennemsnittet. Udbrudsbesætningerne havde en årsydelse pr. ko tæt på eller over landsgennemsnittet for mælkeydelse, især besætning 3 lå højt. Det er blevet diskuteret om høj mælkeydelse kunne være en risikofaktor for udbrud af *Mycoplasma*

bovis, men der foreligger ingen endelige beviser for dette (Aebi et. al., 2015). Trods eksempler på høj mælkeydelse kan resultaterne for vores besætninger umiddelbart generaliseres til vores målpopulation.

Antal køer og observationer

Indsamlingen af data har været afhængig af forekomst af *Mycoplasma bovis* og dyrlægers indrapportering af udbrud samt samarbejdsvillighed hos landmanden. Derudover var dataindsamlingen omkostningstung i form af arbejdstimer til klinisk registrering, prøvehåndtering, laboratoriarbejde og efterfølgende datahåndtering. Disse faktorer har været begrænsende for at et større datamateriale kunne indsamles. Det ville ellers have været ønskeligt i forhold til den statistiske sikkerhed på resultaterne.

Variation i stikprøvestørrelsen mellem de kliniske grupper

Stikprøvestørrelsen varierede mellem de kliniske grupper. *Mastitis gruppe* havde færrest køer og observationer. Med 17 køer i henholdsvis model-datasæt-serum og -mælk og gennemsnitligt 1,4 og 1,2 besøg pr. ko. Grunden til det lave antal besøg pr. ko var varierende incidens af mastitis i besætningerne, samt udsætning af hensyn til dyrevelfærden hos syge køer. Dette har længe været den anbefalede procedure for *Mycoplasma bovis* mastitiskøer (Maunsell et. al., 2011; Nicholas og Ayling, 2003; Pfützner og Sachse, 1996). Få observationer og besøg pr. ko gav større usikkerhed på dels temporal udvikling af antistofniveauer for enkeltdyr samt på modellernes prædikterede ELISA-værdier for denne gruppe i forhold til de andre grupper.

Der findes ikke kliniske tegn som er patognomoniske for *Mycoplasma bovis* (Nicholas og Ayling, 2003). Andre patogener kan give lignende kliniske tegn. Vi forsøgte for mastitis at sikre korrekt gruppering ved kravet om et positivt PCR-resultat for koen i studieperioden. Producenten bag vores anvendte PCR oplyste ikke præcis specificitet og sensitivitet for testen, men kommenterede at de var høje (Finnzymes, 2010). Andre studier af PCR på mælkeprøver har givet henholdsvis specificitet og/eller sensitivitet under 100%, men dog over 82% (Bashiruddin et. al., 2005; Cai et. al., 2005; Sachse et. al., 2010). Fejlklassificering af køer til *Mastitis gruppe* kunne altså ikke udelukkes. Men da samtlige køer i *Mastitis gruppen* havde minimum ét resultat 20 Ct eller derunder, foreneligt med høj forekomst af DNA fra *Mycoplasma bovis*, vurderes risikoen for tildeling til gruppen uden klinisk infektion af *Mycoplasma bovis* at være minimal. Der blev i vores

studie ikke taget højde for at køer med *Mycoplasma bovis* mastitis kunne have uregelmæssig udskillelse af bakterien (Biddle et. al., 2003), hvilket i forbindelse med gruppering efter PCR-resultat ville kunne give fejlklassificering, hvis der ikke var udskillelse på dagen for prøveudtagelse. Det er i litteraturen ikke beskrevet, hvordan denne risiko kunne nedsættes.

Der er ikke foretaget påvisning af *Mycoplasma bovis*, ved eksempelvis PCR-testning på ledaspirater. Dette kunne give usikkerhed på klassificeringen af køerne i *Systemisk gruppe*. Usikkerheden blev forsøgt minimeret ved kun at medtage køer, hvor der ikke var andre åbenlyse årsager til artritt, som eksempelvis traumer eller tykke haser, der kunne forårsages af mange forskellige tilstande og tilfælde i stalden.

Ikke MB gruppe indeholdt køer uden kliniske tegn eller med kliniske tegn, som projektdyrlægerne initialt ikke mente skyldtes *Mycoplasma bovis*. Der blev ikke undersøgt for reproduktionslidelser. Keratokonjunktivitis indgik ikke som grupperingskriterie. Det kunne derfor ikke udelukkes at få køer i gruppen havde klinik grundet *Mycoplasma bovis*. For disse køer ville der være usikkerhed på ELISA-resultaternes placering på x-aksen, da køerne fik tildelt falsk *Dag 0*, som ikke nødvendigvis korresponderede med den dag køerne faktisk startede med at vise kliniske tegn. Høje ELISA-resultater kunne påvirke forløbet af den modellerede kurve samt konfidensintervallet for denne, alt efter, hvor de lå på tidslinjen.

Da vi ønskede at vores modeller skulle reflektere det fulde kliniske billede for køerne i datagrundlaget, fandt vi det nødvendigt at lave en gruppe for køer med usikkerhed på *Mycoplasma bovis* status - *Muligvis gruppe*. I tvivlstilfældene om årsagen til en artritt kom køerne i *Muligvis gruppe*. Det kunne heller ikke udelukkes at nogle af mastitiskøerne i *Muligvis gruppe* stod med en *Mycoplasma bovis* infektion i yveret og havde testet falsk negativ med PCR eller ikke udskilte *Mycoplasma bovis* på dagen prøven blev udtaget.

Stor forskel mellem de enkelte køer, men kun lidt mellem besætninger

CKR_{NR} og CHR_{NR} havde stor betydning for variationen set i vores model udtrykt ved at konditionel R^2 var langt højere end marginal R^2 .

Variationen grundet CKR_{NR} var langt højere end variationen grundet CHR_{NR} , som var lig nul for serum og lav for mælk. Det betød, at der var stor variation mellem køer, mens variationen mellem besætninger var fraværende for LMM serum og lille for LMM mælk. Grunden til den lille

betydning af besætning for LMM mælk kunne være at besætningerne ikke bidragede med det samme antal køer til de kliniske grupper. En overrepræsentation af eksempelvis køer i *Mastitis gruppe* i en besætning kunne medføre betydning af besætning for LMM mælk, da mastitiskøer havde de højeste antistofniveauer i mælk. Dette kunne medføre et overlap af variationen beskrevet ved en 'random effect' og en 'fixed effect'. Dette ville give en overestimering af modellens samlede forklaring af variation. Da variation beskrevet ved CHR_{NR} , var relativt begrænset i LMM vurderedes dette ikke at være problematisk. Vi kunne altså med rimelighed generalisere vores modeller på besætningsniveau, især for serum. De store forskelle mellem enkeltdyr betød, at der ikke kunne generaliseres for individuelle køer med modellen.

Efter at modellen havde taget højde for variation mellem køer kunne der ses en signifikant forskel i temporale antistofniveauer beskrevet ved ELISA for de enkelte grupper samt en variation af antistofniveauet afhængig af tid. Derfor blev det vurderet at modellen var brugbar.

Forskel på temporalt antistofniveau i serum og mælk

For *Systemisk gruppe* kunne der observeres en væsentlig forskel på temporalt niveau af prædikterede ELISA-værdier i modellerne for serum og for mælk. Ud fra LMM lå antistofniveauet stabilt omkring 45 ODC% i måneden efter *Dag 0* i serum, mens der var et støt fald med langt lavere værdier i mælk. Ud fra LMM kunne det ses at antistofniveauerne i *Mastitis gruppen* havde et hurtigt stigende og faldende temporalt forløb i mælk, mens de for serum ikke nåede samme maksimale niveau og faldt langsommere. Da modellerne var baseret på de samme køers ELISA-resultater i serum og mælk kunne det tyde på at især køer i *Systemisk gruppe* havde forskelligt antistofrespons i henholdsvis serum og mælk. Dette kunne skyldes forekomst af forskellige klasser af antistoffer mod *Mycoplasma bovis* i blodbanen og yverets alveoler. IgM findes i høje koncentrationer i blodet, men transporteres ikke aktivt til alveolerne i yveret (Bennet og Jasper, 1978b).

Vi var ikke bekendt med studier, som havde fundet forskelle eller ligheder i antistofniveauer specifik for køer med arthritis grundet *Mycoplasma bovis*. Bennett og Jasper (1980) fandt en forskel i temporalt forløb af antistofniveauet i serum og mælk hos fire køer eksperimentelt inficeret i yveret med *Mycoplasma bovis*. De målte samlet på IgG og IgM på serum og separat på IgG og IgA på mælk. Resultaterne blev dog ikke angivet på samme skala og var derfor svære at sammenligne. Byrne et. al. (2005) fandt at temporale IgG-niveauer i serum og mælk var meget ens for tre køer med mastitis grundet eksperimentiel infektion med *Mycoplasma bovis*. Der er altså modstridende

resultater på området. Det tydede dog på at klassen af antistoffer, der måles på har stor betydning for detekterede niveauer i henholdsvis serum og mælk. Producenten af BIO-X K302 ELISA, som blev benyttet i vores studie, oplyste ikke hvilke klasser af antistoffer testen målte på. Forløbene af antistofniveauerne beskrevet ved ELISA i de forskellige kliniske grupper og deres betydning uddybes senere.

To kliniske grupper fra udbrudsbesætninger havde ikke antistofniveauer forskellige fra niveauer fundet i kontrolbesætninger

I modellerne for serum og mælk var der på intet tidspunkt signifikant forskel på *Ikke MB gruppe* og *Muligvis gruppe* i tidsintervallet, hvor der blev modelleret. Prædikteret ELISA-værdi for *Muligvis gruppe* var enten lig værdien for *Ikke MB gruppe* eller marginalt højere.

Ved plot af rådata for grupperne, kunne det observeres at der var forholdsmæssigt flere køer med et positivt ELISA-resultat i *Muligvis gruppe*. Det vil sige, at der var større sandsynlighed for at teste en ko positiv i *Muligvis gruppen*. Selv få høje ELISA-resultater ville kunne trække gennemsnittet for gruppen op, da køerne generelt lå lavt. Højere LMM prædiktioner i *Muligvis gruppen* kunne skyldes større sandsynlighed for, at der kom en ko med *Mycoplasma bovis* klinik i denne gruppe, da alle køer i gruppen havde kliniske tegn som kunne skyldes *Mycoplasma bovis*.

Under arbejdet med dette studie, havde vi adgang til serum ELISA-resultater fra et tidligere projekt om *Mycoplasma bovis* i danske kvægbesætninger ”Intern rapport om Mycoplasma-antistofresultater i pilotprojekt 2012” (Nielsen, 2012). I rapporten indgik der data fra tre udbrudsbesætninger og tre kontrolbesætninger. Vi brugte data fra de tre kontrolbesætninger, som var uden klinik af eller historik om *Mycoplasma bovis*. Køerne blev testet individuelt på serum med BIO-X K302 ELISA, og deres resultat kan ses i Appendix VI. Det gennemsnitlige ELISA-resultat på serum fra køer i kontrolbesætningerne lå på 26 ODC%, men der var adskillige målinger i intervallet 40-100 ODC%. For *Muligvis-* og *Ikke MB gruppe* lå niveauet set i vores rådata samt LMM serums højeste prædikterede ELISA-værdi marginalt højere. Dette betød at man ikke umiddelbart kunne skelne besætninger med *Mycoplasma bovis* udbrud fra besætninger uden udbrud ved ELISA-test af grupper uden tydelig *Mycoplasma bovis* klinik.

De tidligste observationer før *Dag 0* stammede alle fra første besøg i besætningerne. Et kontinuert svagt faldende forløb af kurverne for prædikteret ELISA-værdi kunne indikere, at der i starten af

udbruddet var en svag antistofreaktion i grupperne. I vores LMM serum fandt vi, at det tidlige antistofrespons for grupperne *Ikke MB gruppe* og *Muligvis gruppe* var for lavt til at give prædikterede ELISA-værdier over grænseværdien. Vi var ikke bekendt med studier, der specifikt omhandlede antistofniveauer i køer uden arthritis og mastitis grundet *Mycoplasma bovis* i udbrudsbesætninger. Szacawa et. al. (2016) fandt med BIO-X ELISA positive antistofresultater i køer uden kliniske tegn stammende fra besætninger med mistanke om udbrud af *Mycoplasma bovis*. Det fremgik dog ikke om besætningerne, hvorfra køerne stammede fik bekræftet mistanken om udbrud. Byrne et. al. (2000) fandt positive antistofresultater i serum hos kontroldyr i en besætning med udbrud af *Mycoplasma bovis*. Studiet koncentrerede sig om køer med mastitis, hvorfor der ikke er oplyst, om der er set anden klinik hos kontroldyrene, der kunne skyldes *Mycoplasma bovis*. Disse studier kunne indikere at antistofrespons forekommer i køer uden *Mycoplasma bovis* klinik, men endelige konklusioner kunne ikke drages grundet manglende informationer.

Forskel på flere kliniske gruppers temporale antistofniveauer i serum

Ud fra vores LMM for serum kunne ELISA anvendes til at skelne mellem kliniske grupper. I perioden omkring start af kliniske tegn hos køerne og indenfor den første måned ville grupper med tydelige kliniske tegn på *Mycoplasma bovis* ifølge modellen gennemsnitligt teste positivt, mens øvrige grupper ville teste negativt. I perioden 0 til 15 dage fra *Dag 0* lå prædikterede ELISA-værdier for *Mastitis gruppe* signifikant højere end værdier for *Systemisk gruppe*. Det tyder altså på, at grupper af køer med *Mycoplasma bovis* mastitis initialt har højere antistofniveau end grupper af køer med arthritis. Dog skal der igen tages højde for få observationer i *Mastitis gruppe*. Det kunne ikke udelukkes at billedet ville ændre sig, hvis man havde flere observationer at modellere på.

Systemisk gruppes nedre konfidensinterval kommer ikke over producentens grænseværdi på 37 ODC%, men ligger konsekvent over 34 ODC% indenfor den første måned. Det kunne derfor diskuteres om grænseværdien skulle rykkes til 34 ODC% for at undgå falsk negative køer med *Mycoplasma bovis* arthritis. Dette ville dog give nedsat specificitet med flere tilfælde af falsk positive. En nedsat specificitet giver dårligere sikkerhed på et positivt testresultat. Stor sikkerhed på positiv diagnose er vigtigt, hvis man eksempelvis bruger denne viden som grundlag for managementbeslutninger om indføring af skærpet biosecurity. Hvis man ønsker bedst sikkerhed på den positive diagnose bør grænseværdien ikke rykkes. Hvis man derimod ønsker sikkerhed på et negativt ELISA-resultat kan grænseværdien rykkes ned med større sensitivitet til følge. Dette kunne

være anvendeligt ved eksempelvis handel, hvor køber ønsker sikkerhed for at køer stammer fra en sygdomsfri besætning.

Hvis man primært udtog og testede blodprøver fra grupper af køer med kliniske tegn på mastitis eller arthritis ville man øge chancer for at finde høje antistofniveauer indikerende tilstedeværelse af *Mycoplasma bovis* i besætningen. Antistofniveauer i kliniske grupper burde undersøges nærmere, gerne på et større datagrundlag og med samtidig test for *Mycoplasma bovis* forekomst hos enkelt dyr med PCR eller kultur på relevant prøvemateriale, eksempelvis ledvæske fra køer med arthritis.

Vores resultater tyder på at gruppetestning af køer med klassisk *Mycoplasma bovis* klinik i form af mastitis eller arthritis var anvendeligt til diagnostik på besætningsniveau afhængigt af grænseværdi.

Usikkerhed om ELISA på mælk kan bruges til diagnostik på besætningsniveau

På vores modellerede graf blev der observeret et smalt tidsmæssigt vindue for positiv diagnostisering af en gruppe køer med mastitis grundet *Mycoplasma bovis*. Dette lå en uge efter start af kliniske tegn og fem dage frem. I tidsrummet adskilte gruppen af køer med *Mycoplasma bovis* mastitis sig signifikant fra grupperne med køer uden klar *Mycoplasma bovis* klinik, men ikke fra gruppen af køer med *Mycoplasma bovis* arthritis.

Byrne et. al. (2000) fandt ni uger efter *Mycoplasma bovis* udbrud i en besætning, at alle otte køer med *Mycoplasma bovis* mastitis, bekræftet ved dyrkning, testede positiv ved ELISA på mælk. Dette tydede på at ELISA på mælk kunne være anvendeligt til diagnostik af *Mycoplasma bovis* mastitis.

Vores resultater fra modellen bekræfter at diagnostik ved positiv ELISA-værdi for *Mycoplasma bovis* mastitis er mulig, men i et kort tidsrum. Det gør diagnostisering af *Mycoplasma bovis* mastitis på mælk svært at anvende i praksis, da man typisk ønsker sikker diagnostisering ved start af klinisk sygdom eller en lang periode med mulighed for diagnostisering.

Den begrænsede mængde observationer på mastitiskøer, der lå til grund for vores model skal dog noteres. Vi havde få gentagende observationer på køerne og dermed en betydelig usikkerhed på temporalt antistofniveau for enkelt dyr. En stor andel af observationerne lå under grænseværdien kort efter start af kliniske tegn. Det kunne altså ikke afvises, at hvis man studerede flere tilfælde, ville det modellerede billede ændre sig. Der er behov for yderligere forskning på området

Der blev i LMM mælk ikke observeret nogen signifikant forskel mellem *Systemisk gruppe*, *Ikke MB gruppe* og *Muligvis gruppe* på noget tidspunkt. Ingen af disse grupper lå signifikant over

grænseværdien. Disse resultater tydede på at grupper af køer i en udbrudsbesætning, som ikke havde *Mycoplasma bovis* mastitis, ikke udskilte antistoffer i mælken i så høj grad, at det ville give udslag i en positiv prædikteret ELISA-værdi. Dette kunne betyde at eksempelvis screening af tankmælk ikke ville kunne bruges for *Mycoplasma bovis* udbrudsbesætninger, hvor de kliniske tegn ikke var mastitis. På baggrund af vores resultater kunne vi ikke anbefale brug af ELISA på mælk til diagnostik på besætningsniveau

Ved plot af vores rådata var der ELISA-resultater over 100 ODC% hos nogle køer i vores *Systemisk gruppe* kort efter start af kliniske tegn. Disse niveauer faldt dog markant indenfor tre uger. Det kunne ud fra rådata ikke fuldstændigt udelukkes, at nogle køer i *Systemisk gruppe* ville have et højt antistofniveau i et kort tidsrum efter start af kliniske tegn. Men ud fra plot af rådata blev det vurderet, at sensitiviteten var for lav til at have diagnostisk værdi. Modellens prædikterede ELISA-niveauer under grænseværdien for gruppen understøttede en antagelse om, at der var for få køer med arthritis, hvor det ville være muligt at måle et ELISA positivt antistofniveau. Her var også behov for yderligere forskning.

Temporalt antistofniveau varierer meget mellem køer i samme kliniske gruppe

Der kunne observeres stor forskel på temporalt antistofniveau mellem køerne internt i grupperne, primært i serum fra køer med *Mycoplasma bovis* arthritis (**Figur 2**). Spredningen på ELISA-resultater i kliniske grupper kan skyldes fejlgruppering. Det kan også skyldes, at køer har forskellig antistofrespons på *Mycoplasma bovis*.

Bürki et. al. (2015) opsummerede en række årsager til, at der kunne ses forskelligt immunrespons på *Mycoplasma bovis* i forbindelse med infektion. *Mycoplasma bovis* har stor variation i sin antigen-profil, og der var demonstreret skift i profilen ved høj forekomst af bovine antistoffer. Der kunne være forekomst af intracellulær *Mycoplasma bovis* samt op- og nedregulering af immunresponset, herunder øget produktion af antistoffer med dårligere beskyttende immunitet. *Mycoplasma bovis* mange mekanismer til påvirkning af immunresponset kunne forklare den store forskel i antistofniveauer mellem køer i samme kliniske gruppe.

Brugen af antistof ELISA til bestemmelse af forekomst af *Mycoplasma bovis* hos enkeltdyr ved påvisning af antistoffer var behæftet med væsentlig usikkerhed. Det er muligt, at en antistof-ELISA baseret på et andet target protein end proteinet benyttet BIO-X K302, ville kunne vise andre

resultater for køerne i dette studie. En forskningsgruppe i Melbourne arbejdede med validering af en nyudviklet antistof ELISA-test, MilA (Wawegama et. al., 2016).

En stor del af *Mycoplasma bovis* arthritis køerne havde ingen positive ELISA-resultater. Dette kunne tyde på at ELISA havde lav sensitivitet ved enkeltdyrsdiagnostik for køer med *Mycoplasma bovis* arthritis. Dette var problematisk, hvis man ville bruge testen som grundlag for elimination af smitten fra en besætning. Hvis man tager udgangspunkt i ELISA-værdier, kunne man overse smittede køer. På baggrund af vores resultater, ville vi ikke anbefale diagnostik på enkeltdyr med ELISA.

Andre tendenser observeret i forbindelse med studiet

Køer med *Mycoplasma bovis* mastitis eller arthritis kan opdeles ud fra PCR

Ved plot af PCR resultater blev der observeret en generel tendens til at køer med kliniske tegn på mastitis havde et lavt PCR-resultat på 20 Ct eller derunder. Køer med kliniske tegn på systemisk sygdom lå generelt i intervallet 30-37 Ct (Appendix II).

Konklusion

Der blev i dette studie produceret Linear Mixed Models til prædiktion af gennemsnitligt temporalt *Mycoplasma bovis* antistofniveau i forskellige kliniske grupper af køer i *Mycoplasma bovis* udbrudsbesætninger.

I modellerne havde CHR_{NR} lille eller ingen betydning for variationen observeret, hvilket tyder på, at modellernes resultater kan generaliseres på besætningsniveau, når besætninger under lignende produktionsforhold undersøges. I modellerne havde CKR_{NR} stor betydning for variationen observeret, hvilket indikerer at der er stor forskel på antistofniveauer imellem køer. Modellernes prædikterede antistofniveauer kan altså ikke generaliseres for enkelt dyr.

Der kunne observeres forskelligt temporalt antistofniveau på gruppeniveau i henholdsvis serum og mælk, især for grupper af køer med *Mycoplasma bovis* arthritis. Dette tydede på forskelligt antistofrespons i blodbanen og yveret hos køerne.

Grupper af køer uden kliniske tegn eller med kliniske tegn som muligvis kan skyldes *Mycoplasma bovis* kunne ikke signifikant adskilles og der blev observeret kontinuert lave prædikterede ELISA-værdier for disse. ELISA-værdierne for disse grupper var meget lig antistofniveauer fundet i besætninger uden *Mycoplasma bovis* udbrud.

Dette tydede på at ELISA-testning af grupper af køer uden kliniske tegn eller med kliniske tegn som muligvis kan skyldes *Mycoplasma bovis* ikke kunne bruges til at diagnosticere udbrud af *Mycoplasma bovis* på besætningsniveau.

I modellen for serum, kunne der i en måned efter start af kliniske tegn ses signifikant højere *Mycoplasma bovis* antistofniveauer for grupper af køer med *Mycoplasma bovis* arthritis og mastitis end for studiets øvrige grupper. Dette tydede på at ELISA målt på serum kunne benyttes til besætningsdiagnose ved test af grupper af køer med kliniske tegn på *Mycoplasma bovis* i form af arthritis og mastitis.

I modellen for mælk, kunne der i et smalt tidsvindue efter start af kliniske tegn, positivt detekteres *Mycoplasma bovis* antistofniveauer i en gruppe af køer med mastitis, men ikke i studiets øvrige grupper. Ved besætningsdiagnostik ønskes typisk mulighed for testning af tankmælk. *Mycoplasma bovis* udbrudsbesætninger med anden klinik end mastitis ville ifølge vores resultater ikke teste positivt og derfor kunne ELISA på mælk ikke anbefales til diagnostik på besætningsniveau.

Der kunne i rådata observeres stor variation i temporale antistofniveauer mellem køer, især for køer med *Mycoplasma bovis* arthritis. Dette tydede på at *Mycoplasma bovis* kunne medføre forskellig immunreaktion hos køer med samme kliniske tegn holdt under samme produktionsforhold. Det kunne ses at kun 55% af de målte antistofniveauer for *Mycoplasma bovis* arthritis køer lå over producentens grænseværdi. Derfor kunne brugen af ELISA målt på serum til detektion af *Mycoplasma bovis* antistofrespons på enkeltdyrniveau ikke anbefales.

Litteraturliste

Referencer

- Aebi, M., van den Borne, B. H. P., Raemy, A., Steiner, A., Pilo, P. and Bodmer, M., 2015. Mycoplasma bovis infections in Swiss dairy cattle: a clinical investigation. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 57(10), epub. [online] Available at: <https://actavetscand.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13028-015-0099-x> [Accessed 14 Jan. 2017].
- Alberti, A., Addis, M. F., Chessa, B., Chessa, B., Cubeddu, T., Profiti, M., Rosati, S., Ruiu, A. and Pittau, M., 2006. Molecular and antigenic characterization of a Mycoplasma bovis strain causing an outbreak of infectious keratoconjunctivitis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 18, pp.41-51.
- Arede, M., Nielsen, P. K., Ahmed, S. S. U., Halasa, T., Nielsen, L.R. and Toft, N., 2016. A space–time analysis of Mycoplasma bovis: bulk tank milk antibody screening results from all Danish dairy herds in 2013–2014. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 58(16), epub. [online] Available at: <http://actavetscand.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13028-016-0198-3> [Accessed 14 Jan. 2017].
- Bashiruddin, J. B., Frey, J., Königsson, M. H., Johansson, K., Hotzel, H., Diller, R., de Santis, P., Botelho, A., Ayling, R. D., Nicholas, R. A. J., Thiaucourt, F. and Sachse, K., 2005. Evaluation of PCR systems for the identification and differentiation of Mycoplasma agalactiae and Mycoplasma bovis: A collaborative trial. *The Veterinary Journal*, 169, pp.268-275.
- Bennett, R. H. and Jasper, D. E., 1978a. BOVINE MYCOPLASMA MASTITIS FROM INTRAMAMMARY INOCULATION OF SMALL NUMBERS OF MYCOPLASMA BOVIS. I. MICROBIOLOGY AND PATHOLOGY. *Veterinary Microbiology*, 2, pp.341-355.
- Bennett, R. H. and Jasper, D. E., 1978b. IMMUNOLOGIC AND PATHOLOGIC RESPONSES OF COWS TO NATURALLY OCCURRING MYCOPLASMA BOVIS MASTITIS. *Veterinary Microbiology*, 2, pp. 325-340.
- Bennett, R. H. and Jasper, D. E., 1980. Bovine Mycoplasmal Mastitis from Intramammary Inoculations of Small Numbers of Mycoplasma bovis: Local and Systemic Antibody Response. *American Journal of Veterinary Research*, 41(6), pp.889-892.
- Biddle, M. K., Fox, L. K., and Hancock, D. D., 2003. Patterns of mycoplasma shedding in the milk of dairy cows with intramammary mycoplasma infection. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 223:8, pp.1163-1166.
- Bio-X Diagnostics, 2011. MYCOPLASMA BOVIS ELISA KIT: ELISA kit for serodiagnosis of Mycoplasma bovis, Indirect test for blood sera and milk, Diagnostic test for cattle, Version [unknown], Jemelle, Belgium, Dec. 2011. Bio-X Diagnostics
- Bürki, S., Frey, J. and Pilo, P., 2015. Virulence, persistence and dissemination of Mycoplasma bovis. *Veterinary Microbiology*, 179(1-2), pp. 15-22.

- Byrne, W. J., Ball, H. J., Brice, N., McCormack, R., Baker, S. E., Ayling, R. D. and Nicholas, R. A. J., 2000. Application of an indirect ELISA to milk samples to identify cows with *Mycoplasma bovis* mastitis. *Veterinary Record*, 146, pp. 368-369.
- Byrne, W., Markey, B., McCormack, R., Egan, J., Ball, H. and Sachse, K., 2005. Persistence of *Mycoplasma bovis* infection in the mammary glands of lactating cows inoculated experimentally. *Veterinary Record*, 156, pp.767-771.
- Cai, H. Y., Bell-Rogers, P., Parker, L. and Prescott, J. F., 2005. Development of a real-time PCR for detection of *Mycoplasma bovis* in bovine milk and lung samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17, pp. 537-545.
- Caswell, J. L. and Archambault, M., 2007. *Mycoplasma bovis* pneumonia in cattle. *Animal Health Research Reviews*, 8(2), pp. 161-186.
- Feenstra, A., Bisgaard Madsen, E., Friis, N. F., Meyling, A. and Ahrens, P., 1991. A field study of *Mycoplasma bovis* infection in cattle. *Journal of Veterinary Medicine*, 38(3), pp. 195-202.
- Finnzymes, 2010. PathoProof® Mastitis Major-3 Kit, F-914, Instruction manual, Version 2.1, Oct. 2010. Finnzymes Part of Thermo Fisher Scientific
- Francoz, D., Fortin, M., Fecteau, G. and Messier, S., 2005. Determination of *Mycoplasma bovis* susceptibilities against six antimicrobial agents using the E test method. *Veterinary Microbiology*, 105, pp. 57-64.
- Friis, N. F., 1984. *Mycoplasma bovis*-induced Mastitis in Cattle in Denmark. *Nordisk Veterinærmedicin*, 36, pp. 324-325.
- Ghadersohi, A., Hirst, R. G., Forbes-Faulkener, J. and Coelen, R. J., 1999. Preliminary studies on the prevalence of *Mycoplasma bovis* mastitis in dairy cattle in Australia. *Veterinary Microbiology*, 65, pp. 185-194.
- Ghadersohi, A., Fayazi, Z. and Hirst, R. G., 2005. Development of a monoclonal blocking ELISA for the detection of antibody to *Mycoplasma bovis* in dairy cattle and comparison to detection by PCR. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 104, pp.183-193.
- Hale, H. H., Helmboldt, C. F., Plastridge, W. N. and Stula, E. F., 1962. BOVINE MASTITIS CAUSED BY A MYCOPLASMA SPECIES. *The Cornell veterinarian*, 52, pp.582-591.
- Hartman, H. A., Tourtellotte, M. E., Nielsen, S. W. and Plastridge, W. N., 1964. Experimental Bovine Uterine Mycoplasmosis*. *Research in veterinary science*, 5, pp. 303-310.
- Hirth, R. S., Nielsen, S. W. and Plastridge, W. N., 1966. Bovine Salpingo-oophoritis Produced with Semen Containing a Mycoplasma. *Veterinary Pathology*, 3(6), pp.616-632.
- Hogan, J. S., Berry, E. A., Hillerton, J. E., Hogeveen, H., Nickerson, S. C., Oliver, S. P., Pighetti, G. M., Rapnicki, P., Schukken, Y. H. and Smith, K. L., 2016. Current Concepts of Bovine Mastitis. 5th ed. New Prague, Minnesota: The National Mastitis Council; 2016. pp. 1-2.

Kruuse, Undated. Vacutainer serum, 4 ml, 100 stk (rød), plastik rør (121625) - BD Vacutainer | www.kruuse.com [online]. Available at: http://www.kruuse.com/da-DK/ecom/Laboratorium/Blodpr%C3%B8ve_laboratori/BD_vacutainer_blodpr/prod_121625.aspx [Accessed 7 Jan. 2017].

Landbrugsinfo.dk., 2015. Gennemsnitsydelsen tæt på 10.000 kg mælk. [online] Available at: <https://www.landbrugsinfo.dk/Kvaeg/RYK/Sider/151109-Gennemsnitsydelsen-taet-paa-10.000-kg-maelk.aspx> [Accessed 22 Nov. 2016].

Lysnyansky, I. and Ayling, R. D., 2016. Mycoplasma bovis: Mechanisms of Resistance and Trends in Antimicrobial Susceptibility. *Frontiers in Microbiology*, 7. epub. [online] Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.00595/full> [Accessed 15 Jan. 2017].

Maunsell, F. P., Woolums, A. R., Francoz, D., Rosenbusch, R. F., Step, D. L., Wilson, D. J. and Janzen, E. D., 2011. Mycoplasma bovis Infections in Cattle. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25, pp.772-783.

Nakagawa, S. and Schielzeth, H., 2013. A general and simple method for obtaining R^2 from generalized linear mixed-effects models. *Methods in Ecology and Evolution*, 4(2), pp. 133-142.

Nicholas, R. A. J., 2011. Bovine mycoplasmosis: silent and deadly. *Veterinary Record*, 168, pp. 459-462

Nicholas, R. A. J. og Ayling, R. D., 2003. Mycoplasma bovis: disease, diagnosis, and control. *Research in Veterinary Science*, 74, pp.105-112.

Nicholas, R. and Baker, S., 1998. Recovery of Mycoplasmas from Animals. *Methods in Molecular Medicine*, 104: Mycoplasma Protocols. Edited by: Miles, R. and Nicholas, R., Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 1998. pp. 37-43.

Nicholas, R. A. J., Ayling, R. D., Woodger, N., Wessells, M. E. and Houlihan, M. G., 2006. Mycoplasmas in adult cattle: Bugs worth bothering about? *Irish Veterinary Journal*, 59, pp. 568-572

Nielsen, L. R., 2012. Intern rapport om Mycoplasma-antistofresultater i pilotprojekt 2012. Unpublished

Nielsen, P. K., Petersen, M. B., Nielsen, L. R., Halasa, T. and Toft, N., 2015. Latent class analysis of bulk tank milk PCR and ELISA testing for herd level diagnosis of Mycoplasma bovis. *Preventive Veterinary Medicine*, 121, pp. 338-342.

Petersen, M. B., Krogh, K. and Nielsen, L. R., 2016. Factors associated with variation in bulk tank milk Mycoplasma bovis antibody-ELISA results in dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 99, pp. 3815-3823.

Pfützner, H. and Sachse, K., 1996. Mycoplasma bovis as an agent of mastitis, pneumonia, arthritis and genital disorders in cattle. *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties*, 15(4), pp.1477-1494.

Pinnow, C. C., Butler, J. A., Sachse, K., Hotzel, H. H., Timms, L. L. and Rosenbusch, R. F., 2001. Detection of *Mycoplasma bovis* in Preservative-Treated Field Milk Samples. *Journal of Dairy Science*, 84(7), pp. 1640-1645.

Punyapornwithaya, V., Fox, L. K., Hancock, D. D., Gay, J. M. and Alldredge, J. R., 2010. Association between an outbreak strain causing *mycoplasma bovis* mastitis and its asymptomatic carriage in the herd: A case study from Idaho, USA. *Preventive Veterinary Medicine*, 93, pp. 66-70.

Sachse, K., Salam, H. S. H., Diller, R., Schubert, E., Hoffmann, B. and Hotzel, H., 2010. Use of a novel real-time PCR technique to monitor and quantitate *Mycoplasma bovis* infection in cattle herds with mastitis and respiratory disease. *The Veterinary Journal*, 186, pp.299-303.

Szacawa, E., Szymańska-Czerwińska, M., Niemczuk, K., Dudek, K., Bednarek, D. and Ayling, R. D., 2016. Comparison of serological, molecular and cultural diagnostic methods for the detection of *Mycoplasma bovis* infections in cattle. *Animal Science Papers and Reports*, 34(4), pp.351-359.

Wawegama, N. K., Markham, P. F., Kanci, A., Schibrowski, M., Oswin, S., Barnes, T. S., Firestone, S. M., Mahony, T. J. and Browning, G. F., 2016. Evaluation of an IgG Enzyme-Linked Immunosorbent Assay as a Serological Assay for Detection of *Mycoplasma bovis* Infection in Feedlot Cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(5), pp.1269-1275.

[Dataudtræk fra Kvægdatabasen](#)

DMS Dyrregistrering/DLBR KvægIT, 2017

SEGES-KvægIT, 2016.

[R software](#)

R version 3.3.2 (2016-10-31). "Sincere Pumpkin Patch" Copyright (C) 2016 The R Foundation for Statistical Computing, Platform: x86_64-w64-mingw32/x64 (64-bit)

Barton, K., 2016. MuMIn: Multi-Model Inference. R package version 1.15.6. <https://CRAN.R-project.org/package=MuMIn>

Bates, D. and Maechler, M. M., 2016. Matrix: Sparse and Dense Matrix Classes and Methods. R package version 1.2-7.1. <https://CRAN.R-project.org/package=Matrix>

Bates, D., Maechler, M., Bolker, B. and Walker, S., 2015. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67(1), pp. 1-48.

Kuznetsova A., Brockhoff, P. B. and Christensen, R. H. B., 2016. lmerTest: Tests in Linear Mixed Effects Models. R package version 2.0-33. <https://CRAN.R-project.org/package=lmerTest>

Wickham, H., 2009. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York, 2009.

Wickham, H., 2016. readxl: Read Excel Files. R package version 0.1.1. <https://CRAN.R-project.org/package=readxl>

Wickham, H. and Francois, R., 2016. dplyr: A Grammar of Data Manipulation. R package version 0.5.0. <https://CRAN.R-project.org/package=dplyr>

Appendix

Appendix I: Klinisk protokol udarbejdet i forbindelse med dette studie:

CHR nr _____ Ko nr _____ Dato _____

Klinik	Resultat	Bemærkning
Generelt		
Almen tilstand		0/1
Huld		tal
Temp		tal
Hoved		
CNS, hovedholdning		0/1
Øjne, flåd		0/1
Nares, flåd		0/1
Hoste		0/1
Lunger		
Respiration		0 – TA /1 – alt andet
Auskulation		0 – nor. Ves, let fors. Ves resp / 1 alt andet
Hjerte		
Auskulation		0 – IAB /1 - alt andet
Led/lemmer		
Hævelse		0/1
Hud		0/1/2
Halthed		0/1/2
Yver		
Inspektion		0/1/2(3-pattet)
Palpation		0/1/2/3
Ømhed		0/1
Mælkeprøve		0 - iab / 1 – ændret udsende
Andet		
Blodprøve		
Gruppe		

Symptom_start: hvilken dato startede symptomerne. Første observation af os eller som oplyst af landmanden.

Obs_est: 0=første dato vi har set det kliniske tegn, 1=præcis angivelse af landmanden eller dennes dyrlæge, eller fundet i dyrereg (mest præcise).

Mb_klinik: klinikken formodes at skyldes M bovis. F.eks. hævelse af et eller flere led uden hud læsioner, udtalt skævhovedholdning, vedvarende markante hænge ører,

Mulig_mb klinik: den observerede klinik kan skyldes M bovis. F.eks. yb, ledhævelse hvor tvivl om huden er involveret, resp symptomer, hænge ører mild grad eller kun fundet ved 1 besøg.

Dyrereg: beskriv hvis oplysninger er fundet i dyrereg.

Forklaringer til kliniske registreringer KØER

Generelt

Almen tilstand: bedømmes 0-1

0 = rask

1 = syg (beskriv under bemærkninger).

Afsnit 3. Koens almentilstand bedømmes på baggrund af en visuel vurdering.

Huld: Vurderes på en skala fra 1-5 efter Fergusons skala. Afsnit 4.

Temp: temperaturen måles med et termometer og temperaturen registreres.

Hoved

CNS, hovedholdning: bedømmes 0-1

0 = normal hovedholdning

1 = skæv hovedholdning

Øjne: bedømmes 0-1

0 = ej flåd fra øjet (uni- eller bilateralt)

1 = forøget mængde flåd fra øjet (uni- eller bilateralt).

Nares: bedømmes 0-1

0 = ej flåd fra nares (uni- eller bilateralt)

1 = flåd fra nares (uni- eller bilateralt), karakteren noteres under bemærkninger (serøst, mukøst, purulent, blodigt, skummende).

Hoste: bedømmes 0-1

0 = ej hørt hoste ved undersøgelsen

1 = hørt hoste ved undersøgelsen.

Lunger

Respiration: Karakteren noteres under bemærkninger (thoracoabdominal, overfladisk, abdominal, dyspnø).

Auskultation: respirationslyden noteres. Normal vesikulær resp, ru resp, bronkøs resp, rallelyde.

Hjerte

Auskultation: IAB hvis lyder normalt, ellers noter

Led/lemmer

Hævelse: bedømmes 0-1

0 = ej hævede led

1 = hævelse af et eller flere led (beskriv under bemærkninger hvilke).

Hud: bedømmes 0-2

0 = huden på lemmerne er intakt

1 = hårlaget slidt af et eller flere områder (beskriv hvor)

2 = sår (>2 cm i diameter) på et eller flere ben (beskriv hvor).

Halthed: bedømmes 0-2. Efter Welfare Quality.

0 = Rengående, fast rytme og ligelig vægtbærende på alle fire ben.

1 = Uren gang, brudt rytme og forkortet skridt på halt ben, uens vægtbæring.

2 = Springhalt, ingen eller minimal vægtbæring på det afficerede ben eller lavgradig halt på mere end et ben.

Yver

Inspektion: bedømmes 0-1.

0 = symmetrisk yver uden sår eller tegn på hævelse

1 = asymmetrisk yver med sår eller visuelle tegn på hævelse (noter hvad)

Palpation: Vurderes 0-3.

0 = normalt blødt yver væv

1 = ødem i én eller flere kirtler

2 = blød hævelse foreneligt med akut inflammation i én eller flere kirtler (notér hvilke)

3 = hård hævelse foreneligt med kroniske forandringer i én eller flere kirtler (noter hvilke).

Ømhed: bedømmes 0-1

0 = ej ømhed

1 = ømhed

CMT:

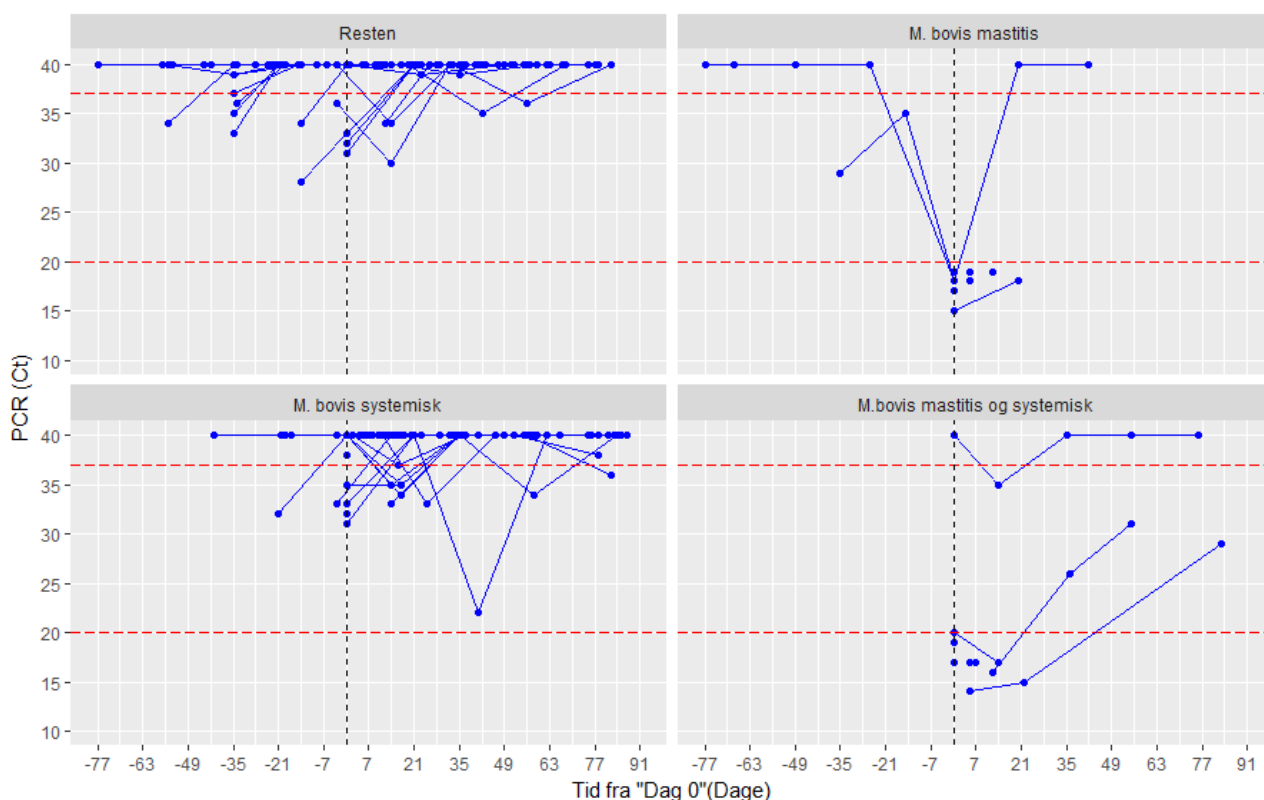
Mælkeprøve: udtag én mælkeprøve, mælk fra alle 4 kirtler blandes i ét glas.

Andet: andre kliniske observationer ikke nævnt i skemaet som umiddelbart observeres.

”Afsnit” referer til: ”Ny-Sundhedsrådgivning. Vejledning og dokumentation til ”Indberetninger for kliniske registreringer” 15. November 2006”.

Appendix II: PCR resultater for de oprindeligt tiltænkte analysegrupper

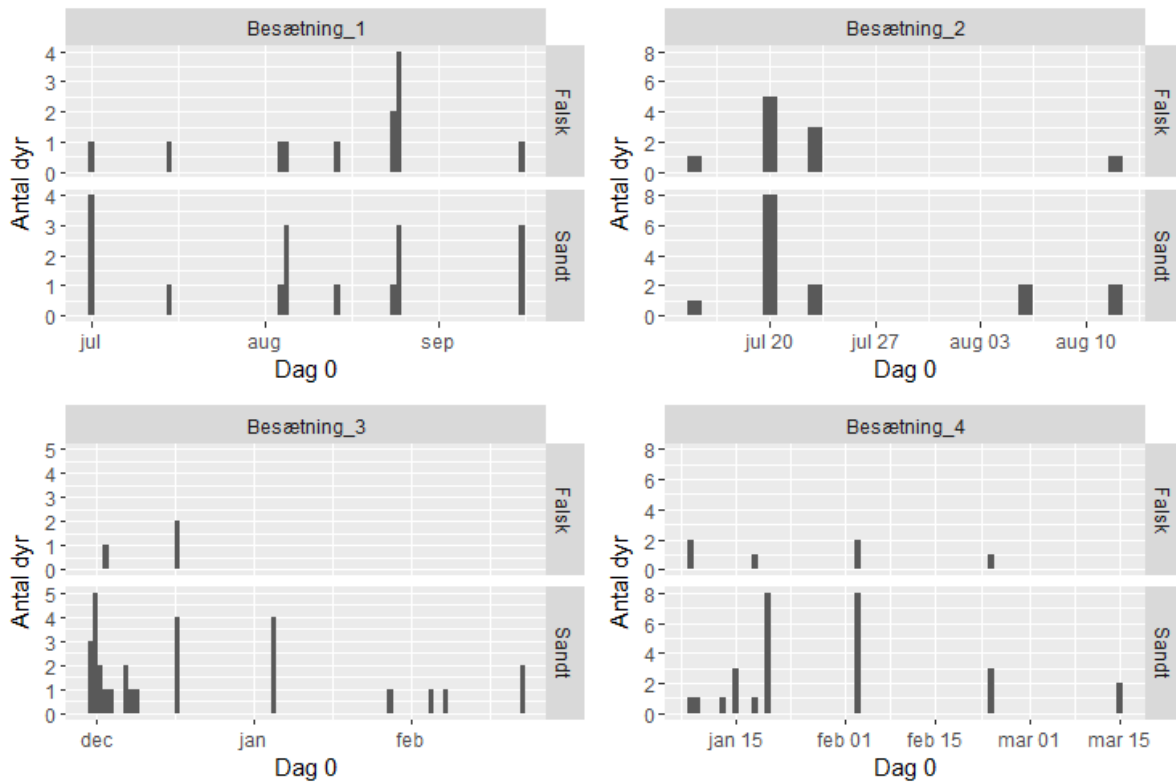
Oprindeligt var det planlagt at lave fire kliniske grupper: “*Mycoplasma bovis* mastitis”, “*Mycoplasma bovis* systemisk”, “*Mycoplasma bovis* mastitis og systemisk” og “Resten”, som ville bestå af dyr ikke i de to andre grupper. Med en gruppe på otte dyr ville gruppen “*Mycoplasma bovis* mastitis og systemisk” statistisk blive for lille. Derfor valgte vi at fordele “*Mycoplasma bovis* mastitis og systemisk” gruppen ud på hhv. gruppen “Mastitis grundet *Mycoplasma bovis*” (≤ 20 Ct) og “Systemisk klinik grundet *Mycoplasma bovis*” (>20 Ct) ud fra PCR resultaterne. “Resten” blev delt ud i to grupper med hh. mistanke og ingen mistanke om klinik grundet *Mycoplasma bovis*.



Figur II: PCR resultater for de først tiltænkte kliniske grupper ud fra Dag 0. Der er trukket streger mellem resultaterne, for at kunne se forløbet for de enkelte køer. De vandrette røde streger er hhv. ved grænseværdien på 37 Ct og ved 20 Ct som er grænsen der har defineret hvilken gruppe dyrene fra “*M. bovis* mastitis og systemisk” er kommet over i.

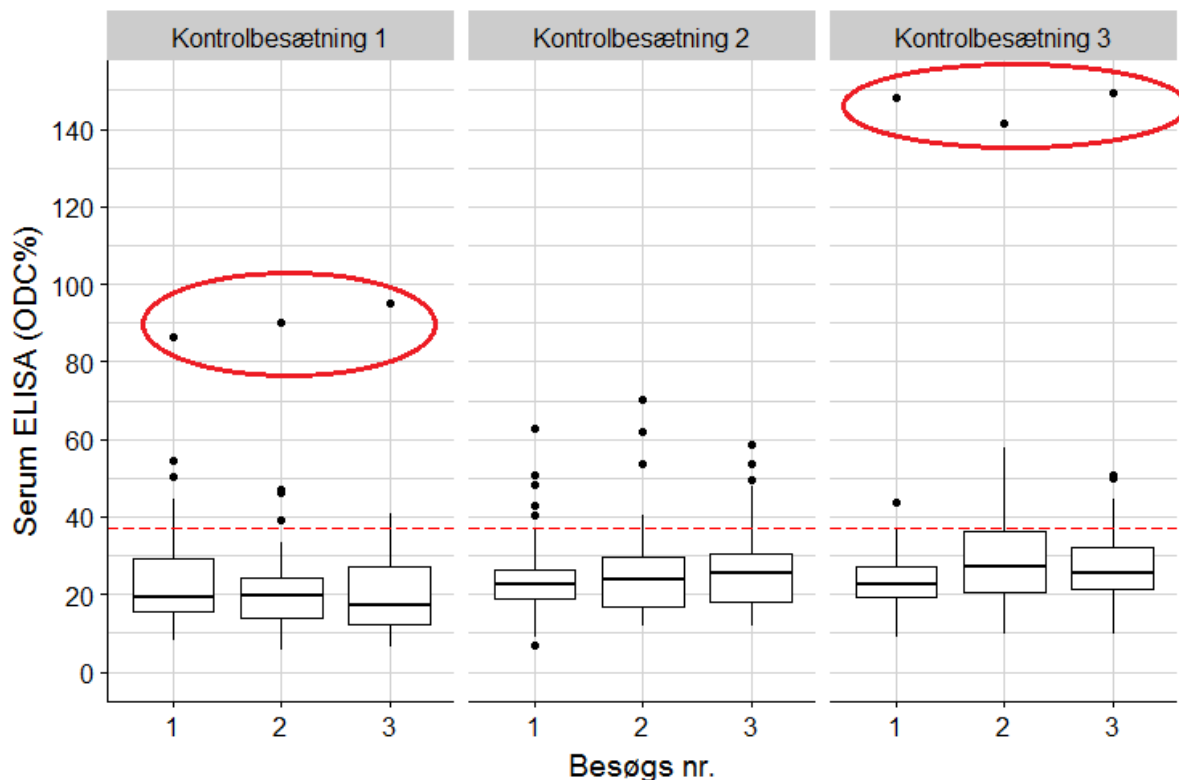
Appendix III: Tildeling af "Falsk Dag 0"

Køerne i gruppen "Ingen klinik grundet *Mycoplasma bovis*" har fået en beregnet Dag 0. "Falsk Dag 0" er lavet på besætningsniveau ud fra de andre gruppers sande Dag 0. Beregningen er foretaget i programmet R med pakken dplyr og funktionen "mutate".



Figur III: Fordeling af start af kliniske tegn i udbrudsbesætningerne. De øverste dele af figurerne for hver besætning "Falsk" viser fordelingen af køer i gruppen "Ingen klinik grundet *Mycoplasma bovis*", som har fået en "Falsk Dag 0". Den nederste del af figuren "Sandt" beskriver fordelingen af "Dag 0" hos dyr med kliniske tegn der enten antages at være eller mistænkes at skyldes *Mycoplasma bovis*.

Appendix IV: ELISA-resultater på serum med BIO-X K302 i kontrolbesætninger fra "Intern rapport om Mycoplasma-antistofresultater i pilotprojekt 2012" af Liza Rosenbaum Nielsen



Figur IV: Boxplot af BIO-X K302 ELISA-resultater for *Mycoplasma bovis* antistoffer i serum hos køer i tre kontrolbesætninger fra et tidligere studie "Intern rapport om Mycoplasma-antistofresultater i pilotprojekt 2012" af Liza Rosenbaum Nielsen. Der er 400 ELISA-resultater fra i alt 154 køer fordelt på de tre besætninger. Hver besætning havde tre besøg og disse er angivet som "Besøgs nr." på x-aksen. Besøgene lå med fire til syv ugers mellemrum. De røde ringe om punkter i besætning 1 og 3 markerer gentagne høje målinger på hver ét dyr. Den røde horisontale stiplede linje angiver producentens grænseværdi på 37 ODC%. Generelt ses at minimum 75% af serum ELISA-resultater ligger under grænseværdien 37 ODC% på alle besøg i kontrolbesætningerne.

Data fra kontrolbesætninger og udbrudsbesætninger		
	Kontrolbesætninger fra ”Intern rapport om Mycoplasma-antistofresultater i pilotprojekt 2012” af Liza Rosenbaum Nielsen.	Dette studies rådata: Ikke MB gruppe + Muligvis gruppe
Antal dyr	154 dyr	60 dyr
Antal observationer	400 observationer	251 observationer
1. Kvartil (angivet i ODC%)	16 ODC%	14 ODC%
Median (angivet i ODC%)	22 ODC%	21 ODC%
Gennemsnit (angivet i ODC%)	26 ODC%	27 ODC%
3. Kvartil (angivet i ODC%)	30 ODC%	34 ODC%
Maksimal værdi (angivet i ODC%)	149 ODC%	129 ODC%

Tabel IV: Sammenligning af data fra Ikke MB gruppen sammenlagt med Muligvis gruppen fra dette studie og kontrolbesætninger fra tidligere studie. Det ses at gennemsnit i de to studier ligger meget tæt på hinanden mens tredje kvartil i vores studie ligger højere.