



Sammenhæng mellem *Fasciola hepatica* og *Salmonella* Dublin infektioner i danske malkekvægsbesætninger



Veterinært speciale 27 ETCS point

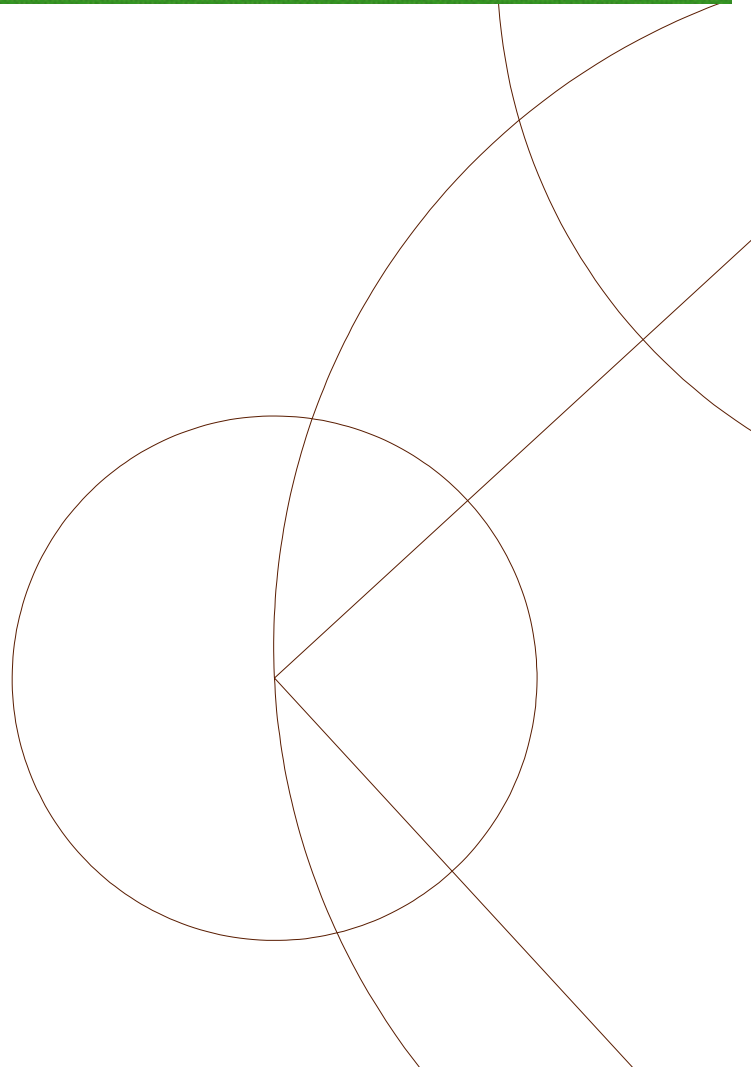
Marianne Karlsen V8933

Vejledere:

Stig Milan Thamsborg
Professor, dyrlæge, ph.d.,
Institut for Veterinær Patobiologi

Liza Rosenbaum Nielsen
Lektor, dyrlæge, ph.d.,
Institut for Produktionsdyr og Heste

Maj 2007



FORORD

Dette speciale er udført ved Institut for Veterinær Patobiologi ved Det Biovidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet (tidligere Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole) i vinteren og foråret 2006-2007. Hensigten med denne rapport er formidle resultaterne fra specialet til alle interesserede, men den henvender sig primært til dyrlæger og andre rådgivere samt dyrlægestuderende med interesse for *Fasciola hepatica* og *Salmonella* Dublin infektioner hos kvæg.

En del af specialets praktiske del har bestået af besætningsbesøg og indsamling af blod- og fæcesprøver. Jeg vil derfor gerne takke ejerne af de syv besætninger, for uden jeres velvillige deltagelse og hjælp, havde specialet ikke været muligt at gennemføre. Der skal også lyde et stort tak til de involverede dyrlæger for hjælp til at finde besætningerne. Også mange tak til mælke kvalitetsrådgivere Bendt Frederiksen, Benny Sørensen, Bent Truelsen, Jan Nelson, Jan Støve, Lars Mortensen og Steen Eriksen fra Dansk Kvæg, der alle var til meget stor hjælp ved besætningsbesøgene.

En stor tak skal også lyde til ”my staff”, Lei Hou (Holly), Marianne Holler, Sofie Nissen og Kurt Bach, der sammen med laborant Pernille Brice Larsen har gjort et stort stykke arbejde med at undersøge fæcesprøverne for æg. Ligeledes tak til laborant Niels Peter K. Hansen for hjælp til at køre ELISA.

Tak til Eurofins, Holstebro, for omhædling af serumprøverne, hvilket var en meget stor hjælp.

For finansiering takkes Dansk Kvæg, men også tak til Landbrugets Hundefond for deres tilskud.

Til sidst, men absolut ikke mindst, vil jeg gerne takke mine vejledere Stig Milan Thamsborg og Liza Rosenbaum Nielsen for vejledning, støtte og hjælp under hele processen. Også mange tak til Liza for hjælp i forbindelse besætningsbesøgene.

Frederiksberg den 7. maj 2007

Marianne Karlsen V8933

SAMMENDRAG

Det primære formål med dette veterinære speciale er at undersøge, om der er en sammenhæng mellem leverikte, *Fasciola hepatica*, og *Salmonella* Dublin infektioner i dansk malkekvæg. To metoder til diagnosticering af *Fasciola hepatica* blev anvendt og sammenlignet. Endvidere blev der foretaget kliniske registreringer for påvise en eventuel effekt af infektion med *Fasciola hepatica* på dyrenes sundhed og vækst.

Projektet blev udført som et observationelt studie i syv malkekvægsbesætninger, hvor der var kendt forekomst af begge infektioner. I hver besætning blev der udtaget prøver fra omkring 50 kvier (8-36 måneder) i december 2006, januar og ultimo februar/primo marts 2007 efter deres første sæson på græs (FGS) (N=182) eller anden sæson på græs (SGS) (N=155). Der blev udtaget blodprøver fra de udvalgte kvier og serum blev undersøgt for specifikke antistoffer mod hver af de to infektioner. Fæcesprøver blev udtaget fra 10 FGS og 10 SGS kvier i hver besætning og undersøgt for *Fasciola hepatica* æg ved sedimentation. Ved hvert besøg blev der også foretaget kliniske registreringer (hårlag, huld, størrelsesmålinger) på kvierne.

Prævalensen af *Fasciola hepatica* fundet ved ELISA var gennemsnitlig 40% med stor variation mellem besætningerne (12-89%). Der var en højere prævalens blandt kvier efter SGS end hos kvier efter FGS. Studiet viste også, at forekomsten af *Fasciola hepatica* indenfor besætningen afhang af, hvilken mark kvierne havde græsset. Prævalensen af *Fasciola hepatica* baseret på æg i fæces var 28% og dermed markant lavere end ved ELISA, hvilket også er fundet ved andre studier. En logistisk analyse viste, at påvisning af æg, antal sæsoner på græs og besætning var signifikante risikofaktorer for at være *Fasciola hepatica* positiv ved ELISA. I tre af de syv besætningerne var der meget begrænset smitte med *Salmonella* Dublin blandt ungdyrene og i alt blev kun 22 kvier (6,7%) klassificeret som tilhørende risikogruppe I (høj risiko for fækal udskillelse). Antallet af dyr i risikogruppe I var lavere end forventet og varierede mellem 0-6 i hver besætning. Baseret på *Fasciola hepatica* ELISA og *Salmonella* Dublin risikogrupper blev der ikke fundet nogen signifikant sammenhæng mellem de to infektioner. Resultaterne viste dog en tendens til lavere prævalens af *Salmonella* Dublin blandt *Fasciola hepatica* ELISA positive kvier. På grund af det lave antal af kvier med begge infektioner var det ikke muligt at drage nogen endelig konklusion.

Ud fra målinger af kviernes størrelse blev der estimeret en vægt. Vægten fundet ud fra brystomfanget antages at stemme bedst overens med den forventede vægt. Effekten af risikofaktorerne alder, besætning og *Fasciola hepatica* ELISA status på den estimerede vægt blev evalueret, og der blev fundet en interaktion mellem besætning og *Fasciola hepatica* ELISA status. Det kan skyldes besætningsforskelle i fordring, management og indvirkning af andre sygdomme på kviernes størrelse. Kun i en af de syv besætninger var *Fasciola hepatica* infektion forbundet med en signifikant lavere estimeret vægt.

Det kan konkluderes, at dette studie ikke fandt en sammenhæng mellem de to infektioner og dermed stemmer overens med et tidligere studie udført på dyreniveau. Resultatet er derimod i modsætning til de to studier udført på besætningsniveau, som fandt en sammenhæng mellem de to infektioner. Det synes derfor mest sandsynligt, at denne sammenhæng skyldes eksterne faktorer. Resultaterne viste også, at *Fasciola hepatica* ELISA var en anvendelig diagnostisk metode sammenlignet med den traditionelle metode med påvisning af æg i fæces. Endvidere kan det konkluderes, at *Fasciola hepatica* infektion kan have negative effekt på kviernes vækst under vise forhold.

SUMMARY

The primary aim of this veterinary master thesis was to investigate if there was an association between liver fluke, *Fasciola hepatica*, and *Salmonella* Dublin infections in Danish dairy cattle. Two diagnostic methods for *Fasciola hepatica* were evaluated and compared. Furthermore, clinical registrations were performed to evaluate the possible effect of *Fasciola hepatica* infection on the health and growth of the animals.

The investigation was undertaken as a field study involving seven dairy herds with a known history of both infections. At each farm, approximate 50 heifers (aged 8-36 months) were sampled in December 2006, January and late February/early March 2007 following their first grazing season (FGS) (N=182) or second grazing season (SGS) (N=155). At each sampling, serum was obtained and analysed for specific antibodies against both infections. Faecal samples were collected from 10 FGS and 10 SGS heifers in each herd and analysed for *Fasciola hepatica* eggs by sedimentation. At each visit, clinical registrations (hair coat score, body condition score and size measurements) were performed on random selected heifers.

The prevalence of *Fasciola hepatica* infection as determined by ELISA was on average 40% with large variation between herds (12-89%). There was a higher prevalence among SGS heifers than FGS heifers. The study also showed that the distribution of *Fasciola hepatica* within herds was highly dependent on which paddock the heifers had been grazing. Based on detection of eggs, the overall prevalence of *Fasciola hepatica* was on average 28% and thus markedly lower than by ELISA, a result which is supported by other studies. A logistic analysis showed that faecal egg count, number of seasons on pasture and herd were significant risk factors for being *Fasciola hepatica* positive by ELISA. In three of the seven herds, *Salmonella* Dublin transmission was very limited among the young stock and in total only 22 heifers (6.7%) could be classified as belonging to risk group I (high risk of faecal shedding). The number of risk group I heifers was lower than expected and varied from 0 to 6 in each herd. No significant association between the two infections based on the *Fasciola hepatica* ELISA status and *Salmonella* Dublin risk groups was found, although the results showed a small tendency towards lower prevalence of *Salmonella* Dublin in *Fasciola hepatica* ELISA positive heifers. It was, however, not possible to draw any final conclusions on this matter due to the limited number of heifers with both infections.

An estimated weight was calculated by using size measurements (heart girth and croup height). The weight estimated by heart girth seemed to be most correct compared to the expected weight. The effect of the risk factors age, herd and *Fasciola hepatica* ELISA status on the estimated weight were evaluated. An interaction was found between herd and *Fasciola hepatica* ELISA status. This could be due to herd differences in feeding, management and the influence of other diseases' on the size of the heifers. Only in one of the seven herds, *Fasciola hepatica* status was associated with a significantly lower estimated weight.

In conclusion, this study did not find any association between the two infections and is therefore in agreement with a previous study conducted at the animal level. However, the results are contrary to two other studies that found an association between the two infections when investigations were conducted at the herd level. Therefore, it seems most likely that the association is due external factors. The results also showed that *Fasciola hepatica* ELISA was useful as a diagnostic test when compared to the traditionally used method of faecal egg count. Furthermore, it can be concluded that the *Fasciola hepatica* infection may have a negative effect on the growth rate of heifers under some circumstances.

INDHOLDSFORTEGNELSE:

FORORD	I
SAMMENDRAG	III
SUMMARY	V
1. INDLEDNING.....	1
2. TEORI	5
2.1. <i>Fasciola hepatica</i>	5
2.1.1. Livscyklus	5
2.1.2. Patogenese og symptomer	6
2.1.3. Betydning af kronisk infektion hos kvæg	6
2.1.4. Immunitet og antistofproduktion.....	7
2.1.5. Diagnostik	9
2.1.6. Udbredelse af <i>Fasciola hepatica</i> i kvæg.....	12
2.2. <i>Salmonella</i> Dublin.....	13
2.2.1. Patogenese og symptomer.....	13
2.2.2. Persisterende smittebærere.....	14
2.2.3. Immunrespons	15
2.2.4. Diagnostik	16
2.2.5. Epidemiologi.....	18
2.3. Sammenhæng mellem <i>Fasciola hepatica</i> og <i>Salmonella</i> Dublin infektioner	19
2.3.1. Eksperimentelle studier	19
2.3.2. Epidemiologiske studier	20
2.4. Litteraturliste.....	22
3. MANUSCRIPT	33
3.1. Introduction	33
3.2. Materials and methods.....	34
3.2.1. Study design and sampling.....	34
3.2.2. Analyses of samples.....	36
3.2.2.1. <i>Fasciola hepatica</i> ELISA	36
3.2.2.2. Faecal egg count	36
3.2.2.3. <i>Salmonella</i> Dublin ELISA	37
3.2.3. Statistical analyses	38
3.3. Results.....	39
3.3.1. Evaluation of <i>Fasciola hepatica</i> ELISA	39
3.3.2. Prevalence of <i>Fasciola hepatica</i>	40
3.3.2.1. Serology	40
3.3.2.2. Faecal egg count	46

3.3.2.3. Association between <i>Fasciola hepatica</i> ELISA and faecal egg count results	48
3.3.2.4. Model for the probability of being <i>Fasciola hepatica</i> positive by ELISA	49
3.3.4. <i>Salmonella</i> Dublin ELISA	52
3.3.5. Association between <i>Fasciola hepatica</i> and <i>Salmonella</i> Dublin	57
3.4. Discussion	58
3.5. References	64
4. KLINISKE REGISTRERINGER	69
4.1. Introduktion	69
4.2. Materialer og metoder	69
4.2.1. Studiedesign	69
4.2.2. Kliniske registreringer	70
4.2.2.1. Hårlag	70
4.2.2.2. Huld	70
4.2.2.3. Hoftebredde	70
4.2.2.4. Krydshøjde	70
4.2.2.5. Brystomfang	71
4.2.2.6. Estimeret vægt	72
4.2.2.7. Fæceskonsistens	73
4.2.3. Statistiske analyser	73
4.3. Resultater	74
4.3.1. Hårlag	74
4.3.2. Huld	74
4.3.3. Krydshøjde	75
4.3.4. Brystomfang	78
4.3.5. Estimeret vægt	79
4.3.6. Sammenhæng mellem <i>Fasciola hepatica</i> status og estimeret vægt	81
4.5. Diskussion	86
4.6. Litteraturliste	90
5. KONKLUSION	93
6. PERSPEKTIVERING	95
7. BILAG	97
Bilag 1 SAS program samt output	97
Bilag 2 Skala til huldvurdering	99
Bilag 3 Billeder	101

1. INDLEDNING

Siden 2002 har der været et nationalt overvågningsprogram for *Salmonella* Dublin i Danmark. Det skyldes kvægbranchens og myndighedernes ønske om at begrænse sygdommen, der både har sundhedsmæssig og økonomisk betydning for mange af de inficerede besætninger. Derudover er der tale om en alvorlig zoonose, der primært smitter via fødevarer. Dansk Kvæg har netop lanceret en saneringskampagne med det mål, at *Salmonella* Dublin skal være udryddet i Danmark i 2014. Der er derfor i disse år øget fokus, hvordan der bedst muligt saneres for infektionen i ramte besætninger. Blandt andet er der fokus på persistens af infektionen i nogle besætninger. I april 2007 var ca. 16,5% af malkekvægsbesætningerne i Danmark sandsynligvis smittede med *Salmonella* Dublin.

I de senere år er der set en stigning i forekomsten af leverikter, *Fasciola hepatica*, i Danmark og det anses, at infektionen er tilstede i hver fjerde besætning. Samme tendens er observeret i andre europæiske lande, hvor infektionen også spreder sig til ikke tidligere inficerede områder. Årsagerne til den øgede forekomst og udbredelse er ikke kendt, men det foreslås, at faktorer som klimaændringer, øget afgræsning af marginaljorde og nedsat behandlingsfrekvens kan have betydning. Effekten af infektion med *Fasciola hepatica* hos kvæg undervurderes ofte. Flere studier har vist, at infektionen har betydning for blandt andet tilvækst, fertilitet og mælkeydelse og derved får økonomisk betydning i kvægbesætninger, når den ikke håndteres.

Eksperimentelle studier indikerer, at infektion med *Fasciola hepatica* øger modtageligheden for *Salmonella* Dublin hos kvæg og forlænger udskillelsen af bakterier hos kvæg, der bliver eksperimentelt inficeret med *Salmonella* Dublin. Der er ligeledes foretaget flere observationelle epidemiologiske studier med varierende konklusioner, men flere af studierne indikerer, at der er en sammenhæng mellem de to infektioner. Det er derfor interessant at undersøge denne problematik nærmere. Hvis infektion med *Fasciola hepatica* har betydning for forekomst og persistens af *Salmonella* Dublin hos kvæg, kan det være med til at besværliggøre indsatsen mod *Salmonella* Dublin i de besætninger, som forsøger at udrydde infektionen.

Det overordnede formål med dette projekt er derfor:

- At undersøge om der er en sammenhæng mellem forekomst af *Fasciola hepatica* infektion og *Salmonella* Dublin infektion på individniveau i syv danske malkekvægsbesætninger, som formodes at have begge infektioner ud fra serologiske undersøgelser og slagtefund.

For at kunne undersøge denne sammenhæng var det nødvendigt at opnå bedre forståelse for fortolkningen af de diagnostiske resultater for *Fasciola hepatica*. Derfor blev projektet tilføjet følgende delformål:

- At evaluere og sammenligne de to anvendte metoder, ELISA og påvisning af æg, til diagnosticering af *Fasciola hepatica*.
- At undersøge hvilke faktorer, der påvirker sandsynligheden for at være *Fasciola hepatica* ELISA-positiv.

Endelig var det interessant at få undersøgt, om der i projektbesætningerne kunne påvises en effekt af infektion med *Fasciola hepatica* på vægten hos kvierne. Delformålet kan præciseres som:

- At undersøge om der er en sammenhæng mellem infektion med *Fasciola hepatica* og de kliniske registreringer for vægt foretaget på kvier i alderen 10-30.

Dataindsamlingen foregik i syv malkekvægsbesætninger. Studiet blev tilrettelagt som en tværsnitstudie med follow-up, hvor hver besætning blev besøgt tre gange i løbet af studieperioden fra december 2006 til marts 2007. Der blev udtaget prøver til diagnostik fra en stikprøve af kvier samt foretaget kliniske registreringer (hårlag, huld, hoftebredde, krydshøjde, brystomfang og fæcescore).

Et observationelt studie blev valgt for at afspejle forholdene i danske besætninger under naturlige forhold. Valg af besætninger er begrundet med, at det kun var interessant at undersøge besætninger, hvor begge infektioner var til stede. Undersøgelsen blev koncentreret om kvierne, da det oftest er den aldersgruppe, som bliver inficeret med *Fasciola hepatica*. De gentagne prøveudtagninger i løbet af studieperioden skyldes ønsket om øget sikkerhed vedrørende de enkeltes kviers infektionsstatus. De kliniske registreringer blev udført for at få mål på kviernes trivsel og sundhed, og dermed mulighed for at påvise en effekt af *Fasciola hepatica* infektion.

Teoriafsnittet er et litteraturstudie skrevet på dansk og omhandlende *Fasciola hepatica* og *Salmonella* Dublin. Her gennemgås de væsentligste aspekter vedrørende klinik, immunitet, diagnostik og epidemiologi for hver af de to infektioner samt en gennemgang af de tidligere undersøgelser, som omhandler sammenhængen mellem de to infektioner. Rapportens tredje afsnit er skrevet som et manuskript på engelsk med henblik på publikation i et internationalt tidsskrift. Det

beskriver projektets resultater om brug af de diagnostiske metoder, forekomst af de to infektioner og deres eventuelle sammenhæng. Til specialerapporten er det for helhedens skyld prioriteret at medtage de fleste resultater. Et manuskript til publikation vil skulle reduceres til kun at indeholde de væsentligste resultater. Herefter følger et afsnit på dansk om de kliniske registreringer, der er foretaget i studieperioden og deres sammenhæng med *Fasciola hepatica* infektion. Til sidst afsluttes med den sammenfattende konklusion for hele specialet og en perspektivering.

2. TEORI

2.1. *Fasciola hepatica*

På dansk kaldes *Fasciola hepatica* også den store leverikte (Monrad & Nansen, 1994), og den tilhører ordenen Digena, som er en del af klassen Trematoda (ikter). *Fasciola hepatica* er årsag til sygdommen fasciolose, der er udbredt blandt husdyr, især hos får og kvæg. Der er dog tale om et meget bredt værtsspektrum, som også inkluderer mennesket, men i det følgende er hovedvægten lagt på infektion hos kvæg. Parasitten er udbredt på verdensplan og har stor økonomisk betydning (Roberts & Janovy, 2005). En undersøgelse opgør det gennemsnitlige tab per inficeret dyr til at være € 299 under schweiziske forhold (Schweizer *et al*, 2005).

2.1.1. Livscyklus

Fasciola hepatica har en indirekte livscyklus. Mellemværten er snegle af slægten af *Lymnaea* og under danske forhold pytsneglen, *Lymnaea truncatula* (Monrad & Nansen, 1994, Andrews, 1999).

I slutværten, der er et pattedyr, lever de voksne ikter i leverens galdegange og deres æg kommer ved hjælp af galden ud i tarmen og udskilles i fæces (Roberts & Janovy, 2005). Den videre udvikling af ægget afhænger af omgivelsernes temperatur, fugtighed, iltniveau samt pH. Ægget klækkes, når det første larvestadie, miracidiet, er udviklet. Miracidiet svømmer i vand eller i vandfilm på planter o. lign. ved hjælp af sine cilier for at finde en mellemvært, pytsneglen. Da miracidiet ikke er i stand til at optage føde, skal det ske inden for omkring et døgn. Efter miracidiet har trængt ind i mellemværten sker der en ukønnet opformering, og miracidiet udvikles til en sporocyst, hvori næste larvestadie, redier, udvikles ud fra nogle kimcentre. På tilsvarende vis udvikles der i redierne cercarier, der er det sidste larvestadie. Disse frigives fra mellemværten og omdannes til infektive metacercarier ved at encystere sig på vegetationen. Slutværten æder vegetationen med metacercarierne og disse excystrer i tarmen, hvorefter de juvenile ikter penetrerer tarmvæggen. De bevæger sig nu rundt i abdomen, indtil de når leveren (Roberts & Janovy, 2005). De juvenile ikter borer sig rundt i leveren, hvilket medfører blødning og fibrose. Omkring syv uger efter optag af metacercarierne, når ikterne galdegangene, hvor de udvikles til voksne ikter (Andrews, 1999).

Angående infektion af mellemværten er der under danske forhold to typer af snegleinfektion, en sommerinfektion og en vinterinfektion. Sidstnævnte finder sted om eftersommeren, men overvejende på grund af den lave temperatur færdigudvikles redier og cercarier ikke før næste forår. Smitten i sneglene kan således overføres fra en græsningsæson til den næste. Sommerinfektion af sneglene finder sted om foråret og sommeren. Udviklingen på denne årstid tager seks-otte uger, så der er nye metacercarier hen på sensommeren og efteråret. Sommerinfektionen har størst betydning i Danmark og derfor topper mængden af metacercarier fra juli-august og frem til oktober (Shaka & Nansen, 1979).

2.1.2. Patogenese og symptomer

Akut fasciolosis resulterer ofte i pludselig død uden andre kliniske symptomer. Det er sjældent hos kvæg, men forekommer hyppigere hos får. Hvis sygdom ses, er symptomerne sløvhed, slaphed, mangel på appetit, blege ødematøse slimhinder og smerte ved palpation i leverregionen (Radostits *et al*, 2000). Dette skyldes et meget stort antal juvenile ikter i leverparenchymet og ses derfor typisk i det sene efterår og tidlig vinter (Mitchel, 2002).

På samme tidspunkt af året er der beskrevet tilfælde af subakut fasciolosis hos får, hvor der er mange juvenile ikter i leverparenchymet, men dog færre end ved de akutte tilfælde. Forløbet er længere, hvor fårene har symptomer en-to uger før de dør (Mitchel, 2002). Overvejende består symptomerne af vægttab og blege slimhinder. I få tilfælde ses der også submandibulært ødem (Radostits *et al*, 2000).

Tilfælde med kronisk fasciolose ses hos både får og kvæg senere på vinteren og først på foråret. Hvis der ses kliniske symptomer er det normalt vægttab, anæmi, hypoalbuminæmi, og skyldes de voksne ikter i galdegangene (Mitchel, 2002).

2.1.3. Betydning af kronisk infektion hos kvæg

Hos kvæg er kronisk fasciolose ofte subklinisk (Mitchel, 2002), og der er derfor tendens til dens betydning undervurderes. Forsøg viser dog, at infektion med *Fasciola hepatica* mindsker tilvæksten. Et eksperimentielt studie har angivet, at en lavgradig infektion (600 metacercarier) reducerer tilvæksten med 8% i de første fire måneder og en højgradig infektion (1000 metacercarier) medfører en reduceret tilvækst på 28% (Hope Cawdery *et al*, 1977). Samme forfatter

har dog tidligere (Hope Cawdery & Conway, 1971) vist i et pilotstudie, at inficerede dyr voksede mere end kontroldyrene i perioden 4-16 uger efter infektionen.

Andre (Oakley *et al*, 1979) har tillige vist, at en signifikant reduktion i tilvækst blandt inficerede kvier sammenlignet med kontrolgruppen, hvilket svarede til at de inficerede kvier gennemsnitlig var 42 dage mere om at nå den ønskede vægt på 330 kg ved samme fodring i de to grupper.

Ifølge flere studier har infektion med *Fasciola hepatica* også indflydelse på fertiliteten. Oakley *et al* (1979) fandt, at konceptionsraten var signifikant højere hos kvier uden leverikter sammenlignet med inficerede kvier. Tilsvarende er det vist, at første brunst optræder 39 dage senere hos inficerede kvier i forhold til de ikke-inficerede kvier (López-Díaz *et al*, 1998). Denne forskel kunne skyldes den langsommere vækst på grund af infektionen med *Fasciola hepatica*, men forsøget viste, at serumkoncentrationen af østrogen var forøget hos de inficerede kvier og dermed afvigede i forhold til det normale niveau. En nyere undersøgelse (Charlier *et al*, 2007) viser også, at jo højere niveau af antistoffer mod *Fasciola hepatica* i tankmælken desto længere er kælvningsintervallet i besætningen.

Et studie (Black & Floyd, 1972) antyder, at behandling for leverikter vil medføre en forbedret mælke kvalitet/tørstof i mælken. På besætningsniveau er der en sammenhæng mellem et stigende niveau af antistoffer mod leverikter i tankmælken og et fald i henholdsvis gennemsnitlig årlig ydelse og mælkens fedtprocent (Charlier *et al*, 2007). Der er dog ingen tilsvarende sammenhæng med mælkens proteinprocent.

2.1.4. Immunitet og antistofproduktion

Kvæg er tilsyneladende mere resistente over for *Fasciola hepatica* end får (Boray, 1969), hvilket også kan ses af den overnævnte beskrivelse af symptomer. Hos får kan leverikter leve i galdegangene i op til 11 år (Malone, 1986), mens forsøg har vist, at leverikter har en begrænset levetid i galdegangene hos kvæg (Ross, 1968, Doyle, 1971). Ved obduktion 21 måneder post infectio (p.i.) (med 200 metacercarier) var antallet af leverikter reduceret med 75% sammenlignet med dyr obduceret 2-4 mdr. p.i.. Faldet i antal af ikter viste sig også ved et fald i ægudskillelse. Tre måneder p.i. havde alle atten dyr æg i fæces og havde maksimal udskillelse frem til 8 mdr. efter infektionen. Derimod var der ingen æg i 50% af prøverne 10-18 mdr. efter infektionen og tilsvarende var der ingen æg i 70% af prøverne 18-26 mdr. p.i.. (Ross, 1968). Ved et andet forsøg

blev antallet af leverikter fundet i leveren reduceret med 85% mellem 16 og 30 uger efter en enkelt infektion med 750 metacercarier (Doyle, 1971).

Det er også vist, at kvæg er mere resistente ved reinfektion (Boray, 1969, Doyle, 1971, Hope Cawdery *et al*, 1977, Kendall *et al*, 1978). Et forsøg har angivet, at antallet af leverikter i leveren blandt reinficerede dyr kun udgjorde 16% af antallet fundet hos kontroldyrene, som ikke havde været inficeret tidligere (Doyle, 1971). Et andet studie fandt samme grad af resistens, da man kun fandt 18% af leverikterne hos de reinficerede kalve sammenlignet med antallet af leverikter hos enkeltinficerede kalve (Kendall *et al*, 1978). Tilsvarende er fundet af både Boray (1969) og Hope Cawdery *et al* (1977). Et eksperimentelt studie angiver, at modstanden mod reinfektion skyldes mekanismer i forbindelse med penetrering af leveren eller lige efter (Doy & Hughes, 1984).

Resultatet af et nyere studie (Clery *et al*, 1996) stemmer dog ikke overens med de ovennævnte studier. I det studie var antallet af leverikter fundet post mortem hos to kvier, der var inficeret en gang, og hos seks køer, der var kronisk inficeret med *Fasciola hepatica*, og som blev reinficeret, stort set ens. Det kan skyldes, at dyrene blev inficeret med flere små doser (50 metacercarier) over 10 dage modsat de andre forsøg, hvor de blev inficeret med en stor dosis (>500 metacercarier). Dette kunne tyde på, resistens mod reinfektion ikke udvikles under naturlige forhold med naturlig smitte (Clery *et al*, 1996).

Kvæg, der er inficeret med *Fasciola hepatica*, begynder at producere antistoffer omkring 13 dage p.i. og antistoftiteren stiger frem mod 100 dage p.i. Der er dog ikke påvist sammenhæng mellem antistofniveauet og antallet af leverikter fundet post mortem (Leclipteux *et al*, 1998). Et studie indikerer dog, at lav infektionsdosis kan medføre, at antistoftiteren først stiger 5-7 uger p.i. (Cornelissen *et al*, 1999). Flere undersøgelser viser, at antistofniveauet falder langsomt efter, at leverikterne er migreret til galdegangene (Movesesijjan *et al*, 1975, Levieux *et al*, 1992b). Hvis der behandles mod leverikter, sker der et hurtigere fald i antistofniveauet i 4-6 måneder efter (Levieux *et al*, 1992b, Castro *et al*, 2000). Tilsvarende stiger antistoftiteren igen efter reinfektion (Castro *et al*, 2000). Et studie fra Peru finder endvidere, at der er små udsving i antistofniveauet hos kvier og køer sammenfaldende med sæsonændringer i smitteniveauet (Ortiz *et al*, 2000).

2.1.5. Diagnostik

En simpel diagnostisk metode er påvisning af æg i fæces. Det er dog først muligt, når der er voksne ikter i galdegangene som kan producere æg, dvs. fra 10-12 uger efter infektionen (Torgorson, 1999). Ved et eksperimentelt forsøg begyndte de første kvier at udskille efter 10 uger efter infektion, men hovedparten udskilte først efter 15 uger og de sidste først efter 17 uger (Oakley *et al*, 1979). Tilsvarende falder/begrænses ægudskillelsen fra omkring 10 måneder p.i., da leverikterne, som nævnt tidligere, har begrænset levetid i kvæg (Ross, 1968, Doyle, 1971). Generelt er ægudskillelsen lav hos kvæg (Boray, 1969, Bouvry & Rau, 1986), men den er især lav hos voksne dyr på grund af deres øgede resistens mod infektionen (Boray, 1969, Malone, 1986). Det er fundet, at udskillelsen af æg varierer fra dag til dag (Boray, 1969), men et studie indikerer også, at udskillelsen kan variere i løbet af et døgn (Dorshman, 1956). En ældre dansk undersøgelse (Henriksen & Pilegaard-Andersen, 1979) viser, at der er sæsonvariation i den procentvise forekomst af æg-positive prøver, og de topper i december-marts. Det hænger fint sammen med at smitten er størst sidst på græsningssæsonen (Shaka & Nansen, 1979). Tilsvarende sæsonvariation i prævalens af æg i fæces er fundet i et andet studie (Bouvry & Rau, 1986), hvor man også fandt, at det gennemsnitlige antal æg fulgte samme mønster.

Der er udviklet flere metoder til påvisning af æggene, men fordi der er tale om tunge æg er sedimentation mest anvendelig (Torgorson, 1999). Ved sedimentation af fæcesprøver med et kendt antal æg var det kun muligt at finde omkring 30% (Happich & Boray, 1969). En nyere undersøgelse har vist, at sensitiviteten er 69% og specificiteten er 98,3% ved sedimentation af 10 g fæces, og sensitiviteten forøges til 89,6% hvis samme fæcesprøve undersøges tre gange (30 g), mens specificiteten falder en smule til 97,8% (Rapsch *et al*, 2006).

Der er beskrevet flere serologiske teknikker til diagnosticering af leverikter, hvoraf de fleste er variationer af ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) (Dorchies, 2006). I dette speciale vil fokus blive lagt på studier vedrørende antistoffer mod antigen "f2", der er et tegument-antigen fra *Fasciola hepatica* (Hillyer, 1980), og undersøgelser, hvor det kommercielle ELISA-kit fra Institut Pourquier, Montpellier, Frankrig bliver evalueret. Dette skyldes, at det nævnte ELISA-kit er anvendt i projektets praktiske del.

Et studie viser, at der er god overensstemmelse med forekomsten af leverikter diagnosticeret ved hhv. fund i leveren ved slagtning eller ægudskillelse i fæces og fund af antistoffer mod antigen "f2" i serum (Levieux *et al*, 1992a). Hos kalve, der blev eksperimentelt inficeret (med 700

metacercarier), begyndte antistoftiteren mod "f2" at stige 2-4 uger p.i. og fortsatte med at stige markant frem til 6 uger p.i.. Efter 14 uger nåede den et plateau og forblev på det niveau til forsøget sluttede (28 uger). Ligeledes var der en stigning i antistoftiteren hos kalve, som blev naturligt inficeret på marken. Dyrene blev lukket på græs i april og allerede først i juli var den gennemsnitlige antistoftiter steget. Hen i november var alle kalve positive mht. antistoffer mod antigen "f2" (Levieux *et al*, 1992c).

Det kommercielle ELISA-kit (Institut Pourquier, Montpellier, Frankrig) er blandt andet evalueret af Reichel (2002), som fandt, at seksten eksperimentelt inficerede kalve alle serokonverterede to uger p.i. og forblev seropositive hele forsøget (84 dage). Antistofniveauet i serum måles i en %S/P værdi dvs. prøvens indhold af antistoffer i procent i forhold til en positiv kontrol. Disse %S/P værdier fordelte sig i to adskilte grupper svarende til hhv. den kendt ikke-inficerede og den kendt inficerede gruppe af dyr (i alt N =296). Ved denne undersøgelse var både sensitiviteten og specificiteten meget høj (100%), når cut-off værdien var mellem 54-75 %S/P. Der blev dog ikke fundet nogen korrelation mellem ægudskillelsen, antallet af voksne ickter i leveren og ELISA responset (Reichel, 2002).

Samme ELISA-kit er også blevet evalueret af Molloy *et al* (2005) på serum og mælk. I serumprøverne fandt man et minimalt overlap i %S/P værdierne mellem gruppen af dyr fra en ikke-inficeret besætning og gruppen af dyr med udskillelse af æg i fæces. Disse resultater viste, at den anbefalede cut-off værdi på 30 %S/P var meget passende. Blandt dyrene i fem inficerede besætninger var 41,4% positive ved ELISA, mens der kun blev fundet *Fasciola hepatica* æg i fæcesprøverne (6 g undersøgt) fra 26,5% af dyrene. Der var kun et dyr ud af 86, som havde æg i fæces, men var negativ i serum ELISA. Der er altså en høj sensitivitet på 98,2% for ELISA'en blandt de dyr, hvor infektionen er bekræftet via æg i fæces. Der er også fundet en høj specificitet på 98,3%, men det er blandt dyrene i en ikke-inficeret besætning og dermed en anden population (Molloy *et al*, 2005). At sensitiviteten og specificiteten ikke er beregnet ud fra samme population blev kommenteret af Leeflang & Bosssuyt (2005), da disse testkarakteristika kan ændre sig afhængig af populationen. Det kan betyde, at specificiteten ikke er så høj i de inficerede som i de ikke-inficerede besætninger. I en schweizisk undersøgelse fandt man, at sensitiviteten var 91,7% og specificiteten 93,7% for det samme ELISA-kit. Disse tal blev beregnet ved hjælp af Bayesianske metoder, der tager højde for at ingen af testene har perfekt validitet og derfor med rimelighed kan bruges som gold standard test ved evalueringen af en anden test (Rapsch *et al*, 2006).

Der er også brugt andre metoder til diagnosticering af leverikter. Blandt andet måling af leverenzymet i blodet, hvis koncentration stiger i forbindelse med inflammation og nekrose i leveren og galdegangene (Torgerson, 1999). Ændringer i niveauet af glutamat dehydrogenase (GLDH) sker, når der er migration af juvenile ikter i leveren, mens gamma glutamyl transferase (GGT) stiger i forbindelse med skader i galdegangene. Der er således en signifikant sammenhæng mellem stigningerne og antallet af ikter fundet post mortem (Leclipteux *et al*, 1998). Desværre er disse leverenzymet ikke specifikke for infektion med *Fasciola hepatica*, men kan også skyldes andre årsager til leverskader, hvorfor det ikke er muligt at drage endelige diagnostiske konklusioner heraf (Torgerson, 1999).

Endelig er der også den mulighed at diagnosticere infektionen post mortem på baggrund af den typiske patologi med fibrose af lever og galdegange i de kroniske tilfælde (Cullen & MacLachlan, 2001), og det sker hovedsageligt i forbindelse med slagting/kødkontrol. En undersøgelse fra Schweiz viser, at sensitiviteten er 63,2% ved kødkontrol på slagteri, hvor specificitet er fastsat til 100% (Rapsch *et al*, 2006).

Der er altså stor forskel på de nævnte diagnostiske metoder. Påvisning af æg er en simpel metode med meget høj specificitet og tilstedeværelsen af æg er et sikkert tegn på en aktiv infektion. Desværre er sensitiviteten lav pga. lav ægudskillelse, men den kan øges til vis grad i takt med prøvens størrelse øges, hvilket dog er tidskrævende. Falsk-negative resultater optræder ved sedimentationstesten især i perioden mellem dyret er blevet inficeret og inden der er voksne ikter i galdegangene. Fordelen med antistofmålinger som ELISA er netop, at man kan diagnosticere sygdommen tidligere i forløbet. Til gengæld er påvisning af antistoffer ikke ensbetydende med en aktiv infektion, da antistofniveauet kun falder langsomt i forhold til antallet af ikter i galdegangene. Testen har også en høj sensitivitet og specificitet sammenlignet med de øvrige metoder.

Ved hjælp af en stigning i leverenzymet er det også muligt at påvise infektionen tidligt i forløbet, men specificiteten ved denne metode er lav, da disse ændringer ikke er specifikke for infektion med leverikter. Fund af de typiske patologiske fund i forbindelse med slagting viser, at dyret på et tidspunkt har været inficeret, men kan jo ikke bruges ante mortem og siger derfor mest noget om dyrets og besætningens status retrospektivt.

2.1.6. Udbredelse af *Fasciola hepatica* i kvæg

En undersøgelse fra 1969-71 baseret på slagtefund hos kvæg i Danmark viste, at prævalensen af leverikter var 16,5%. Der var ingen forskel på prævalensen for hvert af de tre år, men derimod var der stor geografisk variation. I Jylland var 19,6% af dyrene inficeret, mens det kun var 9,4% på Fyn og Sjælland. På Bornholm inkl. de øvrige øer var prævalensen helt nede på 1,6% (Riising *et al*, 1973).

Et andet dansk studie undersøgte forekomsten af leverikter vha. fæcesprøver i årene 1963-77. Det viste, at prævalensen faldt i perioden 1973-77, hvilket kunne hænge sammen med, at der var øget fokus på bekæmpelse og kontrol i de år, men kunne også skyldes en mindre nedbørsmængde/færre nedbørsdage end gennemsnitligt (Henriksen & Pilegaard-Andersen, 1979).

I alt var 10,4% af de over titusinde fæcesprøver, der blev undersøgt i det studie, positive for *Fasciola hepatica* æg, men der var stor variation blandt de forskellige aldersgrupper. Blandt kalvene var kun 1,5% positive, mens det var 10,1% blandt kvier/ung kreaturer og 14,4% blandt køerne. Det kan tolkes som infektion med *Fasciola hepatica* overvejende fandt sted i 2. græsningssæson under danske forhold (Henriksen & Pilegaard-Andersen, 1979). Dette kunne skyldes, at potentielt smittefarlige områder, dvs. lavtliggende fugtige græsmarker, oftest er beliggende relativt langt fra gården og kalve derfor sjældent vil komme til at græsse der (Riising 1971).

Nyere undersøgelse baseret på slagtefund hos 1,4 mio. kvæg (svarende til 85-90% af alt kvæg slagtet i perioden) kunne dog tyde på, at tendensen til faldende prævalens er vendt. I årene 2000 til 2003 er der i Danmark sket en stigning i antallet af kasserede lever som følge af leverikter fra 0,9% til 3,2% hos malkekvæg og 2,7% til 8,3% hos kødkvæg. Også i denne undersøgelse var prævalensen højest blandt de ældre dyr og der var store regionale forskelle med størst forekomst i Jylland. Samlet set var infektionen til stede i hver fjerde besætning. Hvorvidt stigningen skyldes klimaændringer, øget græsning af marginaljorde, mindre brug af anthelmintikum eller eventuelt en forbedret registrering på slagteriet er ikke nærmere undersøgt (Thamsborg *et al*, 2005).

Prævalensen i andre lande varierer meget afhængig af vejr og temperaturforhold. For eksempel er forekomsten høj i Irland pga. milde temperaturer og meget nedbør (Dorchies, 2006). Et irsk studie viste, at 65% af dyrene havde leverikter eller patologiske forandringer sfa. leverikter ved slagtning (Murphy *et al*, 2006). I et land som Schweiz er den sande prævalens på baggrund af flere diagnostiske metoder ca. 18% (Rasch *et al*, 2006). Et ældre engelsk studie viste en samlet prævalens

på 21% baseret på slagtefund, men bekræftede også at prævalensen er højest i de vestlige egne med mest nedbør (Froyd, 1975). En nyere opgørelse viser, at prævalensen har været stigende de senere år pga. mildere, fugtigere vejr samt at infektionen har spredt til de østlige egne af Skotland (Mitchell, 2002). Tilsvarende er forekomsten af *Fasciola hepatica* øget i East Anglia, England og det kan skyldes øget nedbør om sommeren samt øget afgræsning af fugtigere naturområder (Pritchard *et al*, 2005).

2.2. *Salmonella* Dublin

Salmonella enterica subspecies *enterica* serovar Dublin (*Salmonella* Dublin) er en gramnegativ bakterie, som tilhører familien *Enterobacteriaceae* (Larsen & Aalbæk, 2000) og er en af de mere end 2500 *Salmonella* serotyper der findes (Grimont *et al*, 2000). Det er kvægets værtsadopterede *Salmonella*-type (Larsen & Aalbæk, 2000) og er den hyppigste årsag til kvæg salmonellose i Danmark (Anonym, 2007a). Som nævnt i indledningen er *Salmonella* Dublin en zoonose, men den er ikke årsag til som så mange humane tilfælde som de øvrige *Salmonella* typer i Danmark. Der er dog alligevel tale om vigtig zoonose, da der er stor overdødelighed blandt de humane tilfælde (Helms *et al*, 2003).

2.2.1. Patogenese og symptomer

I langt de fleste tilfælde optages *Salmonella* Dublin oralt (Nazer & Osborne, 1977, Radostits *et al*, 2000). Smitte via konjunktiva eller luftveje er vist eksperimentelt (Nazer & Osborne, 1977), og også smitte via pattekanalen er beskrevet (Spier *et al*, 1991).

Ved oral infektion giver en dosis 10^6 - 10^8 colony forming units (CFU) akut sygdom, mens intraduodenal infektion giver tilsvarende sygdom ved en dosis på 10^4 - 10^5 CFU. Det skyldes, at den orale dosis reduceres pga. forholdene i rumen og abomasom (Nazer & Osborne, 1977). Invasionen af bakterierne sker via tarmvæggen i den terminale ileum og caecum, og der sker spredning til de lokale lymfeknuder (Hall *et al*, 1978, Radostits *et al*, 2000). Infektionens videreudvikling afhænger af faktorer som dyrets alder og immunstatus samt bakteriens virulens. Hvis der sker spredning udover de lokale lymfeknuder, sker det først til leveren og derfra videre til blodbanen. Den systemiske infektion kan dermed give anledning til septikæmi med dertil hørende symptomer (Radostits *et al*, 2000).

Salmonella Dublin kan medføre sygdom hos kvæg i alle aldre, men symptomerne ses ofte først blandt kalve mellem ti dage og tre måneder (Rings, 1985). Perakut sygdom med septikæmi er mest almindelig hos kalve op til et par uger gamle. Symptomerne er depression, toksæmi, feber, dyspnø og svaghed. Diarre kan forekomme, men er ikke almindeligt (Radostits *et al*, 2000). Oftest dør kalven med kun få kliniske symptomer indenfor 24-48 timer, men forløbet kan være helt ned til få timer (Rings, 1985).

Diarre er det dominerende symptom hos akutte infektioner hos kalve over en uge og voksne dyr (Radostits *et al*, 2000). De typiske symptomer er feber, sløvhed, manglende appetit samt diarre med blod, men der er betydelig variation (Wray & Davies, 2000). *Salmonella* Dublin kan også medføre pneumoni, polyarthritis, osteomyelitis og meningoencephalitis hos kalve (Rings, 1985).

Den kroniske form optræder ofte hos kalve ældre end 6-8 uger. Symptomerne er utrivelighed, nedsat tilvækst, løs fæces/diarre, let forhøjet temperatur samt unormalt hårlag (Rings, 1985). Som følgetilstand er tør gangrænøs nekrose af ekstremiteterne, f.eks. ørespids, halepids og distalt på benene beskrevet (Nadalian & Bolourchi, 1998, Radostits *et al*, 2000).

Hos kvæg ses også abort som følge af *Salmonella* Dublin, enten samtidig med andre symptomer eller som det eneste symptom på infektionen (Hughes *et al*, 1971). En undersøgelse viste, at abort var det eneste kliniske fund i 86 ud af 111 tilfælde af abort, hvor *Salmonella* Dublin blev fundet som agens. Hovedparten af aborterne fandt sted mellem sjette og ottende drægtigheds måned (Hinton, 1974).

2.2.2. Persisterende smittebærere

Der er en tendens til, at *Salmonella* Dublin producerer persisterende, raske smittebærere, som på engelsk betegnes carriers. Disse dyr er uden symptomer, men udskiller bakterier enten kontinuerligt eller lejlighedsvis i fæces gennem længere tid (Wray & Davies, 2000). Det er muligt at opdele smittebærerne i tre typer (Richardson, 1973):

- Passive smittebærere, som optager bakterien oralt, hvorefter den passer gennem tarmkanalen og udskilles i fæces.
- Latente smittebærere, hvor bakterien via tarmkanalen invaderer forskellige væv og bliver som en passiv infektion eventuelt med intermitterende udskillelse i fæces.
- Aktive smittebærere med en persisterende infektion i tarmen, hvilket medfører en konstant udskillelse af bakterier i fæces.

Stress menes at kunne medføre reaktivering af latent infektion samt øget udskillelse af bakterier og det underbygges af flere studier. McCaughey *et al* (1971) fandt, at der var højere forekomst af udskillelse blandt kvæg, som havde været transporteret i længere tid, sammenlignet med dyr, der havde en kort transporttid. Andre studier fandt også, at transport i syv timer medførte udskillelse af bakterier i fæces hos kalve, der ellers ikke havde udskilt i fem uger. Fund af bakterier i flere organer antydede sammen med udskillelsen af bakterier, at der var tale om latente smittebærere, som var blevet reaktiveret af transporten (Grønstøl *et al*, 1974a, Grønstøl *et al*, 1974b).

Der er ikke afklaret, hvorfor nogle dyr bliver persisterende smittebærere. Risikoen for at blive smittebærer afhænger af alder og laktationsstatus. Sandsynligheden for at blive smittebærer er højere hos dyr, der bliver inficeret som kvier (dvs. mellem et år gamle og første kælving) og køer omkring kælving (+/- 70 dage fra kælvningsdatoen) sammenlignet med køer i midt- og senlaktationen (Nielsen *et al*, 2004b).

Antallet af smittebærere varierer betydeligt mellem de forskellige undersøgelser. Ifølge Smith *et al* (1992) antages det, at 1-2% af køerne i inficerede besætninger er raske smittebærere. Tilsvarende havde omkring 3% af alle dyr en høj antistoftiter op til 17 måneder efter et *Salmonella*-udbrud (Hoorfar *et al*, 1996). Derimod fandt Nielsen *et al* (2007), at hele 7,7% af dyrene i smittede besætninger havde en persisterende høj antistoftiter og derudover havde 26,4% af dyrene en moderat høj antistoftiter i kronisk smittede besætninger.

2.2.3. Immunrespons

I forbindelse med en *Salmonella* Dublin infektion består det specifikke immunrespons både af en cellulær og humoral del (Holt, 2000), men kun produktionen af antistoffer vil blive omtalt her. Det skyldes, at antistofferne bruges i forbindelse med diagnostik.

Hos kalve i alderen 6-7 uger, som blev inficeret oralt med *Salmonella* Dublin, var der en signifikant stigning i IgM 15 dage p.i. og tilsvarende i IgG 20 dage p.i.. Antistofniveauet forblev højt under resten af studieperiodens 56 dage (Robertsson, 1984). En anden undersøgelse, at niveauet af antistoffer i serum stiger efter eksperimentel oral infektion af voksne dyr og toppes 10-76 dage p.i.. Herefter falder antistoftiteren gradvist og når det oprindelige niveau omkring 100-140 dage p.i..

Hvorimod antistof titeren forbliver høj i mere end 360 dage hos de dyr, som menes at være raske smittebærere (Smith *et al.*, 1989). Andre studier har også fundet raske smittebærere ved hjælp af vedvarende høje antistofniveauer (Spier *et al.*, 1990, Smith *et al.*, 1992).

Antistofresponset ved *Salmonella* Dublin infektion afhænger af dyrets alder. Ifølge et studie producerede kalve under 11 uger ikke antistoffer (IgG og IgM) mod *Salmonella* Dublin bakteriens lipopolysakkarider 2-4 uger p.i., mens der hos kalve over 11 uger var en stigning i antistofniveauet i samme periode (DaRoden, 1992). En korrelation mellem alder og antiniveau er også fundet i et andet studie. I en besætning blev raske smittebærere udpeget ved hjælp af gentagende høje antistofmålinger og to grupper (8 køer og 5 kalve) blev fulgt seks måneder efter udpegningen. I starten, da kalvene var 7,5 måned gamle, var deres antistofniveau signifikant lavere end blandt de otte køer. I løbet af de seks måneder steg antistofniveauet blandt kalvene og nåede samme niveau som køerne. Baggrunden for forskellen i antistofniveau kendes ikke (House, 1993).

2.2.4. Diagnostik

Salmonella Dublin kan diagnosticeres ved bakteriologisk dyrkning af fæces og organer. I et ældre studie blev bakterien isoleret fra minimum et væv post mortem hos 20,8% af 183 kalve, der var yngre end tre måneder. Blandt de kalve, som havde minimum en positiv vævsprøve, var 44,7% positive ved dyrkning fra rektalsvaber (Richardson & Fawcett, 1973). I et andet studie var kun 3,35% af fæcesprøverne positive fra otte køer, der alle var raske smittebærere ud fra gentagende høje antistofmålinger, og 17,26% var positive fra fem kalve, som også var raske smittebærere. Diagnosticering af smittebærere ved dyrkning af fæcesprøver er derfor vanskelig pga. den intermitterende udskillelse af bakterier (House *et al.*, 1993). Ved en evaluering af bakteriologisk dyrkning fra fæces, hvor specificiteten er sat til 1, var sensitiviteten 6-14% afhængig af dyrenes aldersgruppe i smittede besætninger uden klinisk udbrud (Nielsen *et al.*, 2004a).

Der er på baggrund de begrænsninger, der er ved en bakteriologiske dyrkning, udviklet andre metoder til diagnosticering, blandt andet ELISA (Barrow, 2000). I forbindelse med det danske overvågningsprogram for *Salmonella* Dublin i kvæg anvendes ELISA metoden, der er beskrevet af Nielsen & Ersbøll (2004). Det er indirekte ELISA for antistoffer mod "O"-antigen LPS. Antistofniveauet måles i %ODC, som er en baggrundskorrigeret måling af en prøves optiske densitet i forhold til en positiv kontrolprøve. Overordnet var testen god (dvs. havde det største areal

under receiver operating characteristic (ROC) kurven) hos dyrene i alderen 100-299 dage. Hos kvæg ældre end 300 dage var testen moderat god, mens den hos dyr under 100 dage var dårlig (Nielsen & Ersbøll, 2004). Et andet studie har vist, at sensitiviteten og specificiteten varierede i de nævnte aldersgrupper ved samme cut-off værdi. Ved en cut-off værdi på 50 %ODC var sensitiviteten 0,21 blandt dyrene, der var under 100 dage gamle, 0,77 hos dyrene i alderen 100-299 dage og 0,59 for dyrene over 300 dage. Specificiteten var henholdsvis 0,96, 0,95 og 0,89 for de tre aldersgrupper. Hvis cut-off værdien blev sænket til 25 %ODC steg sensitiviteten henholdsvis til 0,46, 0,85 og 0,73, mens specificiteten faldt til 0,89, 0,88 og 0,76 for de tre aldersgrupper (Nielsen *et al*, 2004a).

Udpegning af raske smittebærere kan også ske ved hjælp af antistofmålinger (ELISA) (Smith *et al*, 1989, Spier *et al*, 1990, House *et al*, 1993), da disse som nævnt havde en høj koncentration af antistoffer gennem en længere periode (måneder). Derfor anbefales tre antistofmålinger over en periode på minimum 120 dage for at afskille smittebærere fra midlertidige inficerede dyr (Smith *et al*, 1992). Der er ingen klare retningslinier for, hvornår antistoftiteren er høj, men ifølge et studie (Smith *et al*, 1989) har smittebærerne en ELISA-titer på omkring 90 ODC%.

Der er dog undersøgelser, hvor det ikke har været muligt at finde bakterien hos alle de dyr, som er identificeret som smittebærere vha. gentagne høje ELISA-målinger. I et studie med to grupper bestående af henholdsvis kalve og køer var der positive dyrkninger fra organer post mortem fra 4 ud af 5 kalve og kun 3 ud af 8 køer. Alle dyrene havde haft gentagende høje ELISA-målinger og havde udskilt bakterier på minimum et tidspunkt (House *et al*, 1993). En anden undersøgelse viste, at der kun var positive dyrkninger fra organer post mortem fra mindre end halvdelen af de dyr, som havde haft høje antistofmålinger igennem længere tid. Derudover var der et positivt dyrkningssvar fra et af de fire seronegative kontroldyr (Hoorfar *et al*, 1996). Ved et nyere studie fandtes ingen udskillelse af bakterier i mælk eller fæces i en kortere periode (8-14 dage) fra ti dyr, som var mistænkte smittebærere (høj antistoftiter i mere 180 dage). Dette var på trods, at dyrene havde været udsat for stress i forbindelse med transport og var blevet immunsupprimeret med injektion af dexamethason. Ved obduktion blev der udtaget væv til dyrkning, men der var kun positive dyrkninger fra tre af dyrene (30%) (Lomborg, 2006, Nielsen *et al*, 2007).

På baggrund af gentagne ELISA-målinger ved et observationsstudie i fjorten besætninger blev dyrene (over syv måneder) grupperet i fire risikogrupper: 1. Persisterende høj antistofniveau (>80

ODC%), 2. Moderat høj antistofniveau (50-80 ODC%), 3. Middel – lav antistofniveau (25-50 ODC%), 4. Lav antistofniveau (<25 ODC%). Sandsynligheden for at udskille bakterier i fæces, dvs. positiv ved dyrkning, var afhængig af både risikogruppe og alder, så jo yngre jo større udskillelse. Det var en signifikant større sandsynlighed for en positiv fæcesprøve blandt dyrene i risikogruppe 1 og 2 sammenlignet med grupperne 3 og 4 (Nielsen *et al*, 2007).

Ud fra ovenstående ses det, at ingen af anvendte metoder til diagnosticering af *Salmonella* Dublin er perfekte. Brug af dyrkning har den fordel, at bakterien påvises direkte og derfor har en høj specificitet. Dertil kommer muligheden for at typebestemme bakterien. Ulempen er derimod meget lav sensitivitet, hvilket resulterer i mange falsk-negative. Det gælder især i forbindelse med udpegningen af raske smittebærere, da de har intermitterende udskillelse af bakterier og ofte lav koncentration af bakterier. Ved at bruge ELISA påvises *Salmonella* Dublin indirekte via antistoffer. Der er dog individuelle forskelle i antistofproduktionen og den afhænger af, hvor mange gange dyret har mødt bakterien. Traditionelt er raske smittebærere blev udpeget ved hjælp af en høj antistoftiter gennem længere tid, men den metode udfordres af flere nyere studier, da det kun er muligt at isolere bakterier fra omkring 30% af de mistænkte smittebærere.

2.2.5. Epidemiologi

I april 2007 er 83,5% af de mælkeleverende besætninger i Danmark i Niveau 1 ifølge det nationale overvågningsprogram, hvilket vil sige at de sandsynligvis er fri for smitte med *Salmonella* Dublin på baggrund af tankmælksmålinger. De øvrige 16,5% af besætningerne er i Niveau 2 eller 3, det vil sige, at der henholdsvis er en væsentlig risiko for *Salmonella* Dublin i besætningen (antistoffer i tankmælk, kontakt med smittede besætninger) eller der er påvist *Salmonella* Dublin bakterier i besætningen (Anonym, 2007b).

Salmonella Dublin adskiller sig fra andre serotyper ved en tendens til at persistere i besætning gennem flere år. I en lukket mælkekvægsbesætning var *Salmonella* Dublin isoleret flere gange i løbet af et tre års studie (Wray *et al*, 1989). Årsagen til dette er overvejende den intermitterende udskillelse af bakterier fra raske smittebærere (House *et al*, 1993), men *Salmonella* Dublin udskilles også i fæces fra akut smittede dyr (Wray & Davies, 2000). Overførslen af bakterier fra smittebærer til kalv har stor betydning for smittespredningen i besætningen (Richardson, 1973).

2.3. Sammenhæng mellem *Fasciola hepatica* og *Salmonella* Dublin infektioner

2.3.1. Eksperimentelle studier

Flere eksperimentelle studier har vist, at infektion med *Fasciola hepatica* øger modtageligheden for *Salmonella* Dublin hos kvæg (Aitken *et al*, 1976, Aitken *et al*, 1978b). Begge studier var designet, så en gruppe af dyrene fik tusind metacercarier oralt og 13 uger efter blev alle dyrene i begge grupper inficeret intravenøst med *Salmonella* Dublin (dosis 10^6 - 10^9). Resultatet var i begge tilfælde, at infektion med leverikter nedsatte den letale dosis af *Salmonella* Dublin. Tilsvarende viste det ene studie (Aitken *et al*, 1978b), at udskillelse af *Salmonella* Dublin i fæces var større og længerevarende blandt dyr inficeret med leverikter sammenlignet med dyr uden ikter. Ved obduktionerne 26 uger efter infektionen med *Salmonella* Dublin (dosis 10^6 - 5×10^7) blev bakterien isoleret fra flere væv hos de dyr, som var inficeret med ikter, mens de dyr uden leverikter stort set var fri for *Salmonella* Dublin. Altså tyder det på, at infektion med leverikter disponerer for forlænget infektion dvs. en persistent infektion.

Et andet forsøg viser dog, at den viste effekt afhænger af intervallet mellem smitten med henholdsvis *Fasciola hepatica* og *Salmonella* Dublin (Aitken *et al*, 1978a). Igen blev en del af dyrene inficeret med leverikter (1000 metacercarier oralt) mens alle blev inficeret intravenøst med *Salmonella* Dublin (dosis 10^7 - 10^8). Dette skete med enten 1 eller 25 ugers interval. Blandt de dyr, som var inficeret med 10^8 bakterier efter 25 uger, var effekten den samme som den tidligere beskrevet ved 13 ugers interval. Derimod var der ingen forskel blandt dyr uden leverikter og de, som var inficeret med leverikter en uge tidligere. Ved en dosis på 10^7 bakterier fandtes ingen effekt af infektionen med leverikter.

Der er også lavet forsøg, hvor dyrene blev inficeret oralt med *Salmonella* Dublin (Hall *et al*, 1981). I den ene gruppe blev dyrene inficeret med *Salmonella* Dublin 13 uger efter de havde fået indgivet 1000 metacercarier ligeledes oralt. Ved den anden gruppe fik dyrene to doser af *Salmonella* Dublin ti uger efter de var inficeret med leverikter første gang. Den første dosis *Salmonella* Dublin blev givet dagen inden og den anden dagen efter, at dyrene fik den anden dosis af metacercarier. Alle var givet oralt. Ved ingen af de to eksperimenter blev modtageligheden for *Salmonella* Dublin øget, der var ingen forøget spredning af smitte fra tarmen og ingen af dyrene inficeret med leverikter blev persisterende fækale udskillere.

Infektion med leverikter påvirkede heller ikke overlevelsen efter reinfektion med *Salmonella* Dublin (inficeret intravenøst) hos kvæg, som tidligere var blevet inficeret med *Salmonella* Dublin enten oralt, intravenøst eller efter kontakt med en persistent udskiller (Aitken *et al*, 1981).

En undersøgelse af immunresponset mod blandt andet *Salmonella* Dublin hos kvæg med leverikter viste, at leverikte-infektionen ikke svækkede produktionen af antistoffer (mod antigenerne "O" og "H"). Der var stor individuel variation i antistofsvaret mod *Salmonella* Dublin, men der var ikke forskel mellem grupperne med og uden leverikter (Aitken *et al*, 1979).

Der er altså studier som angiver, at infektion med leverikter øger modtageligheden for *Salmonella* Dublin. Men det tyder også, at effekten af afhænger intervallet med de to infektioner og at dette kan kædes sammen med *Fasciola hepaticas* udvikling i værten. Sammenhængen er dog kun vist ved intravenøs *Salmonella* Dublin infektion, hvor bakterierne i store doser hurtigt når leveren. Det har dog ikke været muligt at vise sammenhængen ved orale infektion, som ellers er den hyppigste smittevej.

2.3.2. Epidemiologiske studier

Blandt besætninger i det nordvestlige England blev *Salmonella* Dublin hos voksne dyr diagnosticeret ved hjælp af dyrkning. Om der var forekomst af *Fasciola hepatica* på besætningerne blev fastlagt udfra om det var et kendt eller mistænkt ikke-område og brug af rutinemæssig behandling. I alt mentes 142 af besætningerne at have leverikter og blandt disse var der diagnosticeret *Salmonella* Dublin på de 48 (dvs. 33,8%). Blandt de 81 besætninger, som formodedes at være fri for leverikter, var 16 positive for *Salmonella* Dublin (19,8%). Der var altså en signifikant højere prævalens af *Salmonella* Dublin blandt besætninger med leverikter, men studiet melder ikke noget om eventuelle underliggende årsager til denne sammenhæng (Richardson & Watson, 1971).

Et ældre hollandsk studie (Dijkstra, 1973) viser, at der i årene 1970-72 var et markant fald i antallet af positive prøver ved dyrkning for *Salmonella* Dublin i fæcesprøver. I samme periode var der ligeledes et stort fald i antallet af fæcesprøver, som var positive med leverikte-æg ved sedimentation. Den reducerede forekomst af leverikter kan ifølge forfatteren tilskrives øget behandling (med et ikke-baktericidt middel) samt to tørre somre i 1970 og 1971, og dette menes at have medført faldet i *Salmonella* Dublin forekomsten. Det kan dog ikke udelukkes, at de tørre

somme har haft en direkte indflydelse på *Salmonella* Dublin-niveauet snarere end faldet i leverikteforekomst.

I en næsten tilsvarende irsk undersøgelse (Taylor & Kilpatrick, 1975) blev alle fæcesprøver indsendt til parasitologisk undersøgelse i perioden 1968-73 også undersøgt for *Salmonella* Dublin. Når man så på antallet af positive prøver for henholdsvis leverikter og *Salmonella* Dublin for hvert af de seks år var der en positiv korrelation på 0,85. Det vil sige, at de år, hvor der var mange positive for leverikter var der også mange positive for *Salmonella* Dublin. Hvis man derimod så på antallet af positive prøver indenfor hver af de seks år, var der ingen signifikant sammenhæng ved en χ^2 test ($\alpha=0,01$). Det konkluderes derfor, at de to infektioner er uafhængige af hinanden, men at de påvirkes af de samme eksterne faktorer. Ligeledes menes det, at forekomsten af begge infektioner topper i oktober-november som følge af deres individuelle sygdomsdynamik og ikke på grund af en sammenhæng mellem de to infektioner.

I et fransk case-control studie (Morisse & Cotte, 1994) af risikofaktorer for salmonellose udtog man prøver i otte besætninger (cases) med nyligt udbrud af *Salmonella* (også andre typer end *Salmonella* Dublin) og seks lignende raske besætninger (controls). *Salmonella* blev fundet ved hjælp af dyrkning fra rektalsvabere, og *Fasciola hepatica* blev diagnosticeret på baggrund af antistoffer (ELISA). Både antallet af positive og niveauet af de positive reaktioner var ens blandt dyrene i de to grupper, så der var tilsyneladende ingen sammenhæng mellem de to infektioner.

Et case-control studie fra Holland (Vaessen *et al.*, 1998) viser, at der var en signifikant sammenhæng mellem leverikter og *Salmonella* Dublin (OR=14,16, P=0,0059). Casene var besætninger, hvor der var diagnosticeret *Salmonella* Dublin efter juli 1993 og kontrolbesætningerne var udvalgt i samme område. Om der var leverikter i besætningen blev fastslået ved hjælp af et spørgeskema til landmændene, og det blev ikke bekræftet ved diagnostik. Forfatterne nævner selv muligheden for, at landmændene er mere bevidste om leverikteinfektion, når de ved, at de er *Salmonella* Dublin positive.

Resultaterne fra de udførte epidemiologiske studier er ikke entydige. De studier, som fandt en sammenhæng er udført på besætningsniveau, hvorimod der i et studie på dyreniveau ikke blev fundet nogen sammenhæng. På baggrund af disse blandende resultater vil det derfor være oplagt med en ny undersøgelse af den eventuelle sammenhæng mellem de to infektioner, især da der er sket en forbedring af metoder til diagnosticering af begge infektioner.

2.4. Litteraturliste

Aitken M.M., Jones P.W., Hall G.A., Hughes D.L. (1976): The effects of fascioliasis of cattle to *Salmonella dublin*. *British Veterinary Journal*, 132, 119-120

Aitken M.M., Hughes D.L., Jones P.W., Hall G.A., Collis K.A. (1978a): Effects of intravenous *Salmonella dublin* on cattle at different stages of *Fasciola hepatica* infection. *Journal of Comparative Pathology*, 88, 433-442

Aitken M.M., Jones P.W., Hall G.A., Hughes D.L., Collis K.A. (1978b): Effects of experimental *Salmonella dublin* in cattle given *Fasciola hepatica* thirteen weeks previously. *Journal of Comparative Pathology*, 88, 75-84

Aitken M.M., Hughes D.L., Jones P.W., Hall G.A., Smith G.S. (1979): Immunological responses of fluke-infected and fluke-free cattle to *Salmonella dublin* and other antigens. *Research in Veterinary Science*, 27, 306-312

Aitken M.M., Jones P.W., Hall G.A., Hughes D.L., Brown G.T.H. (1981): Responses of fluke-infected and fluke-free cattle to experimental reinfection with *Salmonella dublin*. *Research in Veterinary Science*, 31, 120-126

Andrews S.J. (1999): The life cycle of *Fasciola hepatica*. I: Dalton J.P (eds.) (1999): Fasciolosis. 1st edition, CABI publishing. Cambridge, UK. 1-29

Anonym (2007a): Brugerhåndbog 2007. 18.udgave, Veterinærinstituttet, Danmarks Tekniske Universitet, København, 66-68

Anonym (2007b): Oversigt over *Salmonella* Dublin-niveauer. Fordeling pr. 25. april 2007. Veterinær forhold og Råvarekvalitet, Dansk Kvæg. Tilgængelig på Internettet: <http://kvaegvet.dk/Dublin/AASduOversigt.html>

Barrow P.A. (2000): Serological diagnosis of *Salmonella* by ELISA and other tests. I: Wray C., Wray A. (eds.) (2000): *Salmonella* in domestic animals. 1st edition, CABI Publishing, 407-427

- Black N., Froyd G (1972): The possible influence of liver fluke infestation on milk quality. *Veterinary Record*, 90 (3), 71-72
- Boray J.C. (1969): Experimental fascioliasis in Australia. *Advances in Parasitology*, 7, 95-210
- Bouvry M., Rau M.E. (1986): Seasonal variations in egg passage of *Fasciola hepatica* in dairy cows in Quebec. *Veterinary Parasitology*, 22, 267-273
- Castro E., Freyre A., Hernández Z. (2000): Serological responses of cattle after treatment and during natural re-infection with *Fasciola hepatica*, as measured with a dot-ELISA system. *Veterinary Parasitology*, 90, 201-208
- Charlier J., Duchateau L., Claerebout E., Willams D., Vercruysse J. (2007): Associations between anti-*Fasciola hepatica* antibody levels in bulk-tank milk samples and production parameters in dairy cattle. *Preventive Veterinary Medicine*, 78 (1), 57-66
- Clery D., Torgerson P., Mulcahy G. (1996): Immune respons of chronically infected adult cattle to *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, 62, 71-82
- Cornelissen J.B., Gaasenbeek C.P., Boersma W., Borgsteede F.H., van Milligen F.J. (1999): Use of a pre-selected epitope of cathepsin-L1 in a highly specific peptide-based immunoassay for the diagnosis of *Fasciola hepatica* infections in cattle. *International Journal of Parasitology*, 29, 685-696
- Cullen J.M., MacLachlan N.J. (2001): Chapter 2. Liver, biliary system and exocrine pancreas I: McGavin M.D., Carlton W.W., Zachary J.F. (eds.) (2001): Thomson's special veterinary pathology, 3rd edition, Mosby, 81-124
- DaRoden L., Smith B.P., Spier S.J., Dilling G.W. (1992). Effect of calf age and *Salmonella* bacterin type on ability to produce immunoglobulins directed against *Salmonella* whole cells or liposaccharide. *American Journal of Veterinary Research*, 53 (10), 1895-1899

Dijkstra R.G. (1973): Does control of the liver fluke decrease the occurrence of Salmonellosis in cattle?. *Veterinary Record*, 93, 467-468

Dorchies Ph. (2006): Flukes: Old parasites but new emergence. World Buiatrics Congress 2006, Nice, France

Dorshman W. (1956): Fluctuation within a day in the liver-fluke egg-count of the rectal contents of cattle. *Veterinary Record*, 68, 571-574

Doy T.G., Hughes D.L. (1984): *Fasciola hepatica*: Site of resistance to reinfection in cattle. *Experimental Parasitology*, 57, 274-278

Doyle J.J. (1971): Acquired immunity to experimental infection with *Fasciola hepatica* in cattle. *Research in Veterinary Science*, 12, 527-534

Froyd G. (1975): Liver fluke in Great Britain: A survey of affected livers. *Veterinary Record*, 97, 492-495

Grimont P.A.D., Grimont F., Bouvet P. (2000): Chapter 1 Taxonomy of the genus *Salmonella*. I: Wray C., Wray A. (eds): *Salmonella in domestic animals*. 1st edition, CABI Publishing, 1-18

Grønstøl H., Osborne A.D., Pethiyagoda S. (1974a): Experimental *Salmonella* infection in calves. 1. The effect of stress factors on the carrier state. *Journal of Hygiejne*, 72, 155-162

Grønstøl H., Osborne A.D., Pethiyagoda S. (1974b): Experimental *Salmonella* infection in calves. 2. Virulence and the spread of infection. *Journal of Hygiejne*, 72, 163-168

Hall G.A., Jones P.W., Aitken M.M. (1978): The pathogenesis of experimental intra-ruminal infections of cows with *Salmonella dublin*. *Journal of Comparative Pathology*, 88, 409-417

- Hall G.A., Hughes D.L., Jones P.W., Aitken M.M, Parsons K.R., Brown G.T.H. (1981): Experimental oral *Salmonella dublin* infection in cattle: Effects on concurrent infection with *Fasciola hepatica*. *Journal of Comparative Pathology*, 91 (2), 227-233
- Happich F.A., Boray J.C. (1969): Quantitative diagnosis of chronic fasciolosis. 1. Comparative studies on quantitative faecal examinations for chronic *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Australian Veterinary Journal*, 45, 326-328
- Helms M., Vastrup P., Gerner-Smidt P., Mølbak K. (2003): Short and long term mortality associated with foodborne bacterial gastrointestinal infections: registry based study. *British Medical Journal*, 357-361
- Henriksen S.A., Pilegaard-Andersen C. (1979): *Fasciola hepatica* i Danmark. Status over 15 års diagnostiske undersøgelser af bovine fæcesprøver. *Nordisk Veterinærmedicin*, 31, 6-13.
- Hillyer G.V. (1980): Isolation af *Fasciola hepatica* tegument antigens. *Journal of Clinical Microbiology*, 12, 5, 695-699
- Hinton M. (1974): *Salomonella* Dublin abortion in cattle: Studies on the clinical aspects of the condition. *British Veterinary Journal*, 130, 556-563
- Holt P.S. (2000): Chapter 5. Host susceptibility, resistance and immunity to *Salmonella* in animals. I: Wray C., Wray A. (eds.) (2000): *Salmonella* in domestic animals. 1st edition, CABI Publishing, 73-87
- Hope Cawdery M.J, Conway A. (1971): Production effects of the liver fluke, *Fasciola hepatica*, on beef cattle. *Veterinary Record*, 89 (24), 641-643
- Hope Cawdery M.J, Strickland K.L., Conway A., Crowe P.J. (1977): Production effects of liver fluke in cattle I. The effects of infection on liveweight gain, feed intake and food conversion efficiency in beef cattle. *British Veterinary Journal*, 133, 145-159

House J.K., Smith B.P., Dilling G.W., Roden L.D. (1993): Enzyme-linked immunosorbent assay for serologic detection of *Salmonella dublin* carriers on a large dairy. *American Journal of Veterinary Research*, 54 (9), 1391-1399

Hughes L.E., Gibson E.A., Roberts H.E., Davies E.T., Davies G., Sojka W.J. (1971): Bovine salmonellosis in England and Wales. *British Veterinary Journal*, 127, 225-238

Kendall S.B., Sinclair I.J., Everett G., Parfitt J.W. (1978): Resistance to *Fasciola hepatica* in cattle I. Parasitological and serological observations. *Journal of Comparative Pathology*, 88, 115-122

Larsen H.E., Aalbæk B (2000): Veterinær mikrobiologi. Bind II Gramnegative bakterier. 3. udgave, DSR Forlag, 223-240

Leeflang M.M.G, Bossuyt P.M.M (2005): Letter to the Editor: Test accuracy is likely to vary depending on the population it is used in. *Veterinary Parasitology*, 134, 189

Leclipteux Th., Torgerson P.R., Doherty M.L., McCole D., Protz M., Farnir F., Losson B. (1998): Use of excretory / secretory antigens in a competition test to follow the kinetics of infection by *Fasciola hepatica* in cattle. *Veterinary Parasitology*, 77, 103-114

Levieux D, Levieux A., Venien A. (1992a): An improved passive hemagglutination test for serological diagnosis of bovine fascioliasis using the specific antigen f2. *Veterinary parasitology*, 42, 53-66

Levieux D, Levieux A., Mage C., Garel J.-P. (1992b): Immunological detection of chemotherapeutic success in bovine fasciolosis using the specific antigen f2. *Veterinary parasitology*, 45, 81-88

Levieux D, Levieux A., Mage C, Venien A. (1992c): Early immunodiagnosis of bovine fascioliasis using the specific antigen f2 in a passive hemagglutination test. *Veterinary parasitology*, 44, 77-86

Lomborg S.R. (2006): Immune suppression of cattle suspected as carriers of *Salmonella Dublin*. *Veterinært speciale*, Den Kongelige Veterinær og Landbohøjskole, Frederiksberg.

López-Díaz M.C., Carro M.C., Cadórniga C., Díez-Baños P., Mezo M. (1998): Puberty and serum concentrations of ovarian steroids during prepuberal period in Friesian heifers artificially infected with *Fasciola hepatica*. *Theriogenology*, 50, 587-593

Malone J.B. (1986): Fascioliasis and cestodiasis in cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 2 (2), 261-275

McCaughey W.J., McClelland T.G., Hanna J. (1971) Some observations on Salmonella Dublin infection in clinically healthy beef cattle. *British Veterinary Journal*, 127 (12) 549-556

Mitchell G. (2002): Update on fasciolosis in cattle and sheep. *In Practice*, 24, 378-385

Molloy J.B., Anderson G.R., Fletcher T.I, Landmann J., Knight B.C. (2005): Evaluation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies to *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* in cattle, sheep and buffaloes in Australia. *Veterinary Parasitology*, 130, 207-212

Monrad J., Nansen P. (1994): Veterinær parasitologi helmintologi for veterinærstuderende. 2. udgave, Samfundslitteratur KVL-bogladen, København, 106-114

Morisse J.P., Cotte J.P. (1994): Evaluation of some risk factors in bovine salmonellosis. *Veterinary Research*, 25, 191-195

Movesesijan M., Jovanovic B., Aalund O., Nansen P. (1975): Immune response of sheep to *Fasciola hepatica* infection. *Research in Veterinary Science*, 18, 171-174

Murphy T.M., Fahy K.N, McAuliffe A., Forbes A.B., Clegg T.A., O'Brien D.J. (2006): A study of helminth parasites in culled cows from Ireland. *Preventive Veterinary Medicine*, 76, 1-10

Nadalian M.Gh., Bolourchi M. (1998): Different clinical aspects of salmonellosis in calves. XX World Buiatrics Congress Sydney Juli 6-10 1998, 897-898

Nazer H.K., Osborne A.D. (1977): Experimental *Salmonella* Dublin infection in calves. *British Veterinary Journal*, 133, 388-398

Nielsen L.R., Ersbøll A.K. (2004): Age-stratified validation of an indirect *Salmonella* Dublin serum enzyme-linked immunosorbent assay for individual diagnosis in cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 16, 212-218

Nielsen L.R., Toft N., Ersbøll A.K. (2004a): Evaluation of an indirect serum ELISA and bacteriological faecal culture test of diagnosis of *Salmonella* serotype Dublin in cattle using latent class models. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 311-319

Nielsen L.R., Schukken Y.H, Gröhn, Ersbøll A.K. (2004b): *Salmonella* Dublin infection in dairy cattle: risk factors for becoming a carrier. *Preventive Veterinary Medicine*, 65, 47-62

Nielsen L.R., Baggesen D.L., Ersbøll A.K (2007): Challenging the traditional methods for detection of *Salmonella* Dublin carrier animals. *Proceedings of the DubPar seminar*, March 22, 2007, Copenhagen, Denmark, 11-16

Oakley G.A., Owen B., Knapp N.H.H. (1979): Production effects of subclinical liver fluke infection in growing dairy heifers. *Veterinary Record*, 104, 503-507

Ortiz P.L., Claxton J.R., Clarkson M.J, McGarry J., Willams D.J.L (2000): The specificity of antibody responses in cattle to *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, 93, 121-134

Pritchard G.C., Forbes A.B., Williams J.L., Salimi-Bejestani M.R., Daniel R.G. (2005): Emergence of fasciolosis in cattle in East Anglia. *Veterinary Record*, 157, 578-582

Radostits O.M., Gay C.C., Blood D.C., Hinchcliff K.W. (2000): *Veterinary Medicine – A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses*. 9. ed. W.B. Saunders Company Ltd., London, 809-829 (*Salmonella* spp.), 1378-1382 (*Fasciola hepatica*)

Rapsch C., Schweizer G., Grimm F., Kohler L., Bauer C., Deplazes P., Braun U., Torgerson P.R. (2006): Estimating the true prevalence of *Fasciola hepatica* in cattle slaughtered in Switzerland in the absence of an absolute diagnostic test. *International Journal for Parasitology*, 36, 1153-1158

Reichel M.P. (2002): Performance characteristics of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of liver fluke (*Fasciola hepatica*) infection in sheep and cattle. *Veterinary Parasitology*, 107, 65-72

Richardson A. (1973): The transmission of *Salmonella* Dublin to calves from adult carrier cows. *Veterinary Record*, 92, 112-115

Richardson A., Watson W.A. (1971): A contribution to the epidemiology of *Salmonella* Dublin infection in cattle. *British Veterinary Journal*, 127, 173-183

Richardson A., Fawcett A.R. (1973): *Salmonella* Dublin infections in calves: The value of rectal swabs in diagnosis and epidemiological studies. *British Veterinary Journal*, 129, 151-156

Riising H.J. (1971): Undersøgelser over *Fasciola hepaticas* epizootologi. Licentiatforhandling, Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole, Medicinsk Klinik og Laboratorium for Speciel Patologi og Terapi, København, 12-19

Riising H.J., Nansen P., Nielsen K., Haaning K. (1973): Udbredelsen af fascioliasis hos voksent kvæg i Danmark. *Nordisk Veterinærmedicin*, 25, 291-299.

Rings M (1985): Salmonellosis in calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 1 (3), 529-539

Roberts L.S., Janovy J. Jr. (2005): Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts' foundations of parasitology. 7. udgave. McGraw-Hill. New York. 265-269

Robertsson J.Å. (1984): Humoral antibody responses to experimental and spontaneous *Salmonella* infections in cattle measured by ELISA. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B*, 31, 367-380

Ross J.G. (1968): The life span of *Fasciola hepatica* in cattle. *Veterinary Record*, 82, 587-589

Schweizer G., Braun U., Deplazes P., Torgerson P.R. (2005): Estimating the financial losses due to bovine fasciolosis in Switzerland. *Veterinary Record*, 157, 188-193

Shaka S., Nansen P (1979): Epidemiology of fascioliasis. Studies on the seasonal availability of metacercariae and the parasite stages overwintering on pasture. *Veterinary Parasitology*, 5, 145-154

Smith B.P., Oliver D.G., Singh P., Dilling G., Marvin P.A., Ram B.P. (1989): Detection of *Salmonella dublin* mammary gland infection in carrier cows, using an enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies in milk or serum. *American Journal of Veterinary Research*, 50 (8), 1352-1360

Smith B.P., House J.K, Dilling G.W., Roden L.D., Spier S.J. (1992): Identification of *Salmonella Dublin* carrier cattle. *Proceedings of the International Symposium Salmonella and Salmonellosis*. September 15.-17. 1992, Ploufragan, France, 225-230

Spier S.J., Smith B.P., Tyler J.W., Cullor J.S, Dilling G.W., Pfaff L.D (1990): Use of ELISA for detection of immunoglobulins G and M that recognize *Salmonella dublin* lipopolysaccharide for prediction of carrier status in cattle. *American Journal of Veterinary Research*, 51 (12), 1900-1904

Taylor S.M., Kilpatrick D. (1975): The relationship between concurrent liver fluke infection and salmonellosis in cattle. *Veterinary Record*, 96, 342-343

Thamsborg S.M., Larsen M, Kähler J., Pedersen N.D. (2005): Fasciolosis in Danish cattle – a re-emerging problem? *Proceedings of the 1st Symposium of the Scandinavian-Baltic Society for Parasitology*, Vilnius, Maj 2005; *Bulletin of the SBSP*, 14, s.150-151.

Torgerson P. (1999): Bovine Fasciolosis- An Update and Refresher. *Cattle Practice: Journal of the British Cattle Veterinary Association*, 7 (2), 177-187

Vaessen M.A., Veling J., Frankena K., Graat E.A.M., Klunder T. (1998): Risk factors for *Salmonella dublin* infection on dairy farms. *Veterinary Quarterly*, 20, 97-99

Wray C., Davies R.H. (2000): *Salmonella* infections in cattle. I: Wray C., Wray A. (eds.) (2000): *Salmonella* in domestic animals. 1st edition, CABI Publishing, 169-191

Wray C., Wadsworth Q.C., Richards D.W., Morgan J.H. (1989): A three-year study of *Salmonella* Dublin in a closed dairy herd. *Veterinary Record*, 124, 532-537

3. MANUSCRIPT

Association between *Fasciola hepatica* and *Salmonella* Dublin infections in dairy heifers

3.1. Introduction

Experimental studies indicate an association between liver fluke (*Fasciola hepatica*) infection and infection with *Salmonella* Dublin in cattle. Liver fluke infection increases the susceptibility of animals to the lethal effect of *Salmonella* Dublin and predisposes them to the development of a carrier state (Aitken *et al*, 1978b). An effect on the response to *Salmonella* Dublin is found, when the animals are infected with liver flukes 13 or 25 weeks previous, respectively. But no effect was found with one week between the infections (Aitken *et al*, 1978a, Aitken *et al*, 1978b).

Several epidemiological studies have been conducted to investigate the role of *Fasciola hepatica* infection as a risk factor for infection with *Salmonella* Dublin. One study found that among herds diagnosed with *Salmonella* Dublin the presumed prevalence of *Fasciola hepatica* was significantly higher than among herds that were free from *Salmonella* Dublin (Richardson & Watson, 1971).

A Dutch study showed a decrease in liver fluke infections over a period of seven years, which the authors attributed to a combination of treatment with antihelminthetics and dry summers. In the same period, the number of *Salmonella* Dublin infections also decreased. Based on these results, the author concluded that the control of liver fluke decreased the number of *Salmonella* Dublin infections (Dijkstra, 1973).

Another study found that the presence of the two infections in the animals was independent. However the authors found a positive correlation between the annual number of the two infections over a six year period. This study concluded that it was due to the fact that the two infections are influenced by the same external factors (Taylor & Kilpatrick, 1975). Likewise, a French study did not find any difference in the *Fasciola hepatica* infection levels between herds with *Salmonella* infections and the control herds (Morisse & Cotte, 1994). In contrast, a Dutch study found that liver fluke infection and *Salmonella* Dublin infections were highly associated at the herd level. The presence of liver flukes in the herds was based on questionnaire and the authors mention that the

farmers might be more conscious of liver fluke infection, when they are aware their herds are positive for *Salmonella* Dublin (Vaessen *et al*, 1998).

The primary aim of this field study was to investigate if there was an association between liver fluke infection and *Salmonella* Dublin infection at the animal level in Danish dairy cattle. This was investigated using serology to diagnose the two infections in seven dairy herds assumed to be naturally infected with both infections. A control program for *Salmonella* Dublin has just been initiated in Denmark with the purpose of eradicating the infection before year 2014. Therefore it was of relevance to study if an association between *Fasciola hepatica* and *Salmonella* Dublin is taking place in co-infected herds and thereby making it difficult to eradicate *Salmonella* Dublin in these herds. Secondly, two diagnostic methods for *Fasciola hepatica* were evaluated.

3.2. Materials and methods

3.2.1. Study design and sampling

The study was designed as a cross-sectional study with follow-up (Ersbøll *et al*, 2004). The target population of this study were Danish herds with co-infections of *Fasciola hepatica* and *Salmonella* Dublin.

The inclusion criteria for herds were: *Salmonella* Dublin ODC% > 50 in bulk milk collected every quarter of the year for a minimum of one year; more than 1 case of liver fluke recorded at meat inspection over the last year; heifers on pasture in 2005 and 2006; no treatments against liver flukes during the last two years; and a minimum of approximately 50 heifers aged 10-30 months.

Seven dairy herds, all located in Jutland, Denmark, were identified and signed in by their local veterinarian, who was contacted through a mailing list for Danish bovine practitioners. Information about the herds and the number of sampled animals in each herd can be seen in table 3.1. All the herds, except B, have had high *Salmonella* Dublin antibody levels in bulk milk since 2001, when it was tested for the first time. According to the level of antibodies in bulk milk, herd B was infected in 2003.

From each herd about fifty heifers that had been on pasture at least once were randomly selected. The selection was in some herds affected by practical circumstances, for example the possibility of handling the heifers; the age range was between eight and thirty-six months.

Table 3.1 Information about the seven herds (A-G) from the Danish Cattle Database and the number of samples from each herd.

	Herd						
	A	B	C	D	E	F	G
Production type	Conventional	Conventional	Organic	Organic	Conventional	Conventional	Conventional
Number of cows	109	240	179	313	114	140	97
Number of heifers	76	198	195	257*	118	138	80
- over 24 months	18	58	23	79	29	16	18
- 12-24 months	27	50	88	137	46	60	28
- under 12 months	31	90	84	41*	43	62	34
Breed % SDM	93%	92%	63%	43%	70%	99%	97%
Number of heifers blood sampled	43	50	52	49	47	49	47
- FGS	33	28	25	32	12	32	20
- SGS	10	22	27	17	35	17	27
Number of heifers faecal sampled	21	21	20	20	21	21	21
- FGS	12	10	10	15	7	10	9
- SGS	9	11	10	5	14	11	12

* Heifers in the age 6-12 months.

Each herd was visited three times during the study. The first round of visits was in early/mid December 2006, the second round in mid January 2007 and the last visits were in late February/early March 2007. At each visit a blood sample from the coccygea vein was collected from all the selected heifers for detection of antibodies against *Fasciola hepatica* and *Salmonella* Dublin. Faecal samples for egg counts were collected per rectum from ten randomly selected heifers following their first grazing season (FGS) and ten heifers following their second grazing season (SGS). The same heifers were sampled at each visit. At the first visit blood samples were also collected from about ten of the calves aged 3-6 months in order to evaluate the level of *Salmonella* Dublin transmission in the herd.

3.2.2. Analyses of samples

3.2.2.1. *Fasciola hepatica* ELISA

Blood samples were centrifuged. Serum was collected and stored at -18°C until tested. All samples were analysed for specific antibodies against *Fasciola* tegument antigen “f2” using a commercial ELISA kit Pourquier® ELISA Fascioliasis serum and milk verification (P05120) (Institut Pourquier, Montpellier, France). The manufacturer’s instructions (Anonymous, 2006) were followed.

The result was calculated as an S/P ratio for each sample by the following formula:

$$\% \text{ S/P} = \text{corrected OD450}_{\text{sample}} / \text{mean corrected OD450}_{\text{positive control}} \times 100\%$$

Where the corrected $\text{OD450}_{\text{sample}}$ was calculated by subtracting the OD450 value obtained from an uncoated well from the OD450 value from a coated well. Similarly, the two corrected positive controls were calculated and a mean corrected $\text{OD450}_{\text{positive control}}$ was found. For validation of the results, the mean corrected $\text{OD450}_{\text{positive control}}$ had to be >0.350 and the ratio between the mean corrected $\text{OD450}_{\text{positive control}}$ and the mean corrected $\text{OD450}_{\text{negative control}}$ had to be greater than, or equal to 3.5.

If the % S/P was above 30, the sample was considered positive. Accordingly, if the % S/P was under or equal to 30 then the sample was considered negative.

A part of the samples (N=84) were run twice on the same ELISA plate to evaluate their precision (Houe *et al.*, 2004). For animals where the sample was run twice the final % S/P value was a mean of the two measurements. A number of other samples (N=76) were also run twice on different ELISA plates to evaluate the variation between plates. For these animals the %S/P value used was the first measurement.

3.2.2.2. *Faecal egg count*

Faecal samples were collected per rectum and were stored at 4°C . Formaldehyde (4%) was added as fixative in the ratio 1:50. The samples were examined by a sedimentation technique described by Henriksen (1966), which was modified by using 2 grams faeces for detection of *Fasciola hepatica* eggs.

3.2.2.3. *Salmonella* Dublin ELISA

The blood samples were sent to the authorized laboratory, Eurofins, Holstebro, who performed the *Salmonella* Dublin ELISA. The method used was detecting antibodies directed against *Salmonella* Dublin O-antigen based lipopolysaccharide and has been described by Nielsen & Ersbøll (2004).

The antibody response was measured by an ODC%-value, which is a background corrected proportion of the test sample OD to a positive reference sample. The ODC% was calculated by the following formula:

$$\text{ODC\%} = (\text{OD}_{\text{sample}} - \text{OD}_{\text{neg ref}}) / (\text{OD}_{\text{pos ref}} - \text{OD}_{\text{neg ref}}) \times 100\%$$

Where $\text{OD}_{\text{sample}}$ is the mean value of two test wells; $\text{OD}_{\text{neg ref}}$ and $\text{OD}_{\text{pos ref}}$ are the mean values of four reference wells in the ELISA plates. The scale of ODC% runs from 0 to approximately 200 ODC%.

All heifers with two or three ODC%-values from the repeated sampling were divided into risk groups using the following criteria (modified after Nielsen *et al*, 2007):

- Risk group I: The most recent sample above or equal to 50 ODC% or the average of the last (up to) three samples above or equal to 50 ODC%. This group was considered to have a moderate to high risk of being a persistently infected carrier animal.
- Risk group II: The average of the last (up to) three samples was below 50 ODC% and the most recent sample also was below 50 ODC%. This group was considered very low risk of being a persistently infected carrier animal.

Animals in risk group I have previously been shown to have significantly higher probability of having *Salmonella* Dublin faecal culture positive samples than animals in risk group II (Nielsen *et al*, 2007).

3.2.3. Statistical analyses

The statistical analyses were performed in the statistical software package SAS® version 9.1. Some of the graphics were made in Microsoft Excel.

For evaluation of *Fasciola hepatica* ELISA the correlation between two measurements on the same ELISA plate and on two different ELISA plates was found, respectively. Pearson's correlation coefficients were calculated and the correlations were also evaluated by linear regression.

For analyses of infection status of the heifers, several of the variables were dicotomized. *Fasciola hepatica* ELISA were assumed positive or negative according to the cut-off value of the test. The faecal egg count was positive by the finding of at least one egg. The *Salmonella* Dublin status were dicotomised into two risk groups. Mainly, the descriptive analyses have focus on the occurrence of infection (prevalence of positive vs. negative), but regarding to faecal egg count also the number of eggs in 2 grams were described. Fisher exact test was used for testing if there were significant differences in prevalence between groups. The probabilities of being *Fasciola hepatica* positive by the two methods, ELISA and faecal egg count, were tested by the McNemar test. Sensitivity and specificity were calculated for the *Fasciola hepatica* ELISA by using faecal egg count as a gold standard.

A logistic analysis was performed to test several possible risk factors' influence on the probability of being *Fasciola hepatica* positive by ELISA. The risk factors were *Fasciola hepatica* status by faecal egg count, herd and number of seasons on pasture. This statistical procedure was chosen, because the values for the *Fasciola hepatica* ELISA were not normally distributed and were segregated in to two groups.

The association between *Fasciola hepatica* ELISA status and *Salmonella* risk groups was tested using a Fisher exact test. In all the analyses, the significance level used was 0.05.

3.3. Results

3.3.1. Evaluation of *Fasciola hepatica* ELISA

In total, 84 samples were analysed twice on the same ELISA plate to evaluate their precision (figure 3.1.). Pearson's correlation coefficient between the duplicate measurements was 0.996 ($P < 0.0001$). By linear regression the intercept was -0.19 ($se_a = 2.58$, $P = 0.94$) and the slope was 0.9958 ($se_b = 0.01$, $P < 0.001$).

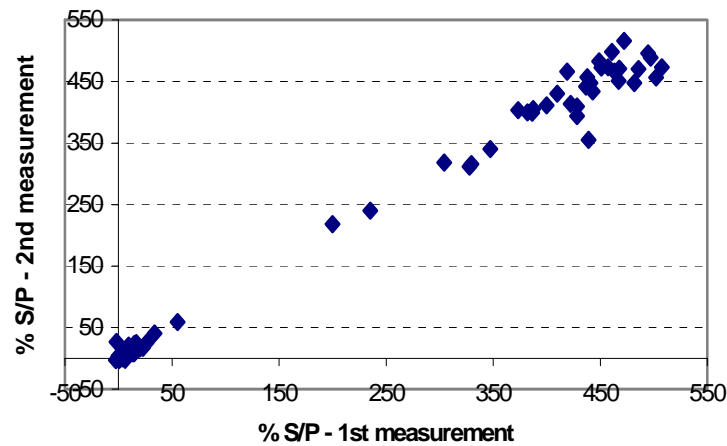


Figure 3.1 Comparison of duplicate measurements of 84 samples on the same *Fasciola hepatica* ELISA plate.

In total, 76 samples were analysed twice on different ELISA plates to evaluate the variation between the ELISA plates. They were all samples from heifers that changed ELISA status (positive/negative) during the study period. The results are illustrated in figure 3.2.

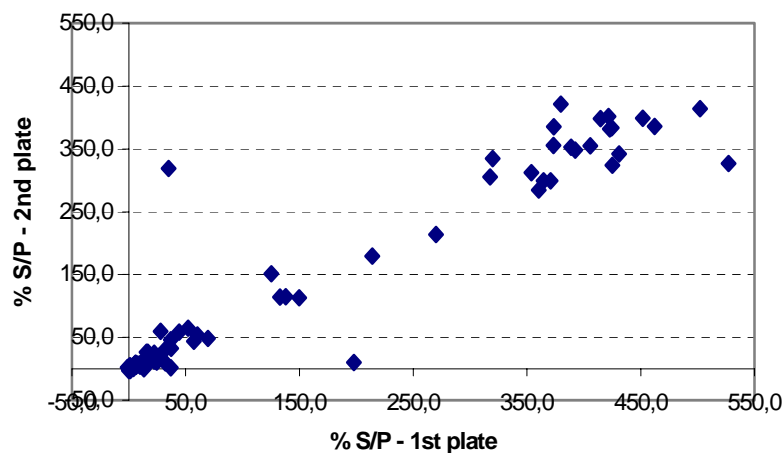


Figure 3.2 Double measurements of 76 samples on different *Fasciola hepatica* ELISA plates.

Pearsons correlation coefficient was 0.955 between the two measurements on the different ELISA plates ($P < 0.0001$). If evaluated by linear regression the intercept is 6.27 ($se_a = 7.79$, $P = 0.42$) and the slope is 1.08 ($se_b = 0.04$, $P < 0.001$).

Five samples changed classification. Three went from positive to negative, but of these two had values just over the cut-off value at the first measurement. Furthermore, two samples went from negative to positive with one of these being very close to the cut-off value at the first measurement.

The variation between the ELISA plates can also be evaluated by the mean corrected positive control and the mean corrected negative control values. The average of the mean corrected positive control is 0.503 (95% confidence interval 0.471-0.535) ($N = 30$ plates) with a minimum value of 0.285 and a maximum value of 0.753. For the mean corrected negative control the average is 0.005 (95% confidence interval is -0.003 – 0.012) and a minimum value and maximum value of -0.031 and 0.093, respectively.

3.3.2. Prevalence of *Fasciola hepatica*

3.3.2.1. Serology

Figure 2.3 shows the distribution of the ELISA values (% S/P) from all three rounds ($N = 1011$). For each round separately the distributions were almost identical (not shown). The histogram shows that the % S/P values divide up into two clearly separated groups with no values in the range 80-100 %S/P. The cut-off value of 30 suggested by the ELISA kit manufacturer was between the two main parts of the values, but not in an area with no values. Therefore there are few values which fall close to the cut-off value.

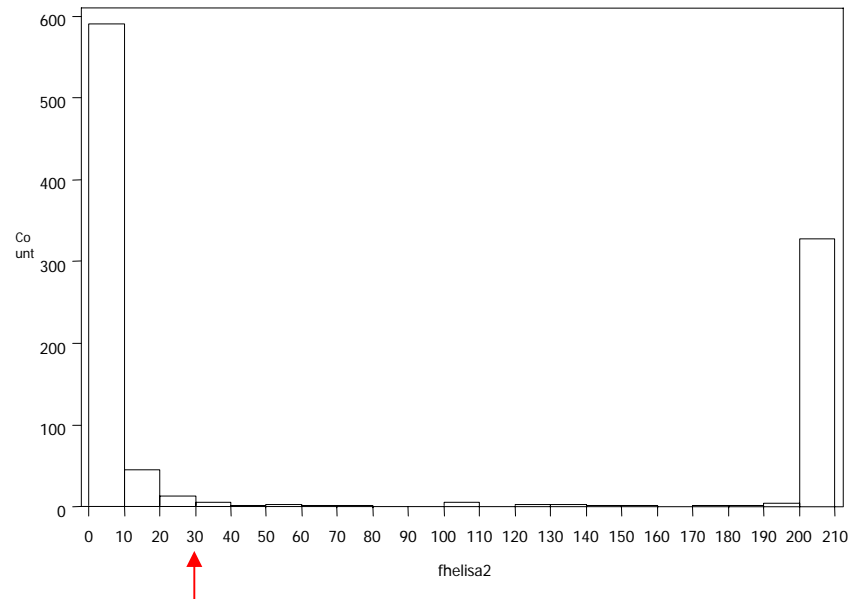


Figure 3.3 Histogram showing the distribution of the % S/P values from all heifers in all three rounds (N=1011) where the values were <0 they were set to 0. Likewise, if values >200 were set to 200. The arrow indicate the cut-off value %S/P = 30.

The individual prevalence of *Fasciola hepatica* in all heifers in the seven herds defined as positive by a minimum of one positive sample in ELISA was 40% (N=337 heifers). The variation between herds was considerable, ranging from 12 to 89%. Among heifers after FGS the prevalence was significantly lower (23%, N=182) than for heifers after SGS (61%, N=155) ($P < 0.0001$).

Figure 2.4 shows the prevalences after respectively FGS and SGS for each herd. In four of the herds (B, D, E and F), the prevalence was significantly higher among heifers after SGS than among heifers after FGS ($P < 0.001 - 0.009$). In another two herds, A and G, the differences were borderline significant with P-values 0.066 and 0.148. In herd C the prevalences were almost equal (NS).

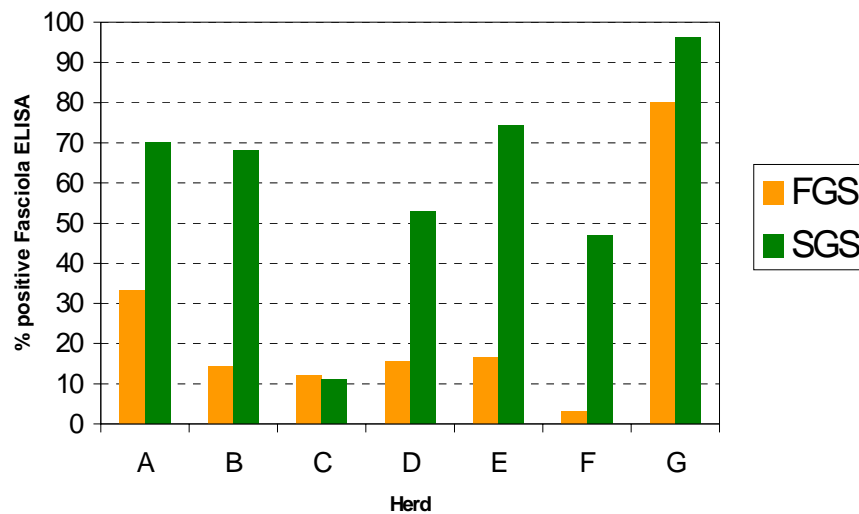


Figure 3.4 The seroprevalence of *Fasciola hepatica* (based on at least one positive ELISA in three rounds of sampling) for heifers after respectively FGS and SGS for each herd.

In some of the herds, the distribution of *Fasciola hepatica* positive heifers was clearly dependent on which paddock they had been grazing. In herd A the FGS heifers were grazed on two paddocks, one near the farm (home) and another rented field (away from the farm). Heifers on the paddock near the farm had a much higher prevalence (61%, N=18) than the heifers on the other paddock (0%, N=11) (P=0.004).

In herd E, SGS heifers were grazing two paddocks. One of the paddocks was a normal grass field near the farm, while the other was an Environmentally Sensitive Area (ESA). Among the heifers that have been grazing near the farm, the prevalence was lower (36%, N=14) than among heifers grazing the ESA (100%, N=16) (P=0.001).

Figure 3.5 shows the prevalence for heifers after FSG and SGS for each of the three rounds, which shows a tendency of increasing prevalence during the period, but they are not significantly different. Neither for the total prevalence per round (1st round: 36.6%, N=328, 2nd round: 37.7%, N=321, 3rd round: 40.1%, N=302). The average of %S/P values was 134.3 in the 1st round, 144.3 in the 2nd round and 142.0 in the 3rd round.

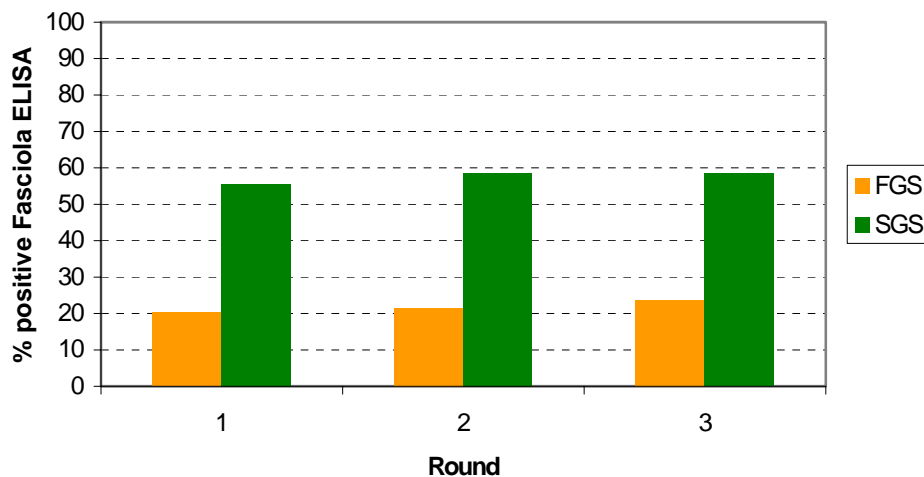
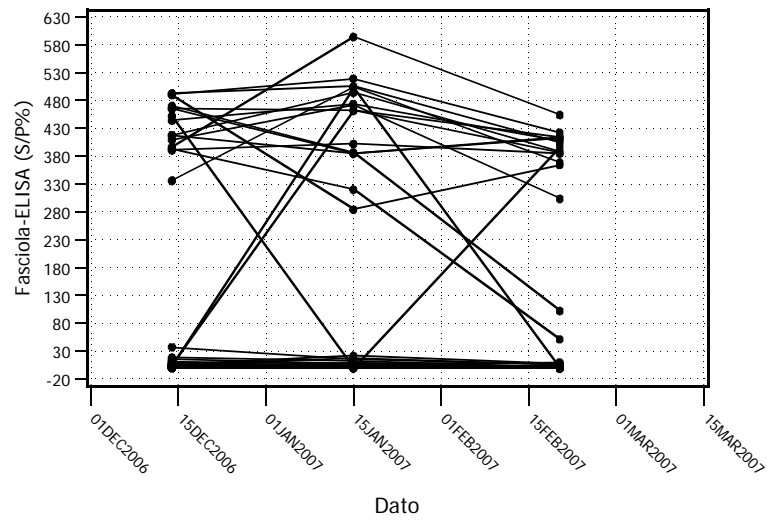


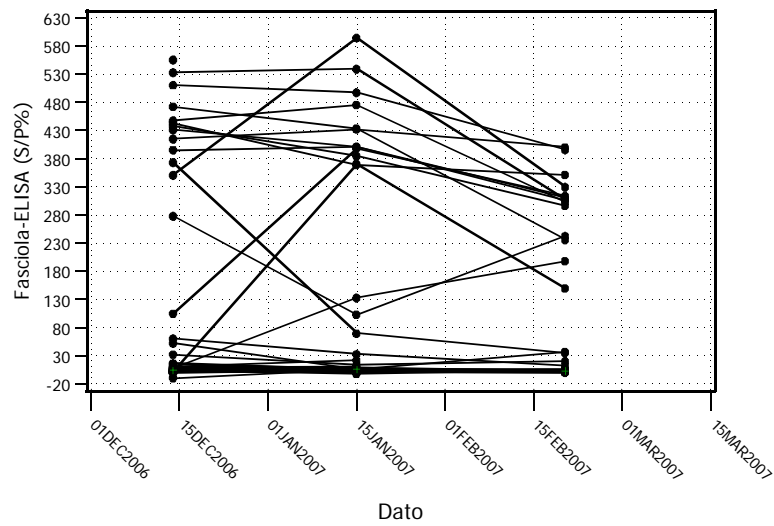
Figure 3.5 The prevalence of *Fasciola hepatica* (positive in ELISA) for heifers after respectively FGS and SGS for each round.

Figure 3.6 shows the development in heifers' ELISA values during the study period for each farm. As mentioned earlier the ELISA values generally fall neatly into two separate groups. In two of the herds F and G, none of the heifers change *Fasciola hepatica* status (positive/negative) during the study period and their % S/P values are clearly separated into a positive and a negative group. The picture is very similar in two other herds C and D and they only differ from the former two herds by each having a heifer that changes status from negative to positive between the first and second visit. In herd A, most of the heifers stayed either positive or negative during the study period. A couple of heifers went from negative to positive between the first two visits, and one of these returned to negative status at the third visit. Another heifer had just the reverse development. Several of the % S/P values of the heifers after SGS decreased towards the end of the period (but stayed positive). The heifers in herd B mainly stayed either positive or negative during the period like as the other herds. Similar to some of the other herds, a few heifers went from being negative to being positive between the first two visits. For a couple of the heifers, the % S/P values decreased during the period, but stayed positive, and both were heifers after SGS. In this herd, a small group of heifers had % S/P values just above the cut-off value (i.e. positive) at the start of the period, but all decreased and became negative. Also in herd E, there is a clear difference between the positive and a negative group. There was a general increase in % S/P values between the first and the second visit, and some heifers changed to positive status. As in herd A, two heifers changed status twice during the period.

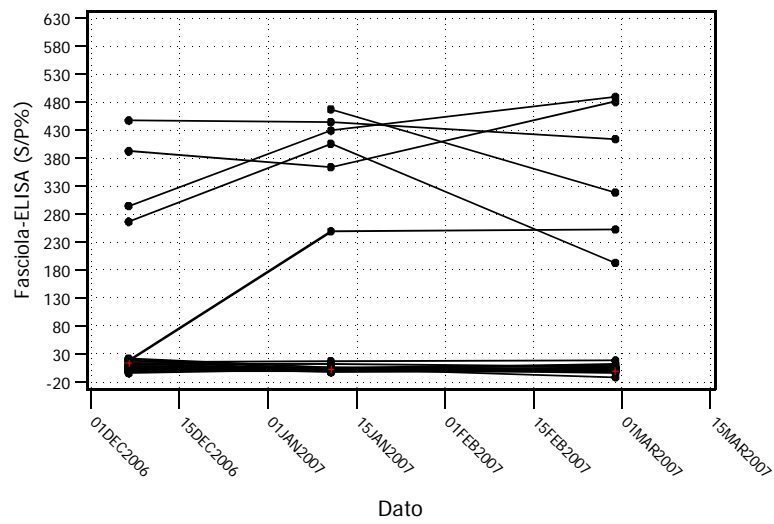
Herd A



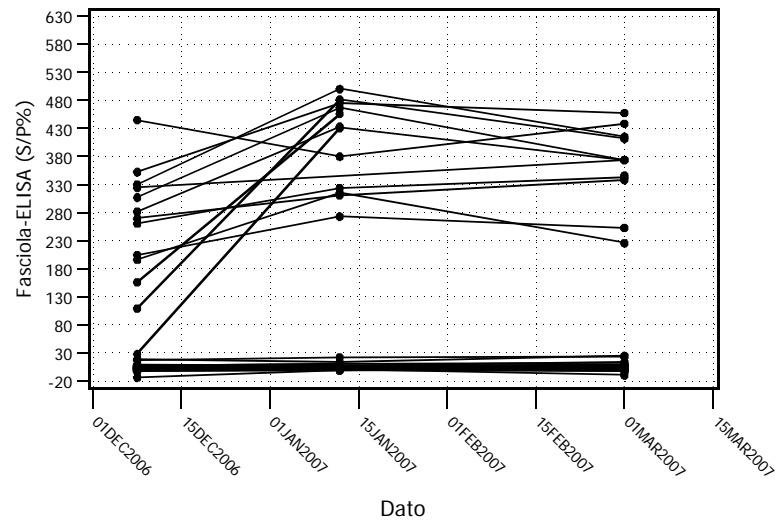
Herd B



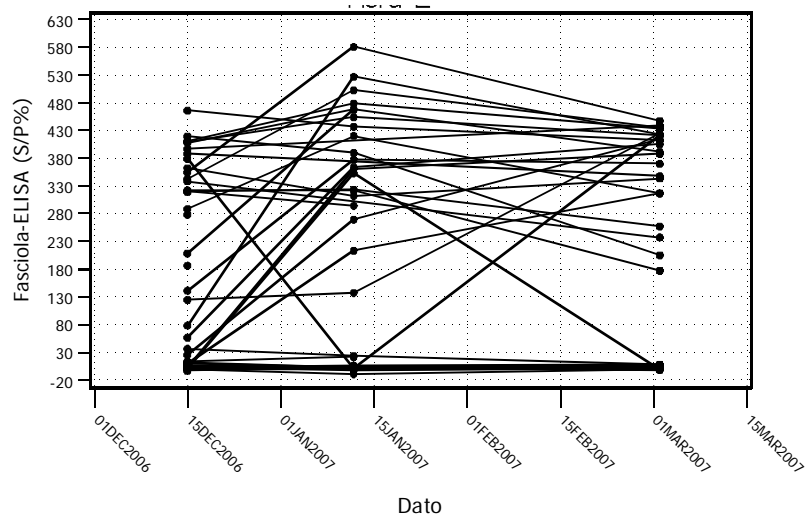
Herd C



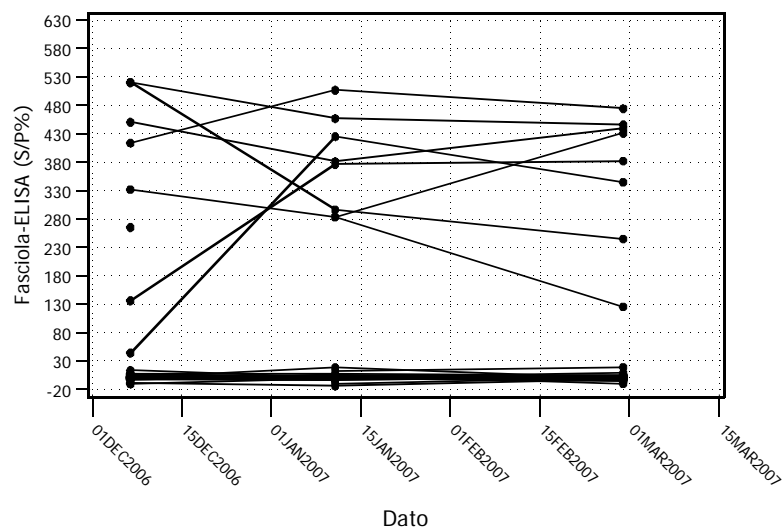
Herd D



Herd E



Herd F



Herd G

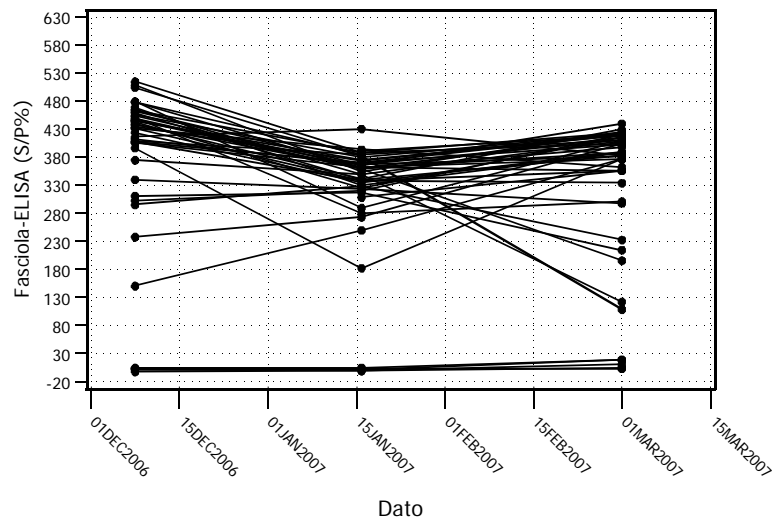


Figure 3.6 Development in *Fasciola hepatica* ELISA during the study period for the heifers in each of the seven herds (A-G).

3.3.2.2. Faecal egg count

In total, there were fifty faecal samples with a positive egg count in the three rounds (N=405). The positive samples were from 41 of the heifers (N=145), which resulted in an overall prevalence (positive in at least one sample) of 28%. Table 3.2 provides an overview of the heifers that had at least one positive faecal egg count. Only five heifers had two positive samples and just two tested positive in all three samples. The table also shows that there were heifers with a positive faecal egg count in all the seven herds, but there was considerable variation in the number of positives (2-16 heifers) between the seven herds and with that the prevalence varied (10-67 %). The prevalence in heifers after FGS (16%, N=73) was lower than in heifers after SGS (40%, N= 72) (P=0.0017) based positive egg counts.

Table 3.2 An overview of grazing patterns, ELISA results and result of faecal egg counts in heifers with at least one positive faecal egg count in seven dairy herds. (See table 3.1 for the number of samples collected)

Herd	Heifer	Pasture	ELISA	Faecal egg count (ep2g)		
				1 st round	2 nd round	3 rd round
A	1498	2	+	0	0	1
A	1502	2	+	0	0	1
A	1504	2	+	1	0	0
A	1528	1	+	0	1	0
B	2388	2	+	0	1	0
B	2530	2	+	1	0	1
B	2538	2	+	0	0	3
B	2543	2	+	0	0	2
B	2595	2	+	.	5	.
B	2725	1	+	0	0	1
C	2180	2	-	1	0	0
C	2336	1	-	0	0	1
D	1703	2	+	0	0	1
D	1710	2	-	0	1	0
D	2415	2	-	0	2	.
D	1724	1	+	0	1	0
D	2470	1	+	1	0	0
D	2607	1	-	3	0	0
E	3028	2	+	2	0	0
E	3068	2	+	1	0	0
E	3082	2	+	0	2	0
E	3088	2	-	0	1	0
E	3089	2	+	0	1	0
E	3110	2	-	1	0	0
F	1769	2	-	0	1	0
F	1796	2	+	0	0	1
F	1835	1	-	0	0	1
G	2089	2	+	5	11	.
G	2090	2	+	0	0	20
G	2109	2	+	0	4	8
G	2155	2	+	0	2	1
G	2157	2	+	0	0	5
G	2164	2	+	0	3	0
G	2170	2	+	0	0	1
G	2171	2	+	1	0	0
G	2183	2	+	0	1	5
G	2205	1	+	0	0	5
G	2212	1	+	1	0	0
G	2217	1	+	15	8	11
G	2222	1	+	0	0	3
G	2233	1	+	3	1	6
Number of egg positive samples				13	17	20
Number of samples				143	134	128

Pasture: 1: one season on pasture, 2: two seasons on pasture. ELISA: +: positive in at least one sample; -: negative in all samples. Faecal egg count: # ep2g, . : missing sample.

The number of eggs found in the samples with a positive faecal egg count varied between 1 and 20 ep2g, but in general were very low (table 3.3). More than half of the positive faecal egg counts had

just one egg in two grams of faeces. Thereby, the mean number of egg passage was 0.40 ep2g for all the faecal samples and the mean number of eggs among the positive samples was 3.2 ep2g.

Table 3.3 Distribution of number of eggs in the samples with a positive faecal egg count

	Ep2g										Total # pos. samples	Total # eggs
	1	2	3	4	5	6	8	11	15	20		
1 st round	8	1	2	0	1	0	0	0	1	0	13	36
2 nd round	9	3	1	1	1	0	1	1	0	0	17	46
3 rd round	10	1	2	0	3	1	1	1	0	1	20	78
Total	27	5	4	1	5	1	2	2	1	1	50	160

If the results were studied separately at each round the prevalence was 9% in the 1st round (N=143), 13% in the 2nd round (N=134) and 16% in the 3rd round (N=128). The results were not significantly different, but they showed a tendency of increasing prevalence during the study period i.e. from December to March. Similarly, the mean number of eggs in all the faecal samples increased during the study period from 0.25 ep2g in the 1st round to 0.34 ep2g in the 2nd round and to 0.61 ep2g in the 3rd round.

3.3.2.3. Association between *Fasciola hepatica* ELISA and faecal egg count results

In the group of faecal sampled heifers (N=145) the overall prevalence (i.e. positive in at least one sample) of *Fasciola hepatica* was 47% and 28 % by ELISA and faecal egg count, respectively. This results in a significantly (P<0.0001) different probability of being tested *Fasciola hepatica* positive by the two methods (McNemar test – table 3.4).

Table 3.4 McNemar test evaluating probabilities for being *Fasciola hepatica* positive by the two methods, ELISA and faecal egg count (+:positive in at least one sample; -: negative in all samples)

	Faecal egg count		Total
	+	-	
<i>ELISA</i>	+	32	68
	-	9	77
Total	41	104	145

As shown in table 3.4, less than half of the sero-positive heifers were positive in the faecal egg count. On the other hand nine of the sero-negative heifers had a positive faecal egg count. All of these nine heifers were only positive in one sample and only had 1 ep2g except from two sero-negative heifers that had 2 ep2g and 3 ep2g, respectively.

The effect of changed cut-off values was evaluated. If the cut-off value for the *Fasciola hepatica* ELISA was changed to 25, 20 or 15 respectively, the number of sero-negative heifer with positive egg count stayed unchanged (cut-off at 25) or decreased to 7 (cut-off at 20 or 15), as the prevalence of ELISA positive increased slightly. This indicates that only two of the sero-negative heifer with positive egg count can be due to an ELISA value just below the cut-off value (border line). Equivalent to that, the cut-off value can be changed up to 80, 100 or 200, which causes the prevalence of ELISA positive to decrease slightly and the number sero-negative heifers with positive egg count to increase to 11.

By using the data in table 3.4 based on the 145 faecal sampled heifers the sensitivity of the *Fasciola hepatica* ELISA was 0.78 with the faecal egg count as a gold standard and the specificity was 0.65.

There is a significant difference in the probability of being tested *Fasciola hepatica* positive by the two methods, when the heifers are divided into two groups according to the number of seasons on pasture (FGS (P=0.013), SGS (P=0.004)).

If the probability of being tested *Fasciola hepatica* positive by the two methods were compared at each round separately they were also strongly significant different (P<0.0001).

3.3.2.4. Model for the probability of being *Fasciola hepatica* positive by ELISA

By using the data from the 145 blood and faecal sampled heifers a logistic analysis was performed. All three risk factors, *Fasciola hepatica* status by egg count, herd and number of seasons on pasture, were tested in the model (see bilag 1) and all were significant (table 3.5) The probability of being *Fasciola hepatica* positive by ELISA is significantly lower among heifers that are *Fasciola hepatica* negative due to faecal egg count than among heifers with a positive faecal egg count when taking herd and seasons on pasture into account. Similarly the probability of being *Fasciola hepatica* positive by ELISA is significantly lower among FGS heifers than among SGS heifers

taking faecal egg count status and herd into account. When taking faecal egg count status and seasons on pasture into account the probability of being *Fasciola hepatica* positive by ELISA was significantly different in the seven herds.

Table 3.5 Results of logistic analysis describing the probability of being *Fasciola hepatica* positive by ELISA (positive in at least one sample).

Variable	Level	β	SE	P-value
Intercept		27.7	0.69	<0.0001
Egg ¹				0.02
	0	-1.24	0.55	
	1	0.00	0.00	
Pasture ²				0.003
	1	-1.36	0.46	
	2	0.00	0.00	
Herd				<0.0001
	A	-25.53	0.72	
	B	-26.26	0.72	
	C	-28.33	0.93	
	D	-27.10	0.81	
	E	-25.99	0.91	
	F	-27.04	0.00	
	G	0.00	0.00	

¹ 1: positive defined as at least one positive faecal egg count, 0: negative, no positive egg count.

² 1: FGS, 2: SGS

The probabilities of being *Fasciola hepatica* positive by ELISA (positive in at least one sample), when taking account for seasons on pasture (FGS/SGS) and *Fasciola hepatica* status by faecal egg count (positive in at least one sample) for each of the herds are illustrated in figure 3.7.

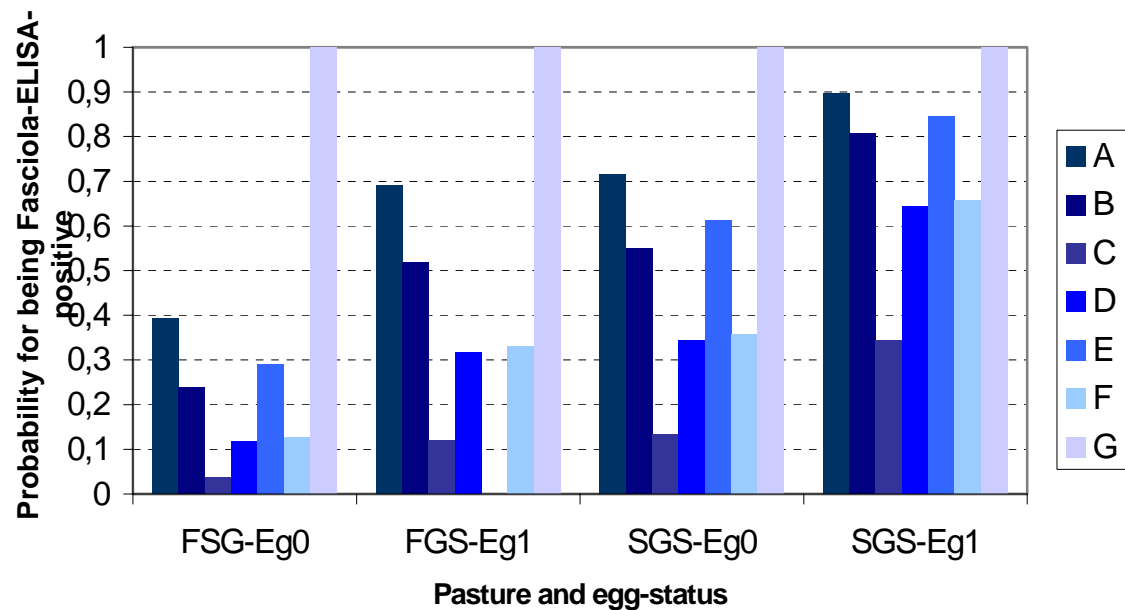


Figure 3.7 The model predicted probabilities of being *Fasciola hepatica* positive by ELISA (positive in at least one sample), when taking account for number of seasons on pasture (FGS/SGS) and *Fasciola hepatica* status by faecal egg count (positive in at least one sample) for each of the herds.

The probabilities for each herd in figure 3.7 reflects the prevalence in the herds. Herd G differs from the others by having a predicted probability for being *Fasciola hepatica* positive equal to 1 independent of faecal egg count status and seasons on pasture. The remaining six herds have a uniform pattern. In these herds the probability of being *Fasciola hepatica* positive is lowest among heifers that are *Fasciola hepatica* negative due to faecal egg count and are heifers after FGS. The probability increases considerably among heifers after FGS that are *Fasciola hepatica* positive due to faecal egg count. Among the heifers after SGS with a negative *Fasciola hepatica* status according to faecal egg count, the probabilities of being *Fasciola hepatica* ELISA positive are slightly higher than among *Fasciola hepatica* egg positive heifers after FGS. Compared to this group the probabilities increase considerably among heifers after SGS with a positive *Fasciola hepatica* status by faecal egg count.

Interaction between these three risk factors were investigated by the model. When including the interaction between herd and *Fasciola hepatica* positive by egg count plus the interaction between herd and number of seasons on pasture the model could not converge. No significant interaction

was found between *Fasciola hepatica* positive by egg count and number of seasons on grass (P=0.12).

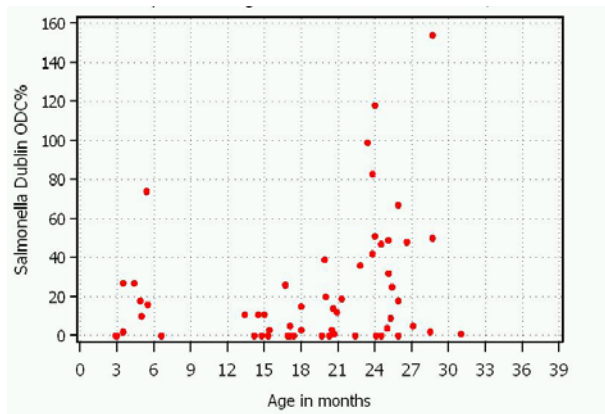
3.3.4. *Salmonella* Dublin ELISA

The *Salmonella* Dublin ELISA results from the first round are shown in figure 3.8 for each of the seven herds. These graphs show the ODC% vs. age. There are relatively few with high ODC% i.e. above 50 ODC%.

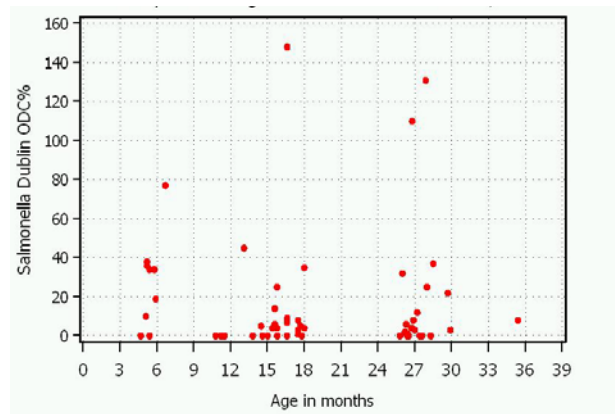
At the first round, calves between were sampled and examined by ELISA. These are also seen in figure 3.8 and show that there is most likely very limited or no transmission of *Salmonella* Dublin among this age group (3-6 months) in herds E, F and G. In the other four herds A, B, C and D most of the calves have been exposed to *Salmonella* Dublin and have produced antibodies.

Among the heifers between eight and thirty-six months of age, the number of heifers with a high ODC% i.e. above 50 were low in all seven herds. But in three of the herds, D, F and G, there was only one heifer with a high ODC%.

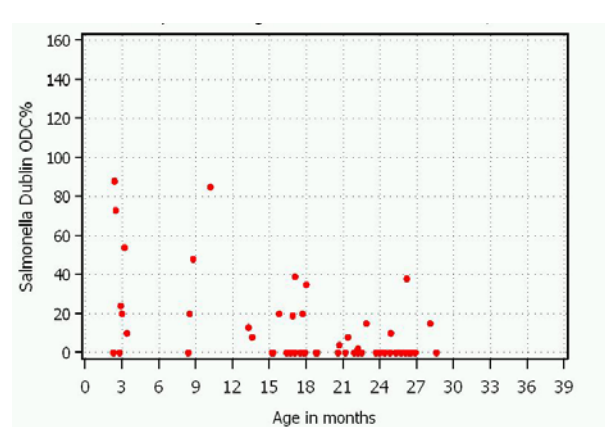
Herd A



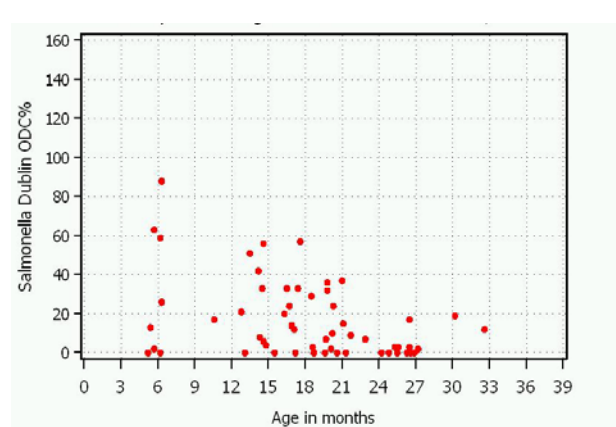
Herd B



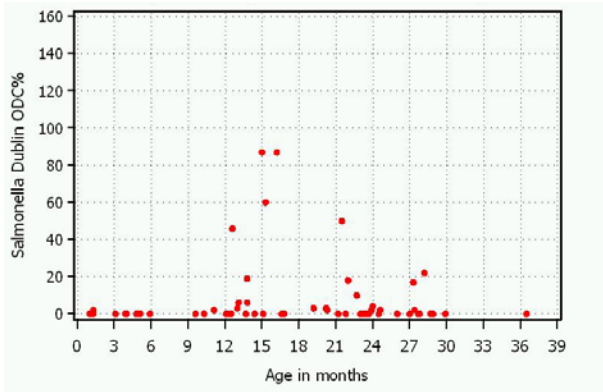
Herd C



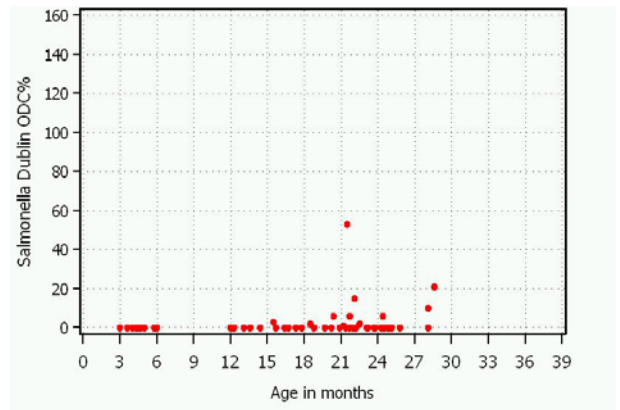
Herd D



Herd E



Herd F



Herd G

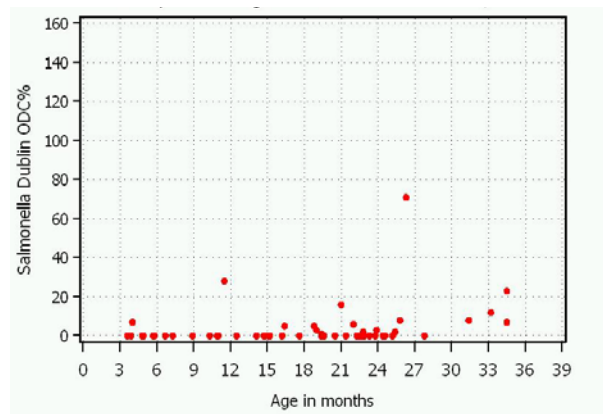
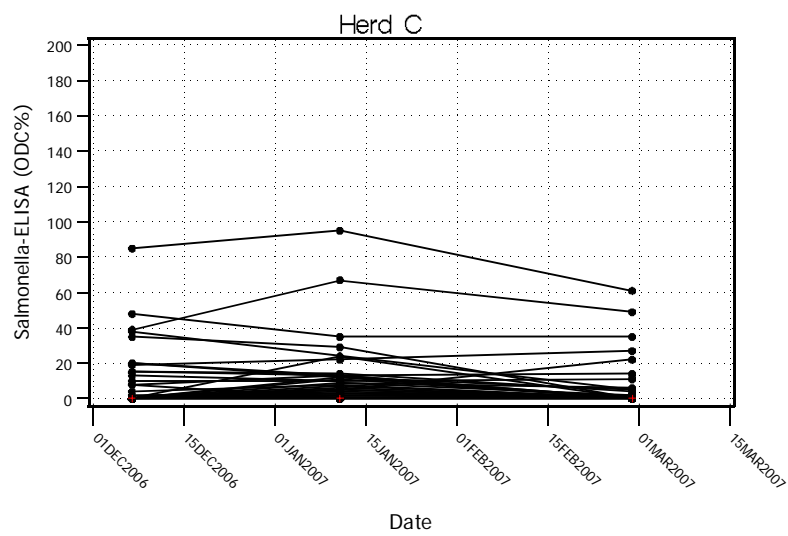
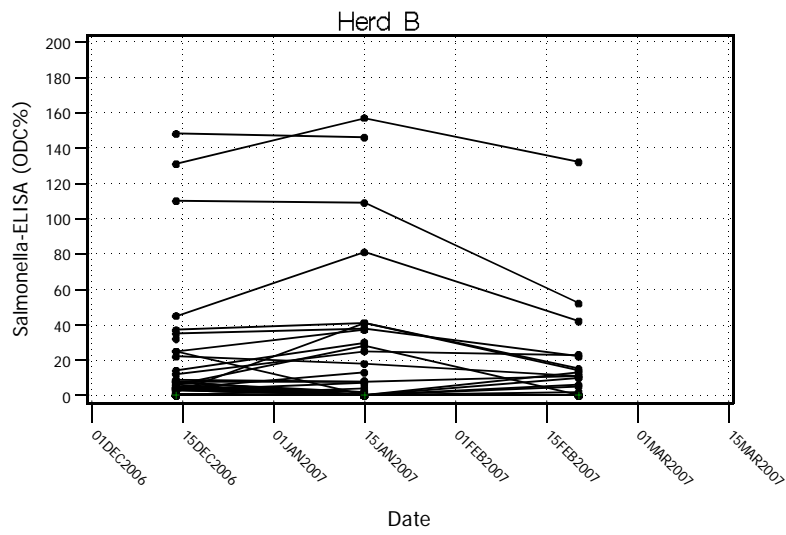
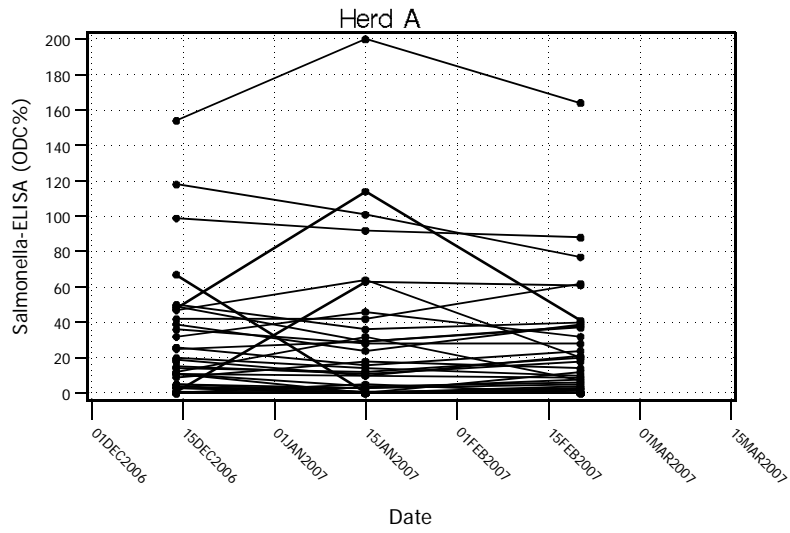
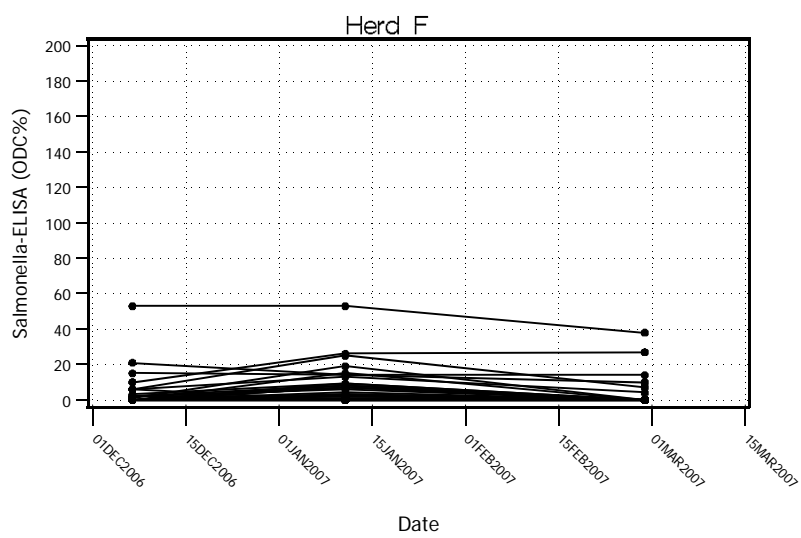
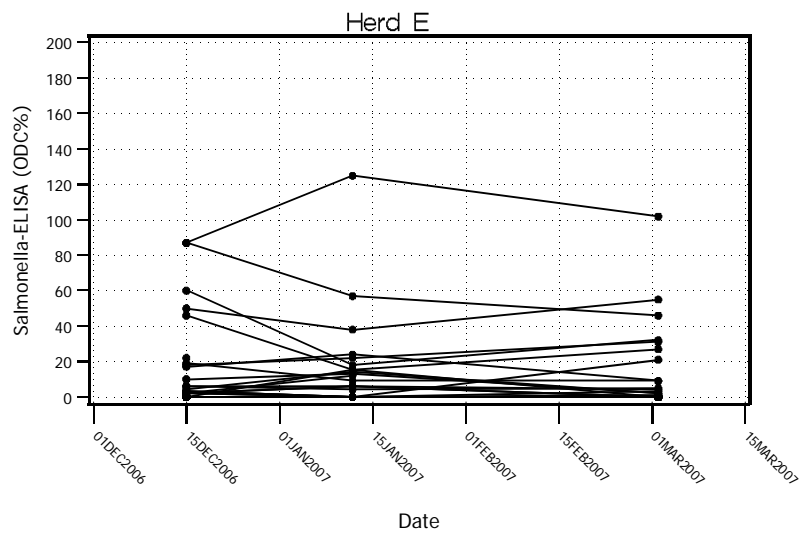
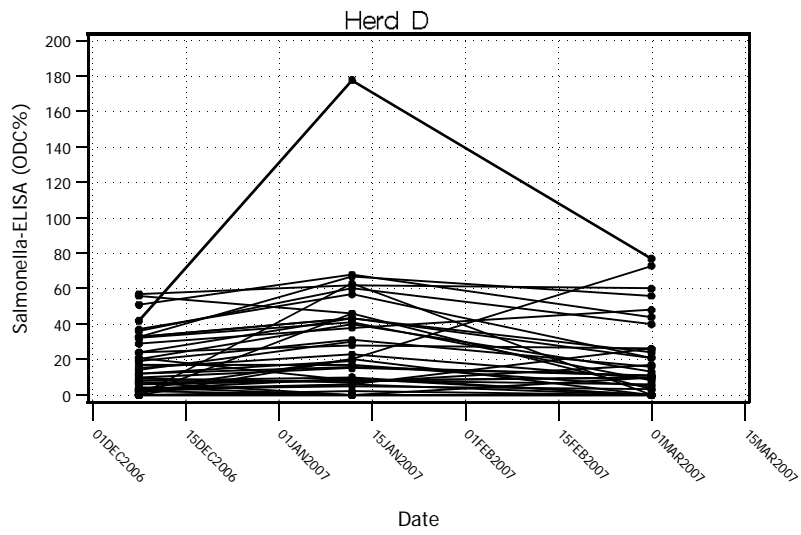


Figure 3.8 Antibodies levels vs. age in the seven herds (A-G) in the first round in December 2006.

Figure 3.9 illustrates how the ODC% for each heifer changed over the study period in the seven herds. The ELISA test results for the same heifer are on the figure joined together with lines despite the fact that the ODC% values between the sampling days are not known. These graphs show no clear segregation into a positive and a negative group as in the *Fasciola hepatica* ELISA. Figure 3.9 also shows that there are few heifers with high ODC%.





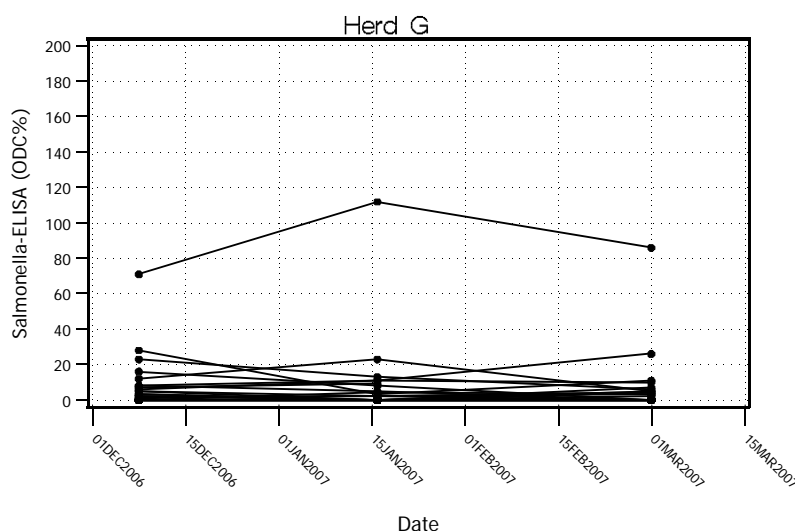


Figure 3.9 Development in *Salmonella*-ELISA during the study period for the seven herds (A-G).

The *Salmonella* Dublin status of each heifer is defined on the basis of at least two ELISA values during the study period. As a result of the average ODC% value and the development of the same the heifers are divided between the two risk groups described earlier. The number of heifers in each group distributed over herds is shown in figure 3.9.

In total, only twenty-two heifers (6.7%) belong to risk group I. The remaining 308 heifers make up risk group II. On herd level, the number of heifers in risk group I varied from zero to six (0.0-14.3%), so risk group II accounts for the majority of the heifers in all the herds (85.7-100.0%).

Thirteen of the heifers in risk group I are heifers after FGS (N=181) and the nine were heifers after SGS (N=149).

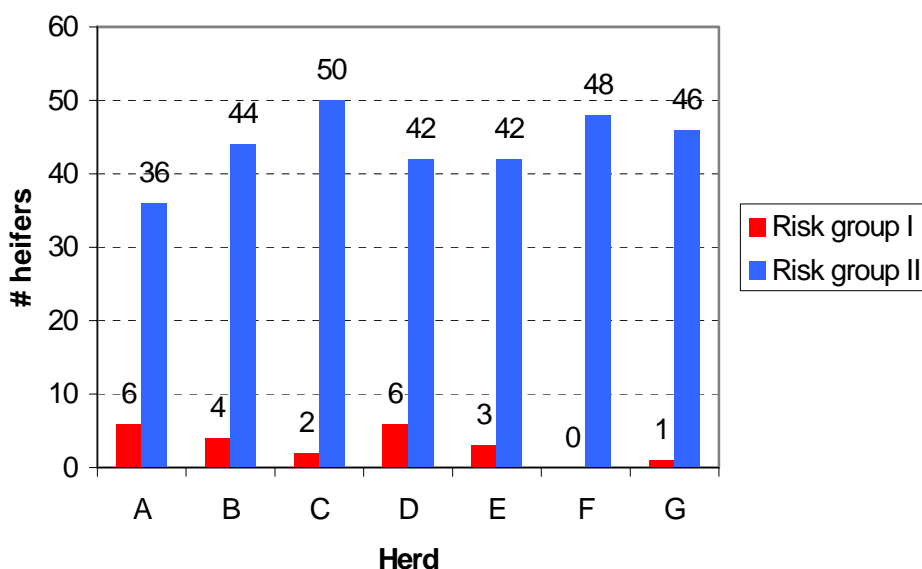


Figure 3.9 Number of heifers in the two risk groups for each of the seven herds (A-G).

3.3.5. Association between *Fasciola hepatica* and *Salmonella* Dublin

On the basis of the *Fasciola hepatica* ELISA, a heifer was said to be positive if at least one sample is positive (i.e. over the cut-off value = 30 %S/P). With regard to the *Salmonella* status, the heifer was said to be positive if it belongs to risk group I. These definitions provide the data shown in table 3.5. Only 22 heifers (6.7%) were *Salmonella* sero-positive and only five of these were also sero-positive regarding to *Fasciola hepatica*. Based on these data, there was no apparent association between the two infections (P=0.12).

The relative risk for having *Salmonella* Dublin is 0.45 when being positive in *Fasciola hepatica* ELISA compared to being negative in *Fasciola hepatica* ELISA (95% confidence interval 0.17-1.18).

Table 3.5 *Salmonella* Dublin infection in relation to *Fasciola hepatica* infection for 330 heifers in seven dairy herds (P=0,12).

	<i>Salmonella</i> Dublin		Total
	+	-	
<i>Fasciola hepatica</i> +	5	126	131
<i>Fasciola hepatica</i> -	17	182	199
Total	22	308	330

The prevalence of *Salmonella* Dublin among 330 heifers was 6.7% and the prevalence of *Fasciola hepatica* was 40.0%. If the two infections are independent, the prevalence of heifers with both infections would be 2.65% with a 95% confidence level between 0.91-4.38%. In this case the prevalence is 1.5% and not significantly different (i.e. contained in 95% confidence level). This implies that in order for there to have been a significant association between the infections, the prevalence of both infections should have been under 0.91% which means three or less heifers positive for both infections, or the prevalence should have been over 4.38%, which means a number of heifers on 15 and upwards that were positive regarding both infections.

If the relative risks found in this study are representative of the full population of heifers in herds with the two infections, the number of animals that should have been sampled to get a significant result was almost twice the current sample size.

In table 3.6 and 3.7 the heifers were divided into two groups according to number of seasons on pasture (FSG vs. SGS) there were still no association between *Fasciola hepatica* and *Salmonella* Dublin ($P(\text{FSG})=0.7$, $P(\text{SGS})=0.16$).

Table 3.6. *Salmonella* Dublin infection in relation to *Fasciola hepatica* infection for 181 FGS heifers in seven dairy herds ($P=0,74$).

	<i>Salmonella</i> Dublin		Total
	+	-	
+	2	40	42
<i>Fasciola hepatica</i> -	11	128	139
Total	13	168	181

Table 3.7. *Salmonella* Dublin infection in relation to *Fasciola hepatica* infection for 149 SGS heifers in seven dairy herds ($P=0,16$).

	<i>Salmonella</i> Dublin		Total
	+	-	
+	3	86	89
<i>Fasciola hepatica</i> -	6	54	60
Total	9	140	149

3.4. Discussion

Evaluation of Fasciola hepatica ELISA

The *Fasciola hepatica* ELISA in this study had a very strong correlation between two ELISA measurements on the same ELISA plate and a slightly lower correlation between measurements on two different ELISA plates. Similarly, only a small variation in mean corrected positive and negative values were found between plates. This shows a good precision for ELISA measurements.

Of the five samples that changed status (positive/negative) from the first to second measurement, three were close to the cut-off value. The remaining two had a large difference between the two measurements and can possibly be related to an error in performing the test. It should also be noted that the samples were from heifers that changed infection status during the study, so they are not

randomly selected. The majority of the ELISA values segregated into two groups with a clear separation above and below 80-100 % S/P. This level was not coincident with the cut-off (30 % S/P) value suggested by the manufacturer of the ELISA kit. The distribution of S/P ratios (%) found in this study was in good agreement with previous studies in cattle using the same commercial ELISA kit. In these two studies, the two groups of %S/P values corresponded to a group of non-infected and infected animals, respectively (Reichel, 2002, Molly *et al*, 2005).

Four heifers changed status (positive/negative) twice during the study with big variations in %S/P values. This seems very unlikely, for example a positive-negative-positive sequence, to be explained by a natural phenomenon. It is probably due to a mix up of the samples, which is supported by the results from the double measurements described earlier. In this study a heifer is defined as *Fasciola hepatica* positive in ELISA when having minimum one positive sample. By this definition a heifer, who had the status negative-positive-negative in the study period, was defined to be positive even if it was unlikely to be true. This has not been taken into account, because of very limited number of heifers with such ELISA-patterns.

Seroprevalence of Fasciola hepatica

The animal level prevalence of *Fasciola hepatica* according to the ELISA (positive at least one sample) was 40% (N=337) with considerable variation between the herds. Overall, the prevalence was higher among heifers after SGS than after FGS, which was also the case in all the herds except one. This result may indicate that infection with *Fasciola hepatica* mainly take place during the second season on grass or the number of infected animals build up over time. This was also described in a previous Danish study based on faecal samples, where the infection was rare among calves and the prevalence increased with age (Henriksen & Pilegaard-Andersen, 1979). Based upon slaughterhouse registrations, the prevalence is highest in older cattle, but it is also high among cattle grazing marginal land (Thamsborg *et al*, 2005). Results from two of the herds in this study showed that the distribution of *Fasciola hepatica* infection was dependent on which paddock they had been grazing and thus clearly on the environment of the paddock. So the lower prevalence among heifers after FSG may be explained by the fact that they are grazing on drier paddocks, whereas heifers at their SGS are grazing on more wet paddocks. According to a British study, the prevalence of *Fasciola hepatica* was associated with the presence of Environmental Sensitive Areas (Pitchard *et al*, 2005). The difference in prevalence after FGS and SGS, respectively, can also be due to a low

infection during the first season on grass, which does not cause an increase in antibodies against *Fasciola hepatica*. One experimental study indicates that a low infectious dose may delay the occurrence of seroconversion to 5-7-weeks p.i. (Cornelissen *et al*, 1999). Normally it occurs 2-4 weeks p.i. (Levieux *et al*, 1992b, Leclipteux *et al*, 1998).

The main part of the heifers in all the seven herds were either positive or negative in the *Fasciola hepatica* ELISA over the whole study period, which gave in an almost steady prevalence in the three rounds of visits. It can be explained by the fact that the study period was in December-March and thereby at least two months after the highest level of transmission in paddock, which in Denmark is the period July-August to October (Shaka & Nansen, 1979) and antibodies can be produced against *Fasciola hepatica* antigens 2-4 weeks p.i. (Levieux *et al*, 1992b, Leclipteux *et al*, 1998). So the prevalences in the three rounds are almost steady and not significantly different, but showed a weak tendency to increase between the first and second round. Similarly the average of the %S/P values increased from December to January. This can be explained by transmission late in the grazing season and late housing. In some heifers a weak tendency for decreasing %S/P values was seen at the end of the study period. Other studies have shown that the antibody level slowly decreases after the liver flukes have migrated to the bile ducts (Movesesijan *et al*, 1975, Levieux *et al*, 1992a). It is likely the tendency to decreasing ELISA values in the end of the study period can be explain by this biological phenomenon, because it is several months after transmission on the paddock and liver flukes have had time to reach the bile ducts during the study period.

Faecal egg count for Fasciola hepatica and association with ELISA

The prevalence of *Fasciola hepatica* according to a positive faecal egg count at least one sample was 28% in the heifers subject to faecal sampling (N=145). In this group of heifers the prevalence according to ELISA was 47%. Positive egg counts were found in all seven herds and the prevalence of *Fasciola hepatica* based on egg counts was higher among heifers after SGS than after FGS. In general the number of eggs was low as expected, because of the fact the cattle shed low numbers of eggs (Boray, 1969, Bouvry & Rau, 1986), especially adults because of their resistance to infection (Boray, 1969). Only few heifers had more than one positive sample during the study, which can be explained by the variation in egg counts from day to day (Boray, 1969) and further the analytic sensitivity of this method is low (Happich & Boray, 1969). One study found a sensitivity equal to 0.69 when using 10 g faeces by a Bayesian technique, where no gold standard was used (Rapsch *et*

al, 2006). In the present study only 2 g were examined and thereby a considerably lower sensitivity must be expected. Both the prevalence and mean number of eggs in the samples for each round showed a tendency to increase during the study period, but it was not significant. In accordance with these results two previous studies have shown that egg excretion is characterized by a peak from December to March (Henriksen & Pilegaard-Andersen, 1979, Bouvry & Rau, 1986). This, like the peak in ELISA, depends on the time of transmission and the time for housing.

As mentioned, the prevalence of *Fasciola hepatica* depend on the method used for diagnosis. The prevalence estimate is higher when using the ELISA (47%) compared to the faecal egg count (28%) among the 145 heifers, from which both blood and faeces were collected. Similar results are found in another study, where the prevalences were 41% by ELISA and 27% by faecal egg count (Molly *et al*, 2005). When comparing the two methods, the probability of being positive (i.e. positive at least one sample) was significantly different.

By using the faecal egg count as gold standard, the sensitivity and specificity for the ELISA were 0.78 and 0.65, respectively. Both test characteristics are found to be higher in other studies. The sensitivity has previously been estimated to be in the range of 92.7%-100% and the specificity was between 93.7-100% (Reichel, 2002, Molly *et al*, 2005, Rapsch *et al*, 2006). The lowest sensitivity and specificity was found by not using a gold standard (Rapsch *et al*, 2006). The low specificity in this study is due to the fact that only about half the heifers that are positive in the ELISA have a positive egg count. This can be explained by the low detection probability of eggs (low analytic sensitivity of the method) and the fact that antibodies are present in the blood after the liver flukes are no longer present in the bile ducts. These reasons can also account for the difference in prevalence by the two methods. The sensitivity is low, because of the 41 heifers with a positive egg count nine are negative in the ELISA. In other studies, the specificity of egg count is considered to be very high (Rapsch *et al*, 2006), so the possibility of false positive is very unlikely. Lowering the cut-off value of the ELISA has only minor effect, which indicates that the negative ELISA status is not due to border line sample value. Further, the heifers with a positive egg count and negative ELISA status can be explained by the possibility that no seroconversion has taken place yet. The manufacturer of the ELISA kit writes in the instructions that in rare cases the animal has *Fasciola hepatica* infection without producing specific antibodies (Anonymous, 2006). A low infectious dose may delay the occurrence of seroconversion to 5-7-weeks p.i. (Cornelissen *et al*, 1999).

Model predicting the probability of being Fasciola hepatica by ELISA

The model showed that faecal egg count, number of seasons on pasture and herd were significant risk factors for being *Fasciola hepatica* positive by ELISA. The predicted probabilities depended on prevalence in the herds. The probability of being *Fasciola hepatica* ELISA positive is higher after SGS than after FGS. The fact that the probability for being *Fasciola hepatica* ELISA positive is higher in heifers with a positive egg count show that there is a strong association between shedding of eggs and an ELISA response. But the probabilities of being *Fasciola hepatica* ELISA positive were not zero when the heifers have a negative egg count. This can be explained by the specificity of the ELISA not being less than one. These results confirm the earlier described results.

Prevalence of Salmonella Dublin

The results from *Salmonella* Dublin ELISA shown that transmission was very limited among the young stock in three of the seven herds. This was despite the fact that the farmers were no action taking to reduce the transmission and the herds had had high antibodies in the bulk milk for a minimum of four years. The development of *Salmonella* Dublin ELISA values for the heifers in each of the seven herds show that there is not a clear segregation into a positive and a negative group. Therefore, determining the true infection status of the heifers is difficult. A recent study (Nielsen *et al*, 2007) divided the animals into groups based on repeated ELISA values and found that on average, above 50 ODC% caused an increased risk of having *Salmonella* Dublin faecal culture positive samples than animals with an average below 50 ODC%. Based on that study the heifers in this study were grouped into two risk groups. Only 22 (6.7%) heifers were in risk group I (higher risk of faecal shedding). The number of risk group I heifers in each herd varied from 0 to 6. The total number of heifers in risk group I was considerably less than expected in several of the herds. Nielsen *et al* (2007) found about 34% with persistently high ODC% values in chronically infected herds. Again this can be due to the fact that transmission of *Salmonella* Dublin was less than expected in several of the herds.

Association between Fasciola hepatica and Salmonella Dublin

Based on the *Fasciola hepatica* ELISA status and *Salmonella* Dublin risk groups, no significant association between the two infections was found. The prevalence of heifers with both infections was 1.5% and thereby in between the limits of 95% confidence level for the prevalence when the two infections are assumed to be independent given the data in this study (131 *Fasciola hepatica*

positive, 22 *Salmonella* Dublin risk group I). Of the 22 *Salmonella* Dublin positive heifers only five were positive in the *Fasciola hepatica* ELISA, whereas 17 were negative. This indicates a tendency of lower prevalence of *Salmonella* Dublin among *Fasciola hepatica* positive heifers. When investigating the association among heifers after FGS and after SGS separately, the same tendency is seen towards a lower prevalence of *Salmonella* Dublin among the heifer *Fasciola hepatica* ELISA positive, particular so among the heifers after SGS. However, the data do not provide enough heifers with both infections or *Salmonella* Dublin alone to say this tendency was significant. To do so the sample size had to be almost twice the current.

The lack of association between the two infections in this study agrees with an other study Taylor & Kilpatrick (1975), who also investigated on the animal level, but using different diagnostic methods. Similar Morisse & Cotte (1994) did not find any difference in number and level of *Fasciola hepatica* ELISA positive animals in herds with and without *Salmonella*. On the other hand, the results from this study are contrary to the studies that found an association between the two infections, but these are investigated on herd level (Richardson & Watson, 1971, Vaessen *et al*, 1998). Because of the opposing results it is difficult to make a definitive conclusion regarding the association between infection with *Fasciola hepatica* and *Salmonella* Dublin, but it seems most likely that the association is due external factors, like climate, as suggested by Taylor & Kilpatrick (1975).

In conclusion, this study did not find any association between *Fasciola hepatica* and *Salmonella* Dublin, but the result showed a small tendency towards lower prevalence of *Salmonella* Dublin in *Fasciola hepatica* ELISA positive heifers. The prevalence of *Salmonella* Dublin positive heifers in the seven herds was considerably lower than expected from the bulk milk ELISA. The prevalence of *Fasciola hepatica* varied in the seven herds and was very high in some of the herds. The results showed that the prevalence in heifers after SGS was higher than after FGS, which was also found in previous studies. The difference in prevalence by the diagnostic methods used for *Fasciola hepatica* was similar to other studies, even though the sensitivity and specificity of the ELISA were lower than found by others.

Based on this study further investigations could be focusing on which external factors that could be common for the infections. Obvious factors are climate and wetter conditions, but this can require a data for at least several years. The results from this study also show that *Fasciola hepatica* ELISA

could be used as a diagnostic tool instead of sedimentation. But caution should be taking in old cattle, because the present of antibodies against *Fasciola hepatica* show that the animal had had the infection at some point, but not necessarily at present active infection.

3.5. References

Aitken M.M., Hughes D.L., Jones P.W., Hall G.A., Collis K.A. (1978a): Effects of intravenous *Salmonella dublin* on cattle at different stages of *Fasciola hepatica* infection. *Journal of Comparative Pathology*, 88, 433-442

Aitken M.M., Jones P.W., Hall G.A., Hughes D.L., Collis K.A. (1978b): Effects of experimental *Salmonella dublin* in cattle given *Fasciola hepatica* thirteen weeks previously. *Journal of Comparative Pathology*, 88, 75-84

Anonymous (2006): Immunological diagnosis of fasciolosis by ELISA method in serum and milk. Pourquier® ELISA bovine fasciolosis serum and milk verification. Version P05120/03 – 20/09/2006. Institut Pourquier, Montpellier, France

Boray J.C. (1969): Experimental fascioliasis in Australia. *Advances in Parasitology*, 7, 95-210

Bouvry M., Rau M.E. (1986): Seasonal variations in egg passage of *Fasciola hepatica* in dairy cows in Quebec. *Veterinary Parasitology*, 22, 267-273

Cornelissen J.B., Gaasenbeek C.P., Boersma W., Borgsteede F.H., van Milligen F.J. (1999): Use of a pre-selected epitope of cathepsin-L1 in a highly specific peptide-based immunoassay for the diagnosis of *Fasciola hepatica* infections in cattle. *International Journal of Parasitology*, 29, 685-696

Dijkstra R.G. (1973): Does control of the liver fluke decrease the occurrence of Salmonellosis in cattle?. *Veterinary Record*, 93, 467-468

- Ersbøll A.K., Toft N., Bruun J. (2004): Chapter 4. Observational studies. I: Houe H., Ersbøll A.K., Toft N. (eds) (2004): Introduction to Veterinary Epidemiology. Biofolia, Frederiksberg, Denmark, 47-60
- Happich F.A., Boray J.C. (1969): Quantitative diagnosis of chronic fasciolosis. 1. Comparative studies on quantitative faecal examinations for chronic *Fasciola hepatica* infection in sheep. Australian Veterinary Journal, 45, 326-328
- Henriksen S.A. (1966): En forbedret metode til påvisning af distomæg i gødningsprøver (A improved method for detection of diastom eggs in faecal samples (in Danish)). Nordisk Veterinærmedicin, 18, 266-270
- Henriksen S.A., Pilegaard-Andersen C. (1979): *Fasciola hepatica* i Danmark. Status over 15 års diagnostiske undersøgelser af bovine fæcesprøver. *Fasciola hepatica* in Denmark. A survey on 15 years diagnostic examination on bovine faeces samples (in Danish). Nordisk Veterinærmedicin, 31, 6-13.
- Houe H., Ersbøll A.K., Nielsen L.R (2004): Chapter 3. Nature of data. I: Houe H., Ersbøll A.K., Toft N. (eds) (2004): Introduction to Veterinary Epidemiology. Biofolia, Frederiksberg, Denmark, 21-46
- Leclipteux Th., Torgerson P.R., Doherty M.L., McCole D., Protz M., Farnir F., Losson B. (1998): Use of excretory / secretory antigens in a competition test to follow the kinetics of infection by *Fasciola hepatica* in cattle. Veterinary Parasitology, 77, 103-114
- Levieux D, Levieux A., Mage C., Garel J.-P. (1992a): Immunological detection of chemotherapeutic succes in bovine fasciolosis using the specific antigen f2. Veterinary parasitology, 45, 81-88
- Levieux D, Levieux A., Mage C, Venien A. (1992b): Early immunodiagnosis of bovine fascioliasis using the specific antigen f2 in a passive hemagglutination test. Veterinary parasitology, 44, 77-86

- Molloy J.B., Anderson G.R., Fletcher T.I, Landmann J., Knight B.C. (2005): Evaluation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies to *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* in cattle, sheep and buffaloes in Australia .*Veterinary Parasitology*, 130, 207-212
- Morisse J.P., Cotte J.P. (1994): Evaluation of some risk factors in bovine salmonellosis. *Veterinary Research*, 25, 191-195
- Movesesijan M., Jovanovic B., Aalund O., Nansen P. (1975): Immune response of sheep to *Fasciola hepatica* infection. *Research in Veterinary Science*, 18, 171-174
- Nielsen L.R., Ersbøll A.K. (2004): Age-stratified validation of an indirect *Salmonella* Dublin serum enzyme-linked immunosorbent assay for individual diagnosis in cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 16, 212-218
- Nielsen L.R., Baggesen D.L., Ersbøll A.K (2007): Challenging the traditional methods for detection of *Salmonella* Dublin carrier animals. Proceedings of the DubPar seminar, March 22, 2007, Copenhagen, Denmark, 11-16
- Pritchard G.C., Forbes A.B., Williams J.L., Salimi-Bejestani M.R., Daniel R.G. (2005): Emergence of fasciolosis in cattle in East Anglia. *Veterinary Record*, 157, 578-582
- Rapsch C., Schweizer G., Grimm F., Kohler L., Bauer C., Deplazes P., Braun U., Torgerson P.R. (2006): Estimating the true prevalence of *Fasciola hepatica* in cattle slaughtered in Switzerland in the absence of an absolute diagnostic test. *International Journal for Parasitology*, 36, 1153-1158
- Reichel M.P. (2002): Performance characteristics of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of liver fluke (*Fasciola hepatica*) infection in sheep and cattle. *Veterinary Parasitology*, 107, 65-72
- Richardson A., Watson W.A. (1971): A contribution to the epidemiology of *Salmonella* Dublin infection in cattle. *British Veterinary Journal*, 127, 173-183

Shaka S., Nansen P (1979): Epidemiology of fascioliasis. Studies on the seasonal availability of metacercariae and the parasite stages over wintering on pasture. *Veterinary Parasitology*, 5, 145-154

Thamsborg S.M., Larsen M, Kähler J., Pedersen N.D. (2005): Fasciolosis in Danish cattle – a re-emerging problem? Proceedings of the 1st Symposium of the Scandinavian-Baltic Society for Parasitology, Vilnius, Maj 2005; *Bulletin of the SBSP*, 14, s.150-151.

Taylor S.M., Kilpatrick D. (1975): The relationship between concurrent liver fluke infection and salmonellosis in cattle. *Veterinary Record*, 96, 342-343

Vaessen M.A., Veling J., Frankena K., Graat E.A.M., Klunder T. (1998): Risk factors for *Salmonella dublin* infection on dairy farms. *Veterinary Quarterly*, 20. 97-99

4. KLINISKE REGISTRERINGER

4.1. Introduktion

Gode kvier er vigtige i malkekvægsbesætninger, da de er fremtidens malkekøer og dermed grundlaget for fremtidens produktion. Det er derfor vigtigt, at kvierne er sunde og raske samt har den ønskede tilvækst. Flere studier har vist, at infektion med *Fasciola hepatica* kan give nedsat tilvækst afhængig af graden af infektionen, og de inficerede kvier er dermed længere tid om at nå en vis vægt (Hope Cawdery *et al*, 1977, Oakley *et al*, 1979). Det er derfor relevant at undersøge om der er en effekt af infektion med *Fasciola hepatica* i de syv besætninger, der indgår i dette studie, da infektionen forekommer i flere af besætningerne med høj prævalens (se afsnit 3).

Formålet med denne del af specialet er derfor at vurdere kviernes sundhed og trivsel, herunder specielt deres størrelse og estimeret vægt, i forhold til deres *Fasciola hepatica* infektionsstatus fundet ved ELISA. Baggrunden for disse undersøgelser er de kliniske registreringer af kvierne, som blev foretaget i forbindelse med indsamlingen af blod- og fæcesprøver ved besætningsbesøgene.

I denne del af specialet anvendes en del af resultaterne fra rapporten - Vurdering af kviers vækst. Resultater fra projekt ”Styring af kvieproduktionen” - der er udarbejdet af Fisker *et al* (2003), hvis formål var at udvikle nogle redskaber til vurdering af kviers vækst. Den bygger på data indsamlet i femten besætninger og dermed målinger af 2053 kvier af forskellig race. Den antages derfor at være repræsentativ for kvier i danske malkekvægsbesætninger og dermed også for de syv besætninger, som indgår i dette studie.

4.2. Materialer og metoder

4.2.1. Studiedesign

Generelt med hensyn til studiedesign, udvælgelse af besætninger samt udvælgelse af kvier i besætningerne henvises der til beskrivelsen af studiet i afsnit 3.

4.2.2. Kliniske registreringer

De kliniske registreringer blev foretaget af i alt fem personer, som i det følgende vil blive omtalt som person 1-5. I første runde blev registreringerne i alle syv besætninger foretaget af samme person, person 1. Ved de følgende to runder af besøg blev registreringerne foretaget af forskellige personer (person 1-5), dog blev alle registreringerne ved et besøg i en besætning foretaget af samme person.

I forbindelse med alle besætningsbesøgene blev der foretaget følgende kliniske registreringer af alle de deltagende kvier:

4.2.2.1. Hårlag

Der blev foretaget blev en vurdering af hårlaget efter følgende skala (modificeret efter Rousing *et al.*, 2001): 1: Normal blank, 2: Mat, 3: Mat med skældannelse, 4: Mat med hudinfektion. Skalaen var ikke yderligere beskrevet eller illustreret.

4.2.2.2. Huld

Kviernes huld blev vurderet visuelt og i nogle tilfælde ved hjælp af palpation. Huldvurderingssystemet, der er udviklet af Jim Ferguson, Pennsylvania State University, blev anvendt (bilag 2). Skalaen går fra 1-5 og er inddelt med kvarte point. Huldscore 1 svarer til en meget mager ko og huldscore 5 til en meget fed ko. Der blev foretaget et mindre antal dobbeltvurderinger (N=8, N=9) for at vurdere enigheden mellem henholdsvis person 1 og 3 samt person 1 og 5.

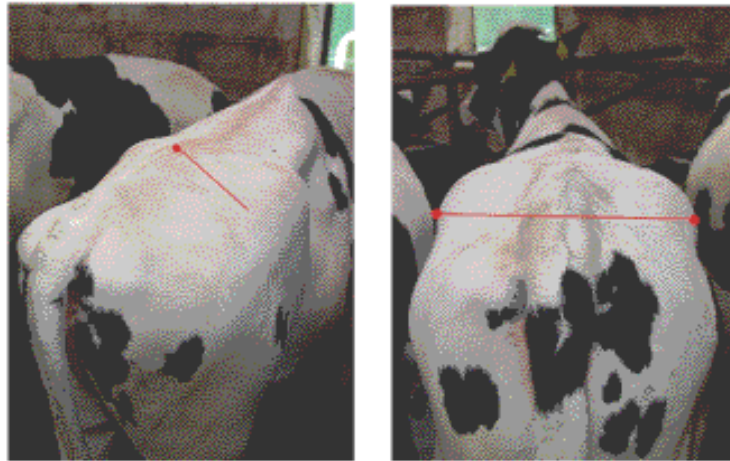
4.2.2.3. Hoftebredde

Kvierne blev målt på det bredeste sted på hoftehjørnerne (tuber coxae) (figur 4.1) ved hjælp af et laserstangmål (Kruuse). Hoftebredden blev ikke brugt til vurdering af kviernes størrelse eller til beregning af vægt og vil derfor ikke blive omtalt yderligere.

4.2.2.4. Krydshøjde

Krydshøjden blev målt lige mellem hoftehjørnerne ved overgangen mellem lænd og korsben (figur 4.1 og 4.2) og ligeledes ved hjælp af et laserstangmål (Kruuse). Det blev tilstræbt, at kvien stod lige

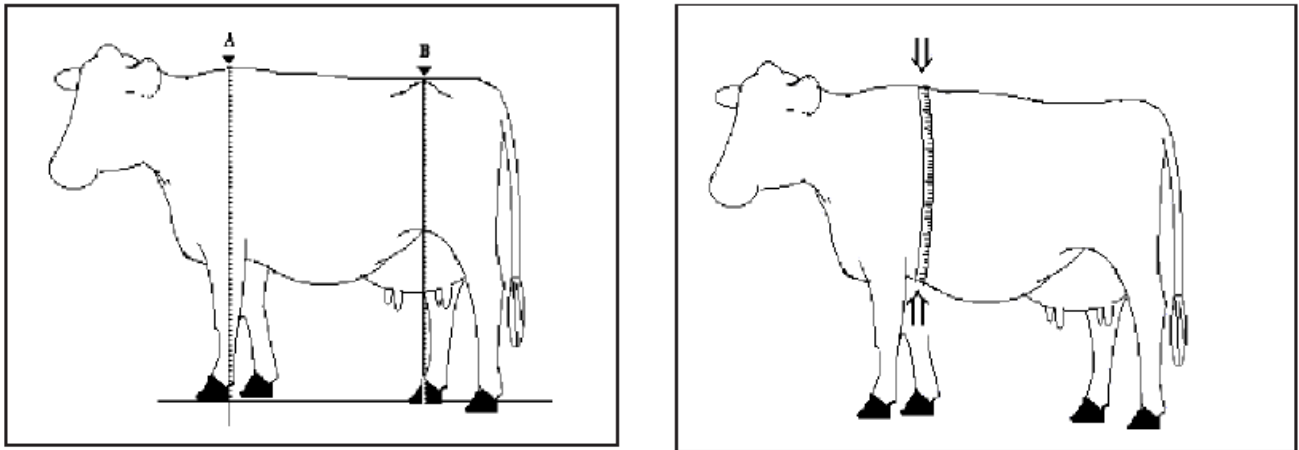
på alle fire ben på et plant underlag, mens den blev målt. Der blev udført dobbeltmålinger på et antal kvier af person 1 (N=27), person 2 (N=8), person 3 (N=8) og person 4 (N=5) for at vurdere målingernes præcision (Houe *et al*, 2004). Tilsvarende blev nogle kvier målt af både person 1 og person 3 (N=8) og af person 1 og person 5 (N=9) for at vurdere præcisionen af målingerne udført af forskellige personer (Houe *et al*, 2004).



Figur 4.1 Illustration af, hvor henholdsvis krydshøjde (billedet til venstre) og hoftebredde (billedet til højre) måles ved hjælp et laserstangmål (Bundgaard, 2003).

4.2.2.5. *Brystomfang*

Ved den sidste runde af besætningsbesøgene blev der målt brystomfang på stort set alle de deltagende kvier. Disse målinger blev også foretaget af flere forskellige personer (person 2-5), men af samme person i hver besætning. Brystomfanget blev målt lige bag skulderbladene, hvor det er mindst (figur 4.2), og det blev angivet i cm. For at vurdere præcisionen målte både person 1 og 2 elleve kvier (Houe *et al*, 2004).



Figur 4.2 Illustration der viser, hvor på kvien der måles krydshøjde (angivet med B på tegningen til venstre) og brystomfang (tegningen til højre) (Fisker *et al.*, 2003).

4.2.2.6. Estimeret vægt

Vægten kan estimeres alene ud fra brystomfang ved hjælp af følgende formel for kvier af racen SDM Dansk Holstein (SDM) (Fisker *et al.*, 2003):

$$\text{Log(vægt)} = 5,5719 + 2,7387 \times \text{bryst}_t$$

Hvor $\text{bryst}_t = \log(\text{brystomfang}) - 5$.

Det er også muligt at estimere vægten ud fra brystomfang, krydshøjde og huld ved hjælp af denne formel for kvier af racen SDM (Fisker *et al.*, 2003):

$$\text{Log(vægt)} = 3,3878 + 1,8829 \times \text{bryst}_t + 0,02387 \times \text{kryds} + -0,00005 \times \text{kryds}^2 + 0,03471 \times \text{huld}$$

Hvor $\text{bryst}_t = \log(\text{brystomfang}) - 5$.

De to formler er, som nævnt for SDM kvier, da den estimerede vægt afhænger af racen (Fisker *et al.*, 2003). I dette studie estimeres vægten på kvier af både racerne SDM og Dansk Rødbroget Holstein (DRH) ved hjælp af de nævnte formler, da der i dag er tæt slægtskab mellem de to racer og de avlsmæssigt er meget ens (Fogh *et al.*, 2006). Så i forbindelse med beregning af estimeret vægt indgår kun kvier, som er registreret som SDM eller DRH, mens kvier af racerne Rød Dansk Malkerace (RDM) og Dansk Jersey samt krydsninger ikke indgår.

4.2.2.7. Fæceskonsistens

Fæcesprøverne, som blev udtaget ved alle tre besøgsrunder, fik vurderet konsistens i forbindelse med sedimentation i laboratoriet. Konsistensen blev vurderet visuelt og følgende vurderingsskala blev brugt: 0: Fast gødning (typisk staldfodret), 1: Normal, 2: Blød, 3: Tydelig diarree, 4: Vandig. Der er ikke foretaget nogen opgørelser eller analyser, hvori fæceskonsistens indgår og den vil derfor ikke blive omtalt yderligere.

4.2.3. Statistiske analyser

De statistiske analyser er udført i SAS® version 9.1. Flere af graferne er lavet i Microsoft Excel. For de kvalitative ordinale parametre hårlag og huld blev der udført deskriptive analyser med hensyn til forekomst og frekvensfordeling. Der blev anvendt vægtet kappa til at sammenligne huldvurderinger udført af forskellige personer.

For at vurdere præcisionen (Houe *et al*, 2004) af målingerne blev dobbeltmålinger udført af samme person sammenlignet. Tilsvarende blev præcisionen (Houe *et al*, 2004) for målingerne foretaget af forskellige personer sammenlignet for de kvantitative kontinuerte variabler som krydshøjde og brystomfang. Vurderingen blev udført ved hjælp af Pearsons korrelationskoefficient og lineær regression.

Vægten blev estimeret ud fra to nævnte formler og sammenlignet indbyrdes samt i forhold til alder. Med hensyn til infektionsstatus blev variablen dikotomiseret på samme måde som i afsnit 3. *Fasciola hepatica* ELISA-en var positiv eller negativ på baggrund af en cut-off værdi på 30 %S/P, og kvien blev betragtet som positiv, hvis mindst en prøve var positiv. For at vurdere sammenhængen mellem *Fasciola hepatica* status og estimeret vægt blev der foretaget en variansanalyse af den estimerede vægt. Det var muligt, da logaritmen til vægten estimeret ud fra brystomfanget er normalfordelt. Alder, besætning og *Fasciola hepatica* status var forklarende variabler i analysen. Det anvendte signifikans-niveau var i alle analyserne 0,05.

4.3. Resultater

4.3.1. Hårlag

Ved vurdering af kvierens hårlag havde alle enten score 1 eller 2, og der blev ikke fundet nogen med score 3 eller 4. I hovedparten af tilfældene blev hårlaget vurderet som værende normalt (score 1) og ved de tre runder var det henholdsvis 100%, 93% og 94%. I de resterende tilfælde, dvs. 7% og 6% ved anden og tredje runde, blev hårlaget vurderet som værende mat (score 2). I tabel 4.1 ses antallet af kvier med score 1 og 2 i hver af de syv besætninger ved de tre besøg. Som det ses er der stor variation i antallet af kvier med score 2 mellem de forskellige besætninger og mellem de forskellige runder.

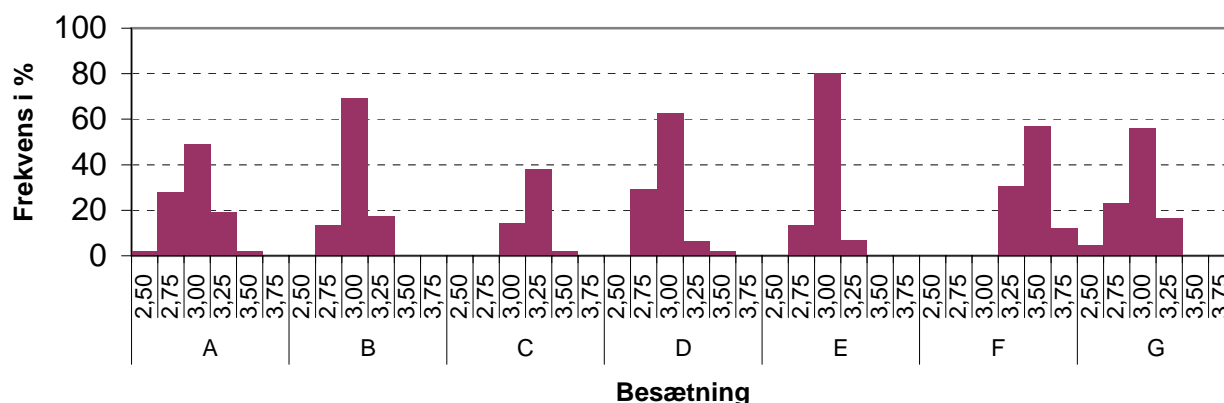
Tabel 4.1 Oversigt over antallet af kvier, som fik hhv. score 1 og 2 i hårlag i hver af de syv besætninger (A-G). Antallet af kvier med score 1 er til venstre for /, men antallet med score 2 er til højre for.

Besætning Runde	A	B	C	D	E	F	G
1	43 / 0	52 / 0	51 / 0	48 / 0	45 / 0	49 / 0	44 / 0
2	42 / 0	52 / 0	52 / 0	33 / 13	33 / 8	48 / 1	45 / 2
3	42 / 0	33 / 0	47 / 0	25 / 16	41 / 1	48 / 0	43 / 1

Udført af person: 1, 2, 3, 4 eller 5

4.3.2. Huld

Til at vurdere, hvordan huldvurderingerne fordeler sig i de syv besætninger bruges data fra første runde, da alle vurderingerne her er foretaget af samme person (person 1). Fordelingen af huldvurderingerne er illustreret på figur 4.3. På figuren ses det, at der er forskel mellem besætningerne i det generelle niveau af huldet samt i variationen af huldet indenfor hver besætning.



Figur 4.3. Fordelingen af huldvurderingerne for hver af de syv besætninger (A-G) foretaget ved besætningsbesøgene i første runde.

Huldvurderingerne er, som nævnt, foretaget af forskellige personer ved anden og tredje runde af besætningsbesøgene. Derfor er et mindre antal kvier blev huldvurderet af to personer for teste graden af enighed ved hjælp af en kappatest (tabel 4.2)

Tabel 4.2 Data til sammenligning af huldvurdering foretaget af hhv. (a) person 1 og person 3 (N=8) samt (b) person 1 og person 5 (N=9).

a.	Person 1			
	2,75	3,00	3,25	
Person 3	2,75	3	0	0
	3,00	1	2	0
	3,25	0	2	0

Vægtet kappa = 0,500

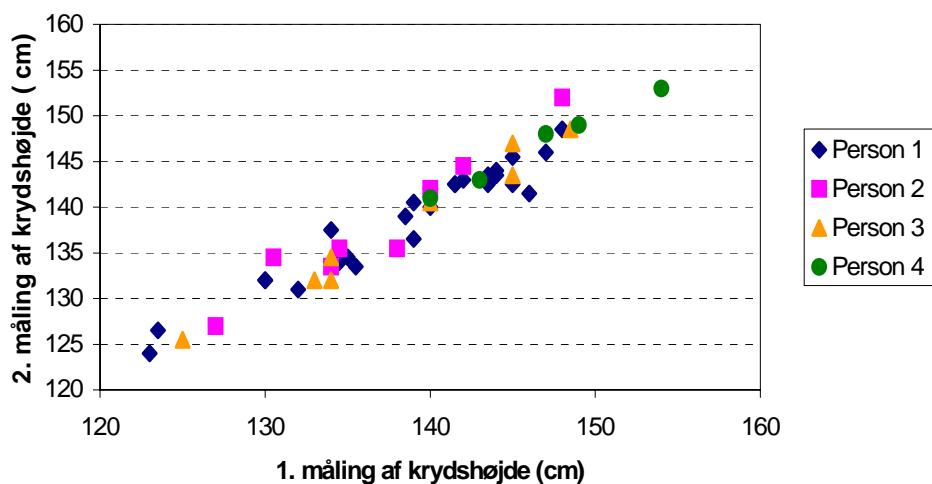
b.	Person 1			
	2,75	3,00	3,25	
Person 5	2,75	4	0	0
	3,00	0	4	1
	3,25	0	0	0

Vægtet kappa = 0,816

En kappaværdi (κ) mellem $0,4 < \kappa \leq 0,6$ vurderes som værende moderat, mellem $0,6 < \kappa \leq 0,8$ vurderes som god, men en κ værdi over 0,8 er meget god (Landis & Koch, 1977, cf. Ersbøll *et al*, 2004).

4.3.3. Krydshøjde

Fire af de fem personer (person 1-4), som udførte målingerne, lavede dobbeltmålinger på en varierende antal kvier (N=5-27) for at vurdere målingernes præcision (figur 4.4).



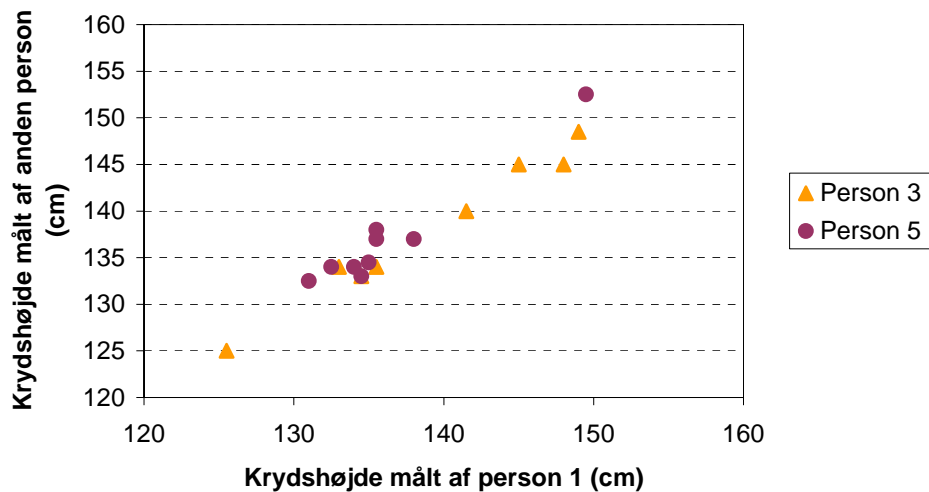
Figur 4.4 Dobbeltmålinger af krydshøjde foretaget af person 1-4.

Korrelationen mellem dobbeltmålingerne for hver af de fire personer blev evalueret ved hjælp af Pearsons korrelations koefficient og endvidere ved lineær regression. Resultaterne ses i tabel 4.3, hvor det fremgår, at der er en god korrelation mellem målingerne for alle fire personer.

Tabel 4.3 Korrelation mellem dobbeltmålingerne af krydshøjde foretaget af person 1-4.

	n	Pearsons korrelations		Lineær regression					
		koefficient	P	Intercept	se _a	P	slope	se _b	P
Person 1	27	0,9670	<0,0001	-8,61	7,76	0,2779	1,06	0,06	<0,0001
Person 2	8	0,9613	0,0001	22,21	13,42	0,1491	0,83	0,10	0,0001
Person 3	8	0,9874	<0,0001	6,29	8,62	0,4929	0,96	0,06	<0,0001
Person 4	5	0,9934	0,0006	-17,28	10,93	0,2121	1,12	0,074	0,0006

Krydshøjden blev målt af person 1 samt henholdsvis person 3 og 5 på et mindre antal kvier for at vurdere korrelation mellem målingerne foretaget af forskellige personer (figur 4.5).



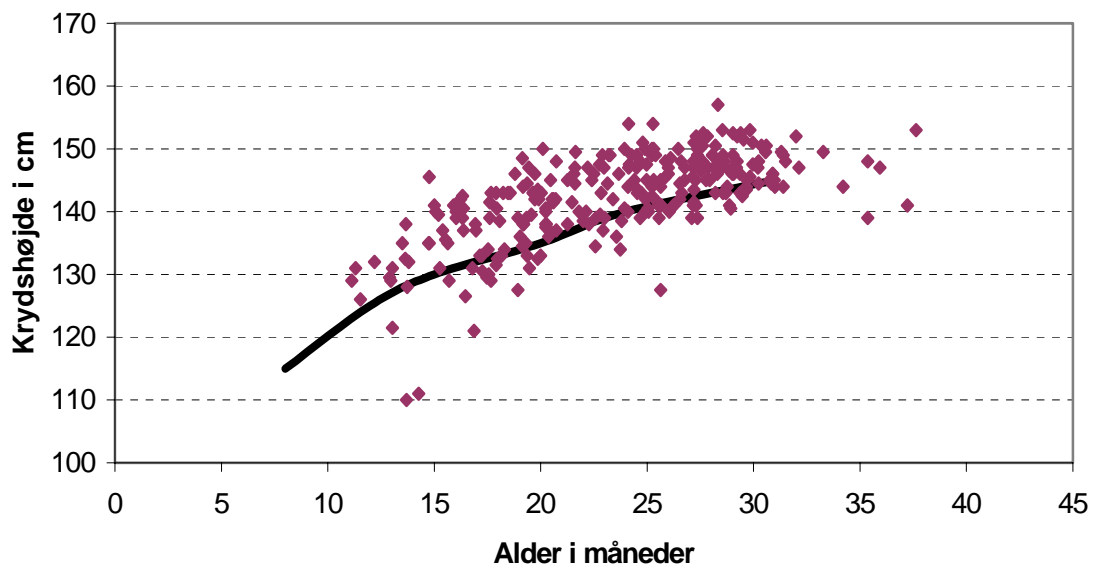
Figur 4.5 Dobbeltmålinger af krydshøjde for at sammenligne mellem person 1 og hhv. person 3 og 5.

Også her blev korrelationen mellem målingerne foretaget af person 1 og hhv. person 3 og 5 evalueret ved hjælp af Pearsons korrelations koefficient og ved lineær regression. Resultaterne ses i tabel 4.4, også her er der en god korrelation mellem målingerne.

Tabel 4.4 Korrelation mellem målingerne af krydshøjde foretaget af person 3 og 5 i forhold til målingerne foretaget af person 1.

	n	Pearsons korrelations		Lineær regression					
		koefficient	P	Intercept	se _a	P	slope	se _b	P
Person 3	8	0,9896	<0,0001	-3,09	8,46	0,73	1,03	0,06	<0,0001
Person 5	9	0,9710	<0,0001	19,82	10,85	0,11	0,85	0,08	<0,0001

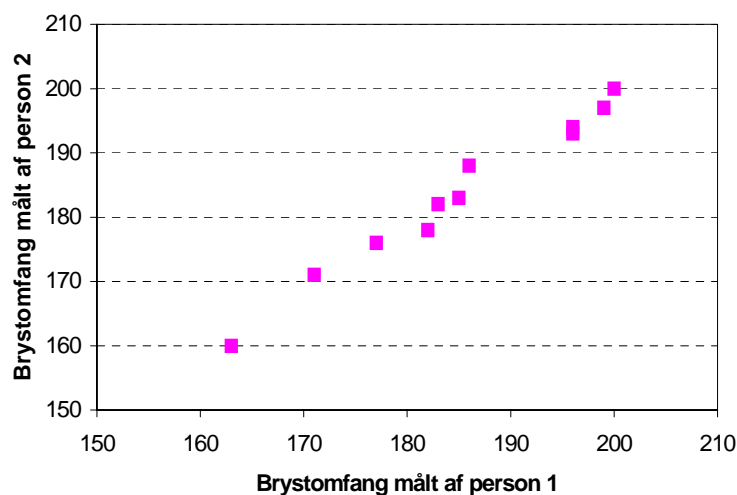
Krydshøjden i forhold til alderen er illustreret i figur 4.6. Da højden er afhængig af racen (Fisker *et al*, 2003) er kun højden for kvier af racerne SDM og DRH vist, og alle målingerne er fra tredje runde. Som det ses på grafen ligger målingerne foretaget i dette studie generelt over den gennemsnitlige højde fundet af Fisker *et al* (2003).



Figur 4.6 Krydshøjde i forhold til alder for alle kvier af racerne SDM og DRH på baggrund af målingerne fra tredje runde. Den sorte linie angiver den gennemsnitlige krydshøjde fundet af Fisker *et al* (2003).

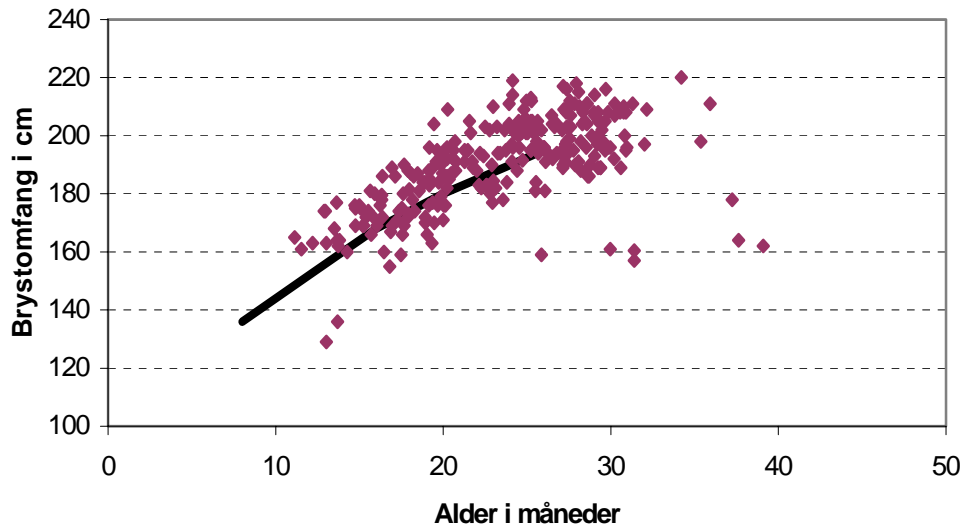
4.3.4. Brystomfang

Et mindre antal kvier (N=11) fik målt brystomfang af person 1 og person 2 for at vurdere præcisionen mellem målingerne foretaget af forskellige personer (figur 4.7). Ud fra disse målinger er Pearsons korrelations koefficient 0,99 ($P < 0,0001$). Ved lineær regression er skæring med y-aksen 6,46 ($se_a = 8,41$, $P = 0,46$) og hældningen er 0,97 ($se_b = 0,05$, $P < 0,001$). Der er altså meget god overensstemmelse mellem de to personers målinger.



Figur 4.7 Måling af brystomfang på de samme 11 kvier målt af person 1 og person 2.

Brystomfanget er afbilledet i forhold til alderen på figur 4.8. Da dette mål også er afhængig af racen (Fisker *et al*, 2003) er der kun vist målinger af kvier af racerne SDM og DRH (fra tredje runde). Målingerne af brystomfang i dette studie fordeler sig på begge sider af det gennemsnitlige brystomfang i forhold til alder fundet af Fisker *et al* (2003).



Figur 4.8 Brystomfang i forhold til alder for alle kvier af racerne SDM og DRH i tredje runde. Den sorte linie angiver det gennemsnitlige brystomfang fundet af Fisker *et al* (2003).

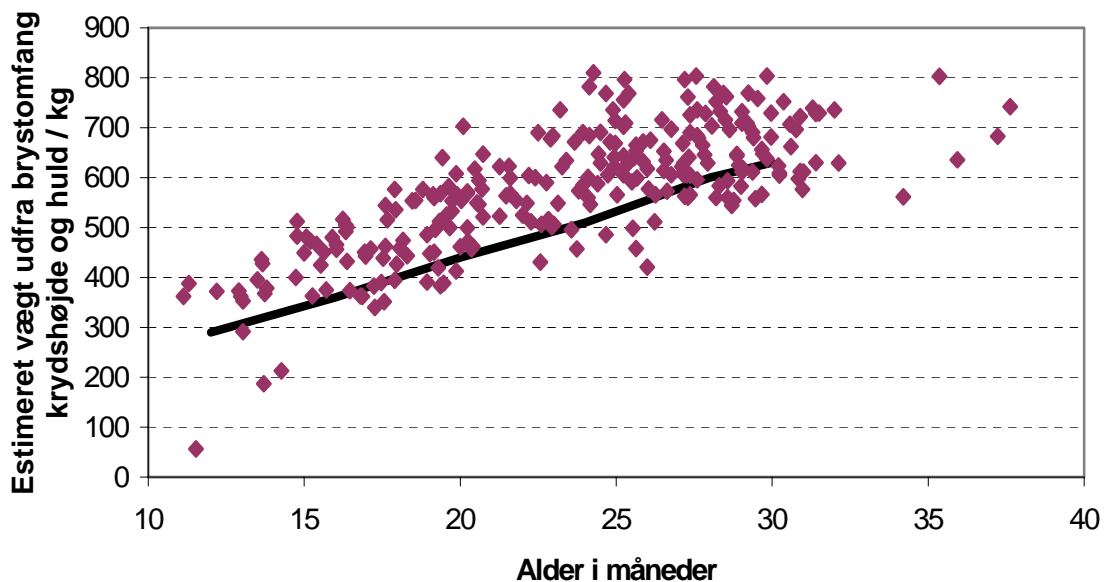
4.3.5. Estimeret vægt

Vægten estimeret ud fra brystomfanget i forhold til alder ses på figur 4.9. Det ses, at kviernes estimerede vægt fordeler sig på begge sider af den gennemsnitlige vægt fundet af Fisker *et al* (2003) ved vejning.



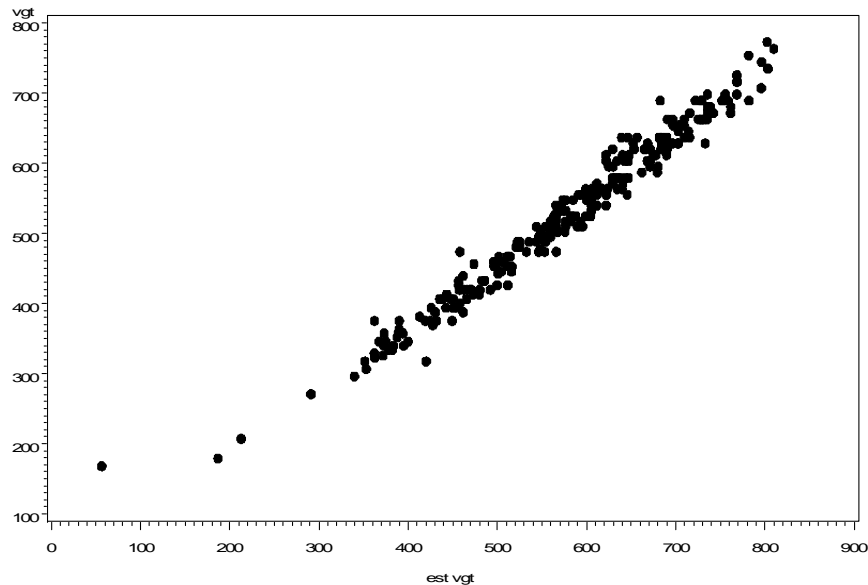
Figur 4.9 Estimeret vægt beregnet ud fra brystomfang alene i forhold til alder i måneder. Den sorte linie angiver den gennemsnitlige sande vægt fundet af Fisker *et al* (2003).

Den tilsvarende graf for den estimerede vægt beregnet ud fra brystomfang, krydshøjde og huld ses på figur 4.10. Her ses det, at den estimerede vægt generelt ligger over den gennemsnitlige sande vægt fundet af Fisker *et al* (2003).



Figur 4.10 Estimeret vægt beregnet ud fra brystomfang, krydshøjde og huld i forhold til alder. Den sorte linie angiver den gennemsnitlige sande vægt fundet af Fisker *et al* (2003).

På baggrund af figur 4.9 og 4.10 tyder det på, at den estimerede vægt beregnet ud fra brystomfang, krydshøjde og huld bliver højere end vægten estimeret alene ud fra brystomfanget. Det kan også ses på figur 4.11.



Figur 4.11 Estimeret vægt beregnet ud fra brystomfang (vgt) vs. vægt beregnet ud fra brystomfang, krydshøjde og huld (est vgt).

Da den estimerede vægt ud fra brystomfanget alene giver det resultat, som bedst stemmer overens med den sande gennemsnitlige vægt fundet af Fisker *et al* (2003) bruges denne formel til estimering af vægten i det følgende.

4.3.6. Sammenhæng mellem *Fasciola hepatica* status og estimeret vægt

Der er foretaget en variansanalyse, hvor alder, besætning og *Fasciola hepatica* infektionsstatus er forklarende variabler. Resultatet ses i tabel 4.5.

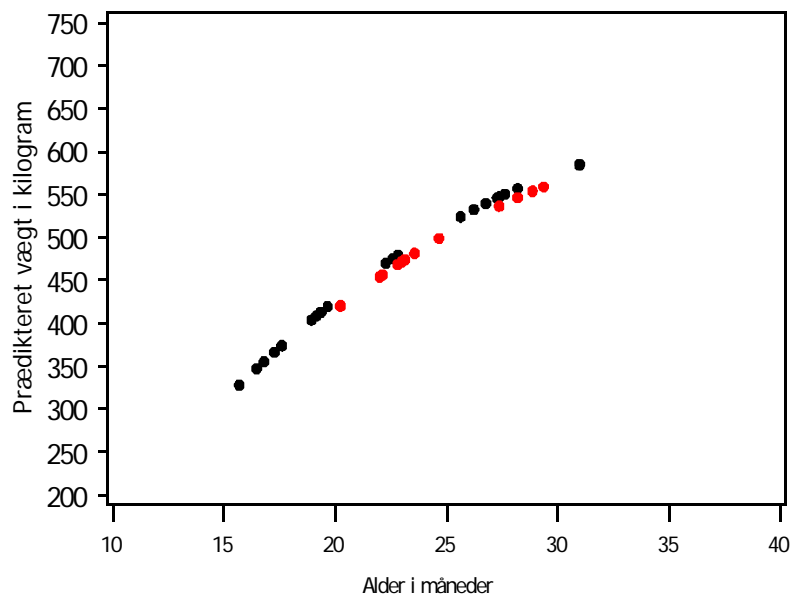
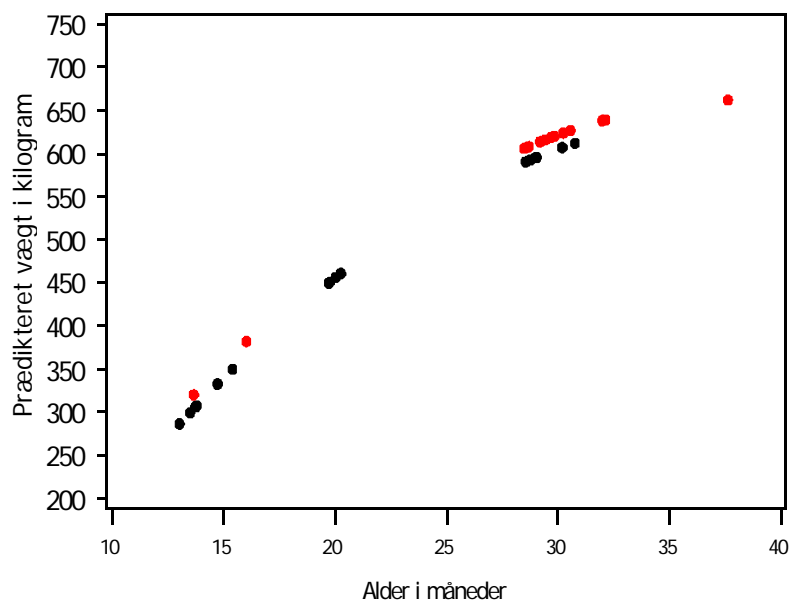
Tabel 4.5 Forskellige variabelers sammenhæng til logaritmen af den estimerede vægt ud fra båndmål.

Parametre	Niveau	β	SE	P
Intercept		-175,81	61,11	0,004
Alder		42,36	5,34	<0,0001
Alder * alder		-0,55	0,11	<0,0001
Fasciola ¹				0,81
	0	-53,27	28,60	
	1	0,0	0,0	
Besætning				<0,0001
	A	-36,72	18,74	
	B	19,63	18,18	
	C	69,20	27,84	
	D	19,25	22,54	
	E	37,20	15,99	
	F	-8,69	22,67	
	G	0,00	0,00	
Interaktion mellem Fasciola og besætning				0,0002
Fasciola negativ	A	64,01	34,74	
	B	36,97	34,96	
	C	37,94	39,62	
	D	18,30	37,48	
	E	78,96	33,74	
	F	153,28	36,24	
	G	0,00	0,00	
Fasciola positiv	Alle	0,00	0,00	

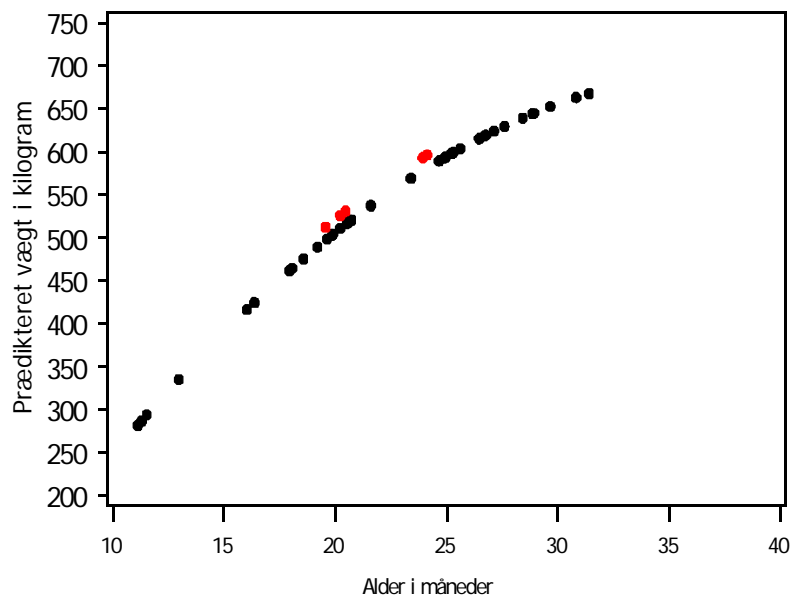
¹: 1: positiv defineret som ELISA positiv i minimum en prøve, 0: negativ i *Fasciola hepatica* ELISA

Modellen prædikterer vægten ud fra alder og *Fasciola hepatica* status vha. ELISA. Figur 4.12 viser den prædikterede vægt for henholdsvis *Fasciola hepatica* ELISA positive og negative kvier i hver af de syv besætninger. Der blev fundet en signifikant interaktion mellem *Fasciola hepatica* ELISA status og besætning. Det kommer til udtryk på følgende måde: I besætning A er der en svag tendens til, at den prædikterede vægt er lidt lavere for de kvier som er *Fasciola hepatica* positive end hos de kvier, som er negative. Figuren for både besætning B og C viser en svag tendens til, at den prædikterede vægt er højere hos kvier, som er positive for *Fasciola hepatica* sammenlignet med kvier uden leverikter. Samme tendens ses i besætning D, dog lidt tydeligere. Hvorimod i besætning E ses modsatte tendens, nemlig at den prædikterede vægt er lavere blandt kvierne positive for *Fasciola hepatica*. I besætning, G, er kun meget få kvier negative for leverikter. Blandt de ældre kvier er kun en kvie negativ for *Fasciola hepatica*, og dennes prædikterede vægt er betydelig under

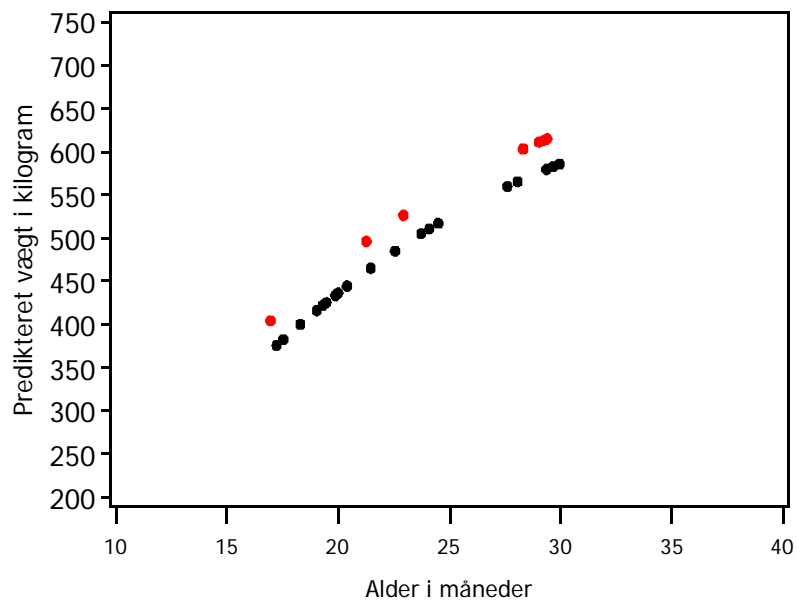
vægten for de positive kvier. Fælles for disse seks besætninger er, at forskellen mellem den prædikterede vægt hos de inficerede og ikke-inficerede kvier ikke er signifikant ($P>0,05$). I besætning F er den prædikterede vægt blandt *Fasciola hepatica* positive kvier markant lavere end blandt de negative kvier og i denne besætning er forskellen signifikant ($P<0,001$).

Besætning A ($P=0,57$)**Besætning B** ($P=0,44$)

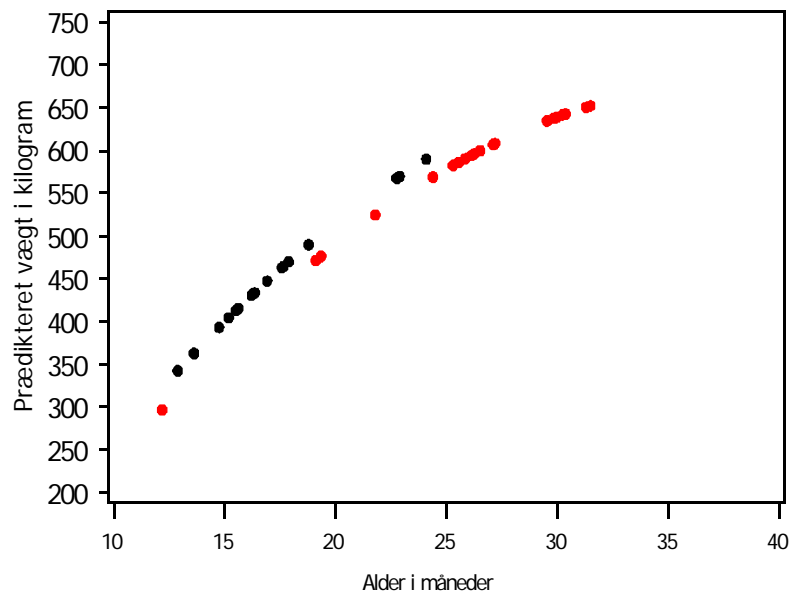
Besætning C (P=0,58)



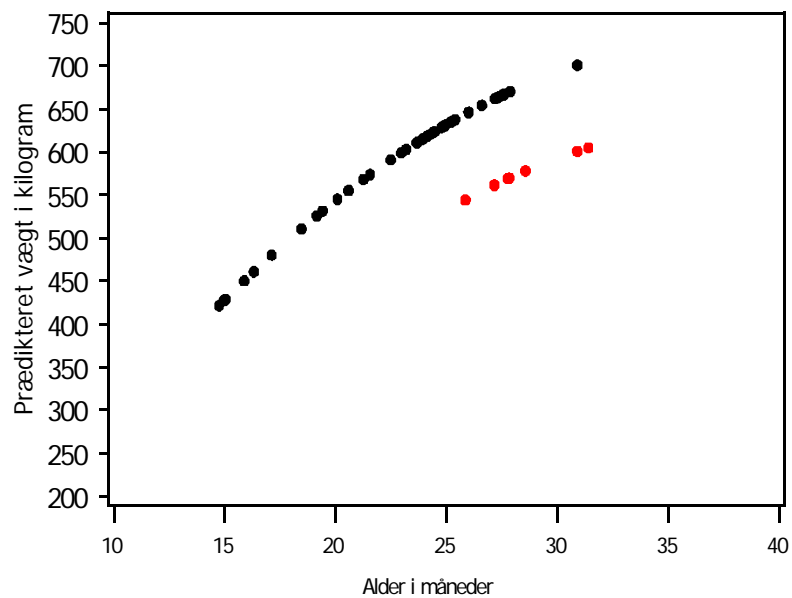
Besætning D (P=0,16)

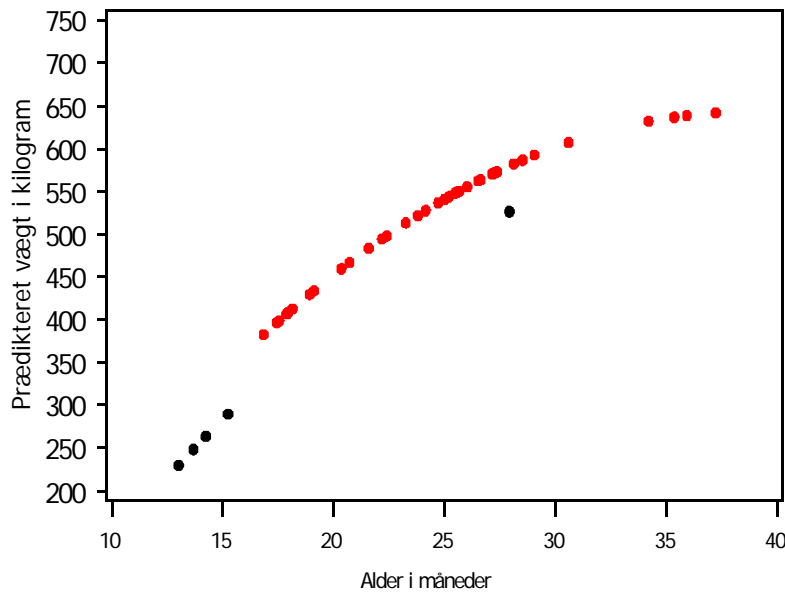


Besætning E (P=0,21)



Besætning F (P<0,001)



Besætning G (P=0,06)

Figur 4.12 Den prædikerede vægt for henholdsvis *Fasciola hepatica* ELISA positive (rød) og negative (sort) kvier i hver af de syv besætninger i forhold til alder. P-værdien, der angivet for hver besætning, er sandsynligheden for, at den forskel der ses på den prædikerede vægt hos hhv. *Fasciola hepatica* positive og negative kvier er tilfældig.

4.5. Diskussion

Hårlag og huld

Resultaterne vedrørende vurderingen af hårlaget kunne tyde på, at der var en forskel på af antallet kvier med mat hårlag mellem besætningerne. Det kan dog ikke helt udelukkes, at denne forskel skyldes, at vurderingerne er foretaget af forskellige personer. I nogle af besætningerne varierer antallet af kvier med score 2 mellem runderne og dermed hvilken person, som har udført vurderingerne. Dertil kommer, at kvierne i nogle af besætningerne var helt eller delvist klippede og det varierende, hvor beskidte de var både mellem besætninger og mellem besætningsbesøgene. En anden faktor var den anvendte skala, som var sparsomt beskrevet og ikke illustreret. Om der var forskel mellem de syv besætninger kunne undersøges mere indgående i en statistisk model, hvor der blev taget højde for hvilken person, som udførte vurderingerne. Det er dog ikke foretaget, da der i følgende overvejende er fokuseret på størrelse og estimeret vægt.

Da huldvurderingerne i første runde af besætningsbesøgene blev foretaget af samme person kan de bruges til at sammenligne kvierne i de syv besætninger. Der var tydeligvis forskel i niveauet af huldet mellem besætningerne. Derudover var der forskel i variationen af huldet indenfor besætningerne og dermed forskel i, hvor ensartede kvierne var. Forskellene i huldet mellem besætningerne kan selvfølgelig skyldes forskelle i fodringsniveau, genetik eller måske i forekomsten af *Fasciola hepatica*. Ved umiddelbart at se på niveauet er kvierne federe i to af besætningerne med lav forekomst af leverikter (C og F), men kvierne er tyndere og huldet varierer mere i tre af de besætninger med højere forekomst af *Fasciola hepatica* (A,D,G) i forhold til de to førstnævnte. Det er dog ikke blevet analyseret nærmere. Et andet studie har dog ikke fundet nogen forskel i huldet hos kvier, som var behandlet mod leverikter sammenlignet med inficerede og ikke-behandlede kvier (Loyacano *et al*, 2002).

Ved hjælp af vægtet kappa blev huldvurderingerne udført af forskellige personer sammenlignet. På grund af manglende data var det kun muligt at sammenligne huldvurderingerne foretaget af person 1 og henholdsvis person 3 og 5. Kappaværdien varierede fra at være moderat til meget god (Landis & Koch, 1977, cf. Ersbøll *et al*, 2004). Det skal dog bemærkes, at dobbeltvurderingerne er foretaget på et lille antal kvier og blot udfaldet af en enkelt vurdering vil påvirke resultatet betydeligt.

Krydshøjde og brystomfang

Dobbeltmålinger af krydshøjden foretaget af samme person viste, at målingerne havde en god præcision. Det er desværre ikke muligt at sammenligne målinger foretaget af person 1 med de alle de øvrige fire, men kun med person 3 og 5 og her viser resultaterne viser god overensstemmelse mellem målingerne.

Ved at se på kviernes krydshøjde i forhold til alder ses, at højdevæksten er størst hos de yngre kvier. Der er tydelig variation i højden blandt kvier med samme alder. Det kan skyldes genetik, at nogle kvier har været sat tilbage i vækst. Ved at sammenligne krydshøjden for kvier af racerne DRH og SDM i dette studie med den gennemsnitlige højde for SDM i forhold til alderen fundet af Fisker *et al* (2003) ses det, at kvierne i dette studie overvejende er højere. Det kan skyldes, kvierne i de syv besætninger rent faktisk er højere end gennemsnittet, men også en generel målefejl. Fisker *et al* (2003) anvendte et traditionelt stangmål til at måle krydshøjden, men en anden dansk undersøgelse viste, at der ikke burde være forskel på krydshøjden målt ved hjælp af et stangmål og et

laserstangmål (Bundgaard, 2003). Forskellen er dog ofte omkring 10 cm, hvilket er meget at forklare ved målefejl. Det er derfor uvist hvad forklaringen til denne forskel er.

Der er kun foretaget dobbeltmålinger af brystomfanget på et mindre antal kvier til at sammenligne korrelationen mellem to personer, og korrelations koefficienten var meget god 0,99 ($P < 0.0001$). Samme resultat er fundet i et amerikansk studie både for dobbeltmålinger udført af samme person og målinger udført af flere personer på det samme dyr (Heinrichs *et al*, 2007).

Udviklingen i brystomfang i forhold til alder svarer til den fundet af Fisker *et al* (2003). Der er bedre overensstemmelse mellem resultaterne for brystomfang fra dette studie og det foretaget af Fisker *et al* (2003) end tilfældet var for krydshøjde. Der er dog tendens til, at målingerne i dette studie ligger lidt højere.

Estimeret vægt

Traditionelt estimeres vægten ud fra brystomfanget, men Fisker *et al* (2003) fandt, at usikkerheden mindskes, når huld og især krydshøjde inddrages i beregningerne. På baggrund af dette blev begge metoder anvendt og resultatet sammenlignet. Det viste, at ved bruge af brystomfang, krydshøjde og huld blev den estimerede vægt højere end estimeret fra brystomfanget *alene*. Den estimerede vægt ud fra brystomfanget *alene* antages at stemme bedst overens med den sande vægt fra Fisker *et al* (2003), da den fordeler sig på begge sider af gennemsnittet af sande vægt. At den estimerede vægt ud fra brystomfang, krydshøjde og huld blev højere end ud fra brystomfanget *alene* kan i hvert fald delvis forklares med, at krydshøjden målt i dette studie var markant højere end fundet tidligere (Fisker *et al*, 2003).

Lige meget hvilken af de to metoder, der benyttes til at estimere vægten ses, at der er en vis variation i den estimerede vægt. Dette er også tilfældet for den sande vægt og denne variation kan forklares ved genetiske forskelle samt forskelle i f.eks. foderoptagelse, foderudnyttelse samt sundhedstilstand (Fisker *et al*, 2003). Vægten er jo også afhængig af flere ting som skeletstørrelse, muskelmasse, grad af fedme, indhold i mavetarmkanal og for de ældste kvier også drægtighedsstatus. Den anvendte formel er til estimering af vægten er lavet ud fra data på kvier op til 28 måneder (Fisker *et al*, 2003) og det er derfor forbundet med usikkerhed at estimere vægten på de ældste kvier i dette studie.

Sammenhæng mellem Fasciola hepatica status og estimeret vægt

I modellen for den prædikterede vægt havde alder en signifikant effekt. Det skyldes, at alderen naturligt har stor betydning for vægten. Tilsvarende var der også en signifikant effekt på den prædikterede vægt afhængig af besætningen. Dette kan skyldes genetiske forskelle mellem besætningerne, men også managementforhold som valg af fodringsstrategi og -niveau. Dertil kommer mange andre forhold som kan variere mellem besætningerne, f.eks. forekomst af andre sygdomme. I dette studie er det højeste sandsynlig en kombination af forskellige faktorer. Overordnet for alle kvierne i de syv besætninger var der ingen effekt af *Fasciola hepatica* infektionsstatus på den prædikterede vægt, men derimod var der en interaktion mellem *Fasciola hepatica* status og besætning. Det betyder, at effekten på den prædikterede vægt af *Fasciola hepatica* afhænger af, hvilken besætning kvien er i.

I seks af besætningerne (A,B,C,D,E,G) var der ikke signifikant forskel på den prædikterede vægt for kvier med og uden *Fasciola hepatica*. Kun i besætning F var den prædikterede vægt signifikant lavere hos kvierne med *Fasciola hepatica* sammenlignet med de *Fasciola hepatica* negative kvier. Resultaterne fra sidstnævnte besætning stemmer overens med resultaterne fra andre studier, hvor det er vist, at infektion med *Fasciola hepatica* nedsætter tilvæksten (Hope Cawdery *et al*, 1977) og derfor kan medføre reduceret størrelse i forhold til kvier uden infektionen (Oakley *et al*, 1979).

I denne undersøgelse af sammenhæng mellem *Fasciola hepatica* status og vægt er der flere faktorer, som medfører betydelig usikkerhed af resultatet. For det første er vægten et estimat på baggrund af brystomfanget og vil derfor medføre en usikkerhed i forhold til kviers sande vægt. Dertil kommer at vægt er sammensat størrelse ud fra bl.a. kviers skeletstørrelse, grad af fedme og drægtighedsstatus. Derudover er det svært at vurdere kviers infektionsgrad, da der er ikke er fundet nogen sammenhæng mellem niveauet af ELISA-værdien og antallet af ikter i leveren (Reichel, 2002). Der er også utrolig mange andre ting, som har indflydelse på kviers vækst og vægt. Det kan være fodringen og andre sygdomme, hvilket selvfølgelig betyder, at der er variation mellem forholdene i de forskellige besætninger. Det er derfor svært at finde årsagen til den varierende effekt af *Fasciola hepatica* i de syv besætninger.

Det kan konkluderes, at effekten af *Fasciola hepatica* status på kviers estimerede vægt afhænger af besætningen og der ikke er nogen overordnet sammenhæng. Det kunne tyde på, at effekten afhænger af faktorer som infektionsgraden, fodringsstrategi og niveau samt måske forekomst af

andre sygdomme i besætningerne. Da der her er brugt en estimeret vægt, er den selvfølgelig behæftet med en vis usikkerhed. Det ville derfor være relevant at foretage en mere sikker vurdering af kviers størrelse, som f.eks. vejning. Det er også muligt, at *Fasciola hepatica* har effekt på hullet eller andre af de foretagne kliniske registreringer, men dette er dog ikke analyseret nærmere.

4.6. Litteraturliste

Bundgaard S.K. (2003): Kviemåling og huldvurdering. Dansk Veterinærtidsskrift, 19, 20-25

Ersbøll A.K., Bruun J., Toft N. (2004): Chapter 13. Data analysis. I: Houe H., Ersbøll A.K., Toft N. (eds) (2004): Introduction to Veterinary Epidemiology. Biofolia, Frederiksberg, Denmark, 205-266

Fisker I., Skjøth F., Sejresen K., Kristensen T. (2003): Vurdering af kviers vækst. Resultater fra projekt ”Styring af kvieproduktionen”. Rapport nr. 107. Landbrugets Rådgivningscenter, Landskontoret for kvæg, Århus

Fogh A., Nielsen U.S., Aamand G.P. (2006): Avlsværdital for DRH beregnes sammen med SDM-DH. Tilgængelig på Internettet:

http://www.lr.dk/kvaeg/diverse/drh_beregnes_sammen_med_sdm.htm

Heinrichs A.J., Erb H.N., Rogers G.W., Cooper J.B., Jones C.M. (2007): Variability in Holstein heifer heart girth measurements and comparison of prediction equations for live weight. Preventive Veterinary Medicine, 78, 333-338

Hope Cawdery M.J., Strickland K.L., Conway A., Crowe P.J. (1977): Production effects of liver fluke in cattle I. The effects of infection on liveweight gain, feed intake and food conversion efficiency in beef cattle. British Veterinary Journal, 133, 145-159

Houe H., Ersbøll A.K., Nielsen L.R. (2004): Chapter 3. Nature of data. I: Houe H., Ersbøll A.K., Toft N. (eds.) (2004): Introduction to Veterinary Epidemiology. Biofolia, Frederiksberg, Denmark, 21-46

- Landis J.R., Koch G.G. (1977): The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 33, 159-174 cf.: Ersbøll A.K., Bruun J., Toft N. (2004): Chapter 13. Data analysis. I: Houe H., Ersbøll A.K., Toft N. (eds.) (2004): *Introduction to Veterinary Epidemiology*. Biofolia, Frederiks-berg, Denmark, 205-266
- Loyacano A.F., Williams J.C., Gurie J., DeRosa A.A. (2002): Effect of gastrointestinal nematode and liver fluke infections on weight gain and reproductive performance of beef heifers. *Veterinary Parasitology*, 107, 227-234
- Oakley G.A., Owen B., Knapp N.H.H. (1979): Production effects of subclinical liver fluke infection in growing dairy heifers. *Veterinary Record*, 104, 503-507
- Reichel M.P. (2002): Performance characteristics of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of liver fluke (*Fasciola hepatic*) infection in sheep and cattle. *Veterinary Parasitology*, 107, 65-72
- Rousing T., Bonde M., Sørensen J.T. (2001): Velfærdsvurderingsrapport for en malkekvægsbesætning med sengestald. Besætning 5. Velfærd i besætninger (1998-2002). Afd. For Husdyrsundhed og Velfærd, Danmarks Jordbrugsforskning, 26

5. KONKLUSION

Der blev ikke fundet en sammenhæng mellem infektion med *Fasciola hepatica* og *Salmonella* Dublin på dyreniveau i dette studie. Dette stemmer overens med tidligere undersøgelser, hvor der er diagnosticeret på individniveau, men er i modstrid med undersøgelser foretaget på besætningsniveau. Det kunne indikere, at sammenhængen mellem de to infektioner skyldes eksterne faktorer, som begge infektioner har til fælles for eksempel klima, vejrforhold og lokale forhold som fugtige jorde. I dette studie var der en tendens til lavere forekomst af *Salmonella* Dublin blandt de kvier, som var positive for *Fasciola hepatica*, hvilket så vidt vides ikke er set tidligere. Det kan dog ikke udelukkes, at dette skyldtes en tilfældighed pga. forholdsvis lille datamateriale af dyr smittet med begge infektioner samtidig.

Undersøgelse af antistofniveauet mod *Salmonella* Dublin blandt ungdyrene i de syv besætninger viste, at der forekom begrænset smitte i tre af dem. Alle besætninger har ellers ligget højt i antistoffer i tankmælken længe, og landmændene havde så vidt vides ikke gjort tiltag for at reducere smitten i besætningen. Forekomsten af kvier i *Salmonella* Dublin risikogruppe I, dvs. kvier med højt antistofniveau og dermed større risiko for at udskille bakterien, var betydelig lavere end forventet i de syv besætninger, hvilket besværliggjorde analysen for det overordnede formål med projektet.

Prævalensen af *Fasciola hepatica* ved brug af ELISA som diagnostisk metode var i gennemsnit 40 % med stor variation mellem besætningerne. I seks ud af de syv besætninger var prævalensen signifikant højere blandt kvierne efter to sæsoner på græs sammenlignet med efter en sæson på græs, og det svarer til tidligere studiers resultater. Det kan skyldes, at de ældre kvier græsser på fugtigere områder, da der også i dette studie blev fundet en signifikant forskel i prævalensen af *Fasciola hepatica* afhængig af, hvilken mark kvierne havde græsset. Kvierne, der har været på græs to sæsoner, har tilbragt længere tid på græs og har dermed også haft større risiko for at blive inficeret. En mulig forklaring er også, at infektionen første sæson på græs er lavgradig og medfører ingen eller forsinket antistofproduktion.

Blandt de kvier, som fik udtaget både blod- og fæcesprøver, var prævalensen af *Fasciola hepatica* signifikant lavere ved påvisning af æg end ved brug af ELISA, hvilket også er fundet i tidligere studier. Denne forskel kan forklares ved, at kvæg har lav udskillelse af æg, en lav analytisk

sensitivitet ved sedimentationsmetoden, og at antistofferne er til stede i blodet efter leverikterne ikke længere er i galdegangene. Ved at bruge ægudskillelse som gold standard blev sensitiviteten og specificiteten af den anvendte ELISA beregnet til hhv. 0,78 og 0,65. Begge testkarakteristika er dermed lavere end fundet i andre studier, hvor man havde en gruppe af naturligt inficerede dyr og en gruppe af ikke-inficerede dyr, men de er også lavere end fundet ved hjælp af Bayesianske metoder, hvor der tages højde for, at der ikke findes en test, der kan bruges som gold standard.

En logistisk analyse af sandsynligheden for at være *Fasciola hepatica* ELISA positiv viste en signifikant sammenhæng med udskillelse af æg, besætning og antal sæsoner på græs. Der er altså stor forskel på forekomsten af infektionen mellem besætningerne, men der er en god sammenhæng mellem, om dyret udskiller/har udskilt æg og et ELISA-positivt resultat.

Evalueret af *Fasciola hepatica* ELISA viste, at der var god præcision mellem dobbeltbestemmelser samt at værdierne fordelte sig i to veladskilte grupper i overensstemmelse med tidligere studier. Kun få kvier skiftede *Fasciola hepatica* ELISA status i løbet af studieperioden, men enkelte blev positive mellem første og andet besætningsbesøg, hvilket formodentlig kan forklares ved sen smitte. Derimod var der ingen biologisk forklaring for de enkelte kvier, som skiftede ELISA status to gange i perioden, og de kan skyldes metodefejl.

Ud fra de kliniske registreringer foretaget ved besætningsbesøgene var det muligt at estimere en vægt for kvierne. Ved en variansanalyse blev der naturligt nok fundet en sammenhæng med alder og besætning. Der var overordnet ikke nogen sammenhæng med *Fasciola hepatica* status, men derimod en interaktion mellem besætning og *Fasciola hepatica* status. Effekten af leverikter på den estimerede vægt afhænger altså af besætningen. Kun i en af de syv besætninger var der en signifikant lavere prædikteret vægt blandt *Fasciola hepatica* positive kvier sammenlignet med kvier, der var negative. Det kunne tyde på, at effekten afhænger af andre faktorer i besætningerne som infektionsgraden, fodringsstrategi og -niveau samt måske forekomst af andre sygdomme. Da der her er brugt en estimeret vægt, er analysen selvfølgelig behæftet med en vis usikkerhed.

I dette studie er effekten af *Fasciola hepatica* vurderet ud fra et ”øjebliksbillede” og giver ikke nogen indsigt i forskel i for eksempel tilvækst over tid. Det er også muligt, at *Fasciola hepatica* har effekt på huldet eller andre af de kliniske registreringer, men dette er dog ikke analyseret nærmere.

6. PERSPEKTIVERING

Da der i dette studie ikke blev fundet nogen sammenhæng mellem de to infektioner, *Fasciola hepatica* og *Salmonella* Dublin, på individniveau, kunne den tidligere fundne sammenhæng på besætningsniveau i andre studier skyldes eksterne samvirkende faktorer. Disse faktorer kunne, som nævnt i konklusionen, være klima, vejrforhold og lokale forhold som fugtige jorde, som alle bekendt har stor betydning for forekomsten af *Fasciola hepatica*. Tilsvarende er overlevelsen af *Salmonella* Dublin bakterier afhængig af forholdene i miljøet. For at få en dybere forståelse af disse forhold kunne det undersøges om, der er forskel i forekomsten af de to infektioner sammenlignet med temperatur og nedbør på årsbasis. En anden måde at undersøge disse eksterne faktorer kunne være at sammenholde de allerede kendte oplysninger fra Kvægdatabasen om registrerede slagtefund af leverikter, *Salmonella* Dublin status, produktionstype og besætningens beliggenhed med supplerende oplysninger, for eksempel indsamlet ved hjælp af et interview/spørgeskema om afgræsning, eventuelt observerede symptomer, tiltag mod infektionerne osv.. Dertil kommer muligheden for at kombinere alle disse data med oplysninger om geografiske forhold, klimaoplysninger, dyretæthed i området mv.. Det er selvfølgelig også en mulighed, at der er en sammenhæng mellem de to infektioner på individniveau, selvom den ikke blev fundet i dette tværsnitstudie. I dette studie var det ikke muligt at sige noget, hvornår kvierne pådrager sig de to infektioner tidsmæssigt i forhold til hinanden. Det kunne derfor være en mulighed at følge en gruppe kvier gennem de første 2-3 leveår og se for eksempel på antistof-niveauet mod *Salmonella* Dublin før, under og efter de har været på græs og eksponeret for leverikter. Baggrunden for denne anbefaling er de eksperimentelle studier, som viser at tiden mellem dyret inficeres med hhv. *Fasciola hepatica* og *Salmonella* Dublin har betydning for effekten. Det kan også være, at der burde fokuseres på en anden aldersgruppe i besætningerne, for eksempel køerne. Årsagen til dette kunne være, at infektion med leverikter måske er en medvirkende stress-faktor, som derfor er med til at øge udskillelsen af bakterier i forbindelse med kælvning og dermed øget risiko for smittespredning i besætningen.

Med hensyn til diagnostik af *Fasciola hepatica* i fremtiden kunne brugen af ELISA blive en god og anvendelig metode, da sedimentation er tidskrævende proces med lav sensitivitet. En ulempe ved ELISA er dog, at påvisning af antistoffer viser, at dyret har været inficeret på et tidspunkt, men ikke er et endeligt bevis for en aktiv infektion, og om den derfor er behandlingskrævende. Det udelukker mest brugen af ELISA blandt ældre dyr, mens den stadig er anvendelig blandt kvier, som kun kan

have fået infektionen indenfor de sidste 1-2 år. Metoden vil derfor være meget velegnet til besætningsdiagnostik, hvis der efter omkring en måned efter indbinding udtages blodprøver af en repræsentativ stikprøve af kvierne. Det er således muligt at få indblik i om kvierne er udsat for leverikteinfektionen og hvor stor en del af kvier, som er inficerede. Derudover vil et positivt ELISA-svar være dokumentation for infektionen, hvilket er påkrævet for, at man må behandle med triclabendazole (Fasinex®) i Danmark. Anvendelse af ELISA-kittet stiller dog nogle krav til laboratoriefaciliteterne inden det kan bruges hos f.eks. praktiserende dyrlæger. Det anbefales derfor, at laboratorier, der har de fornødne faciliteter (blandt andet en ELISA-reader) udbyder testen til praktiserende dyrlæger, der således vil få lettere ved at stille en besætningsdiagnose.

I dette studie tyder det på, at *Fasciola hepatica* har en effekt på den kviernes vægt i en enkelt besætning. På baggrund af det samt tidligere studier kunne det være interessant at gå nærmere i dybden med undersøgelse af dette. Det vil dog kræve gentagne målinger for at få viden om effekten på tilvæksten, og der bør bruges mere sikre metoder til finde vægten, så som vejning. Desuden kræver det viden om fodringsstrategier i besætningerne, og der bør justeres for raceforskelle og eventuelt genetisk potentiale. Det er også en mulighed at undersøge dyrene i forbindelse med slagtning, hvor der kan udtages en blodprøve til undersøgelse af antistoffer samt leveren kan undersøges for antallet af leverikter. Disse resultater kan derefter sammenholdes ved slagtevægten for at undersøge den eventuelle effekt af *Fasciola hepatica*.

7. BILAG

Bilag 1 SAS program samt output

Model for sandsynlighed for at være *Fasciola hepatica* positiv ved ELISA.

- Program for modellen i SAS:

```
proc genmod data=fhsamlet2 descending;
class eg chnr gras;
model ikke=eg chnr gras/dist=bin Link=logit type3;
run;
```

- SAS output:

```

                                The SAS System                                1

                                The GENMOD Procedure

                                Model Information

                                Data Set                WORK.FHSAMLET2
                                Distribution            Binomial
                                Link Function          Logit
                                Dependent Variable     ikke

                                Number of Observations Read      145
                                Number of Observations Used      145
                                Number of Events                 68
                                Number of Trials                 145

                                Class Level Information

                                Class    Levels    Values

                                eg        2        0 1
                                CHRnr     7        A B C D E F G
                                Gras      2        1 2

                                Response Profile

                                Ordered    Total
                                Value      ikke    Frequency

                                1          1          68
                                2          0          77

```

PROC GENMOD is modeling the probability that ikke='1'.

Criteria For Assessing Goodness Of Fit

Criterion	DF	Value	Value/DF
Deviance	136	127.1676	0.9351
Scaled Deviance	136	127.1676	0.9351
Pearson Chi-Square	136	133.3529	0.9805
Scaled Pearson X2	136	133.3529	0.9805
Log Likelihood		-63.5838	

Algorithm converged.

The SAS System

2

The GENMOD Procedure

Analysis Of Parameter Estimates

Parameter	DF	Estimate	Standard Error	Wald	95% Confidence Limits	Chi-Square	Pr > ChiSq
Intercept	1	27.6904	0.6852	26.3473	29.0334	1632.95	<.0001
eg	0	-1.2354	0.5513	-2.3159	-0.1549	5.02	0.0250
eg	1	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	.	.
CHRnr	A	-25.5297	0.7223	-26.9454	-24.1141	1249.32	<.0001
CHRnr	B	-26.2561	0.7178	-27.6631	-24.8492	1337.81	<.0001
CHRnr	C	-28.3312	0.9269	-30.1479	-26.5145	934.23	<.0001
CHRnr	D	-27.0976	0.8025	-28.6705	-25.5246	1140.06	<.0001
CHRnr	E	-25.9943	0.7148	-27.3954	-24.5932	1322.29	<.0001
CHRnr	F	-27.0373	0.0000	-27.0373	-27.0373	.	.
CHRnr	G	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	.	.
Gras	1	-1.3599	0.4649	-2.2711	-0.4487	8.56	0.0034
Gras	2	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	.	.
Scale	0	1.0000	0.0000	1.0000	1.0000		

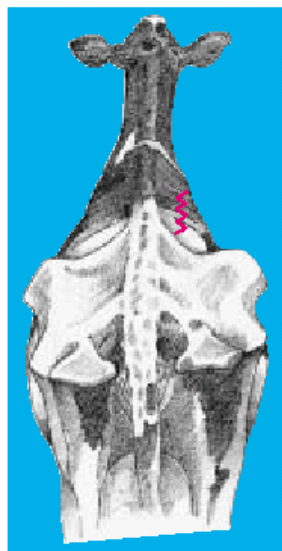
NOTE: The scale parameter was held fixed.

LR Statistics For Type 3 Analysis

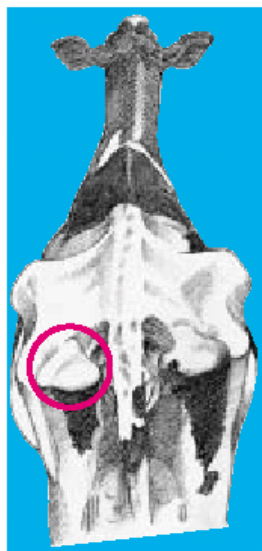
Source	DF	Chi-Square	Pr > ChiSq
eg	1	5.23	0.0222
CHRnr	6	42.46	<.0001
Gras	1	9.07	0.0026

Bilag 2 Skala til huldvurdering

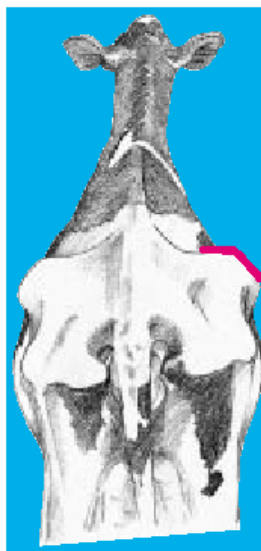
Huldvurderingssystemet udviklet af Jim Ferguson, Pennsylvania State University. 5 point skala med kvarte point.



Tværtappe synlige:
1/2 synlige: 2,25
3/4 synlige: 2,0
Savtakket spinal-
tappe: < 2,0



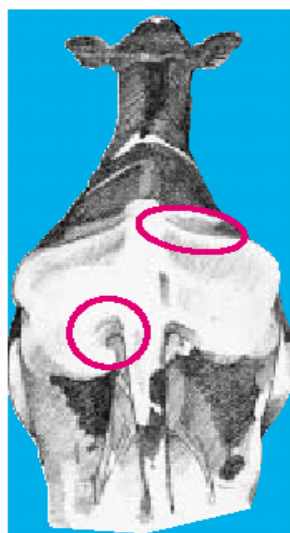
Vinklet sædeben
Huld < 2,75
Mærkbar fedt: 2,5
- mærkbar fedt < 2,5



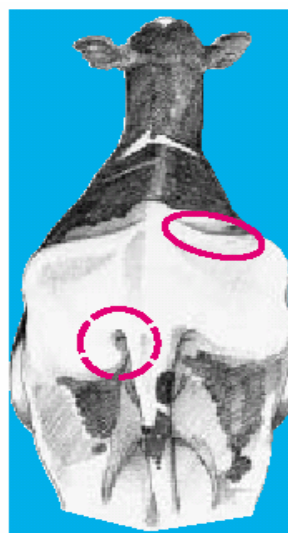
Vinklet hoftehjørne
Huld \leq 2,75



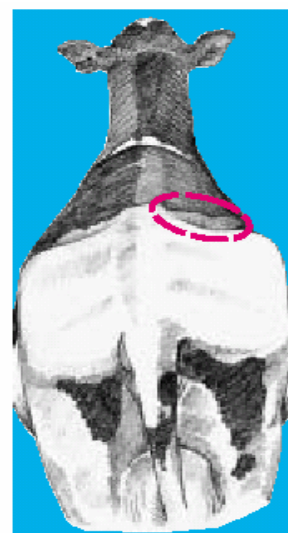
Rundt hoftehjørne
Huld = 3



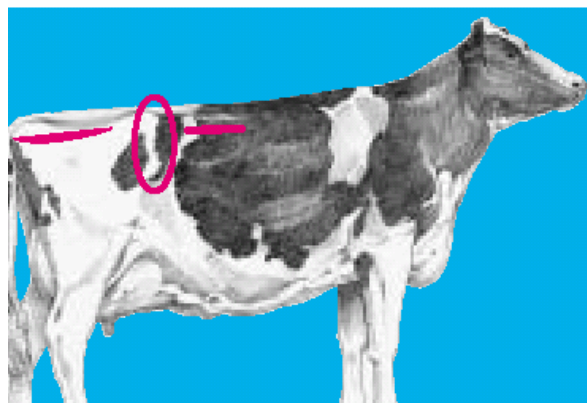
Bækkenbåndsligament
Synligt og halerodsliga-
ment synligt
Huld = 3,25



Bækkenbåndsligament
synligt og halerodsliga-
ment utydelig
Huld = 3,5



Bækkenbåndsligament
utydeligt og halerods-
ligament "væk"
Huld = 3,75
Begge ligamenter "væk"
Huld \geq 4



Omdrejeren flad	> 4,00
Tværtappe netop følbare ved tryk	= 4,00
Tværtappe ”væk”, ribben ikke synlige...	= 4,25
Sædeben usynlige.....	= 4,50
Hoftehjørne utydeligt	= 4,75
Hoftehjørne væk, rundt kryds	= 5,00

Bilag 3 Billeder

Billeder taget ved besætningsbesøgene (der er desværre ingen billeder fra besætning C og G).

Besætning A



Besætning B



Besætning D



Besætning E



Besætning F

