



Kandidatspeciale, 30 ECTS-point

Pernille Knøs Jørgensen
Ips462

Kronisk botulisme hos malkekvæg

- Er der evidens?



Vejleder: Henrik Elvang Jensen

*Institut for Veterinær Sygdomsbiologi, faggruppe Patologi, Ridebanevej 3, 1870
Frederiksberg C.*

Medvejleder: Kaspar Krogh

Videncentret for Landbrug, Kvæg, Team Sundhed, velfærd og fødevarerikkerhed

Afleveret den: 21/12/2012

Titelblad

Titel: Kronisk botulisme hos malkekvæg – er der evidens?
Chronic botulism in dairy cattle – is there evidence?

Forfatter: Pernille Knøs Jørgensen, stud.med.vet.
Studienummer: lps462
Tråsbøl Bygade 10
6200 Aabenraa
Tlf: 31488262
E-mail: knoes@dsr.life.ku.dk

Vejledere: Professor Henrik Michael Elvang Jensen
Faggruppe Patologi
Institut for Veterinær Sygdomsbiologi
Det Sundhedsvidenskabelige Universitet
Københavns Universitet
Ridebanevej 3
1870 Frederiksberg C.
Tlf: 35333100
E-mail: helj@sund.ku.dk

Specialkonsulent, dyrlæge Kaspar Krogh (medvejleder)
Kvæg, Team Sundhed, velfærd og fødevarer sikkerhed
Videncentret for Landbrug
Tlf: 87405270
E-mail: ksk@vfl.dk

Afleveringsdato: 21.december 2012

Resumé

Kronisk botulisme er navnet på et sygdomskompleks, der af nogle dyrlæger menes at være årsag til produktionsnedgang og forringet sundhed i malkekvægsbesætninger. Tyske dyrlæger har opstillet en hypotese, med påstanden om, at det selvsamme toksin, som forårsager botulisme hos kvæg, tillige er i stand til at producere en mildere og mere uspecifik form for botulisme hos malkekøer, der primært giver sig til udtryk som GI-forstyrrelser, hvorfor lidelsen også kaldes for visceral botulisme. Der er dog i øjeblikket megen diskussion blandt dyrlæger og forskere om, hvorvidt man kan opfatte kronisk botulisme som en reel lidelse hos malkekøer, da der ikke er dokumenteret en kausal sammenhæng mellem en kronisk påvirkning af botulinumtoksinerne og de relativt uspecifikke kliniske manifestationer.

For at undersøge om der er evidens for de skrevne publikationer om emnet, er der foretaget en systematisk vurdering af den tilgængelige litteratur om kronisk botulisme hos malkekvæg. Derudover er der foretaget en vurdering af validiteten af de laboratorieundersøgelser, der udbydes af det tyske laboratorium Miprolab GmbH i Göttingen. Slutteligt er der foretaget en kort analyse af produktionsdata fra to frivillige danske malkekvægsbesætninger, der har fået udtaget og analyseret prøvemateriale for kronisk botulisme af Miprolab GmbH.

På baggrund af den systematiske vurdering, bedømmes litteraturen om kronisk botulisme til at have lav evidens. Der er en generel mangel på, hvad der kan betegnes som værende minimumskrav i videnskabelige artikler for at sikre disses kvalitet, især skal fremhæves den komplette mangel på statistiske beregninger. Validiteten af laboratorieundersøgelserne, der tilbydes af Miprolab GmbH er tillige lav, idet en diagnose for kronisk botulisme stilles på et både biologisk og teknisk usikkert grundlag, samtidig med, at der forekommer en mangel på objektivitet som følge af personlige og økonomiske interessekonflikter. Analysen af mælkeydelse og kodødelighed for de to malkekvægsbesætninger indikerer, at beslutningen om at undersøge for kronisk botulisme, ikke skyldes en foregående statistisk analyse af de to produktionsfaktorer i besætningerne, idet der ikke kunne bekræftes et ydelsesfald eller en stigning i kodødelighed fra tidspunktet hvor prøvemateriale blev udtaget sammenlignet med et år forinden.

Således kan det på baggrund af vurderingerne og analyserne foretaget i dette speciale konkluderes, at kronisk botulisme ikke kan bekræftes som værende en reel sygdom hos malkekøer på nuværende tidspunkt, og at der derfor er brug for videre systematiske udredelser af sygdomskomplekset.

Abstract

Chronic botulism is the name given to a disease complex, which some veterinarians believe is the cause for a reduction in milk yield and general health deterioration in dairy herds. German veterinarians have hypothesized, that the same toxin, which is the cause of botulism in cattle, is capable of causing a more low-grade and undefined form of botulism in dairy cattle, which primarily can be seen as disturbances of the GI-system, hence the other name for the disease is visceral botulism.

There is however, a lot of debate amongst veterinarians and scientists about whether or not chronic botulism can be acknowledged as a real disease of dairy cattle, since there no documentation on the causal relationship between a chronic effect of the botulinum toxins and the very unspecific clinical manifestations.

In order to examine if there is any evidence in the published literature on the subject, a systematic assessment has been performed on the available literature on chronic botulism in dairy cattle.

In addition, the validity of the laboratorial tests, which is performed by the German laboratory Miprolab GmbH in Göttingen has been assessed. Finally, a brief analysis of milk yield and cow mortality has been made from the production data of two volunteering Danish dairy herds, which have send in samples to Miprolab GmbH in order to diagnose chronic botulism.

Based on the systematic assessment the literature on chronic botulism is concluded to have low evidence. There is a general lack of what may be regarded as minimum requirements of scientific articles to ensure their quality, especially is the complete lack of statistical calculations a grave mistake. The validity of the laboratory tests offered by Miprolab GmbH is also low, since the diagnosis of chronic botulism is based on a biologically and technically uncertain basis, and in addition there is a lack of objectivity due to personal and financial conflicts of interest.

The analysis of milk yield and cow mortality in the two dairy herds indicated that the decision to investigate for chronic botulism, was not due to a previous statistical analysis of the two factors in the herds, since no reduction in yield or an increase in mortality could be confirmed, from the time the samples were collected and compared with the previous year.

Thus, in the light of the assessments and analyzes performed in this thesis, it can be concluded that chronic botulism cannot be accepted as being a occurring disease in dairy herds at present, and therefore there is need for further systematic studies of the disease complex.

Forord

Dette speciale er udarbejdet i forbindelse med kandidatuddannelsen Veterinærmedicin ved Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet ved Københavns Universitet. Specialet udgør 30 ECTS-point.

I de seneste år har der været megen diskussion om, hvorvidt kronisk botulisme er en reel sygdom som kan forårsage nedsat produktion og forøget sygdomsforekomst i malkekvægsbesætninger. Diskussionen omfatter flere forskellige mennesker, herunder især malkekvægsproducenter og dyrlæger, hvorfor dette speciale er forbeholdt denne målgruppe.

Der er foretaget en kort produktionsanalyse af data fra to frivillige danske malkekvægsbesætninger i specialet. Besætningerne optræder anonymt, og benævnes henholdsvis besætning X og besætning Y. Analysen er foretaget ved hjælp af adgang til DLBR Dyreregistrering og VPR.kvl.dk. De statistiske analyser er foretaget i SAS version 9.3.

Tak til min vejleder Henrik Elvang for konstruktiv kritik og god systematisk overblik i forbindelse med udarbejdet af specialet. Tak til Kaspar Krogh for tilsendte data, og til de to anonyme besætningsejere som gav deres tilladelse til at gøre brug af dem i rapporten. Også stor tak til Carsten Enevoldsen og Øystein Angen for gentagen hjælp med henholdsvis statistik og analyse af laboriemetoder. Derudover ønsker jeg at takke mine forældre for hjælpen med at oversætte den omfattende tyske litteratur om emnet kronisk botulisme. Stor tak til Martina Hoedemaker, Anika Wichern, Frieder Gundling og Theresa Scheu, for at lade mig observere og medvirke i deres undersøgelse for kronisk botulisme i en besætning i Slesvig-Holstein.

Frederiksberg d. 21. december 2012.

Pernille Knøs Jørgensen

Indholdsfortegnelse

Titelblad	1
Resumé.....	2
Forord.....	4
1. Problemformulering	6
2. Historien bag botulismen	7
2.1 Botulisme hos mennesker	7
2.2 Botulisme hos dyr	8
3. Klassisk botulisme hos kvæg	9
3.1 Ætiologi.....	9
3.2 Epidemiologi.....	10
3.2.1 Fodermiddel-associeret botulisme	10
3.2.2 Ådsel-associeret botulisme	11
3.2.3 Toksikoinfektøs botulisme.....	12
3.2.4 Sårbotulisme.....	12
3.3 Patogenese.....	13
3.4 Kliniske manifestationer	14
3.5 Diagnose.....	15
3.6 Differentialdiagnoser	18
3.7 Behandling	19
3.8 Forebyggelse	20
4. Andre Clostridium-arter, der forårsager sygdom hos kvæg.....	21
4.1 Neurotoksiske Clostridier	21
4.2 Histotoksiske clostridium-arter	22
4.3 Enteropathogeniske og enterotoxæmiske clostridie-arter	23
5. Litteratur om sygdomskomplekset kronisk/visceral botulisme	26
6. Analyse.....	34
6.1 Vurdering af testmetoder anvendt af Miprolab GmbH i Göttingen.....	35
6.2 Analyse af ydelse og kodødelighed i henholdsvis besætning X og Y.	39
6.2.1 Mælkeydelse	39
6.2.2 Kodødelighed	41
7. Diskussion/konklusion.....	42
8. Perspektivering.....	48
9. Litteraturliste.....	49

1. Problemformulering

Baseret på observationer og i et mindre omfang dokumentation fra tysk side har en række danske praktiserende dyrlæger og kvægproducenter siden sommeren/efteråret 2012 tilsyneladende observeret, at botulinumtoksinet, der er kendt som værende ætiologien bag sygdommen botulisme, der er karakteriseret af progressiv motorisk paralyse og akutte dødsfald, tillige medvirker ved et kronisk og uspecifikt sygdomskompleks hos køerne i danske besætninger. Baggrunden for dette skulle angiveligt være, at der forekommer en akkumulation af sporer og bakterier i mave-tarmsystemet og toksindannelse i dyret, en såkaldt toksikoinfektion. Tilstanden kaldes variabelt for kronisk botulisme eller visceral botulisme og anses for at være årsagen til produktionstab i besætningerne i form af blandt andet nedsat mælkeydelse, flere syge dyr og dødsfald blandt køerne. Det kan dog argumenteres, at man ikke kan stille diagnosen kronisk botulisme, da der ikke er dokumenteret en kausal sammenhæng mellem kronisk påvirkning af botulinumtoksinerne og de relativt uspecifikke kliniske manifestationer. Hidtidig mangel på systematik og analyser over diverse dataindsamlinger i besætningerne og laboratorium- og behandlingsresultater medvirker til at diagnosen kronisk botulisme pt. kun kan stilles på et meget usikkert grundlag.

At be- eller afkræfte sygdomskomplekset er af stor betydning for den enkelte producent, besætningsdyrlæger og hele kvægsektoren, da den nuværende uvisse situation kan tænkes, at påvirke både sundhed, velfærd og økonomi i en uheldig retning i de pågældende kvægbesætninger. Man kan frygte, at almen god management-praksis og optimal pasning af dyrene måske tilsidesættes, og at der i disse besætninger i stedet bruges energi og økonomi på tilsyneladende nemme, men udokumenterede løsninger, såsom investering i toksinbindere, mælkesyrebakterier og vacciner.

Dette speciale skal rettes mod afsøgning af den tilgængelige litteratur om kronisk botulisme. Derudover foretages der en systematisk vurdering af den dokumentation, der reelt er tilgængelig om årsags- og patogenetiske aspekter af emnet, samt af de anvendte diagnostiske testmetoder for kronisk botulisme. Dette fører frem til følgende problemformulering:

Er det på baggrund af nuværende tilgængelig viden muligt at bekræfte den opstillede patogenese bag kronisk botulisme og at diagnosticere sygdomskomplekset med signifikant videnskabelig sikkerhed? Og hvis ikke, hvilke nye data er der så brug for, til at udvikle en systematisk tilgang der kan medvirke til at be- eller afkræfte diagnosen kronisk botulisme?

2. Historien bag botulismen

2.1 Botulisme hos mennesker

Sygdommen botulisme har været anerkendt som en potential letal forekommende neuropati hos mennesker siden den tyske læge Justinus Kerner i 1820 gav en nøjagtig beskrivelse af de for sygdommen karakteristiske kliniske symptomer hos 76 patienter, der havde indtaget selvrøgede pølser. Navnet på sygdommen fremkom efter dette udbrud, idet *botulus* er det latinske ord for pølse, som på det pågældende tidspunkt var den eneste kendte fødevarer, der havde været årsag til lidelsen (Keese 2008). I 1895 blev ætiologien bag sygdommen klarlagt af mikrobiologen Émile Pierre Marie van Ermengem, da det lykkedes ham at isolere en anaerob spore-producerende mikroorganisme fra en skinke, der blev serveret til et begravelsesselskab i Belgien. 34 gæster udviste de selvsamme symptomer som beskrevet af Justinus Kerner, og den samme mikroorganisme som blev isoleret fra skinken, blev også isoleret fra vævet af de 3 personer der døde som følge af indtagelsen af måltidet. Van Ermengen foretog dyreforsøg, og beskrev bakteriens kultureringsbehov og dens toksin, og kaldte den for *Bacillus botulinus*, senere omdøbt til *Clostridium botulinum* (*C. botulinum*) (Erbguth 2007).

Indtil 1904 var man overbevist om, at kun kød-baserede fødevarer kunne forårsage botulisme, men denne opfattelse ændrede sig, da et botulisme-lignende udbrud dræbte 11 af 21 personer i Tyskland, der havde indtaget en salat indeholdende uforvarmede hjemme-konserverede hvide bønner, hvori man isolerede en bakterie og et toksin, der mindede meget om den, der var beskrevet af Van Ermengen nogle år tidligere. Ved sammenligning af de to bakterier og deres toksiner, fandt man at toksinerne var meget ens, men serologisk forskellige, idet antitoksiner fra de to bakterier ikke krydsneutraliserede. Hermed blev toksinerne navngivet som henholdsvis type A og type B, og man begyndte at udrede deres forskelligartede mikrobiologiske karakteristika. Identifikationen af toksinerne type C, D, E, F og G fandt sted i de efterfølgende år, indtil 1970 (Erbguth 2007).

Patogenesen bag lidelsen blev klarlagt i 1949 af A. Burgen, F. Dickens og L. Zatman i London, hvor forskerne under et *in vitro* forsøg kunne fremkalde en neuromuskulær blokade af Nervus phrenicus i diaphragma isoleret fra en rotte ved tilførslen af type A toksin, der reducerede udskillelsen af acetylcholin fra nerveterminalen.

I 1950'erne erkendte man, at botulisme ikke kun kan forårsage sygdom ved oral indtagelse af præformeret toksin, men at sår tillige kunne virke som en indgangsport til organismen, idet det anaerobe miljø i især dybe sår, kan få *C. botulinum*-sporerne til at udvikle sig til vegetative celler,

som danner toksiner, der efterfølgende absorberes til blodet. Denne sårbotulisme blev især konstateret blandt narkomaner, der injicerede narkotika subcutant, såkaldt ”skinpopping” (Keeseey 2008).

Den tredje form for botulisme blev først endeligt bekræftet i 1976, hvor undersøgelser viste at *C. botulinums* sporer er i stand til at germinere og producere toksiner i tarmkanalen hos spædbørn. Denne såkaldte spædbørnsbotulisme sker efter indtagelsen af fødevarer indeholdende sporer, der pga. spædbørnernes uudviklede tarmflora, ikke bliver hæmmet af tarmbakterier, i at udvikle sig til vegetative celler og efterfølgende producere toksiner. Da patogenen både indeholder en infektion med *C. botulinum*, (i form af kolonisering af tarmen), og en intoksikation, kaldes denne form for botulisme også for en toksikoinfektion. Spædbørnsbotulisme er især forbundet med indtagelse af honning, da sporeindholdet i dette fødevaremiddel kan være højt (Keeseey 2008).

Kendskabet til botulinumtoksinernes meget potente nerverlammende effekt har været årsag til anvendelse af toksinerne til godtgørende formål indenfor medicinalområdet. Blandt andet har oprenset og fortyndet botulinumtoxin type A, kendt under handelsnavnet Botox, siden 1989 været godkendt til injektion for at behandle de potentielt synstabene øjensygdomme strabismus og blefarospasme farmakologisk i stedet for kirurgisk, idet overstimulationen af musklerne i det periokulære område stoppes. Også andre neuromuskulære lidelser der forårsager overstimulation af muskler eller glandulær hypersekretion, kan behandles med Botox. Eksempler herpå er henholdsvis cervikal dystoni og svær hyperhidrose. Botox anvendes tillige som erstatning for ansigtsløftninger, inden for det kosmetiske område, idet smilerynker kan fjernes midlertidigt ved subkutan injektion (Montville & Matthews 2008).

Misbrug af de meget potente og potentielt letale toksiner har også fundet sted gennem historien, blandt andet som et biologisk våben i krigsførelse med henblik på masseødelæggelse. På grund af disse forsøg på at anvende botulinumtoksiner i krigsførelse og terrorhandling, samt lethedens hvorved toksinerne kan fremstilles og de minimale mængder der kræves for at slå mange mennesker ihjel, er toksinerne blevet placeret som et kategori A giftstof af US Centers for Disease Control and Prevention.

2.2 Botulisme hos dyr

Forekomsten af botulisme hos dyr har været kendt endnu tidligere end hos mennesker. Botulisme hos kvæg har været kendt i Sydafrika siden stedet endnu var et subkontinent. Dette beskriver den franske naturalist Francois Le Vaillant i sine optegnelser fra hans rejse til Cape-kolonien i 1780-

1785, idet sydafrikanske farmere beskrev en fatalt lammende sygdom hos deres kvæg, hvis navn de gav *Lam-siekte*, på dansk ”Lammelses-syge” (Le Vaillant 1790). Efterfølgende beskrivelser af lignende sygdomstilfælde af andre rejsende førte til, at Cape-regeringen anerkendte at videre undersøgelser måtte foretages med henblik på at opklare årsagen bag lidelsen. Disse blev foretaget af veterinæren Duncan Hutcheon, der observerede kvæget og rapporterede data i områderne plaget af Lamsiekte i årene fra 1884 til 1903. Baseret på observationerne, der viste at det pågældende kvæg havde bizarre ædemønstre og åd kadavere, opstillede Hutcheon en hypotese, at lidelsen hos kvæget opstod i forbindelse med fejlnæring. Jordanalyser og fodringsforsøg bekræftede denne teori, idet landbrugsjorden i området viste sig at være kalcium- og fosforfattigt, og fodring med store mængder benmel reducerede incidensen af lamsiekte betydeligt. Sammenhængen mellem osteofagien og udviklingen af sygdom blev dog ikke videre belyst før Arnold Theiler i 1911 udførte eksperimentelle forsøg på Armoedsvlakte-farmen beliggende i det lamsiekte-plagede distrikt Vryburg. Theiler beskrev patogenesen for lamsiekte således, at fosforfattig jord og vegetation fremprovokerer pica hos kvæget, hvorfor dyrene æder kadavere, der indeholder en toksigen saprofyt, der forårsager lammelse og død når det optages i organismen. Denne toksigene saprofyt blev først isoleret i 1928 og den endelige identifikation af *Clostridium botulinum* fandt sted i 1930, dog under det daværende navn, *Clostridium parobotulinum bovis* (Cameron 2009). I sin artikel fra 1927 beretter Theiler, at botulisme tillige kan forekomme naturligt samt induceres eksperimentelt hos andre dyr end blot kvæg. Han nævner at geder, får, marsvin og kaniner er meget sårbare overfor botulinumtoksinet, heste og fjerkræ i mindre grad, og at hunde og grise er næsten immune. Da dette speciale omhandler botulisme hos kvæg, vil disse dyrearter samt botulisme hos mennesker ikke blive omtalt yderligere, og al efterfølgende tekst vil omhandle kvæg, med mindre andet er nævnt.

3. Klassisk botulisme hos kvæg

3.1 Ætiologi

Årsagen til botulisme skyldes en intoksikation af organismen, forårsaget af meget potente neurotoksiner, der produceres af den sporedannende, anaerobe bakterie *Clostridium botulinum* (*C. botulinum*). Andre clostridie-arter såsom *Clostridium barati* og *Clostridium butyricum* er også i stand til at producere de selvsamme neurotoksiner, dog kun henholdsvis serotype F og E (Simpson 2004) der ikke anses for at være aktuelle sygdomsskabende serotyper i tilfælde af bovint botulisme. *C. botulinum* er en gram-positiv, stav-formet, obligat anaerob saprofyt, der producerer meget resistente (endo)sporer, der findes udbredt i miljøet og er til stede i bl.a. jord, ferskvandskilder samt

mavetarmkanalen hos forskellige dyrearter samt fisk. Sporerne germinerer til vegetative celler og begynder at producere neurotoksiner under anaerobe betingelser, hvor der er tilstrækkelig med fugt og varme (25-40 °C alt afhængig af typen) samt en optimal pH på mindst 4,5. Eksempler på sådanne favorable miljøer er i rådne kadavere og formuldet organisk materiale, i mavetarmkanalen hos dyr og mennesker samt i dybe nekrotiserende sår (Quinn *et al.* 2002). Der findes 8 forskellige serotyper af *C. botulinum*, (A, B, C1, C2, D, E, F, G) og disse er benævnt efter hvilken type toksin de producerer. Neurotoksinerne kaldes fælles for BoNT og de inducerer lignende kliniske manifestationer i organismen, men varierer i deres antigenitet samt potens. Derudover synes der også at være en forskel i den geografiske distribution af serotyperne i miljøet og ligeledes en forskel i forskellige dyrearters modtagelighed overfor serotyperne. Ifølge Coffield & Whelchel (2012) er kvæg modtagelige overfor BoNT serotype B, C1 og D, der hovedsagligt findes i henholdsvis dårligt fermenteret ensilage eller hør, rådne kadavere, samt fodermidler, hvortil der er anvendt fjerkrægødning som væksts substrat. Serotype A kan angiveligt også forårsage botulisme hos kvæg, dog er der kun registreret et enkelt tilfælde af botulisme-udbrud i kvæghold i Brasilien i 1986 (Lindström *et al.* 2010) og hos en enkelt ko i Irland i 2008 (Hartley *et al.* 2009).

3.2 Epidemiologi

Forekomsten af botulisme hos kvæg er velkendt og veldokumenteret i de fleste lande, herunder Europa, Sydafrika, Australien, og Amerika. Lidelsen respekterer ingen geografiske restriktioner, og alligevel er risikofaktorerne for eksponering af BoNT og risikoen for udvikling af sygdom forskellig fra region til region på grund af forskellige måder at holde dyr på, herunder især foderfremstilling, opbevaring og udfodring, samt gylle- og gødningshåndtering.

Klinisk botulisme hos kvæg kan ifølge litteraturen opstå via følgende ruter: Fodermiddelassocieret botulisme, ådselassocieret botulisme, toksikoinfektøs botulisme og sårbotulisme.

3.2.1 Fodermiddel-associeret botulisme

De fleste tilfælde af botulisme hos kvæg i Europa og Nordamerika er associeret med indtagelse af præformeret toksin i forbindelse med fodring af konserveret foder (Coffield & Whelchel 2012; DTU Veterinærinstituttet 2009; Quinn *et al.* 2002; Radostits *et al.* 2007). Konserverede foderkilder såsom ensilage, udgør en stor del af foderrationen hos malkekvæg i disse kontinenter, hvor bl.a. klima og areal-størrelse ikke muliggør afgræsning året rundt.

Da sporer fra *C. botulinum* er til stede overalt i miljøet, herunder i jorden og i dyrs mavetarmkanal vil det ikke kunne undgås at producere foder såsom ensilage, hø og korn uden at organismen findes i fodermidlerne i et større eller mindre antal. Kontaminering med sporer kan ske i hver fase af produktionen lige fra udspreddelse af gylle på landbrugsjorden året forinden afgrøderne skal høstes, til selve høstarbejdet, konserveringsprocessen samt opbevaringen af foderemnerne.

I tilfælde af favorable betingelser med optimal pH, fugtighed og varme samt et anaerobt (nær)miljø under selve konserveringsprocessen og under opbevaringen af foderet, kan det give anledning til vegetativ vækst af *C. botulinum* og samtidig toksinproduktion i fodermidlet. Dette forekommer især i ensilage der ikke har tilstrækkeligt lav pH-værdi, samt i korn, der ikke er tørret tilstrækkeligt før det opbevares. (Weissbach 2006).

Bovint fæces kan indeholde store mængder sporer, hvorfor gyllespredning på agerjord kan medføre til kontaminering af jorden og afgrøderne (Weissbach 2006). Også spredning af gylle fra andre dyrearter kan udgøre en risiko for kontaminering af fodermidler med sporer. Dette anerkendes især i Storbritannien, hvor det har vist sig, at fjerkrægødning, der ofte anvendes som fodersupplement og strøelse til køerne, har været den primære risikofaktor i udbruddene af botulisme i årene 1999-2004 (ACMSF 2006) og 2001-2009 (Payne *et al.* 2011).

Tilstedeværelsen af præformeret toksin i konserveret foder kan dog også forekomme på trods af optimal gennemført forarbejdning og opbevaring. I så fald vildt og smådyr bliver fanget og dræbt under høst af afgrøderne, kan *C. botulinum*-sporer i disse dyrs mavetarmkanal germinere til vegetative celler og danne BoNT såfremt de rette anaerobe betingelser er til stede. Når forrådnelsen af kadaveret er fremskredent vil toksinet fordeles i fodermidlet (Radostits *et al.* 2007). Denne såkaldte ådsel-associerede botulisme forekommer også i en mere direkte form, såsom det er tilfældet i lande som fx Australien og Sydafrika.

3.2.2 Ådsel-associeret botulisme

I lande som Sydafrika, Australien samt området ved Golf-kysten i Amerika benyttes afgræsning ofte som primær foderkilde for kvæget (Radostits *et al.* 2007), og der anvendes i mindre grad konserveret foder. Afgræsning på fosforfattige arealer eller i områder hvor vegetationen er sparsom efter perioder med tørke, kan fremprovokere pica, og mere specifikt osteofagi, hos kvæget således at dyrene begynder at æde kadavere af domesticerede eller vilde dyr, der kan indeholde store

mængder præformeret BoNT (Theiler 1927). Indtagelse af BoNT via drikkevand fra søer, floder m.m. der er kontamineret med ådsler kan tillige medføre en udvikling af sygdommen.

3.2.3 Toksikoinfektøs botulisme

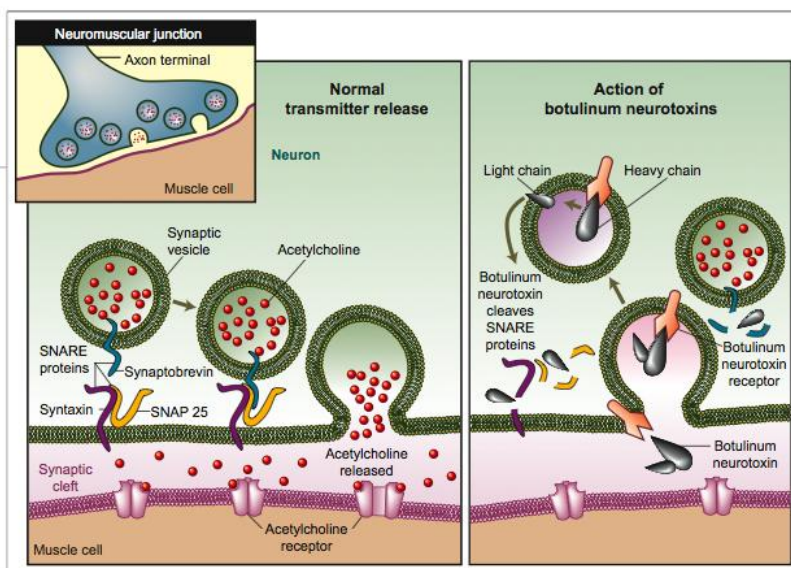
Toksikoinfektøs botulisme hentyder til, at der forekommer vegetative vækst af *C. botulinum*-sporer i et anaerobt eller nekrotisk område i mavetarmkanalen med efterfølgende absorption af BoNT til blodet (Divers & Peek 2008). Ifølge McLoughlin *et al.* (1988) er det muligt at denne form for botulisme forekommer hos kvæg som har en lang inkubationsperiode, idet køerne menes at have optaget subkliniske mængder præformeret toksin fra det kontaminede foder, der har medført gastrointestinal ileus, og derved har tilladt germination af sporer og langsom *in vivo* toksinproduktion. Forfatterne anfører dog, at tilstanden hos kvæg ikke er blevet videnskabeligt bevist, samt at der ikke er defineret nogen kendte prædisponerende faktorer (Neill *et al.* 1989). Toksikoinfektøs botulisme er anerkendt som værende en hyppig årsag til udvikling af botulisme hos spædbørn samt unge føl (*shaker foal syndrome*), hvor tarmfloraen endnu ikke er fuldt udviklet, hvorfor germination af sporer og efterfølgende *in vivo* produktion af BoNT kan forekomme. Da *C. botulinum* ikke er i stand til at konkurrere med normalfloraen i normal, sund tarmkanal forekommer toksikoinfektøs botulisme kun sjældent hos voksne individer (ACMSF 2006; Simpson 2004).

3.2.4 Sårbotulisme

Sårbotulisme hentyder til den vegetative vækst af *C. botulinum*-sporer, og den efterfølgende absorption af toksin til blodet, der kan forekomme i det anaerobe miljø, der er til stede i et nekrotisk sår. Det har ikke været muligt at finde nogen primære kilder der beretter om faktiske opståede tilfælde af sårbotulisme hos kvæg, dog tilskrives patogenesen at være potentielt forekommende hos kvæg af flere sekundære kilder, såsom ACMSF (2006), Coffield & Whelchel (2012) Quinn *et al.* (2002), og Rings (2004). Ifølge Radostits *et al.* (2007) forekommer sårbotulisme kun sjældent og de rapporterede cases, der er beskrevet er sket hos heste efter kastration eller hos heste med omphalophlebitis, inficerede sår eller injektionabscesser.

3.3 Patogenese

Botulinumtoksinet frigives fra den vegetative celle og findes i miljøet som et sammensat proteinmolekyle bestående af selve neurotoksinet BoNT og ikke-toksiske følgeproteiner, der menes at være ansvarlige for at beskytte BoNT fra miljøfaktorer, samt hjælpe med absorptionen fra mavetarmkanalen (Lindström *et al.* 2010). Efter oral indtagelse af det præformerede botulinumtoksin spaltes neurotoksindelen af molekylet fra følgeproteinerne vha. proteaser der er til stede i mavetarmkanalen, og BoNT bliver herved omdannet til sin aktive form, og består nu af en 100-kDa tung kæde og en 50-kDa let kæde, der er forbundet via en disulfidbinding. Toksinet



Figur 1. Grafisk oversigt over neurotransmitter-frigivelse ved en hhv. normal synapse og en synapse, der er påvirket af BoNT.
Fra <http://toxipedia.org/display/toxipedia/Botulinum+Toxin>

absorberes fra mavetarmkanalen ved en endnu uklar mekanisme (Fujinaga 2010) og transporteres med blodet til perifere cholinerge nerveterminaler, der omfatter neuromuskulære synapser, sympatiske og para-sympatiske ganglia samt postgangliære para-sympatiske nerveender. Da BoNT er for stort et molekyle til at krydse blodhjerne-barrieren, er dets selektive påvirkning af de cholinerge nerveterminaler generelt begrænset til de perifære

cholinerge systemer, og påvirker derfor ikke centralnervesystemet (Simpson 2004). Ved ankomsten til de cholinerge nerveterminaler bindes BoNTs tunge kæde selektivt og irreversibelt til receptorer der er placeret på plasma-membranen af den præsynaptiske nerveterminal. Herefter internaliseres toksinets lette kæde vha. endocytose, hvorefter den disulfide binding mellem den tunge og lette kæde kløves. Kløvningen medfører et fald i endosomets pH, som videre medfører en konformationsændring af BoNT-molekylet, således at den lette kæde kan slippe over den endosomale membran og ind i cytolet vha. tranlokation. Når først i cytolet, er den lette kæde i stand til at foretage enzymatisk kløvning af én ud af tre specifikke proteiner indeni den præsynaptiske nerveterminal, enten SNAP-25, synaptobrevin eller syntaxin. Disse tre proteiner

kaldes samlet for SNARE, og er nødvendige for udskillelsen af neurotransmitteren acetylcholin: under normale omstændigheder danner SNARE-proteinerne et fusions-kompleks der sørger for at bringe de acetylcholin-indeholdende vesikler tæt sammen med terminalmembranen, hvorefter fusion af disse strukturer kan ske ved hjælp af Ca^{2+} -signalering og efterfølgende frigivelse af acetylcholin. Proteolyse af én af de tre SNARE-proteiner forårsaget af BoNT forhindrer denne exocytose, hvorfor der ikke frigives acetylcholin fra terminalmembranen (se figur 1), og der opstår flaccid paralyse af organismen (Simpson 2004).

3.4 Kliniske manifestationer

Bovint botulisme ses oftest ikke som enkeltdyrs-tilfælde, men derimod i større udbrud, hvor de fleste dyr i besætningen, der præsenteres for den kontaminerede foderkilde udvikler karakteristiske kliniske manifestationer eller dør (Galey *et al.* 2000; McLoughlin *et al.* 1988; Sharpe *et al.* 2008), og det er således ikke ualmindeligt med en mortalitetsrate på 30-50 % inden for den enkelte besætning (Smith 2009).

Inkubationsperioden afhænger af mængden af indtaget toksin, således at jo større mængder toksin der indtages, des kortere bliver inkubationsperioden (Smith 2009; Theiler 1927). Derfor kan inkubationsperioden variere fra ca. 18 timer til 14 dage, dog er der i de fleste tilfælde en gennemsnitlig inkubationsperiode på to til seks dage (Theiler 1927). Varigheden af de kliniske manifestationer er tillige afhængigt af mængden af optaget toksin og varigheden hvorpå dyrene har været udsat for toksin (Coffield & Whelchel 2012) og der er således både beskrevet perakutte, akutte, subakutte, samt kroniske tilfælde (Radostits *et al.* 2007; Theiler 1927). Generelt varer de kliniske manifestationer mellem 2 til 30 dage (Coffield & Whelchel 2012).

I perakutte tilfælde forårsaget af massive mængder toksin kan dyrene findes selvdøde blot 12 timer efter indtagelse, uden at der er observeret forudgående kliniske manifestationer (Smith 2009). Disse perakutte tilfælde opstår dog kun sjældent, ligesom det er tilfældet med dyr, der er kronisk påvirkede, hvor der kun ses milde kliniske manifestationer og efterfølgende helbredelse efter tre til fire måneders sygdom (Radostits *et al.* 2007). Ifølge Radostits *et al.* (2007) er de fleste tilfælde af bovint botulisme subakutte af natur, og ligger til baggrund for indtagelse af moderate mængder toksin. De typiske kliniske manifestationer er progressiv symmetrisk muskulær paralyse af især muskulatur i kæbe, tunge og halsregion, samt lemmemusklér. Lammelse af svælget og tungen medfører salivation samt dysfagi og adipsi, da dyret bliver ude af stand til at synke. Ved manipulation af tungen findes denne utonisk og let fremtrækkelig. Dyrets bevægelser er ataksiske

og i fremskredne tilfælde bliver det ude af stand til at rejse sig eller løfte hovedet, hvilket ofte ses som sternal rekumbency med hovedet drejet mod flanken, ligesom det er karakteristisk hos køer med mælkefeber. Ved den kliniske undersøgelse findes de vitale parametre oftest som værende indenfor normalområdet og dyret har ikke feber. Derudover kan fund som mydriasis, manglende vommotilitet, samt diarre eller forstoppelse observeres i nogle tilfælde. Reduceret anal- og haletonus kan tillige forekomme (Sharpe *et al.* 2008).

I det terminale stadium medfører paralyse af brystmuskulaturen en besværet abdominal respiration, der viser sig som en kraftig fure bag ribbenskurvaturen, en såkaldt hvepsetalje. Mors forårsages af respirationsstop. Dyret er ved bevidsthed indtil døden opstår, hvilket ofte sker med dyret liggende i lateral rekumbency (Radostits *et al.* 2007).

3.5 Diagnose

Det kan være vanskeligt at stille diagnosen botulisme, da der ikke er tale om en primær infektion af organismen, men derimod en intoksikation, der skyldes et meget potent toksin, der kun er at finde kortvarigt i blodet hos det syge dyr, før irreversibel optagelse i nerveterminalerne forekommer, og som er letalt i ganske minimale mængder. En tentativ diagnose stilles derfor ofte på baggrund af observation af de typiske kliniske manifestationer hos et stort antal dyr, efter at andre differentialdiagnoser er blevet udelukket. En anamnese om foderskift eller fodermanagement omkring tidspunktet for opståen af de kliniske manifestationer kan tillige støtte mistanken. (Jean *et al.* 1995; Sharpe *et al.* 2008).

For at kunne stille en definitiv diagnose er påvisningen af BoNT i det afficerede dyr nødvendigt, når fundet sammenholdes med de karakteristiske kliniske manifestationer for botulisme hos dyret.

Identifikation af *C. botulinum* eller dennes sporer i mavetarmindhold eller i en mistænkt foderkilde, er ikke tilstrækkeligt for at bekræfte diagnosen, da bakterien og sporerne jo som bekendt er meget udbredt i miljøet, og er til stede i mavetarmkanalen hos selv raske dyr (Radostits *et al.* 2007; Rings 2004).

Grundet sygdommens til tider akutte natur, hvor dyr kan findes døde uden at forudgående kliniske manifestationer er blevet observeret, foregår meget af det diagnostiske udredningsarbejde ved postmortelle undersøgelser og prøveudtagninger. Fundet af BoNT i fæces eller væv ved postmortel undersøgelse af dyret skal dog tolkes med stor forsigtighed, da opformering af bakterien og samtidig toksinproduktion er en del af den naturlige forrådnelsesproces i kadaveret (Payne *et al.*

2011; Quinn *et al.* 2002)). Prøvemateriale skal derfor udtages fra levende dyr eller fra nyligt døde dyr for at undgå falsk-positive laboratorieresultater (Quinn *et al.* 2002).

Mouse Bioassay-testen (MBA) er anerkendt som værende gold standard for at stille en definitiv diagnose hos kvæg (Brooks *et al.* 2010; Cai *et al.* 2007; Coffield & Whelchel 2012) og er på nuværende tidspunkt den eneste internationalt accepterede metode til at påvise BoNT i prøvemateriale ifølge AOAC International (Cai *et al.* 2007). Testen er angivet som værende gold standard, da den hidtil er den mest sensitive test der er tilgængelig, og således er bedst egnet til at påvise sygdom hos et dyr, der faktisk er sygt af botulisme. Grunden til at man efterstræber en test med højst mulig sensitivitet med henblik på at påvise botulisme, er at BoNT kan forårsage mors af organismen i ekstremt lave mængder og i løbet af en kort inkubationsperiode, hvorfor man i de fleste tilfælde ikke rettidigt når at udtage materiale, der indeholder minimumskoncentrationen af toksinet, der kan opdages ved laboratorieprøver (Coffield & Whelchel 2012). Sandsynligvis er det kun muligt at finde toksin i serum eller plasma i perakutte tilfælde, hvor mors opstår indenfor 48 timer efter en periode med hurtigt udvikling af progressive kliniske manifestationer (Smith 2009). Betydningen af MBA som diagnoseredskab for botulisme understreges, idet testen ofte må stå alene som bevis på sygdommen, når den sammenholdes med de karakteristiske manifestationer, eftersom parakliniske prøver ikke viser nogle for botulisme specifikke ændringer i hverken blodværdier eller serum-biokemiske værdier, og ej heller erkendes der patognomoniske sektionsfund, eller karakteristiske histologiske forandringer ved postmortel undersøgelse af dyret (Radostits *et al.* 2007). Disse fraværende værdier og læsioner er dog ikke nyttesløse, idet de, når de sammenholdes med de typiske kliniske manifestationer, kan anvendes til at bekræfte en tentativ diagnose om botulisme, ved at udelukke differentialdiagnoser (Smith 2009).

Til trods for at MBA har den højeste sensitivitet af de på nuværende tidspunkt tilgængelige tests, er testen ikke optimal til påvisning af botulisme hos kvæg. Falsk negative resultater prøver kan opstå, idet kvæg ifølge Moeller *et al.* (2003) tilsyneladende er op til 13 gange mere følsomme overfor bl.a. type C toksin end mus på en kg-vægtbasis. Det vil sige, at dén dosis toksin, der podes på mus, og som ikke efterfølgende udviser typiske kliniske manifestationer og mors, muligvis ville have været udløst karakteristiske manifestationer hvis denne var podet på kvæg. Theiler (1927) fandt ligeledes at MLD (Minimum Lethal Dose), for hvad der sandsynligvis var BoNT type C (Robinson 1929), for kvæg er 0,02 c.c. per. kg legemsvægt ved per oral indtagelse, mens mors hos hvide mus først opstår

ved relativt store mængder toksin på 0,1 c.c. MLD angiver MBA's sensitivitet og værdien angiver den mindste mængde toksin, og således den højeste fortynding af prøven, der forårsager mors hos samtlige inokulerede mus (Cai *et al.* 2007).

Der er i litteraturen delte meninger om, hvilket prøvemateriale fra dyret, der bør anvendes til MBA, således at en definitiv diagnose kan stilles. Ifølge Quinn *et al.* (2002) er det kun tilstedeværelsen af BoNT i serum, der bekræfter diagnosen om botulisme, hvorimod andre kilder også accepterer brugen af væv (ACMSF 2006; Coffield & Whelchel 2012; Radostits *et al.* 2007), rumenindhold (Coffield & Whelchel 2012; Divers & Peek 2008; Radostits *et al.* 2007) og fæces (Divers & Peek 2008) som prøvemateriale. Årsagen til denne diversitet kan muligvis forklares ud fra artiklen skrevet af Brooks *et al.* (2010), der nævner at man i stedet for at anvende serum, som er det anbefalede prøvemateriale for at stille en definitiv diagnose for bovint botulisme, har valgt at undersøge fæces for BoNT, da man således oftere får positive resultater.

I Danmark foretages botulismediagnostik for husdyr bl.a. på DTU Veterinærinstituttet, hvor prøvematerialet består af lever-væv fra selvdøde dyr med en tentativ diagnose på botulisme, der er baseret på kliniske symptomer, eller foderprøver, der antages at have været kilden til sygdom i en besætning. Muligheden for at påvise toksin på organmateriale fra selvdøde dyr er ofte anseelig, dog kan det være vanskeligt hos aflivede dyr, da toksinmængden formodes at være mindre i disse dyr (Angen 2012, personlig kommunikation), samt i foderprøver (DTU Veterinærinstituttet 2009), da ensilage er et meget inhomogent materiale (Weissbach 2006), hvorfor fordelingen af toksin kan være meget uens fordelt i stakken under mistanke (ACMSF 2006; Radostits *et al.* 2007).

Proceduren for selve muse-delen af Mouse Bioassay-testen er opdelt i to dele, og er gengivet fra USDA/FSIS Microbiology Laboratory Guidebook (1998): Første del af testen består af påvisningen af BoNT vha. hhv. intraperitoneal (IP) injektion af oprenset prøvemateriale i forsøgsmus, samt IP-injektion af prøvemateriale, der er blevet opvarmet således at eventuelle toksiner i materialet ødelægges, i de såkaldte kontrolmus. Alle mus observeres nu periodevist i 48-96 timer for typiske neurologiske manifestationer for botulisme hos mus, herunder tilstedeværelsen af den såkaldte hvepsetalje, svaghed og paralyse af lemmerne, og besværet vejrtrækning efterfulgt af mors. Anden del af testen består af, at bekræfte tilstedeværelsen af BoNT i prøvematerialet samt foretage en typning af toksinet, samt bestemme kvantiteten af BoNT i prøvematerialet. Dette gøres ved at injicere monovalente antitoksiner for henholdsvis A, B, C, D, E og F i mus, der efterfølgende

injiceres med forskellige fortyndinger af prøvematerialet. Musene observeres nu over de næste 48 timer for typiske manifestationer for botulisme og diagnosen botulisme kan nu bekræftes samtidigt med at den serologiske type af toksin klarlægges, idet det kun er den gruppe mus, der modtog det tilsvarende antitoksin, som er til stede i prøvematerialet, der overlever toksininjektionen.

Da MBA er en længerevarende test, hvor resultatet ved en negativ test først foreligger efter ca. fire døgn, og den endelige diagnose for en positiv test først foreligger ca. en uge senere, har man forsøgt at udvikle andre hurtigere metoder til at diagnosticere botulisme hos pattedyr. Som tidligere nævnt er BoNT kun meget kortvarigt tilstede i blodet, hvilket begrænser MBA's sensitivitet, idet testen kun kan måle det aktive, ubundne BoNT, og ikke er i stand til at måle tilstedeværelsen af toksin, når dette først er bundet til nerveterminalerne (Heider *et al.* 2001). Det store antal forsøgsdyr, der indgår i testen er tillige med til at gøre kravet om udviklingen af *in vitro*-metoder, der med samme eller højere sensitivitet end MBA kan anvendes i diagnosticeringen, større. Eksempler på *in vitro*-metoder der er forsøgt anvendt er PCR og ELISA, der dog hver især har deres mangler i forbindelse med diagnosticeringen af botulisme; PCR påviser kun genet for BoNT i prøvematerialet og ikke selve det aktive toksin, hvilket kan give falsk-positive resultater, idet nogle gener er "stille" og ikke kommer til udtryk og skaber sygdom hos dyret (Lindström & Korkeala 2006, Rings 2004).

ELISA kan anvendes til at måle både antigenmængden og antistoffer i prøvemateriale, men metoden har lav sensitivitet (Cai *et al.* 2007; Lindström & Korkeala 2006), og kan i forbindelse med antistofmåling give resultater som ikke nødvendigvis er korreleret med klinisk sygdom hos dyret, idet tilstedeværelsen af antistoffer generelt ikke kan betragtes som et mål på om et dyr har haft klinisk sygdom, men kun er en indikation på at dyrets immunsystem har reageret på det pågældende agens (Quinn *et al.* 2002), eller et andet agens der giver serologisk krydsreaktion i den serologiske test (Angen 2012, personlig kommunikation).

3.6 Differentialdiagnoser

Differentialdiagnoser til bovin botulisme er lidelser, hvor neurologiske forstyrrelser i form af progressiv symmetrisk muskelsvaghed og paralyse er den primære kliniske manifestation. Eksempler på sådanne lidelser er stofskifteforstyrrelser såsom hypocalcæmi og hypomagnesæmi, listeriose, blyforgiftning, kronisk organofosfat-forgiftning, ionophoretoksitet, flåtparalyse, paralytisk rabies og nutritionelle eller plante-toksin-inducerede myopatier (Coffield & Whelchel 2012). Det er i de fleste tilfælde muligt at differentiere de ovenfor nævnte diagnoser fra botulisme ved hjælp af enten ante- eller postmortelle undersøgelser og analyser. F.eks. vil dyr med

stofskifteforstyrrelser såsom hypocalcæmi, oftest reagere positivt på behandling rettet mod underskuddet af den pågældende ion, hvorimod dyr med botulisme ikke vil vise forbedring efter behandlingen. Sygdomme som listeriose og paralytisk rabies kan blandt andet bekræftes ved histologi af CNS (især medulla oblongata), hvor man vil finde henholdvis multifokale mikroabscesser og viralt antigen. Derudover kan ELISA anvendes til at identificere rabies antigen, og CSF vil afsløre forøget antal protein og leukocytter i tilfælde af listeriose. Blyforgiftning, organofosfatforgiftning og ionophoreforgiftning kan bekræftes ved blod – eller vævsprøver, idet det ses hhv. en forhøjet koncentration af bly, en reduceret koncentration af cholinesterase, og en forhøjet koncentration af CPK (creatinin phosphokinase). Mykotoksikose kan være svært at diagnosticere hos kvæg, og stilles på baggrund af kemiko-analytisk identifikation af mykotoksinerne i foderet, blod eller i væv såsom lever og nyrer. Flåt-paralyse er tilsvarende svært, da der ikke opstår patognomiske fund, og diagnosen stilles ved fund af flåter på dyret (Radostits *et al.* 2007).

3.7 Behandling

Da de kliniske manifestationer på botulisme skyldes en irreversibel binding af BoNT til nerveterminalerne, kan forbedret neuromuskulær funktion kun opnås ved regeneration af nye nerveterminaler (Smith 2009). Denne regeneration kan være uger eller måneder om at blive komplet (Rings 2004), hvorfor (selv)helbredelse kan være en langvarig proces. Sandsynligheden for helbredelse og dyrets prognose afhænger af sværhedsgraden af de kliniske manifestationer, og generelt angiver man prognosen som værende slet, hvis dyret er rekumbent, og ikke længere er i stand til at rejse sig, hvorfor aflivning må overvejes (Coffield & Whelchel 2012; Freeman & Bevan 2007).

Antibiotika har ingen effekt på de kliniske manifestationer hos dyret, da sygdommen jo skyldes en intoksifikation, og ikke en bakteriel infektion (Freeman & Bevan 2007). Antibiose bør derfor kun anvendes i tilfælde af sekundært opståede komplikationer, såsom aspirationspneumoni, der er angivet som værende relativt hyppigt forekommende følgesygdom hos dyr med botulisme, grundet fejlsynkning ved lammelse af svælget. Dog skal valget af antibiotikabehandling overvejes nøje, da produkter indeholdende procain penicillin, tetracyclin eller aminoglykosider ikke bør anvendes, grundet deres tendens til at virke svagt muskelsvækkende (Divers & Peek 2008).

Equint polyvalent antiserum kan administreres intravenøst til kvæg, dog er antitoxin-terapi mindre effektivt hos kvæg end hos heste, idet det meste af toksinet ikke længere vil være aktivt i blodet på

det tidspunkt de kliniske manifestationer forekommer og diagnosen bliver stillet (Coffield & Whelchel 2012).

Således er støttende terapi den vigtigste behandling for bovint botulisme (Coffield & Whelchel 2012). Påvirkede dyr bør opstaldes på en sådan måde at bevægelse minimeres, da overanstrengelse forværrer progressionen af de kliniske manifestationer (Smith 2009). Derudover bør dyr, der ikke er i stand til at æde og drikke behandles med væsketerapi enten ved passage af næse-svælgsone eller ved intravenøs infusion, for at rette op på elektrolyt- og syre-baseforstyrrelser samt undgå dehydrering og hypoglycæmi. I tilfælde af ileus kan mineralolie administreres med næse-svælgsone, og rumen-transfaunation kan udføres.

3.8 Forebyggelse

Vaccination mod bovint botulisme foretages i stort omfang i endemiske områder, herunder områder i Sydafrika og Australien og Israel. Vaccinerne er baseret på toxoid mod BoNT type C og D, da disse er de hyppigst forekommende serotyper i disse lande. Udover vaccination suppleres dyrenes foder med fosfor- og proteinrige foderkilder, herunder blandt andet benmel, for at forhindre opståen af pica og osteofagi hos det afgræssende kvæg.

Da antallet af tilfælde af bovint botulisme generelt er begrænsede i Europa og Nordamerika, findes der ingen registreret vaccine til brug i Danmark (DTU Veterinærinstituttet 2009), Storbritannien (ACMSF 2006) og USA (Coffield & Whelchel 2012). Der kan dog ved gentagne udbrudstilfælde gives dispensation til at vaccinere, dette gælder for alle de nævnte lande.

Kvægproducenter, der anvender konserveret foder som primær foderkilde, kan bedst forebygge sygdommen ved at være omhyggelig med at opretholde en god hygiejne under hvert enkelt trin af foderproduktionen og ensilageringsprocessen, således at der sker mindst mulig kontamination med sporer fra jord og gylle (Weissbach 2006). For videre at hindre en opformering af clostridierne i ensilagestakken, er det vigtigt at producere ensilage af god kvalitet, hvilket sikres ved en god afgrødekvalitet, en optimal fermentationsproces hvor pH-værdien falder hurtigt pga. omfattende mælkesyreproduktion, samt en lagring og udfodring, hvor der sker mindst mulig luftindslip til ensilagestakken (Hvelplund & Nørgaard 2003; Knický 2005).

Ydermere bør der inden starten på høstarbejdet tages praktiske forholdsregler for at minimere risikoen for at vildt påkøres i forbindelse med høstarbejdet, således at ådselassocieret botulisme undgås. Dette gælder især ved høstning af grønfoder i vildtets yngletid (DTU Veterinærinstituttet 2009).

4. Andre Clostridium-arter, der forårsager sygdom hos kvæg

Patogene Clostridier-arter er en betydelig årsag til sygdom hos produktionsdyr, da de findes overalt i miljøet, herunder i jord, fæces og ferskvandskilder. Grundet clostridiernes omfangsrige udbredelse i miljøet er udryddelse umuligt, og sygdomstilfælde må derfor forsøges reduceres ved hjælp af forebyggende foranstaltninger, herunder god hygiejne og vaccination. (Radostits *et al.* 2007). Alle clostridiearter er i stand til at producere potente exotoksiner, som altid er selve årsagen til sygdom. Toksinerne der dannes af de forskellige arter udøver forskellige effekter i dyret og skaffer sig adgang til kroppen på forskellige måder, og kan på baggrund af dette opdeles i tre hovedgrupper; neurotoksiske clostridier, histotoksiske clostridier samt enteropathogeniske og enterotoxæmiske clostridier (Quinn *et al.* 2002).

4.1 Neurotoksiske Clostridier

Denne gruppe udgøres udover *C. botulinum* også af *C. tetani*, der er ansvarlig for opståelsen af sygdommen tetanus, også kendt som stivkrampe. Tetanus er en akut og potentielt fatal intoksikation, forårsaget af potente neurotoksiner, der ved hjælp af irreversibel binding til inhibitoriske nerveterminaler og efterfølgende manglende frigivelse af inhibitoriske neurotransmittere, medfører spastisk paralyse i dyret og efterfølgende mors grundet kvælning pga. fiksering af respirationsmusklerne (Radostits *et al.* 2007). Pattedyr er forskelligt modtagelige overfor neurotoksinet, hvor mennesker og heste er meget modtagelige, medens ruminanter kun er betegnet som værende moderat modtagelige. Lidelsen forekommer sporadisk og hos enkeltdyr ofte i forbindelse med opståen af sår hos ikke-vaccinerede dyr. Infektion opstår når endosporer, der befinder sig i jord og fæces introduceres ind i traumatiseret væv, såsom dybe penetrerende sår, kastrationer/andre operationer, overfladiske sår opstået i forbindelse med dystokier hos køer og får, og via umbilicus hos unge dyr. Tilstedeværelsen af nekrotisk væv, og fremmedlegemer og fakultative anerobe bakterier i såret kan medføre et anerobt miljø, hvorved endosporerne kan germinere og danne det potente tetanospasmin.

Kliniske manifestationer på tetanus og prognosen for overlevelse afhænger af det anatomiske område hvor toksinet produceres, samt mængden af toksin og dyreart. Hos kvæg ses generaliseret muskelstivhed, spasmer, hyperestæsi, prolaps af tredje øjenlåg, trismus (Lockjaw), kramper, respirationsstop og død. (Radostits *et al.* 2007). Diagnosen stilles ofte ud fra de kliniske manifestationer, der er meget let-adskillelige fra andre sygdomme og anamnesen om opståede skader eller sår hos dyret, der ikke er vaccineret mod tetanus. Der findes ingen antemortelle tests og

ingen postmortelle læsioner, der kan hjælpe med at stille den endelige diagnose, men dyrkning af organismen fra svab fra såret eller milten kan forsøges, hvis minimal autolyse er forekommet på tidspunktet for obduktionen, idet det så muligvis kan lykkes at identificere de store Gram-positive stave, indeholdende karakteristiske tennisketsjer-lignende sporer. Lidelsen kan forsøges behandlet ved administration af høje doser penicillin parenteralt, aggressivt debridement og lavage af såret samt administration af muskelafslappende midler. Voksnt kvæg med milde tilfælde overlever ofte, mens case-mortaliteten hos unge dyr er høj.

4.2 Histotoksiske clostridium-arter

Clostridie-arterne i denne gruppe har fået deres navn, da de producerer udbredte infektioner i væv, såsom muskler og leveren (*histo* = gr. for væv) (Quinn *et al.* 2002). Spredningen af organismerne til deres målorganer kan foregå ved to ruter, nemlig via penetration gennem et sår eller via hæmatogen spredning efterfølgende per oral optagelse.

Sårinfektioner med *Clostridium* spp. såsom *C. septicum*, *C. perfringens*, *C. novyi* eller *C. chauvoei* kaldes for gasgangræn eller malignt ødem, og skyldes bakteriernes evne til at proliferere og danne exotoksiner under de anaerobe og alkaliske forhold, som ofte er til stede i dybe sår. Exotoksinerne skaber udbredt ødem og nekrose samt gangræn lokalt i området, og medfører mors af dyret, når de absorberes i blodbanen. Dyr i alle aldre er udsatte. Risikofaktorer er dårlig hygiejne i dyrenes miljø, samt ved injektion af lægemidler. Udover selve injektionshygiejnen ved administration af lægemidler, udgør vævsirriterende lægemidler tillige en risiko ved intramuskulær injektion, da disse midler kan fremprovokere lokal nekrose (Radostits *et al.* 2007).

Kliniske manifestationer opstår 6-48 timer efter infektion, hvor der observeres en lokal læsion på infektionsstedet, der består af en blød, dejagtig hævelse med markeret lokalt erythem (rødme af huden). Området er meget smertefuldt ved palpation. Senere i forløbet bliver hævelsen fast og huden mørk og stram. Emfysem kan være til stede, alt afhængigt af hvilke Clostridie-arter, der er årsag til infektionen, og kan i nogle tilfælde ses som skummende eksudation fra såret. Dyret er nedstemt og har høj feber (41-42 °C) og der ses tegn på kredsløbsforstyrrelser og shok. Mors opstår inden for 24-48 timer fra opståen af de første kliniske manifestationer uden intensiv behandling. Når infektionen opstår under kælvningen grundet laceration af vulva, ses der hævelse af vulva der breder sig lokalt til at omfatte hele pelvis- og perinealregionen, og derudover ses der rød-brunligt flåd. Efterfølgende opstår der svær toksæmi og koen dør inden for 24-48 timer.

En tentativ diagnose kan stilles ved udtagelse af svab fra det lokale område, således at behandling hurtigt kan igangsættes. Derudover kan der differentieres mellem clostridie-arterne vha. PCR. Behandling skal igangsættes med det samme infektionen viser sig, og består af intravenøst administration af høje doser penicillin gentagne gange, samt eventuelt lokalt i såret, og derudover administration af NSAIDS, samt sørge for drænage fra såret. I enzootiske områder anbefales vaccination (Radostits *et al.* 2007).

Hæmatogen spredning af især *C. chauvoei* efterfølgende per oral optagelse af bakteriesporer kan forekomme hos kvæg, hvor tilstanden kaldes for miltbrandsemfysem. Det formodes at sporerne optages til blodbanen via fordøjelseskanalens slimhinde, hvorefter de transporteres til (skelet)muskulaturen, hvor de kan ligge i en dvaletilstand indtil fx lokal muskelnekrose eller lav ilttension får dem til at germinere. Derved opstår der en svær lokal nekrotiserende myositis af skeletmuskulaturen samt en akut systemisk toxæmi, der ofte medfører mors af dyret indenfor 12-36 timer efter opståen af de kliniske manifestationer, men som også kan opstå per akut, således at kliniske manifestationer ikke observeres før indtrædelsen af mors. Dyret vil udvise svær nedstemthed, være anorektisk og have høj feber (41 °C). Der observeres svær halthed, og udtalt hævelse af den øvre del af det afficerede ben, som i de tidlige stadier vil være varmt og smertefuldt ved palpation, men som hurtigt bliver koldt og indolent, hvorved ødem og emfysem kan erkendes. Huden i området bliver herefter misfarvet, tør og sprækker. Dette kliniske billede er karakteristisk for tilstanden, der af samme grund kaldes *Blackleg* på engelsk. Diagnosen stilles ved postmortel obduktion af dyret, hvor incision af den afficerede muskelmasse vil afsløre opsvulmet og ildelugtende væv, der varierer i farven fra mørkerødt til sort, og er dækket af et tynd, blod-lignende væske indeholdende gasbobler. Ved friske indsnit i vævet virker snitfladen tør og skinner metallisk. En endelig diagnose kan stilles ved identifikation af *C. chauvoei* vha. fluorescent antibody staining. Miltbrandsemfysem opstår oftest hos ung-kvæg, der vokser hurtigt og fodres intensivt. Derudover ses en sæson-præget udbredelse, idet tilstanden især opstår i de varme og våde måneder af året. Grundet sygdommens akutte forløb og læsionernes svære udbredelsesgrad er behandling sjældent succesfuld, hvorfor vaccination af ungvæg anbefales til kvægproducenter, hvor sygdommen er enzootisk forekommende (Radostits *et al.* 2007).

4.3 Enteropathogeniske og enterotoxæmiske clostridie-arter

C. perfringens er en del af den normale tarmflora hos kvæg. Ændringer af tarmmiljøet og motilitet grundet stressende forhold for dyret, såsom transport, foderskift mm., kan dog begunstige en

voldsom vækst af *C. perfringens* i tarmen, således at store mængder toksin produceres, der dels har en lokal påvirkning af tarmslimhinden og dels absorberes til blodbanen og fremkalder toksæmi hos dyret. (Dunn 2007; Lebrun *et al.* 2010).

C. perfringens inddeles i biotyperne A-E, alt efter hvilke af de letale hovedtoksiner, *alfa*, *beta*, *epsilon* og *iota*, der produceres. Alle fem typer er blevet tilskrevet at kunne forårsage enterisk og enterotoksisk sygdom hos kvæg, dog er der til stadighed udfordringer i at definere og diagnosticere det enterotoksæmiske syndrom hos denne dyreart, samt at differentiere mellem de forskellige typer i forbindelse med identifikation af ætiologien i flere af de kliniske syndromer der tilskrives *C. perfringens*. Disse udfordringer beror bl.a. på, at selvom de forskellige typer af *C. perfringens* (A-E) har forskellige toksin-profiler og skaber forskellige sygdomssyndromer, er det ikke altid muligt at skelne mellem dem, da de kliniske manifestationer og risikofaktorerne der er associeret med de forskellige sygdomme produceret af *C. perfringens* ofte overlapper hinanden (Smith 2009).

Derudover kan det være svært at stille en korrekt diagnose, da *C. perfringens* udgør en del af den naturlige tarmflora selv hos raske dyr, og at organismen, som indgår i den postmortelle forrådnelsesproces, indenfor få timer efter mors er opstået, vil gennemgå hurtig vækst og sprede sig fra mavetarmkanalen og invadere kroppens andre væv (Smith 2009).

Enterotoksæmi forårsaget af *C. perfringens* kan forekomme hos både neonatale kalve, ungvæg samt voksent kvæg, og lidelsen er karakteriseret som et perakut eller akut syndrom, hvor mors opstår pludseligt og ofte uden observation af forudgående kliniske manifestationer. Generelt for de enterotoksiske syndromer gælder det at behandling ofte er nyttesløst grundet sygdommens akutte natur, hvorfor vaccination af drægtige køer og kvier anbefales, således at nyfødte kalve beskyttes via kolostrum. For at kunne stille den absolutte diagnose for enterotoksæmi forårsaget af *C.*

perfringens kræves en dyrkning af organismen fra tarmen, samt efterfølgende genotypning vha. mPCR, samt demonstration af karakteristiske makro- eller mikroskopiske læsioner, og hvis muligt, identifikation af toksin fra tarmene (Divers & Peek 2008). Da dyrkningen anvendes til at foretage en kvantitativ bakteriologisk undersøgelse bør prøvemateriale udtages hurtigst muligt postmortelt for at undgå falsk-positive resultater (i form af opformering *C. perfringens* under forrådnelsesprocessen), og opbevaring samt transport af prøvematerialet bør være således at yderligere vækst af *C. perfringens* ikke forekommer (Lebrun *et al.* 2010) En cut-off-værdi er ikke endeligt bestemt og varierer derfor mellem forfattere, men dog anses værdier højere end 10^6 til 10^7 cfu/ml som værende tegn på overvækst af *C. perfringens* og bekræfter derfor diagnosen, da det

normale antal (som findes hos raske dyr) er mellem 10^2 til 10^5 cfu/ml i tarmindehold (Lebrun *et al.* 2010).

C. perfringens type B og C forårsager enterotoksisk hæmorrhagisk enteritis hos neonatale og unge kalve, som modtager kolostrum og endnu ikke har en fuldt udviklet tarmflora. Patogeniciteten for begge disse typer af *C. perfringens* tilskrives især beta-toksinet, der hos det voksne dyr inaktiveres af trypsin, et enzym der dannes af pankreas. Denne trypsin-produktion kan mangle hos helt unge kalve, således at kolonisering og opformering af type B eller C kan forekomme i mavetarmkanalen, efter indtagelse af organismen fra et kontamineret miljø. Derudover er neonatale kalve udsat for infektion med disse typer, da der i kolostrum findes trypsin-inhibitorer, der har som funktion at sikre at immunoglobinerne ikke nedbrydes. De neonatale kalve indtager type B eller C fra miljøet under kælvningen (Smith 2009). Kliniske manifestationer kan bestå af diarre, eventuelt blodtilblandet, og akutte mavesmerter, der associeres med urolighed og brølen. I andre tilfælde opstår mors akut uden forudgående kliniske manifestationer.

C. perfringens type D producerer den klassiske forædnings-sygdom kendt som *pulpy kidney disease*, der oftest forekommer hos lam, men som også er anerkendt hos kalve. Sygdommen er karakteriseret ved per akut opstået mors hos velfungerede kalve i god foderstand. Andre tilfælde udviser akut opståen af neurologiske manifestationer, såsom krampeanfald, ataksi og blindhed, opisthotonus og dyret er manisk og brøler voldsomt. De neurologiske manifestationer tilskrives epsilon-toksinet der er årsagen til type D's patogenicitet, da dette toksin øger den vaskulære permeabilitet og skaber ødem i flere af dyrets organer, især lungerne, nyrerne og hjernen (Smith 2009). Sygdommen opstår oftest hos kalve der er en til fire måneder gamle, som er i god foderstand og fodres intensivt med rationer der indeholder store mængder kulhydrat og/eller protein, såsom korn eller meget frodigt græs. Fodring af store mængder mælk eller mælkeerstatning af få omgange kan tillige fremprovokere sygdom. Især udgør bratte fodringsskift med en forøget andel af kulhydrater en risikofaktor, da dette kan skabe ubalance i den bakterielle tarmflora, således at der kan ske opformering af gram-positive bakterier, såsom *C. perfringens* (Divers & Peek 2008; Radostits *et al.* 2007).

C. perfringens type A mistænkes også for at kunne producere hæmorrhagisk enteritis hos kalve og voksent kvæg og derudover for at være årsag til hæmolytisk sygdom, løbesår hos kalve og Haemorrhagic bowel syndrome (HBS) hos kvæg (Divers & Peek 2008; Radostits *et al.* 2007). Denne mistanke beror på at type A's patogenicitet primært tilskrives alfa-toksinet, der udviser

hæmolytisk aktivitet. Rollen som *C. perfringens* type A spiller i patogenesen for de nævnte lidelser er endnu usikre, da organismen kan isoleres fra fæces fra tilsyneladende raske dyr (Smith 2009), og derudover er den mest dominerende af typerne under den postmortelle forrådnelsesproces, hvorfor den altid findes i store mængder i kadaveret. Dertil kommer, at det kan være meget vanskeligt at differentiere en type A infektion fra en type B eller C infektion, da sidstnævnte typers patogenicitet kan tilskrives beta-toksin, der inden for få timer efter dødens opståen nedbrydes af proteaser i tarmlumen, hvorfor toksinet ikke kan isoleres (Smith 2009). At type A ikke altid er årsag til sygdom hos dyret, indikeres videre ved at antistoffer mod alfa-toksin kan findes i serum hos raske køer, hvilket tyder på, at en del af det producerede toksin muligvis absorberes til blodet og behandles af immunsystemet, og at infektion med type A kan forløbe subklinisk (Lebrun *et al.* 2010; Radostits *et al.* 2007).

HBS er en forholdsvist nyligt opdaget tarmsygdom hos malkekøer, der er karakteriseret ved pludselig opstået, progressiv og af og til massiv blødning ind i tyndtarmlumen, der efterfølgende omdannes til koagler og obstruktion af tarmlumen, hvorved der sker nekrose af det pågældende tarmsegment. Sygdommen er ofte letal, og dyret dør af shok. Ætiologien til HBS er på nuværende tidspunkt ukendt, og ingen konsistente prædisponerende faktorer er blevet identificeret, dog anses *C. perfringens* type A at være involveret i patogenesen blandt andet, fordi type A kan isoleres i store mængder fra koagler til stede i jejunum, der er mikroskopisk bevis for tarmnekrose associeret med en tyk intraluminal population af store grampositive bakterier, samt at der sjældent identificeres andre enteriske patogener, der kan associeres med hæmorrhagisk enteritis hos køer med lidelsen (Divers & Peek 2008). HBS ses oftest tidligt i laktationen (inden for de første fire måneder), men kan også opstå sent i laktationen, samt hos goldkøer. Risikofaktorer, der formodes at være associeret med sygdommen er fysiologisk stress i forbindelse med topydelse hos koen, samtidigt med fodring af rationer med højt indhold af kulhydrater og protein, men lavt indhold af fibre.

5. Litteratur om sygdomskomplekset kronisk/visceral botulisme

Udover den anerkendte klassiske botulisme, der er karakteriseret ved en progressiv flaccid paralyse og (evt. mors) hos dyrene, har der i Tyskland siden 1990'erne været megen opmærksomhed omkring, hvorvidt der tillige findes en kronisk form for botulisme hos malkekvæg, hvis kliniske billede primært er forstyrrelser af mavetarmkanalen. Derfor kaldes lidelsen også for visceral botulisme. Navnet på sygdomskomplekset og hypotesen bag det kliniske billede og

årsagssammenhængen beskrives for første gang af Böhnel *et al.* (2001), i artiklen “*Visceral Botulism – A New Form of Bovine Clostridium botulinum Toxication*”, hvor forfatterne redegør for en mulig ætiologi og patogenese bag det kliniske billede, der er observeret i besætninger i Mecklenburg-Vorpommern i Nordøsttyskland siden 1999: På besætningsniveau ses der markant fald i mælkeydelse, forhøjet celletal, forhøjet kodødelighed og flere syge dyr med løbedrejninger, mastitis og haltheder især i form af laminitis. Dyrene i besætningerne synes ikke at reagere positivt på behandling, og virker somnolente. (Schwagerick 2000; Schwagerick 2006). På enkeltdyrsniveau er de kliniske manifestationer typisk meget uspecifikke og forekommer oftest hos køerne i den peripartuelle periode, selvom køer i senlaktation og goldkøer tillige kan udvikle manifestationerne. I besætninger, der har været påvirket af sygdomskomplekset i en længere periode, kan unge kalve tillige påvirkes, og blive svage og somnolente. De kliniske manifestationer består bl.a. af indigestion, der viser sig som vekslende diarre og forstoppelse, ikke-infektiøst akut og kronisk laminitis, ataksi, stiv gangart og parese, apatiske dyr der er rekumbente og ligner mælkefebertilfælde, men som ikke reagerer på calcium-infusion, kredsløbsforstyrrelser (opsvulmede vener og positiv venepuls samt ødem i benene samt yveret), forceret respiration, opkneben abdomen og krum ryg samt afmagring. (Schwagerick 2000; Schwagerick 2006). Modsat den klassiske botulisme, der er en perakut tilstand, forløber de kliniske manifestationer for kronisk botulisme over flere måneder og år (Böhnel & Gessler 2004). På baggrund af udelukkelsen af almindelige infektiøse og metaboliske lidelser vha. laboratorieundersøgelser af de ramte besætninger, og fundet af clostridie-arter i fæces fra køerne, herunder *C. botulinum* og dennes toksiner blev det konkluderet at sygdomskomplekset kunne være en ny form for botulisme. (Böhnel *et al.* 2001; Schwagerick 2006).

Forfatterens forklaring på det atypiske kliniske billede i forhold til det, der opstår i tilfælde af klassisk botulisme hos kvæg, er at patogenesen bag lidelserne ikke er den samme. I tilfælde af kronisk botulisme sker der ikke kun en toksikation af organismen som det er tilfældet for den klassiske botulisme, men derimod en blanding af en infektion og en toksikation, en såkaldt toksikoinfektion. Toksikoinfektøs botulisme er beskrevet hos spædbørn, unge føl (Shaker Foal syndrome) og i forbindelse med Equine grass sickness, og skyldes *in vivo* produktion af BoNT i tarmene efter germination af *C. botulinum*-sporer, der er indtaget med maden/foderet (Böhnel *et al.* 2001; Schwagerick 2000). Patogensen hos kvæg formodes at forløbe således, at der efter indtagelse af sporer med foderet, forekommer vækst og kolonisering af *C. botulinum* i de nedre tarmafsnit, hvorefter små mængder BoNT dannes og delvist absorberes over tarmslimhinden over adskillige

dage, mens resten af BoNT udskilles med fæces. Denne længerevarende absorption af små mængder BoNT forstyrrer den neurologiske kontrol af GI-kanalen hos kvæg, således at indigestion opstår, idet der sker stimulation af det sympatiske autonome nervesystem da BoNT fremprovokerer en lokal paralyse af de parasympatiske neuroner, da disses synapser er placeret tættere på slimhindens lumen, hvor BoNT bliver produceret. Den sympatiske effekt fremprovokerer en delvis paralyse af GI-kanalen, hvorved yderligere BoNT bliver produceret og absorberet, hvilket medfører det følgende kliniske billede: reduceret foderindtag, dehydrering, langsom vækst, reduceret mælkeydelse, stiv gangart og opkneben bug (Böhnel *et al.* 2001).

En forudsætning for at denne kolonisering af *C. botulinum* kan forekomme, er at der er opstået en mikrobiologisk ubalance af den normale tarmflora, en såkaldt dysbiose i tarmen (Schwagerick 2000). Denne hypotese påpeges også af Monica Krüger (2010a) idet skader på tarmslimhinden muliggør kolonisering af *C. botulinum*, da translokation af bakterien over tarmvæggen er mulig. Dysbiosen i tarmen kan tænkes at opstå som følge af ufysiologisk fodring, forhøjet mykotoksin – og sporebelastning i foderet og et indskrænket enteralt immunforsvar (Schwagerick 2000).

Schwagerick (2000) spekulerer dog på, om der kan være tale om nogle nye specielt højpatogene toksigene stammer af *C. botulinum* bag sygdomskomplekset, da dysbiose i form af den kvantitative belastning af tarmene med diverse sporer fra bl.a. svampe og *C. botulinum* ikke altid medfører sygdom. Denne teori er også fremført af Böhnel & Gessler (2004), der spekulerer på, om nye og indtil nu ukendte typer af bakterien kan være indført til landet pga. af den verdensomspændende handel med dyr, animalske produkter, fodermidler og turisme.

Hypotesen om kronisk/visceral botulisme hos malkekvæg er ikke videnskabelig bevist (BfR 2012; BMELV 2011; FLI 2001 1a) idet der ikke forefindes systematiske registreringer og data, der bekræfter at *C. botulinum* er årsagen til dette nye sygdomskompleks (BfR 2004; Rodloff & Krüger 2012). Desuden besværliggøres be- eller afklaringen af hypotesen, da diagnose af botulisme vha. laborietests generelt er vanskeligt, og sygdommen generelt bekræftes ved opståen af de meget karakteristiske kliniske manifestationer. Dette er ikke muligt for kronisk botulisme, da de uspecifikke og ukarakteristiske kliniske manifestationer, der er beskrevet for sygdommen gør det umuligt at definere en casedefinition (FLI 2011b; Hoedemaker 2012) og dermed stille en diagnose (Krogh 2012). De uspecifikke kliniske symptomer, der er angivet for sygdommen kan desuden tilskrives mange forskellige differentialdiagnoser, hvilket komplicerer udredelsesprocessen (Hoedemaker 2012).

En påvisning af, at sygdomskomplekset skyldes *C. botulinum* kompliceres yderligere ved, at organismen er meget udbredt i miljøet. Således er fundet af *C. botulinum* i miljøet, organer eller fæces ikke er bevis for sygdommen (FLI 2011b; Hoedemaker 2012; Weissbach u.å.). BoNT kan også findes i fæces hos raske dyr og en sammenhæng er usikker mellem påvisning af BoNT hos det enkelte dyr og sygdommen på besætningsniveau. (Krüger 2010b; Schwagerick 2000; Schwagerick & Rosenmöller 2010). Tilstedeværelsen af antistoffer mod BoNT i serum, kan heller ikke fungere som en diagnose på klinisk sygdom, da både klinisk raske og klinisk syge dyr har vist sig at have antistoffer mod toksinet (Schwagerick & Rosenmöller 2010). På nuværende tidspunkt må den tilgængelige diagnostik for påvisning af BoNT erklæres som værende utilstrækkelig (BfR 2004; FLI 2011b), dette bestyrkes af forskellige laboratoriers botulismediagnostik i Tyskland, hvor resultaterne varierede betydeligt. Det er således nødvendigt med en troværdig diagnostik for påvisning af BoNT og *C. botulinum*- sporer eller levende bakterier for at man kan have en objektiv og reel diskussion om emnet (FLI 2011b).

Alternative hypoteser er opstillet for at forklare de uspecifikke kliniske manifestationer i malkekvægsbesætninger, hvor langt de fleste påpeger, at der kan være tale om en multifaktoriel sygdom (BfR 2004; Boysen 2012; Landbrug og Fødevarer, kvæg 2012; Weissbach u.å.), hvor enkeltfaktorer ikke i sig selv udløser sygdom eller nedsat produktion, men hvor det snarere er summen af faktorer, der påvirker dyrene og giver denne virkning. Især nævnes ukorrekt fodring og uoptimalt management som værende faktorer, der kan forklare sygdomskomplekset, der især er præget af fordøjelsesforstyrrelser (BMELV 2011). Blandt andet nævnes fodring af lavkvalitets græsensilage, der har et reduceret indhold af protein, aminosyrer og Vitamin E (FLI 2011b), samt manglende foderhygiejne og management i forbindelse med produktionen, opbevaringen og udfodringen af især græsensilage (Weissbach u.å.). Dårligt foder kan indeholde et ukendt antal svampe, der eventuelt kan danne mykotoksiner, som kan påvirke hjernen og nervesystemet. Normalt nedbrydes toksinerne især i leveren, men ved overbelastning af denne grundet for store mængder toksiner, kan organet tage skade og der udvikles fedtlever, der kan medføre en række uspecifikke kliniske manifestationer og forgiftningssymptomer (Boysen 2012).

Ukrudtsbekæmpelsesmidlet glyphosat (Round up) menes tillige at kunne spille en rolle i sygdomskomplekset kronisk botulisme, da midlet har en hæmmende effekt på mange godartede bakteriers og svampes vækst i mavetarmkanalen, hvorved der sker en mikrobiologisk ubalance af tarmfloraen, således at potentielt patogene bakterier såsom *C. botulinum* kan opformeres. Derudover kan glyphosat medvirke lever – og nyreskader hos dyrene, samt binde diverse mineraler,

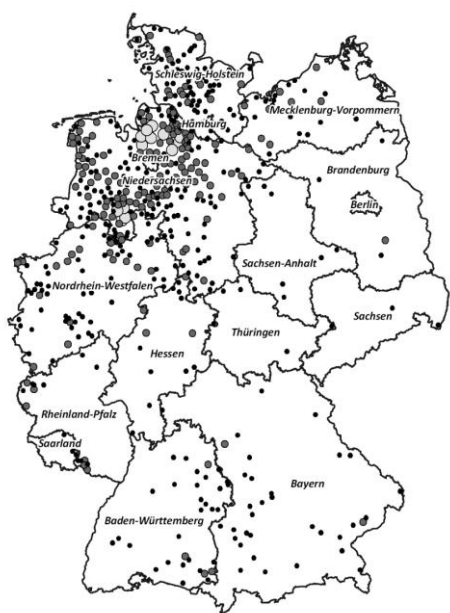
således at disse ikke kan optages af både planter og dyr (Boysen 2012; Krüger 2012). I forsøg udført på 400 køer fra besætninger med kronisk botulisme har man kunnet påvise glyphosat i urinen i næsten alle prøver (Krüger 2012).

Der har været spekulation om, hvorvidt biogasanlæg medvirker til smittespredningen af patogene clostridier, grundet opformering og toksindannelse i gærsubstratet under fermenteringsprocessen, hvorefter det tiloversblevne fra biogasproduktionen spredes ud som gødning på markerne, og kan udgøre en smitterisiko for bl.a. græssende kreaturer. Denne teori kan ikke fuldstændigt udelukkes, men undersøgelser i 15 biogasanlæg i Tyskland påviste ingen patogene clostridier eller BoNT og risikoen vurderes derfor for at være minimal (BMELV 2011; Breves 2012).

Böhnelt *et al.* (2005) fandt *C. botulinum* type B i en kirtel hos en ko med kronisk mastitis, der blev bekræftet som havende visceral botulisme, grundet tilstedeværelsen af BoNT type C/D i tyndtarmen, sammenholdt med de kliniske manifestationer. Man fandt dog ingen anaerobe bakterier i hverken mælkeprøven eller i det beskadigede yvervæv, hvorfor det er uvist, hvordan BoNT er kommet i mælken. Fundet af BoNT i frisk mælk rejser spørgsmålet om kronisk botulisme kan agere som en zoonose, hvor mælk og kød fra dyr, der mistænkes for at lide af kronisk botulisme kan udgøre en risiko for mennesker. Krüger *et al.* (u.å.) understreger ligeledes, at man bør tage forholdsregler under slagtingen af dyr fra besætninger med kronisk botulisme og under alle omstændigheder slagte disse dyr adskilt fra andre (raske dyr), da man vha. immuniperoxidasetest har kunne påvise BoNT type ABE i levervævet hos 5 ud af 15 aflivede dyr, der kom fra besætninger med kronisk botulisme, og BoNT type A og E er almen kendt som værende patogene for mennesker.

Observationen af kliniske symptomer hos en malkekvægsproducent, der bortset fra at være kroniske og uletale af natur, stemmer overens med det humane forløb for klassisk botulisme, har yderligere ført til konklusionen, at kronisk botulisme tillige kan påvirke mennesker (Rodloff & Krüger 2012). Krüger *et al.* (2012) udførte derfor en undersøgelse, hvor der blev analyseret fæcesprøver fra køer i besætninger med diagnosen kronisk botulisme og fra de pågældende malkekvægsproducenter samt analyser af husstøv og foder, for at afklare om der forekommer en mulig transmissionsrute af *C. botulinum* fra kvæg til mennesker. Resultatet af undersøgelsen viste dog ingen sammenhæng mellem serotyperne i køerne og landmændenes fæces, hvilket tyder på at der ikke forekommer en sådan transmission. Forfatteren nævner dog, at forklaringen på de forskellige serotyper hos køerne og de pågældende ansvarlige malkekvægsproducenterne kan skyldes at kvæg kan have flere serotyper i fæces, men at det er nødvendigt at lave flere forsøg for at afklare mulige

transmissionsruter (Rodloff & Krüger 2012). Andre kilder understreger, at det ikke er entydigt videnskabeligt bevist, at sygdomskomplekset, der kaldes kronisk botulisme kan udgøre en zoonose og at der findes såkaldt humant kronisk botulisme (FLI 2011a). Der er ingen beviser for en årsagssammenhæng af den postulerede sygdom og en toksikoinfektion hos voksne (DNG 2012). Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) har foretaget en systematisk vurdering af de tilgængelige videnskabelige data og konkluderer, at fersk kød og ubehandlet mælk fra køer syge af både klassisk og kronisk botulisme ikke udgør en risiko for mennesker, da der ikke er nogen indikationer på, at BoNT udskilles i mælk hos køer med klassisk botulisme, og i tilfælde af kronisk botulisme er der ikke påvist en transmissionsvej (BfR 2012; BMELV 2011). Det understreges, at der ifølge litteraturen ikke forekommer toksikoinfektion hos voksne individer, og at der ikke foreligger sammenlignelige undersøgelser ml. eksponerede og ikke-eksponerede befolkningsgrupper. Der er kun rapporteret om et enkelt tilfælde af BoNT i mælk, så det er nødvendigt med flere data (BfR 2004). Da kronisk botulisme således ikke betragtes som en zoonose, må dyr fra besætninger der



Figur 2. Geografisk fordeling af kronisk botulisme i Tyskland. (Böhnel & Gessler (2012)).

mistænkes for at have kronisk botulisme gerne slagtes og sælges som levnedsmidler, såfremt de ikke udviser klinisk sygdom (BfR 2004; BMELV 2011).

Antallet af tyske besætninger og dyr, der er ramt af sygdommen og dennes regionale udbredelse er ikke kendt, grundet manglende systematiske indberetninger (BfR 2012). Böhnel & Gessler (2012) har dog forsøgt at afbilde den regionale fordeling af botulismetilfælde i Tyskland i årene 1996 til 2010 vha. indberetninger fra praktiserende dyrlæger, der på baggrund af kliniske undersøgelser sammenholdt med laboratoriesvar, har diagnosticeret enten klassisk eller visceral botulisme i besætningerne. Indberetningerne viser, at der i den nævnte periode var 1108 besætninger med

botulisme-relaterede problemer, og at der tilsyneladende er en forskellig fordeling af sygdomstilfælde i landet. Især

forekommer der et højere antal botulismetilfælde i Nordtyskland end i andre regioner af landet (figur 2). Årsagen til denne fordeling er dog uklar, og der er ingen korrelation mellem kvægkoncentrationen og sygdomsforekomsten. I samme artikel konkluderer forfatterne, at BoNT

type C/D er den hyppigst forekomne toksintype blandt de indberettede besætninger, da 47,4 % af besætningerne reagerede positivt på toksinneutralisationen mod type C/D i Mouse-bioassay-testen og yderligere 35,9 % reagerede positivt på både type ABE og C/D.

Vaccination mod botulisme er ikke tilladt i Tyskland, dog er der undtagelsesvist givet tilladelse til vaccination i nogle delstater. Effekten af vaccinationen er uklar, da der samtidigt blev ændret på andre faktorer i de ramte besætninger, herunder forbedret foderhygiejne (BMELV 2011) og optimal fodersammensætning (Schwagerick 2000).

Begrebet kronisk botulisme stammer fra Tyskland, men har i de seneste år også været et meget omdiskuteret emne blandt dyrlæger og malkekvægsproducenter i Danmark. Den skærpede opmærksomhed omkring emnet opstod i forbindelse med et besætningsbesøg hos en sønderjysk malkekvægsproducent, hvor en tysk rådgiver gjorde opmærksom på, at de sundheds- og ydelsesmæssige problemer der fandtes i besætningen meget vel kunne skyldes kronisk botulisme (Erri *et al.* 2012). Herefter har enkelte praktiserende dyrlæger hævdet, at kronisk botulisme også forekommer hos kvæg i Danmark, og at de har stillet diagnosen i flere danske besætninger (Skau 2012). Marie Skau fra LVK-dyrlægerne beretter, at lidelsen altid opstår samtidigt med gasgangræn, og at vaccination mod *C. perfringens* og *C. botulinum* har en positiv effekt i form af markant ydelsesfremgang og færre lemmelidelser (Erri *et al.* 2012; Skau 2012). Forfatterne understreger dog at det vigtigste tiltag i forebyggelse og behandling af lidelsen er at tilføre mælkesyrebakterier, såkaldte probiotika til foderet, således at dyrenes modstandsdygtig øges. Probiotika virker som toksinbindere, der selv i lave koncentrationer kan udkonkurrere *C. botulinum* og derudover danne acetylcholin, der kan kompensere for BoNT's hæmmende effekt på de neuromuskulære synapser (Erri *et al.* 2012). Foruden den forstærkede negative effekt, der opstår ved tilstedeværelsen af *C. perfringens* hos køer der lider af kronisk botulisme, spekulerer forfatterne også på, om infektioner med *Mycoplasma bovis* kan medvirke til sygdomsbilledet. Tanken bag dette er, at der i den seneste tid er observeret en forøget forekomst af mykoplasmainfektioner hos malkekøer i Danmark, og at forfatterne har fundet antistoffer mod *C. botulinum* samt BoNT i fæces i besætninger med diagnosticeret mykoplasmosse (Erri *et al.* 2012). En undersøgelse af forekomsten af *Mycoplasma bovis* i danske kvægbesætninger udført af Landbrug og Fødevarer, Kvæg i 2011 konkluderede dog, at det ikke er sandsynligt, at *C. botulinum* eller BoNT har betydning for udvikling af sygdom forårsaget af *Mycoplasma bovis* (Landbrug og Fødevarer, Kvæg 2011). Specialkonsulent og dyrlæge Kaspar Krogh forholder sig generelt skeptisk overfor begrebet kronisk botulisme, idet sygdommen ikke optræder andre steder i verden og at de uspecifikke kliniske manifestationer for

sygdommen, og den nuværende laboratoriediagnostik for botulisme, ikke med sikkerhed kan anvendes til at stille en diagnose. Han påpeger yderligere, at man ikke bør fokusere blindt på, at kronisk botulisme er årsagen til sygdom og ydelsesnedgang i besætningerne, da andre og mere almentkendte faktorer kan have betydning (Krogh 2012).

Grundet pres fra frustrerede malkekvægsproducenter med økonomiske vanskeligheder pga. uforklarlige dødsfald, forøget sygdomsforekomst og markant ydelsesnedgang, har man både i Tyskland og i Danmark været nødsaget til at i gang sætte omfattende videnskabelige undersøgelser for at forsøge at be- eller afkræfte hypotesen om kronisk botulisme. Universitetet for veterinærmedicin i Hannover (TiHo) har på foranledning af det tyske Landbrugs- og Fødevareministerium (BMELV) påbegyndt et længerevarende forskningsprojekt, der har til formål at afklare om der er en mulig sammenhæng mellem *C. botulinum* og kroniske sygdomsproblemer i malkekvægsbesætninger. Forsøget er opbygget som et case-control-studie, hvor i alt 150 udvalgte malkekvægsbesætninger skal agere som casebesætninger (100 stk.) og kontrolbesætninger (50 stk.). I hver af de 150 besætninger udvælges der på besøgsdagen yderligere 2 x 5 køer, der skal agere som henholdsvis case-køer og kontrol-køer. En besætning skal opfylde tre ud af fem udvalgte kriterier for at kunne blive betragtet som en case-besætning, herunder fx fald i mælkeydelse på over 15 % over en periode på mindst tre måneder, forøget antal døde/aflivede køer (over 5 %) og forøget forekomst af sygdom blandt køerne. En besætning kan klassificeres som kontrol, i så fald de 5 kriterier ikke forekommer i besætningen. Udvælgelsen af enkeltdyrene som enten cases eller kontroller, foregår ved scoring af huld, bevægelse, renlighed, afskrabninger (især over led), samt hårlag og almentilstand, af samtlige malkekøer i besætningen. Opdelingen af køerne i mulige cases og kontroller foregår ved markering af hhv. rød og grøn farvespray. En ko betegnes som en mulig case, når de to hovedkriterier samt mindst 1 underkriterier er opfyldt. Hovedkriterierne er 1) Afmagring og 2) ligne et dyr med kronisk sygdom. Underkriterierne kan bl.a. bestå af reduceret mælkeydelse, der er 20 % mindre end andre køer i besætningen der er på samme laktationsstadium og dage i mælk, en halthedsscore på ≥ 3 , diarre, dyspnø, ataksi og parese/paralyse, positiv venepuls eller opkneben bug. En ko kan blive en mulig kontrol, hvis ingen af disse kriterier er til stede. Herefter udvælges der tilfældigt fem køer med påmalet rød farve, der skal fungere som cases, og tilsvarende 5 kontrolkøer (køer med grøn farve). Disse ti køer undergår en meget grundig og systematisk klinisk undersøgelse, og der foretages adskillige parakliniske prøver hos hvert dyr, herunder blodprøve, vomsaftprøve, hårprøve (test for tungmetaller), fæcesprøve, urinanalyse mm. Herefter foretages der klovsbeskæring og undersøgelse af klovene i en klovboks, for at udelukke

eller bekræfte om haltheden skyldes neurologisk dysfunktion eller blot almindeligt forekomne klovlidelser. Derudover udtages der tankmælkeprøver som testes for Paratuberkulose, vandprøver til mikrobiologisk undersøgelse, samt foderprøver. En agronom analyserer foderrationen og der stilles opklarende spørgsmål til mælkeproducenten. Alle data vil blive indtastet i en SQL-database og undergå statistiske og epidemiologiske analyser (Hoedemaker 2012). Udover Universitetet for veterinærmedicin i Hannover (TiHo) er Friedrich-Loeffler-Institutet (FLI) inddraget som co-partner i projektet, og har til opgave bl.a. at udføre MouseBioassay-testen på de udtagne fæcesprøver. TiHo og FLI har modtaget hhv. 1.540.000 og 680.000 Euro til projektet (BMELV 2012).

I Danmark har Landbrug og Fødevarer, Kvæg afsat 500.000 kroner til en undersøgelse, der skal forsøge at afklare årsagen til de uforklarlige sundhedsproblemer og ydelsesnedgang i en række malkekvægsbesætninger i DK. Videncentret for Landbrug skal stå for undersøgelsen og følge og beskrive et mindre antal besætninger med henblik på drift og management igennem en periode på op til fire uger. I de udvalgte besætninger vil der blive foretaget meget detaljerede analyser af fodring, drift, indretning og sundhedstilstand. Blandt andet vil foderets indhold og sammensætning blive screenet ved alle udfodringer, og sundhedstilstanden vil blive beskrevet ud fra kliniske undersøgelser af syge dyr og dyr i risikogrupper, ud fra klovregistreringer samt ved laboratorie-diagnostik og obduktion af døde dyr (Landbrug og Fødevarer, Kvæg 2012).

6. Analyse

Til trods for, at kronisk botulisme ikke er videnskabeligt anerkendt som en lidelse der forekommer hos malkekvæg, igangsætter nogle dyrlæger vaccination mod kronisk botulisme (og clostridiose generelt) i danske besætninger. Der findes dog ikke nogen registreret vaccine der er godkendt til brug mod botulisme hos kvæg i hverken Danmark eller Tyskland, hvorfor der skal ansøges om specialtilladelse for hver besætning, der ønsker at vaccinere med udenlandske vacciner mod BoNT type C og D fra Sydafrika og Australien. I Danmark skal besætningsdyrlægen til den pågældende besætning ansøge DTU-Veterinærinstitutet om tilladelse til at anvende vaccinen, og der stilles ikke krav om bestemte kliniske manifestationer eller påvisning af toksiner mv. fra prøver udtaget i besætningerne (Krogh 2012, personlig kommunikation). I Tyskland gives tilladelsen af den kompetente veterinærmyndighed i tilfælde af, at sygdommen er diagnosticeret på baggrund af kliniske manifestationer samt relevante laboratorieundersøgelser i henhold til § 17c af *"Loven om*

Dyresygdomme” (Tiersuchengesetzes). Dokumentationen til denne tilladelse tilbydes af laboratoriet Miprolab GmbH i Göttingen, Tyskland og den sydafrikanske vaccine kan købes gennem firmaet (Miprolab GmbH 2012).

Da det generelt er meget svært at stille en diagnose for botulisme, vil der i det efterfølgende afsnit blive foretaget en beskrivelse og vurdering af Miprolab GmbH’s diagnostiske testmetoder, herunder deres belæg for at kunne retfærdiggøre vaccination af en besætning mod kronisk botulisme og/eller clostridiose. Udgangspunkt for vurderingen er testmetoder og laboratorieresultater fra to danske malkekvægsbesætninger, henholdsvis X og Y, der har indsendt prøver til Miprolab GmbH i Göttingen.

Da kronisk botulisme observeres som meget uspecifikke kliniske manifestationer både på besætningsniveau og hos enkeltdyr, herunder fald i mælkeydelse, forøget kodødelighed og sygdomsfrekvens, kan udvælgelsen af besætninger, hvor der skal udtages prøver til diagnostisk udredning, være vanskelig. Som følge heraf foretages der en analyse af mælkeydelse og kodødelighed i de to førnævnte danske besætninger X og Y, der har fået udtaget prøver for kronisk botulisme og som er blevet analyseret af Miprolab GmbH i Göttingen, for at vurdere om der reelt har været en grund til mistanke om sygdommen i de pågældende besætninger.

6.1 Vurdering af testmetoder anvendt af Miprolab GmbH i Göttingen

Laboratoriet Miprolab GmbH i Göttingen udbyder flere forskellige undersøgelses-profiler med henblik på at diagnosticere kronisk botulisme og/eller clostridiose hos kvæg (bilag A).

Testmetoderne anvendt i de forskellige profiler varierer fra bl.a. PCR, ELISA, dyrkning og Bioassay. Både besætning X og Y har udtaget blodprøver fra fem køer, som efterfølgende er blevet sendt til laboratoriet, hvor der er foretaget en ELISA-analyse med henblik på at finde antistoffer mod *C. botulinum* type A-D samt *C. perfringens* alfa-toksin i serum. Derudover har begge besætninger udtaget fæcesprøver fra de selvsamme fem køer, der i laboratoriet er blevet samlet i 2 pools, med henholdsvis tre og to fæcesprøver i hver pool. Besætning X har fået analyseret fæcesprøverne for *C. perfringens* vha. PCR og ELISA (bilag B), mens besætning Y tillige har fået analyseret fæcesprøverne for det kvantitative indhold af clostridie-arter, som efterfølgende er blevet indentificeret vha. selektiv dyrkning. Derudover er der foretaget bioassay for *C. botulinum* både uden og med foregående dyrkning, samt ELISA med og uden foregående dyrkning for *C. perfringens* (bilag C).

Direkte/Sandwich- ELISA er den mest almindelige immunologiske testmetode anvendt til at identificere BoNT, dog er det uklart om der overhovedet er nogen korrelation mellem forekomst af kronisk botulisme og et serologisk respons. Serologiske studier udført i forbindelse med botulismeudbrud i malkekvægsbesætninger viser ikke noget entydigt billede på, hvornår og i hvilken mængde køer danner antistoffer mod BoNT. Således kan antistoffer mod BoNT både findes i serum hos syge og raske dyr (Jubb *et al.* 1993; Thomas 1991) og mere specifikt, hos dyr i vaccinerede besætninger og hos uvaccinerede dyr fra besætninger, hvor der ikke har forekommet udbrud af botulisme, men hvor området blev betragtet som endemisk, samt fra både helbredte og klinisk raske køer fra uvaccinerede besætninger, der var placeret i ikke-endemiske områder (Gregory *et al.* 1996). Kvæg, der eksponeres naturligt for subkliniske såvel som sublethale doser af BoNT, danner altså sandsynligvist specifikke antistoffer overfor toksinet, hvorfor fundet af antistoffer mod BoNT i serum ikke kan bekræfte en klinisk diagnose for botulisme.

Mængden af dannet antistof mod BoNT synes heller ikke at korrelere med graden af de kliniske manifestationer. Mawhinney *et al.* (2012) fandt kun en lille forskel i antistofniveauerne hos køer med kliniske manifestationer og kontrolkøer, og Main & Gregory (1996) fandt højere antistoftitre i de køer, der var subkliniske udsatte for BoNT end, de der var klinisk påvirkede under et botulismeudbrud i Australien. Forfatterne spekulerer på, om forklaringen kan være, at køer der dør af botulisme, dør for hurtigt til at der kan nå at dannes antistoffer. Steinman *et al.* (2006) fandt under et vaccinationsstudie i Israel højere antistofniveauer i raske køer end i syge køer i et ud af tre store udbrud, og fandt ligeledes lavere antistofniveauer i yngre dyr, hvilket kan skyldes gentagen naturlig eksponering for subkliniske toksin-doser hos ældre dyr. I samme studie blev det konkluderet, at den på daværende tidspunkt anvendelige vaccinationsprotokol i Israel var utilstrækkelig, grundet manglende immunisering som følge af vaccinationen, der siden 1977 har foregået rutinemæssigt i landets malkekvægsbesætninger. Forfatterne fremhæver det vanskelige i, at tilrettelægge en vaccinationsprotokol mod forebyggelse af botulisme, da der ikke er identificeret en antistof-cutoff-værdi, der med sikkerhed vides at være beskyttende mod sygdommen.

At der muligvis kun opstår et svagt og kortvarigt immunrespons hos kvæg efter eksponering af BoNT, både under naturlige og eksperimentelle forhold, observerede Theiler under sine forsøg på Armoedsvlakte-farmen: *"The behaviour of cattle under natural conditions demonstrates that the order of immunity is at best small. A beast which recovers from a mild attack of lamsiekte may contract the disease a second, third or fourth time within relative short periods, although it is rare for it to survive a third and fourth attack."* (Theiler 1927).

Da MiproLab udsætter fæcesprøverne fra de fem køer for Mouse Bioassay-testen, både uden og med forudgående dyrkning, må man forvente, at firmaet vurderer, at fundet af enten *C. botulinum*-sporer, selve bakterien eller BoNT tæller som en positiv diagnose på kronisk botulisme.

Når man foretager en anaerob dyrkning af prøvematerialet inden dette udsættes for Bioassay-testen, kan man i nogle tilfælde opnå en højere sensitivitet af testen. Ved en dyrkning opnås en aktivering af sporerne i prøvematerialet samt en opformering af de vegetative celler, hvorved toksinindholdet i prøven også forøges. Mængden af toksin kan således blive stor nok til, at den kan detekteres af Bioassay-testen (Øystein 2012, personlig kommunikation). Det vil sige, at man ved dyrkning af prøvemateriale, som indeholder *C. botulinum*-sporer, kan fremkalde en toksindannelse, som ikke nødvendigvis er til stede i prøvematerialet. Således kan man ved en positiv Bioassay-test efter dyrkning konkludere, at der enten har været sporer eller *C. botulinum* i prøvematerialet, men det er ikke fuldstændigt sikkert, at der har været BoNT i prøvematerialet. Omvendt må et negativt testresultat af Bioassay efter dyrkning indikere, at der ikke har været sporer og/eller *C. botulinum* i prøvematerialet.

Uanset om der kan identificeres sporer, *C. botulinum* eller BoNT i prøvematerialet, kan man undre sig over at disse vurderes som værende en bekræftelse af en positiv diagnose for kronisk botulisme, da tilstedeværelsen af sporer og *C. botulinum* i fæces hos køer ifølge litteraturen er et normalfund, og at man endnu er usikker på, om tilstedeværelsen af BoNT i fæces er ensbetydende med kliniske sygdom hos dyret.

MiproLab GmbH udtager kun en enkelt blodprøve fra hver af de fem køer i besætningerne, hvorefter prøven analyseres for tilstedeværelsen og mængden af antistof mod de forskellige typer BoNT.

Ifølge Quinn *et al.* (2002) er det dog nødvendigt at udtage parrede blodprøver for at påvise forhøjede antistoftitre, når man anvender serologi som diagnose af sygdom i en besætning. Den første prøve bør udtages ved opståen af de kliniske manifestationer og den anden prøve under rekonvalescensperioden. Tilstedeværelsen af antistoffer i serum kan generelt ikke betragtes som et mål på om et dyr har haft klinisk sygdom, men er kun en indikation på at dyrets immunsystem har reageret på det pågældende agens (Quinn *et al.* 2002), eller et andet agens der giver serologisk krydsreaktion i den serologiske test (Angen 2012, personlig kommunikation).

Det er dog mest sandsynligt at en sådan ”før”-prøve i de fleste tilfælde ikke vil være tilgængelig og det vil tillige være vanskeligt at sige, hvornår en sådan prøve skulle udtages, da de kliniske manifestationer på kronisk botulisme jo er så uspecifikke.

Man kan endvidere stille spørgsmål ved, hvordan laboratoriet er kommet frem til en stikprøvestørrelse på fem køer fra hver besætning. Størrelsen på en stikprøve beregnes generelt med henblik på populationsstørrelse og den forventede prævalens af sygdom i populationen, men da prævalensen af dyr med kronisk botulisme i de pågældende besætninger ikke er kendt, er det ikke muligt at foretage sådanne beregninger. Et grundigt kendskab til sygdommens biologi, og forekomst i den pågældende population m.m. er således nødvendigt ved fastlæggelse af stikprøvens størrelse (DTU Veterinærinstituttet 2009).

Miprolab angiver ingen reference-værdier til metoderne, hvorfor det er umuligt for en udenforstående at give en vurdering af laboratoriesvaret. Således er det kun laboranterne i firmaet, der er i stand til at bedømme hvorvidt den pågældende besætning har et problem med kronisk botulisme og om vaccination kan anbefales. Dette mindsker troværdigheden af laboratoriets resultater, især med tanke på, at partnerne i Miprolab er de selvsamme, der har postuleret, at kronisk botulisme er en reel sygdom, nemlig Helge Böhnelt og Frank Gessler. At firmaet derudover selv sælger vacciner mod botulisme kan påvirke deres objektivitet yderligere, således at man er tilbøjelig til at anbefale vaccination, selvom der ikke er forekommet overbevisende laboratorieresultater. På firmaets hjemmeside står der nævnt, at det udelukkende er den enkelte besætningsdyrlæge, der på baggrund af laboratoriesvarene og grundig kendskab til besætningen, kan stille diagnosen ”*Clostridienerkrankung*” (Miprolab GmbH 2012), men en sådan vurdering af dyrlægen umuliggøres grundet de manglende referenceværdier.

Udover at teste for botulisme, udbyder Miprolab diverse undersøgelser for clostridiose, især med henblik på påvisning af *C. perfringens*. I den forbindelse opstår der nogle af de samme fortolkningsmæssige misforståelser som for kronisk botulisme, herunder tolkning af tilstedeværelsen af antistoffer, fundet af bakterien i prøvemateriale samt manglende referenceværdier. Som en del af standard-profilen (begge besætninger fik lavet denne) testes der for antistoffer mod *C. perfringens* alfa-toksin, men som det er tilfældet for botulisme, er man endnu ikke klar over betydningen af dette fund, da antistoffer mod alfa-toksin kan findes i serum hos raske køer, hvilket tyder på, at en del af det producerede toksin muligvis absorberes til blodet og behandles af immunsystemet, og at infektion med type A kan forløbe subklinisk.

Manglende referenceværdier udgør især en stor fejlkilde ved vurderingen af, om et dyr lider af en enteropati forårsaget af *C. perfringens*, da laboratoriediagnosen vha. dyrkning stilles på baggrund af en kvantitativ bakteriologisk undersøgelse. Det er jo netop antallet af *C. perfringens* der når dette

opretholdes mod en referenceværdi, afgør om der er tale om en overvækst af bakterien, eller om denne er til stede i tarmlumen i det antal der også findes hos klinisk raske dyr.

Firmaet tilbyder bl.a. en undersøgelsespakke, der hedder *Hemorrhagic Bowel Syndrome*, hvor der undersøges for *C. botulinum* og BoNT samt *C. perfringens* og dens toksiner. Dette må siges at være meget vildledende, idet *C. perfringens* type A kun er mistænkt for at spille en rolle i patogenesen af HBS, men ætiologien bag lidelsen er endnu ikke videnskabeligt bevist. Derudover kan man undre sig over, at der tillige undersøges for *C. botulinum* og BoNT i samme pakke, da denne bakterie og dette toksin ikke tidligere er sat i forbindelse med HBS.

6.2 Analyse af ydelse og kodødelighed i henholdsvis besætning X og Y.

Da besætning X og Y har fået udtaget prøver til analyse af Miprolab GmbH, er det meget interessant at se, om denne beslutning beror på en formodet eller faktisk produktions- og sundhedsnedgang i besætningerne, som har vækket mistanke om kronisk botulisme.

For at vurdere, om dette er tilfældet, er der foretaget statistiske analyser af mælkeydelse og kodødelighed i de to besætninger, hvor der undersøges om der er sket en ændring i de to faktorer fra tidspunktet hvor prøverne er bestilt fra Miprolab GmbH (og man må formode, at mælkeproducenten og besætningsdyrlægen har vurderet at produktionen er blevet forværret), og et år tidligere, der således fungerer som en referencegruppe, da man her ikke har valgt at udtage prøver. Besætning X og Y og fået udtaget prøver til Miprolab GmbH henholdsvis d. 8/5/2012 og 4/4/ 2012, og der er derfor anvendt data, der ligger tættest muligt på disse datoer og et år tilbage i tiden.

6.2.1 Mælkeydelse

For at vurdere, om der er sket en forskel i mælkeydelse fra april 2011 til april 2012 opstilles følgende nul-hypotese for henholdsvis besætning X og Y:

H₀: ”Den gennemsnitlige mælkeydelse ved dag 60 efter kælvning i 2011 er ikke forskellig fra den gennemsnitlige mælkeydelse ved dag 60 efter kælvning i 2010”

Hypotesen testes ved at foretage en variansanalyse, da denne test er velegnet til at sammenligne en kontinuer variabel, såsom gennemsnitlig mælkeydelse, med mere end en forklarende variabel, der har to eller flere niveauer, fx paritet, der er ofte opdeles i 1.paritet, 2.paritet og 3+-køer (Houe *et al.* 2004). Således er variansanalysen i stand til ikke blot at vurdere, om der er sammenhæng mellem

ydelsen og paritet, og ydelsen og laktationsstadiet, men også i stand til at vurdere en eventuel relation mellem de to forklarende variabler. Da en ko's ydelse stiger i takt med pariteten, er det ikke korrekt at sammenligne ydelsen det ene år med ydelsen et andet, uden at tage hensyn til om fordelingen er pariteter i de to år er ens. Normen for topydelse for 1. kalvs køer (gennemsnitlig dagsydelse i perioden 9-92 dage efter kælvning) er således angivet til at være 75 % af ældre køer (defineret som køer ved 3. laktation eller højere), og normen for topydelse for 2. kalvs. køerne er tilsvarende 93 % af de ældre køer (Enevoldsen 2012).

Udover fordelingen af pariteter, er det af stor vigtighed at vurdere om fordelingen af køernes laktationsstadier er nogenlunde ens de to år, man ønsker at sammenligne, da ydelsen ikke ligger fast gennem hele laktationen. En typisk laktationskurve starter med en stigning i mælkeydelse indtil et par uger efter kælvning, hvorefter kurven flader ud indtil dag ca. 305. Der er i beregningerne valgt at sammenligne den gennemsnitlige ydelse ved dag 60 efter kælvning, da der i litteraturen om kronisk botulisme er beskrevet, at køer i perioden lige efter kælvning er mest negativt påvirkede af lidelsen.

SAS-udskriften for besætning X kan ses nedenfor:

Parameter	Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	40.68 B	0.74	55.33	<.0001
knr 1	-10.045 B	0.68	-14.86	<.0001
knr 2	-4.23 B	0.74	-5.71	<.0001
knr 3	0.00 B	.	.	.
aar 10	1.58 B	0.74	2.15	0.0326
aar 11	1.32 B	0.75	1.77	0.0781
aar 12	0.00 B	.	.	.

Et 95 % - konfidensinterval (KI) for forskellen af gennemsnittet af mælkeydelse ved dag 60 kan således beregnes ud fra følgende formel, under forudsætning af, at data er normalfordelte:

$$KI = (\text{forskellen ml. gns. ydelse i år 2010 og 2011}) \pm 1,96 \cdot \sqrt{(SEM_{\text{gns.ydelse, år 2011}})^2 + (SEM_{\text{gns.ydelse, år 2010}})^2}$$

$$KI = (1,58 - 1,32) \pm 1,96 \cdot \sqrt{(0,74)^2 + (0,75)^2} = \underline{\underline{[-1,8 ; 2,3]}}$$

Da konfidensintervallet indeholder 0, kan nulhypotesen ikke afvises, og vi kan med 95 % sikkerhed konkludere, at der ikke var nogen statistisk signifikant forskel i den gennemsnitlige mælkeydelse ved dag 60 efter kælvning fra året 2010 til 2011.

Den samme beregning foretages nu for besætning Y ud fra SAS-udskriften:

Parameter	Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	35.8 B	0.51	70.11	<.0001
knr 1	-7.7 B	0.55	-14.18	<.0001
knr 2	-1.98 B	0.54	-3.64	0.0003
knr 3	0.0 B	.	.	.
aar 10	-1.92 B	0.56	-3.43	0.0007
aar 11	0.3 B	0.57	0.52	0.6007
aar 12	0.0 B	.	.	.

$$KI = (\text{forskellen ml. gns. ydelse i år 2010 og 2011}) \pm 1,96 \cdot \sqrt{(SEM_{\text{gns.ydelse, år 2011}})^2 + (SEM_{\text{gns.ydelse, år 2010}})^2}$$

$$KI = (-1,92 - 0,3) \pm 1,96 \cdot \sqrt{(0,56)^2 + (0,57)^2} = \underline{\underline{[-3,3; -0,21]}}$$

Da konfidensintervallet ikke indeholder 0, kan nulhypotesen afvises, og vi kan med 95 % sikkerhed konkludere, at der er en statistisk signifikant forskel i den gennemsnitlige mælkeydelse ved dag 60 efter kælvning fra året 2010 til 2011. Ved at kigge på SAS-udskriften ses det dog, at der er tale om en forskel i form af en stigning i ydelse, idet køerne i besætningen giver (0,3kg-(-1,92kg) 2,22 kg EKM mere i gennemsnit ved dag 60 efter kælvning i år 2011 end i 2010.

6.2.2 Kodødelighed

Der foretages nu en analyse, med henblik på at identificere en eventuel ændring i besætningernes kodødelighed fra tidspunktet hvor der tilsendes prøvemateriale til Miprolab GmbH i Göttingen, i forhold til året før. Da det ikke har været muligt at udtrække data fra DLBR Dyreregistreringen om dødelighed fra den nøjagtige dato for prøveindsendelse og et år forinden, (henholdsvis april 2011 og april 2012), foretages analysen på baggrund af data fra (helåret) 2010 og 2011. Der opstilles følgende nul-hypotese:

$$H_0: \text{''kodødeligheden i 2011 er ikke forskellig fra kodødeligheden i 2010''}$$

6.2.2.1 Besætning X:

Ifølge udskriftet *Dødelighed-Køer-Besætningsdynamik* pr. 30/4/11 (bilag D) er der i alt 5 køer, der er afgåede ufrivilligt fra besætningen grundet aflivning eller selvdød i både 2010 og 2011. Da det gennemsnitlige antal køer i besætningen de to år er næsten ens, (henholdsvis 97 og 94), kan man alene ved at se på tallene, konkludere, at en eventuel forskel i kodødeligheden fra år 2010 til 2011, vil være helt ubetydelig. En mulig sammenhæng kan dog beregnes ved hjælp af følgende Poisson-metode, i så fald vi forudsætter, at der er det samme antal køer hvert år, og at køerne var forskellige de to år og alle observeret ensartet i ens tidsrum:

$$Z = \frac{(5-5)}{\sqrt{(5+5)}} = 0$$

Da $Z = 0$ kan man konkludere, at der er 100 % sandsynlighed for, at forskellen i kodødelighed fra år 2010 til 2011 er 0 køer, såfremt den ukendte sandhed er, at der ikke er nogen forskel. Altså kan nulhypotesen ikke forkastes, og der er således ikke en forskel i kodødelighed for de to år.

6.2.2.2 Besætning Y:

Ifølge udskriftet *Dødelighed-Køer-Besætningsdynamik* pr. 28/2/11 (bilag E) er der i alt 10 og 9 køer, der er afgået fra besætningen grundet aflivning eller selvdød i hhv. 2010 og 2011. En poisson-test anvendes, idet det forudsættes, at der er det samme antal køer hvert år, og at køerne var forskellige de to år og alle observeret ensartet i ens tidsrum:

$$Z = \frac{(9-10)}{\sqrt{(9+10)}} = 0,2$$

En Z-værdi på 0,2 svarer til en p-værdi (2-sidet test) på over 0,62 (Enevoldsen 2011), hvorfor nulhypotesen ikke kan forkastes, og det er således statistisk signifikant, at der ikke er nogen forskel i kodødeligheden fra år 2010 til 2011.

7. Diskussion/konklusion

Dette speciale er udført med henblik på at vurdere, om der er videnskabelig evidens for hypotesen om kronisk botulisme hos malkekvæg, der er opstillet i hovedsageligt tyske publikationer.

Derudover er der foretaget en vurdering af validiteten for laboratorieundersøgelserne, der anvendes af Miprolab GmbH i Göttingen, Tyskland, til at bekræfte diagnosen kronisk botulisme. Slutteligt er der foretaget statistiske analyser af ydelsesdata og kodødelighed i to besætninger, der har indsendt prøvemateriale til Miprolab GmbH, for at vurdere om en forværring af disse produktionsparametre mon har været grunden til, at man besluttede sig for at teste for sygdommen.

En publikations evidens vurderes på baggrund af flere faktorer, såsom valg af forsøgsdesign, beregning af stikprøvestørrelse, og brugen af statistiske analyser (Habicht 2001). Tilfælles for de (tyske) publikationer om kronisk botulisme er, at de har lav evidens: Mest graverende er den komplette mangel på statistiske beregninger, der medfører at publikationernes resultater ikke kan generaliseres ud over de beskrevne forsøg, da beregning af statistisk signifikans, hjælper med at afgøre, om resultaterne er fremkommet ved en tilfældighed eller om der er en kausal sammenhæng mellem sygdommen og risikofaktoren. For at opnå nok sikkerhed omkring resultaterne, for at det er statistisk signifikant, er det nødvendigt at beregne en stikprøvestørrelse inden undersøgelsen igangsættes. Men dette mangler også i samtlige publikationer.

For at konkludere kausalitet er det ligeledes nødvendigt, at have tilstrækkelige beviser for, at eksponering for risikofaktoren går forud for sygdommens opståen. Et sådant bevis vanskeliggøres, da samtlige af studierne om kronisk botulisme, hører ind under kategorien observationsundersøgelser, hvor langt størstedelen af dem er af designtypen tværsnitsstudier. Tværsnitsstudier er baseret på et øjebliksbillede, hvorfor vi ikke kender rækkefølgen af de hændelser vi er interesseret, og der er således vanskeligt at sige, hvad der kom først: sygdommen eller risikofaktoren, kronisk botulisme eller dysbiose i tarmen.

Studierne for kronisk botulisme er retrospektive, idet de anvender historiske data, såsom dødelighed, forøget sygdomsforekomst m.m. over en tilbageskuende periode/fra forrige år, hvilket gør det svært at identificere og eliminere de såkaldte *confounders*, bagvedliggende faktorer, som kan forstyrre den sammenhæng, man ønsker at undersøge. Eksempler på sådanne faktorer er ændring i management, ledelse, fodring, dyrlæge m.m.

Risikoen for konfounding reduceres i så fald, der inkluderes en kontrolgruppe i undersøgelsen, et såkaldt case-control-studie. Dette studie anvendes i nogle af publikationerne, men må sige at være ufuldstændige, idet der ikke er defineret klare inklusions – og eksklusionskriterier på hvilke dyr der udgør henholdsvis cases og kontroller. Eksempelvis kan nævnes artiklen ”*Visceral Botulism - A New Form of Bovine Clostridium botulinum Toxication*” (Böhnel *et al.* 2001).

Ved at læse artiklerne om kronisk botulisme, fremgår det klart og tydeligt, at forfatterne bag hypotesen, ikke forholder sig objektivt og nøgternt, til fortolkning af de fremkommende data. Der forekommer ikke nogen form for selvkritik med hensyn til fejl og mangler i studiet, hvilket mindsker troværdigheden af publikationerne. Konklusioner og diskussionsafsnit fremført af forfatterne er ikke uvildige, idet disse konsekvent drejes i en bestemt retning, nemlig at kronisk botulisme utvivlsomt, må være årsagen til de diverse besætningsproblemer. Eksempeltvist kan artiklerne ”*Chronischer viszeraler Botulismus in einem Kuhbestand im Allgäu*” og ”*Klinische Fälle von Viszeralem Botulismus bei Milchrindern in Mecklenburg-Vorpommern*“ fremhæves, idet åbenlyse differentialdiagnoser til kronisk botulisme i de to besætninger, synes at blive bevidst ”glemte” og/eller hurtigt afvist; Førstnævnte artikel beretter om de uforklarlige dødsfald, massive lunge- og klovlidelser samt fordøjelsesproblemer, der opstod i en malkekvægsbesætning bestående af ca. 65 dyr i Allgäu, Sydtykland. De kliniske manifestationer opstod især hos køer lige efter kælvning og efter indkøb af dyr til besætningen, og blev tilskrevet som kronisk botulisme forårsaget af BoNT type B, som den sandsynlige årsag, da man identificerede mange *C. botulinum* type ABE i organerne, BoNT type B i mælken hos en enkelt ko, samt en stigning i antistoftitre for type B hos indkøbte dyr. Derfor påbegyndte man vaccination mod botulisme type C/D, da en type B-vaccine ikke er tilgængelig. Ved laboratorieundersøgelser målte man antistoffer mod BVDV hos i alt 11 ud af 15 dyr, hvorfor man efterfølgende påbegyndte vaccination mod BVD i besætningen. Udover vaccinationen mod botulisme og BVD blev foretaget diverse ”saneringsforanstaltninger”, i form af bedre generel hygiejne, samt administration af tilskudsstoffer, såsom vitamin E og selen, vitamin B1, og ensilagehjælpstoffer. Efter disse tiltag erkendtes en forbedring af sundhedstilstanden i besætningen. Forfatterne bag artiklen afviser, at der var nogen effekt af BVD-vaccinen, da sygdommen ikke kan forklare de kliniske manifestationer der opstod i besætningen, og tilskriver derfor den forbedrede sundhed til vaccinationen mod botulisme type C/D. Dette kan man dog undre sig over, da der jo netop konkluderes at type B er den sandsynlige årsag til sundhedsnedgangen i besætningen. Desuden kan det ikke afvises, at de kliniske manifestationer kunne opstå som følge af infektion med BVD, da sygdommen kan antage mange former, og vise sig både som akut sygdom og mors, og som uspecifik sygelighed, hvor immunosuppression medfører øget risiko fra infektion med andre agens (Divers & Peek 2008). Forfatterne understreger, at dødsfaldene og lungelidelser opstod i forbindelse med introduktionen af nye dyr til besætningen, hvilket også kan tilskrives en opblussen af BVD i besætningen, i så fald de nye dyr var bærere af BVDV (PI-dyr). Obduktionsfund, der blev gjort under besætningsproblemernes begyndelse viste

primært læsioner forårsaget af pyogene bakterier, herunder lungeabscesser, lungetromboser, endocarditis, nyreinfarkter og purulente ledbetændelser. Og da der udover *Clostridium perfringens* og *thermofile Campylobacter sp.* blev isoleret *Actinobacillus pyogenes*, kunne det tænkes, at denne bakterie, der er i stand til at lave pyogene infektioner overalt i organismen, som følge af en bakteræmi, har været årsag til de kliniske manifestationer i besætningen – enten som primær agens, eller eventuelt som følge af en BVDV-forårsaget immunosuppression.

I ”*Klinische Fälle von Viszeralem Botulismus bei Milchrindern in Mecklenburg-Vorpommern*“ beskrives en mærkbar ydelsesnedgang og stigning af celletal, samt uforklarlige sygdomstilfælde, der opstod efter en periode af fodring med ensilage, der var snittet fra en tidligere oversvømmet græsmark, i en besætning med 250 malkekvæg i Mecklern-Vorpommern i Nordtyskland. De kliniske manifestationer bestod af brunstmangel, fordøjelsesproblemer i form af varierende forstoppelse og diarre, endometritis, og at over halvdelen af køerne var halte, de fleste tilfælde pga. laminitis. Derudover var kalvene svage allerede fra fødslen, hvoraf nogle af dem døde indenfor få dage. Nogle kalve udviklede ørerandsnekrose og læsioner i mundhulen.

Inden påbegyndt fodring med ensilagen, undergik denne en mikrobiologisk analyse, der ikke viste ikke andet afvigende end et for lavt proteinindhold. Man forsøgte at få ydelsen op igen, ved at fodre køerne med en øget mængde kraftfoder på 14 kg kraftfoder/dyr/dag, men dette gjorde kun situationen værre. Derfor udtog man efterfølgende flere foderprøver til analyse, og man testede køerne for infektionssygdomme, såsom BVD, BHV-1, brucellose, leptosporose o.a. En mikroskopisk analyse af en græsensilage viste et højt indhold af *Enterobakterier*, *Pseudomonas sp.*, *Coryneforme* bakterier og svampesporer, og der kunne erkendes synlige skimmelrester i fodermidlet. Derudover havde majsensilagen et forhøjet indhold af gær. Laboratorieundersøgelserne viste ingen tegn på infektion hos køerne, men samtlige af de lakterende køer led af let metabolisk acidose. Artiklens forfatter konkluderer, på baggrund af fundet af BoNT i fæces hos fem dyr, at ydelsesnedgangen og de kliniske manifestationer kan tilskrives kronisk botulisme, der er opstået som følge af en dysbiose i tarmen. Som behandling/forebyggelse blev der bl.a. administreret vitamin- og mineraltilskud til alle køer efter kælvning, kraftfoderandelen blev indskrænket til 10 kg/dyr/dag og man påbegyndte anvendelsen af ensilagetilsætningsstoffer. Behandlingen synes at forbedre ydelsen og de kliniske manifestationer. Man kan dog under sig over, at forfatteren mener, at kronisk botulisme er årsag til besætningsproblemerne, da der ikke kunne påvises clostridiumsporier i nogen af foderprøverne. Det er jo netop en stor sporebelastning, der postuleres at være årsag til udviklingen af kronisk botulisme. En anden mere åbenlys differentialdiagnose til

besætningsproblemerne, er vomacidose, dog nævnes denne lidelse ikke af forfatteren. Vomacidose burde stærkt overvejes som differentialdiagnose, grundet fodringen med store mængde kraftfoder, metabolisk acidose hos samtlige af de lakterende køer, samt laminitis-relaterede haltheder hos over halvdelen af køerne i besætningen. Laminitis er netop ofte det tydeligste symptom på kronisk sur vom, udover de mere uspecifikke manifestationer, såsom nedsat mælkeydelse, nedsat fedtindhold i mælken og nedsat grovfoderoptagelse (Strudsholm & Sejersen 2003). Den metaboliske acidose kan opstå som følge af længerevarende/kronisk vomacidose, idet blodets syrebasebalance også forstyrres grundet leverens begrænsede kapacitet til at omsætte de store mængder mælkesyre. Man kan også undre sig over, hvorfor, der besluttes at fodre med ekstra kraftfoder, efter at foderanalyserne har konkluderet at ensilagen har et for lavt indhold af protein. Det lave proteinindhold kan sandsynligvis i sig selv medføre en ydelsesnedgang.

Forfatteren beretter, at fundet af det forhøjede indhold af *Enterobakterier*, *Pseudomonas* sp., *Coryneforme* bakterier og synlige skimmelrester i foderet højest kan bidrage til dysbiosen, der prædisponerer dyrene for kronisk botulisme, og ikke i sig selv kan forårsage de kliniske manifestationer. Det er dog muligt, at oversvømmelsen af græsmarken, der efterfølgende blev lavet til ensilage, har medført en kontaminering af afgrøderne med de nævnte bakterier, der alle kan findes i fx gylle. Enterobakterier såsom *E. coli*, *Salmonella* sp. og *Yersinia* sp., er vidt udbredte i miljøet samt i fæces, og kan agere som primære patogener, der kan forårsage både lokale tarminfektioner og systemiske infektioner i dyret (Quinn *et al.* 2002). Der er ikke angivet hvilke enterobakterier, der er tale om, men da der fandtes ørerandsnekroser hos nogle af kalvene i besætningen, kan det tænkes at der er tale om *Salmonella Dublin*, da denne kliniske manifestation er alment forekommende efter en endotoksæmi hos kalve forårsaget af denne agens. Salmonellose kan forekomme hos kvæg i alle aldersgrupper, og kan antage både akutte, subkliniske og kroniske former, og det kan derfor ikke udelukkes, at køer i besætningen også kan være inficeret af bakterien, og at den bidrager eller er årsag til de kliniske manifestationer. Dog synes vomacidose som følge af fodring med for store mængder kraftfoder at være den mest åbenlyse årsag, grundet det høje antal køer med laminitis og tilstedeværelsen af metabolisk acidose hos de lakterende køer.

Manglende objektivitet og mulige interessekonflikter kan udover at findes i publikationerne om kronisk botulisme, også erkendes i firmaet MiproLab GmbH's brug af laboratorieundersøgelser, der har til formål at bekræfte diagnosen for sygdommen. Firmaet tilbyder diverse undersøgelsesmuligheder for kronisk botulisme og generel clostridiose, som kan anvendes til gyldig dokumentation, i så fald en vaccinationstilladelse til besætningen ønskes.

Laboratorieundersøgelserne mangler dog validitet, idet den biologiske baggrund for sygdommen ikke er klarlagt, og det således ikke er muligt at sige noget konklusivt ud fra en ELISA antistofmåling eller fundet af BoNT i prøvemateriale. Den komplette mangel på referenceværdier for laboratorieresultaterne medvirker, at det er fuldstændig umuligt at vurdere, om de taler for eller imod en diagnose om kronisk botulisme. Den mindre kritiske dyrlæge eller malkekvægsproducent kan derfor være tilbøjelig til at lade firmaet konkludere, om vaccination er nødvendig. Dette er meget uheldigt, da Helge Böhnelt og Frank Gessler, som udover at være partnere i Miprolab GmbH, også er nogle af de mest synlige fortalere for, at kronisk botulisme er en reel sygdom. Således er firmaets anbefalinger ikke baseret på et objektivi grundlag, da partnerne bag har stor personlig og økonomisk interesse i, at lade folk bibeholde troen på, at sygdommen er en reel sygdom: Foruden at opkræve penge for de forskellige laboratorieundersøgelser, sælger firmaet selv vaccine mod botulisme, hvilket bidrager til firmaets indkomst og dermed eksistens berettigelse. Som bekendt af forfatteren af dette speciale, bidrager firmaet ikke med forskning eller deltager i forskningsprojekter med andre interessenter i selve sygdommen, hvilket ville være yderst relevant jf. den manglende evidens for sygdommen.

Ud fra resultaterne af de statistiske analyser af ydelsesdata og kodødelighed i henholdsvis besætning X og Y, kan det konkluderes, at beslutningen om at undersøge for kronisk botulisme, ikke er baseret på faktiske analyser af de to faktorer i besætningerne. For besætning X fandtes der hverken en forskel i mælkeydelse eller i kodødelighed fra år 2010 til 2011, mens der for besætning Y blev bekræftet en ydelsesforskel, i form af en stigning af gennemsnitlig EKM på dag 60 efter kælvning fra år 2010 til 2011. Der fandtes ingen forskel i kodødelighed fra år 2010 til 2011. Det skal dog nævnes, at den i specialet udførte besætningsanalyse er meget forenklet, og kun er baseret på et rent teoretisk grundlag, idet der udover de rå data, ikke er noget videre kendskab til besætningerne. Grundige multivariable analyser kan dog foretages af besætningsdyrlæger, der har et omfattende kendskab til deres besætninger, og som har mulighed for at monitorere sundheds- og produktionstilstanden over en længere periode, for at kunne bekræfte over for besætningsejeren, om der sket en forværring eller forbedring af produktionen, eller om der er tale om status quo. Således undgås uberettigede og impulsive beslutninger om at teste for videnskabeligt ubekræftede sygdomme såsom kronisk botulisme.

8. Perspektivering

Da det på baggrund af den tilgængelige litteratur ikke kan bekræftes, at der findes en kausal sammenhæng mellem kronisk lavgradig påvirkning af BoNT og de uspecifikke kliniske manifestationer, der ses i malkekvægsbesætningerne, er det nødvendigt med flere systematiske undersøgelser på området. Forskningsprojekter er på nuværende tidspunkt igangsat både i Tyskland og i Danmark, og modsat de hidtidige studier, er projekterne baseret på omfattende statistiske og epidemiologiske analyser, hvilket vil forbedre evidensen på området betydeligt.

Dog vil evidensen for epidemiologiske undersøgelser generelt være lavere end for kliniske interventionsundersøgelser, da førstnævnte anvender historiske data, til forskel fra de kliniske undersøgelser, som er prospektive. Derfor ville en forsøgsopstilling under kontrollerede forhold, med malkekvæg som forsøgsdyr, kunne bidrage yderligere til at afklare, om sygdomskomplekset er reelt eller ej, idet man ville være i stand til at fodre med forskellige foderkilder med varierende indhold af *C. botulinum*, sporer og BoNT, og samtidig udtage blodprøver fra dyrene løbende. Således kunne forholdet mellem tilstedeværelsen og antallet af *C. botulinum*, sporer og BoNT i foderet opholdes mod fundet i fæces og ligeledes opholdes med de kliniske manifestationer, og derudover opnå en bedre viden om, hvornår og under hvilke eksponeringer, køer danner antistoffer mod BoNT, hvilket ville hjælpe med at afklare om, fundet af *C. botulinum*, sporer eller BoNT i fæces og antistoffer i blodet, kan bekræfte en diagnose for kronisk botulisme.

For endeligt at kunne be- eller afkræfte den opstillede patogenese bag kronisk botulisme, ville en fiksering af BoNT i nerveenderne i tarmen være påkrævet. Dette kan dog vise sig at være en svær opgave, da man på nuværende tidspunkt stadig ikke har fuldstændig afklaret, hvordan BoNT transmitteres over tarmvæggen og optages i blodet.

Slutteligt skal man huske, at det ikke kun er forskere, der kan bidrage med viden om kronisk botulisme. Landets besætningsdyrlæger kan hver især gøre deres for at differentiere mellem reel produktionsnedgang og rene spekulationer, ved løbende at foretage grundige og løbende besætningsanalyser, og som efterfølgende forklares til malkekvægsproducenten. På den måde kan den impulsive investering i toksinbindere og vacciner forhindres, der bidrager til at laboratorier såsom Miprolab GmbH i Göttingen, tjener penge på en sygdom, der ikke er videnskabelig bevist.

9. Litteraturliste

ACMSF, Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food (2006): *Ad hoc group on botulism in cattle. Report on botulism in cattle*, [online]. ACMSF Secretariat, third floor, Aviation house, 125 Kingsway, London WC2B 6NH. Telefon: 02072768947. e-mail: acmsf@foodstandards.gsi.gov.uk. [citeret 10/8/2012]. Tilgængelig på internet: <http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/botulismincattlereport1206.pdf>

Angen, Ø. (2012): Personlig meddelelse. Seniorforsker. DTU Veterinærinstituttet, Sektion for Bakteriologi, Patologi og Parasitologi. Danmarks Tekniske Universitet, Bülowsvej 27, bygning 2, rum 109A, 1870 Frederiksberg C. Telefon: 35886201. e-mail: OANG@vet.dtu.dk

BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung) (2004): *Viszeraler Botulismus – Ein neues Krankheitsbild?* [online]. Max-Dohrn-Str. 8-10, D - 10589 Berlin. Tel.: +49-30-18412-0 [citeret 13/11/2012]. Tilgængelig på internet: http://www.bfr.bund.de/cm/343/viszeraler_botulismus_ein_neues_krankheitsbild.pdf

BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung) (2012): *Questions and answers on chronic botulism*. [online]. Max-Dohrn-Str. 8-10, D - 10589 Berlin. Tel.: +49-30-18412-0 [citeret 13/11/2012]. Tilgængelig på internet: <http://www.bfr.bund.de/cm/349/questions-and-answers-on-chronic-botulism.pdf>

BMELV (Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz) (2011): *Chronischer Botulismus*. Drucksache 17/6542 per 8/7/2011, Antwort der Bundesregierung.[online] P.O. Box 14 02 70, 53107 Bonn el. 11055 Berlin. Tel: 0 30 / 1 85 29 – 0. [citeret 12/11/2012] Tilgængelig fra internet: <http://dipbt.bundestag.de/dip21/btd/17/065/1706542.pdf>

BMELV (Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz) (2012): *Aktuelle Forschung zum chronischen Botulismus*. Drucksache 17/9659 per 16/5/2012, Antwort der Bundesregierung.[online] P.O. Box 14 02 70, 53107 Bonn el. 11055 Berlin. Tel: 0 30 / 1 85 29 – 0. [citeret 12/11/2012] Tilgængelig fra internet: <http://dip21.bundestag.de/dip21/btd/17/096/1709659.pdf>

Boysen, I. (2012): Kronisk botulisme - fup eller fakta? *Bovilogisk* 26:6 (2012), pp. 22-26.

Breves, G. (2012): Biogas und Botulismus. *Hochschulmagazin der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover* 41:1 (2012) pp. 5-6.

Brooks, C.E., Clarke, H.J., Finlay, D.A., McConnell, W., Graham, D.A., Ball, H.J. (2010): Culture enrichment assists the diagnosis of cattle botulism by a monoclonal antibody based sandwich ELISA. *Veterinary Microbiology* 144 (2010), 226-230.

Böhnel, H., Schwagerick, B., Gessler, F. (2001): Visceral botulism – a new form of bovine *clostridium botulinum* toxication. *Journal of Veterinary Medicine* 48 (2001), pp. 373-383.

Böhnel, H. & Gessler, F. (2004): Von der Bakterienspore zum Tod des Patienten. Botulinomics – Die Entwicklungskaskade des Botulismus. *Tierärztliche Umschau* 59 (2004), pp. 12-17.

Böhnel, H., Neufeld, B., Gessler, F. (2005): Botulinum neurotoxin type B in milk from a cow affected by visceral botulism. *The Veterinary Journal* 169 (2005), pp. 124-125.

Böhnel, H. & Gessler, F. (2012): Hinweise zum Vorkommen von Rinderbotulismus in Deutschland anhand von Laboruntersuchungen der Jahre 1996-2010. *Tierärztliche Umschau* 67 (2012), pp. 000-000.

Cai, S., Singh, B.R., Sharma, S. (2007): Botulism diagnostics: From clinical symptoms to in vitro assays. *Critical Reviews in Microbiology* 33 (2007), 109-125.

Cameron, C.M. (2009): A brief history of botulism in South Africa. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 76 (2009), 11-12.

Coffield J.A. & Whelchel D.D. (2012): Botulinum neurotoxins. In: Ramesh C. Gupta (ed.) (2012): *Veterinary toxicology. Basic and clinical principles*. 2. udgave. Forlaget Elsevier, Academic Press. pp. 937-949.

Cook, L. V., Lee, W. H., Lattuada, C. P., Ransom, G.M. (1998): Methods for the detection of *Clostridium botulinum* in meat and poultry products. In: *USDA/FSIS Microbiology Laboratory Guidebook*, 3rd Edition (1998), Chapter 14. [online]. [citeret 15/8/2012]. Tilgængelig fra internet: <http://www.fsis.usda.gov/ophs/microlab/mlgchp14.pdf>

Divers, T.J. & Peek, S.F. (2008): *Rebhun's diseases of dairy cattle*. Second Edition. Saunders elsevier, 11830 Westline Industrial drive, St. Louis, Missouri, 63146.

DNG (Deutsche Gesellschaft für Neurologie (2012): *Kein eindeutiger Beweis für „chronischen Botulismus“ beim Menschen*. [online]. Pressestelle der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN), c/o albertZWEI media GmbH, Englmannstr. 2, 81673 München. Tel:+49 (0)89 46 14 86 – 22. [citeret 12/11/2012]. Tilgængelig på internet: http://www.dgn.org/images/stories/Stellungnahme_DGN_HCB_final_080212.pdf

DTU Veterinærinstituttet (2009): Botulisme hos kvæg. In: DTU Veterinærinstituttet, Danmarks Tekniske Universitet (2009). *Brugerhåndbog 2009. Vejledning om diagnostiske undersøgelser*. 20. udgave. Forlaget Schultz. pp. 70-71.

Dunn, S. (2007): *Enterotoxaemia in cattle*. [Online]. NSW Departement of Primary Industries. Primefact 418, Februar 2007. [citeret 5/10/2012]. Tilgængelig på internet: http://www.dpi.nsw.gov.au/__data/assets/pdf_file/0013/110092/enterotoxaemia-in-cattle.pdf

Enevoldsen, C. (2012): *Besætningsanalyse i malkekvægbesætninger*. Professor. Institut for Produktionsdyr og Heste, Produktion og Sundhed, Grønnegårdsvej 2, 1870 Frederiksberg C, Kontor: 1-18, B211. Telefon: +45 353-32683. E-mail: ce@sund.ku.dk

Enevoldsen, C. (2011): *En praksisorienteret tilgang til håndtering af usikkerhed*. Professor. Institut for Produktionsdyr og Heste, Produktion og Sundhed, Grønnegårdsvej 2, 1870 Frederiksberg C, Kontor: 1-18, B211. Telefon: +45 353-32683. E-mail: ce@sund.ku.dk

Erbguth, F.J. (2007): From poison to remedy: the chequered history of botulinum toxin. *Journal of Neural Transmission* 115 (2008), 559-565.

Erri, j., Skau, M., riising, B. (2012): Kronisk botulisme – ikke kun i Tyskland. [online]. [citeret 12/11/2012]. Tilgængelig på internet:
http://www.lvk.dk/upload/fckeditor/file/kronisk_botulisme.pdf.

Freeman, P. & Bevan, P. (2007): *Botulism in cattle*, [Online]. NSW Departement of Primary Industries. Primefact 596, April 2007. [citeret 5/10/2012]. Tilgængelig på internet:
http://www.dpi.nsw.gov.au/__data/assets/pdf_file/0003/139233/botulism-in-cattle.pdf

FLI (Friedrich-Loeffler-Institut), Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit (2011a): Botulismus und *Clostridium Botulinum* - ein aktuelles Problem in der Rinderhaltung? In: *Jahresbericht 2011*. [Online]. Südufer 10, 17493 Greifswald-Insel Riems, Deuchland. Telefon: +49 38351 7-0. [citeret 12/11/2012]. Tilgængelig på internet:
http://www.fli.bund.de/fileadmin/dam_uploads/Jahresberichte/2011/Jahresbericht_2011.pdf

FLI (Friedrich-Loeffler-Institut), Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit (2011b): *Information on classic and chronic/visceral botulism*. [Online]. Südufer 10, 17493 Greifswald-Insel Riems, Deuchland. Telefon: +49 38351 7-0. [citeret 12/11/2012]. Tilgængelig på internet:
http://www.fli.bund.de/fileadmin/dam_uploads/IBIZ/FLI_Botulismus_Informationen_20111005en.pdf

Fujinaga, Y. (2010): Review article: Interaction of botulinum toxin with the epithelial barrier. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010 (2010), 1-9.

Galey, F.D., Terra, R., Walker, R., Adaska, J., Etchebarne, M.A., Puschner, B., Fisher, E., Whitlock, R.H., Rocke, T., Willoughby, D., Tor, E. (2000): Type C botulism in dairy cattle from feed contaminated with a dead cat. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 12 (2000), 204-209.

Gregory, A.R., Ellis, T.M., Nickels, R.J., Cousins, D.V. (1996): Use of enzyme-linked immunoassays for antibody to types C and D botulinum toxins for investigations of botulism in cattle. *Australian Veterinary Journal* Vol. 73, No. 2. (1996). pp. 55- 61.

Habicht, A. (2011): *Vurder selv evidens*. Munksgaard Danmark, København 2011. Sjæleboderne 2, 1122 København K. Telefon 33755900.

Hartley, H.M., Clarke, H.J., Graham, D.A., Ball, H.J., Malone, F.E. (2009): Detection of *Clostridium botulinum* type A toxin in a cow in Northern Ireland. *Veterinary Record* 165 (2009), 544.

Heider, L.C., McClure, J.T., Leger, E.R. (2001): Presumptive diagnosis of *Clostridium botulinum* type D intoxication in a herd of feetlot cattle. *Canadian Veterinary Journal* 42 (2001), 210-212.

Hoedemaker, M. (2012): *Chronic Botulism – Fact or Speculation?* Forelæsningslides fra foredrag holdt onsdag d. 5. september 2012, Vingsted hotel & conferencecenter. Martina Hoedemaker, University of Veterinary Medicine Hannover (TiHo), Bischofsholer Damm 15, 30173 Hannover. Tel: 0049-511-8567246, e-mail: Martina.Hoedemaker@tiho-hannover.de

Houe, H., Ersbøll, A. K., Toft, N. (2004): *Introduction to veterinary epidemiology*. Biofolia, Rosenørns Allé 9, 1970 Frederiksberg C, Danmark. Tlf: 38153880. slforlag@sl.cbs.dk.

Hvelplund, T., Nørgaard, P. (2003): *Kvægets ernæring og fysiologi. Bind 1 – Næringsstofomsætning og fodervurdering*. DJF rapport, Danmarks Jordbrugsforskning. Husdyrbrug nr. 53 (2003).

Jean, D., Fecteau, G., Scott, D., Higgins, Quessy, s. (1995): *Clostridium botulinum* type C intoxication in feedlot steers being fed ensiled poultry litter. *Canadian Veterinary Journal*, Vol. 36 (1995), pp. 626-628.

Jubb, T.F., Ellis, T.M., Gregory, A.R. (1993): Diagnosis of botulism in cattle using ELISA to detect antibody to botulinum toxins. *Australian Veterinary Journal* Vol. 70, No. 6 (1993), pp. 226-227

Keesey, J. (2008): The most vulnerable synapse: historic aspects of neuromuscular junction disorders. *In*: A.G. Engel (ed) (2008). *Handbook of Clinical Neurology*. Vol. 91, 3rd series. Elsevier. pp. 1-7.

Knický, M. (2005): *Possibilities to improve silage conservation. Effects of crop, ensiling technology and additives*. Doctoral thesis, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Department of Animal Nutrition and Management, Acta Universitatis Agriculturae Sueciae, Uppsala (2005). Tilgængelig på internet: http://pub.epsilon.slu.se/834/1/Thesis_for_epsilon2.pdf

Krogh, K. (2012): Personlig meddelelse. Specialkonsulent, dyrlæge. Kvæg, Team Sundhed, velfærd og fødevarerikkerhed. Videncentret for Landbrug, Agro Food Park 15 Skejby, 8200 Århus N. Tlf: 87405270. E-mail: ksk@vfl.dk

Krogh, K. (2012): Frygter ny kvægsygdom i Danmark. [online]. Landbrugsavisen. [citeret 1/10/2012]. Tilgængelig på internet: <http://www.landbrugsavisen.dk/Landbrugsavisen/2012/1/13/FrygternykvaegsygdomiDanmark.htm>

Krüger, M (2010a): *Clostridium botulinum* in Tierbeständen aus mikrobiologischer Sicht. *In*: *Chronischer Botulismus: Botulinumtoxikosen bei Mensch und Tier – Chronischer Botulismus in Milchviehherden? Was is dran?* Nutztierpraxis Rind (2010), pp. 24 -27. Tilgængelig fra internet: http://www.ava1.de/pdf/ava_np_rind_botulismus_leseprobe.pdf

Krüger, M. (2010b): Aktuelle Erkrankungen im Milchviehbetrieb. *Nutztierpraxis Aktuell* 33 (2010), pp. 20- 22. Tilgængelig fra internet: http://www.ava1.de/botulinum/npa_33_2010_biogasteil.pdf

Krüger, M. (2012): *Pflanzenschutzmittel Glyphosat kann laut Experten krank machen*. [online]. WAZNewMedia GmbH & Co. KG, Friedrichstraße 34 – 38, 45128 Essen. Telefon: 0049-201- 8 04 – 0. E-Mail: kontakt@derwesten.de. [citeret 12/11/2012]. Tilgængelig på internet: <http://www.derwesten.de/region/westfalen/pflanzenschutzmittel-glyphosat-kann-laut-experten-krank-machen-id6897961.html>

Krüger, M., Herrenthey, A. G., Schrödl, W., Gerlach, A., Rodloff, A. (2012): Visceral botulism at dairy farms in Schleswig Holstein, Germany – Prevalence of *Clostridium botulinum* in feces of cows, in animal feeds of the farmers, and in house dust. *Anerobe* 18 (2012), pp. 221-223.

Kruger, M., Herrenthey, A.G., Lücker, E., Domel, G., Schwarz, S., Schrödl, W. (u.å.): *Nachweis von Clostridium (C.) botulinum –Toxin und C. botulinum – Sporen in Magen-Darm-Trakt (MDT), Tonsillen und Lebern bei Kühen mit chronischem Botulismus*. [online]. Prof. Dr. Monika Krüger, Institut für Bakteriologie und Mykologie, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig, Tierkliniken 29, 04103 Leipzig. E-mail: mkrueger@vmf.uni-leipzig.de. [citeret d. 12/11/2012]. Tilgængelig på internet: <http://www.vetmed.uni-giessen.de/food-science/dvg/GarmischVortraege/Krueger-Mi15.50Uhr.pdf>.

Landbrug og Fødevarer, Kvæg (2011): *Rapport om Mycoplasma*. [online]. Landbrug & Fødevarer Axelborg, Axeltorv 3,1609 København V. Telefon: +45 33 39 40 00, e- mail: info@lf.dk. [citeret d. 14/11/2012]. Tilgængelig på internettet: <https://www.landbrugsinfo.dk/kvaeg/sundhed-og-dyrevelfaerd/mycoplasma/sider/Rapport-om-Mycoplasma-beredskabet-februar-2012.pdf>.

Landbrug og Fødevarer, Kvæg (2012): Vi skal søge nældens rod. *Kvægnyt* nr. 12 (2012,) pp. 1-2. tilgængelig på internet: <http://www.vfl.dk/NR/rdonlyres/22ABF312-BBAC-49F4-B868-273755D89992/0/KvaegNYT1212.pdf>

Lebrun, M., Mainill, J.G., Linden, A. (2010): Cattle enterotoxaemia and *Clostridium perfringens*: description, diagnosis and prophylaxis. *Veterinary Record* 167 (2010), 13-22.

Le Vaillant, F. (1790): Travels into the interior parts of Africa by the way of the Cape of good hope in the years 1780, 81,82, 83, 84 and 85. Vol. II. Printed for G.G.J. and J.Robinson Paternoster-row. London, M.DCC.XC. [13/8/2012]. Tilgængelig på internet: [//books.google.dk/books?id=mtcNAAAQAAJ&printsec=frontcover&dq=inauthor:%22Fran%20C3%A7ois+Le+Vaillant%22&hl=da#v=onepage&q&f=false](http://books.google.dk/books?id=mtcNAAAQAAJ&printsec=frontcover&dq=inauthor:%22Fran%20C3%A7ois+Le+Vaillant%22&hl=da#v=onepage&q&f=false)

Lindström, M. & Korkeala, H (2006): Laboratory diagnostics of botulism. *Clinical Microbiology Reviews* 19 (2006), 298-314.

Lindström, M., Myllykoski, J., Sivelä, S., Korkeala, H. (2010): *Clostridium botulinum* in cattle and dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 50 (2010), 281-304.

Mahlkow-nerge, K. (2010): Silagebereitung aus der Sicht der Fütterung. *Nutztierpraxis Aktuell* 33 (2010), pp. 64- ?

Main, D.C. & Gregory, A.R. (1996): Serological diagnosis of botulism in dairy cattle. *Australian Veterinary Journal* Vol. 73, No. 2. (1996). pp. 77- 78.

Mawhinney, I., Palmer, D., Gessler, F., Cranwell, M., Foyle, L., Otter, A., Payne, J., Strugnell, B. (2012): Investigation of serology for diagnosis of outbreaks of botulism in cattle. *The Veterinary Journal* 192 (2012), pp. 382-384.

McLoughlin, M.F., McIlroy, S.G., Neill, S.D. (1988): A major outbreak of botulism in cattle being fed ensiled poultry litter. *Veterinary Record* 122 (1988), 579-581.

Miprolab GmbH (2012): [online]. <http://www.miprolab.com>

- Moeller, R.B., Puschner, B., Walker, R.L., Rocke, T., Galey, F.D., Cullor, J.S., Ardans, A.A. (2003): Determination of the median toxic dose of type C botulinum toxin in lactating dairy cows. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 15 (2002), 523-526.
- Montville, T.J. & Matthews, K.R. (2008): *Food microbiology – an introduction*. 2. udgave. ASM Press, 1752 N St. NW, Washington, DC 20036-2904, USA.
- Neill, S.D., McLoughlin, M.F., McIlroy, S.G. (1989): Type C botulism in cattle being fed ensiled poultry litter. *Veterinary Record* 124 (1989), 558-560.
- Neufeld, B. & Neufeld A.B. (2004): Chronischer Viszeraler Botulismus in einem Kuhbestand im Allgäu. *Tierärztliche Umschau* 59 (2004), pp. 19-24.
- Payne, J.H., Hogg, R.A., Otter, A., Roest, H.I.J., Livesey, C.T. (2011): Emergence of suspected type D botulism in ruminants in England and Wales (2011 to 2009), associated with exposure to broiler litter. *Veterinary Record* 168 (2011), 640-643.
- Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J.C., Leonard, F.C., Maghire, D. (2002): *Veterinary microbiology and microbial disease*. Blackwell Science Ltd, Blackwell Publishing company, 9600 Garsington Road, Oxford OX4 2DQ, UK.
- Radostits, O.M., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W., Constable, P.D. (2007): *Veterinary medicine – a textbook of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. 10th edition. Saunders Elsevier, Elsevier's Health Sciences Rights Department, 1600 John F. Kennedy Boulevard, Suite 1800, Philadelphia, PA 19103-2899, USA.
- Rings, D.M (2004): Clostridial disease associated with neurologic signs: tetanus, botulism, and enterotoxemia. *Veterinary Clinic: Food Animal Practice* 20 (2004), 379-391.
- Robinson, E.M (1929): Botulism in domesticated animals in South Africa. I: *Pan-African Agricultural and veterinary conference, Pretoria, 1st August to 17th August, 1929*. Papers, veterinary section, The Government Printer, Pretoria (1930). pp. 204-213. [13/8/2012]. Tilgængelig på internet:
http://repository.up.ac.za/bitstream/handle/2263/13764/24_paper24_robinson1.pdf?sequence=1 og
http://repository.up.ac.za/bitstream/handle/2263/13764/24_paper24_robinson2.pdf?sequence=2
- Rodloff, A.C. & Krüger, M. (2012): Chronic clostridium botulinum infections in farmers. *Anaerobe* 18 (2012), pp. 226-228.
- Schwagerick, B. (2000): Klinische Fälle von Viszeralem Botulismus bei Milchrindern in Mecklenburg-Vorpommern. *Tierärztliche-Umschau* 59 (2004), pp. 25-29
- Schwagerick, B. (2006): Botulism and silage. Part II. Diagnosis and discussion. In: *Conference proceedings from the 12th International Symposium on Forage conservation* (2006), BRNO, Czech Republic, April 3-5, 2006. pp. 41-43.

Schwagerick, B. & Rosenmüller, R. (2010): Clostridienbedingte Erkrankungen des Milchviehs. *Nutztierpraxis Aktuell* 33 (2010), pp. 24- 28.

Sharpe, A.E., Brady, C.P., Byrne, W., Moriarty, J., O'Neill, P., McLaughlin, J.G. (2008): Major outbreak of suspected botulism in a dairy herd in the Republic of Ireland. *Veterinary Record* 162 (2008), 409-412.

Simpson, L.L. (2004): Identification of the major steps in botulinum toxin action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 44 (2004), 167-93.

Skau, M. (2012): Frygter ny kvægsygdom i Danmark. [online]. Landbrugsavisen. [citeret 1/10/2012]. Tilgængelig på internet: <http://www.landbrugsavisen.dk/Landbrugsavisen/2012/1/13/FrygternykvaegsygdomiDanmark.htm>

Smith, B.P (2009): *Large animal internal medicine*. 4. udgave. Mosby Elsevier, 11830 Westline Industrial Drive, St. Louis, Missouri 63146, USA.

Steinman, A., Chaffer, M., Elad, D., Shpigel, N.Y. (2006): Quantitative analysis of levels of serum immunoglobulin G against botulinum neurotoxin type D and association with protection in natural outbreaks of cattle botulism. *Clinical and Vaccine Immunology* 13 (8) (2006). pp. 862- 867.

Strudsholm, F., Sejersen, K. (2003): *Kvægets ernæring og fysiologi. Bind 2 – fodring og produktion*. DJF rapport, Danmarks Jordbrugsforskning. Husdyrbrug nr. 54 (2003).

Theiler, A. (1927): Lamsiekte (parabotulism) in cattle in South Africa. *11th and 12th Reports of the Director of Veterinary Education and Research - Part 2, January 1927*. pp. 821- 1307. Tilgængelig på internet: <http://repository.up.ac.za/handle/2263/12755>

Thomas, R.J. (1991): Detection of *Clostridium botulinum* types C and D toxin by ELISA. *Australian Veterinary Journal*, Vol. 68, No. 3 (1991), pp. 111-113.

Weissbach, F. (2006): Strategies for minimizing clostridia spores in silages. In: *Conference proceedings from the 12th International Symposium on Forage conservation* (2006), BRNO, Czech Republic, April 3-5, 2006. pp. 26-32.

Weissbach, F. (u.å.): *Chronic botulism – how much is health preservation worth?* [online]. [citeret 12/11/2012]. Tilgængelig på internet: http://www.addcon.com/fileadmin/addcon/pdf/feed/Botulismus_Weissbach_2011_GB_screen.pdf

Bilagssamling

Bilag A: Test fra Miprolab GmbH Götting

Bilag B: Analyse resultater af besætning X fra Miprolab GmbH

Bilag C: Analyse resultater af besætning Y fra Miprolab GmbH

Bilag D: Udskrift „Dødelighed-Køer-Besætningsdynamik“, Dansk Kvæg pr. 30.4.2011

Bilag E: Udskrift „Dødelighed-Køer-Besætningsdynamik“, Dansk Kvæg pr. 28.2.2011



Leistungsverzeichnis Rind

Untersuchung	Methode	Probenmaterial	Preise*
Profile			
miPROFIL Botulismus			
<i>C. botulinum</i> , Erreger & Toxin	Bioassay	50 g Pansensaft oder Kot gefroren	130,- € Poolaufschlag 3,- €/Probe
<i>C. botulinum</i> , Antikörper	ELISA	1 mL Serum (kein Pool!)	
miPROFIL Clostridien Rind groß			
allgemein Clostridienbelastung	MPN	50 g Pansensaft, Kot oder Darmabschnitt gefroren	240,- € Poolaufschlag 3,- €/Probe
<i>C. botulinum</i> , Erreger & Toxin	Bioassay		
<i>C. perfringens</i> , Erreger & Toxin	ELISA/PCR		
<i>C. difficile</i> , Erreger & Toxin	ELISA/Biochemie		
selektive Clostridienanzucht inkl. Identifizierung relevanter Spezies	IFT/PCR/ Biochemie		
miPROFIL Clostridien Rind klein (Hemorrhagic Bowel Synd.)			
<i>C. botulinum</i> , Erreger & Toxin	Bioassay	50 g Pansensaft, Kot oder Darmabschnitt gefroren	149,- € Poolaufschlag 3,- €/Probe
<i>C. perfringens</i> , Erreger & Toxin	ELISA/PCR		
miPROFIL Clostridien Gewebe			
selektive Clostridienanzucht inkl. Identifizierung relevanter Spezies	IFT/PCR/ Biochemie	20 g Gewebe gekühlt, oder 2 anaerobe Tupfer	80,- €
miPROFIL Kälberdiarrhoe			
aerobe BU inkl. <i>E. coli</i> F ₅ (K99)	Kultur	20 g Kot gekühlt	55,- €
Salmonellen	Kultur		
Rotaviren	ELISA		
Coronaviren	ELISA		
Kryptosporidien	ELISA		
Kokzidien	Flotation		
miPROFIL Rinderenteritis			
aerobe BU inkl. <i>E. coli</i> F ₅ (K99)	Kultur	50 g Kot gekühlt	38,- €
Salmonellen	Kultur		
Kokzidien	Flotation		

* Alle genannten Preise verstehen sich pro Probe und zzgl. der gesetzlichen Mehrwertsteuer.



Leistungsverzeichnis Rind

Untersuchung	Methode	Probenmaterial	Preise *
Darmökologie			
Dysbiose aerobe und anaerobe Gesamtkeimzahl, aerobe und anaerobe Sporenbildner, Enterobakterien inkl. <i>E. coli</i> , Laktobazillen, Bifidobakterien, Hefen	MPN/Kultur	10 g Kot gekühlt	78,- €
Serologie			
<i>C. botulinum</i> Antikörper	ELISA	1 mL Serum	20,- €
<i>M. avium ssp. paratuberculosis</i> Antikörper	ELISA	1 mL Serum	11,- €
<i>C. perfringens</i> α -Toxin Antikörper	ELISA	1 mL Serum	11,- €
Impfkontrolle			
<i>C. botulinum</i> Antikörper	ELISA	1 mL Serum	20,- €
<i>C. perfringens</i> α -Toxin Antikörper	ELISA	1 mL Serum	11,- €
Impfstoffe			
Gewinnung bestandsspezifischer Isolate	Kultur	10 g Kot, Labmagen oder Darmabschnitt, gekühlt	80,- €
Herstellung von bestandsspezifischem Impfstoff			auf Anfrage
Trächtigkeit			
Nachweis von trächtigkeitsassoziierten Glykoproteinen (PAGs)	ELISA	1 mL Serum	11,- €

* Alle genannten Preise verstehen sich pro Probe und zzgl. der gesetzlichen Mehrwertsteuer.



Leistungsverzeichnis Rind

Untersuchung	Methode	Probenmaterial	Preise *
Einzeluntersuchungen			
Antibiogramm			
MHK-Bestimmung	Mikrodilution	je Stamm	12,- €
Bakterien			
BU, aerob inkl. <i>E. coli</i> F5 (K99)	Kultur	10 g Probe gekühlt	16,- €
Clostridienanzucht, selektiv inkl. Identifizierung relevanter Spezies	Biochemie/IFT/PCR	10 g Probe gekühlt	80,- €
Clostridienbelastung, allgemein	MPN	10 g Probe gekühlt	20,- €
<i>C. botulinum</i> , Toxingentypisierung	PCR	10 g Probe gekühlt	80,- €
<i>C. botulinum</i> , Erreger & Toxin	Bioassay	50 g Probe gefroren	120,- €
<i>C. difficile</i> , Erreger & Toxin	ELISA/Biochemie	10 g Probe gefroren	30,- €
<i>C. perfringens</i> , Toxingentypisierung	PCR	10 g Probe gekühlt	35,- €
<i>C. perfringens</i> , Erreger & Toxin	ELISA/PCR	10 g Probe gefroren	45,- €
<i>C. perfringens</i> , Isolate für bestandsspezifischen Impfstoff	PCR	10 g Probe gekühlt	80,- €
<i>Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis</i>	PCR	10 g Kot gekühlt	26,- €
Salmonellen	Kultur	10 g Kot gekühlt	16,- €
Stammidentifizierung über 16S rDNA-Sequenzierung	Sequenzierung	je Stamm	60,- €
Viren			
Coronaviren	ELISA	10 g Kot gekühlt	13,- €
Rotaviren	ELISA	10 g Kot gekühlt	13,- €
Endoparasiten			
Kryptosporidien	ELISA	10 g Kot gekühlt	13,- €
Kokzidien	Flotation	50 g Kot gekühlt	9,- €

* Alle genannten Preise verstehen sich pro Probe und zzgl. der gesetzlichen Mehrwertsteuer.



Bilag B
Besetzung X
*s.1



Mikrobiologische Diagnostik GmbH

mipro lab GmbH · Marie-Curie-Str. 7 · 37079 Göttingen

[REDACTED]

Göttingen, 11. Mai 2012

Report 2012-M-0327

Specimen Information

Owner:

[REDACTED]

Untersuchungsauftrag:

according to sample submission form

Einsendedatum:

08.05.2012

Zustand:

frozen

Probengruppe:

cattle

Results

		2012 - M - 0327 - 1	2012 - M - 0327 - 2	2012 - M - 0327 - 3
		1649	2068	1656
		Serum	Serum	Serum
test	Wertebereich/ Sollwert	result	result	result
C. botulinum Typ A - Antikörper ELISA	-- +++	-	-	-
C. botulinum Type B - Antibodies ELISA	-- +++	-	+	-
C. botulinum Typ C - Antikörper ELISA	-- +++	-	-	-
C. botulinum Typ D - Antikörper ELISA	-- +++	-	-	-
C. perfringens alpha- Toxin - Antibodies ELISA	-- +++++	+	-	++

Bilag B
Besetzung X
s. 2.



Mikrobiologische Diagnostik GmbH

		2012 - M - 0327 - 4 1785 Serum	2012 - M - 0327 - 5 2034 Serum
test	Wertebereich/ Sollwert	result	result
C. botulinum Typ A - Antikörper ELISA	-- +++	-	-
C. botulinum Typ B - Antikörper ELISA	-- +++	-	-
C. botulinum Typ C - Antikörper ELISA	-- +++	-	-
C. botulinum Typ D - Antikörper ELISA	-- +++	-	-
C. perfringens alpha- Toxin - Antibodies ELISA	-- +++++	++	+++

		2012 - M - 0327 - 6 1649, 2068, 1656 (1st pool) fecal sample	2012 - M - 0327 - 7 1785, 2034 (2nd Pool) fecal sample
test	Wertebereich/ Sollwert	result	result
C. perfringens - Toxingentypisierung PCR		negativ	negativ
C. perfringens - Toxinextrakt ELISA		negativ	negativ
C. perfringens - Erregerkultur PCR		negativ	negativ

Interpretation

The positive serum from animal 2068 indicates that there has been previous contacts with Botulinum Neurotoxin type B.

The positive sera of the other cattle indicate that there have been previous contacts with Clostridium perfringens alpha toxin (by infection or vaccination).

Bilag C
Besatzung y
s. 1

mipro lab GmbH · Marie-Curie-Str. 7 · 37079 Göttingen

[REDACTED]

Göttingen, 20. April 2012

Bericht 2012-M-0245

Probeninformation

Farm: [REDACTED]
Untersuchungsauftrag: according to sample submission form
Einsendedatum: 04.04.2012
Zustand: frozen
Probengruppe: cattle

Results

	2012 - M - 0245 - 1	2012 - M - 0245 - 2	2012 - M - 0245 - 3
	2658	2468	2149
	Serum	Serum	Serum
test	Wertebereich/ Sollwert	result	result
C. botulinum Typ A - Antikörper ELISA	-- +++	-	-
C. botulinum Typ B - Antikörper ELISA	-- +++	-	-
C. botulinum Typ C - Antikörper ELISA	-- +++	-	-
C. botulinum Typ D - Antikörper ELISA	-- +++	-	-
C. perfringens alpha- Toxin - Antibodies ELISA	-- +++++	+++	++

Bilag C
Besatzung 9
S. 2.

		2012 - M - 0245 - 4 2588 Serum	2012 - M - 0245 - 5 2716 Serum
test	Wertebereich/ Sollwert	result	result
C. botulinum Typ A - Antikörper ELISA	-- +++	-	-
C. botulinum Typ B - Antikörper ELISA	-- +++	-	-
C. botulinum Typ C - Antikörper ELISA	-- +++	-	-
C. botulinum Typ D - Antikörper ELISA	-- +++	-	-
C. perfringens alpha- Toxin - Antibodies ELISA	-- +++++	■	+

		2012 - M - 0245 - 6 2658, 2468, 2149 (1st Pool) fecal sample	2012 - M - 0245 - 7 2588, 2716 (2nd Pool) fecal sample
test	Wertebereich/ Sollwert	result	result
General burden of Clostridia MPN	0 <= ... <= 100000	>1100 Z/mL	4600 Z/mL
C. botulinum - Toxinextrakt Bioassay	negativ - A,B,C,D,E,F,G	negativ	negativ
C. botulinum - Erregerkultur Bioassay	negativ - A,B,C,D,E,F,G	negativ	negativ
C. perfringens - Toxinextrakt ELISA		negativ	negativ
C. perfringens - Erregerkultur ELISA		negativ	negativ
C. difficile A/B - Toxinextrakt ELISA		negativ	negativ
C. difficile - Erregerkultur Biochemie		negativ	negativ
selective Clostridia cultivation		C. perfringens $\alpha+\beta_2+\epsilon$, C. sporogenes, C. hastiforme, C. tetani, C. bifermens, C. difficile	C. perfringens $\alpha+\beta_2+\epsilon$, C. perfringens $\alpha+\epsilon$, C. sporogenes, C. difficile, C. tetani, C. hastiforme

Dansk Kvæg	Malkekvæg	Dødelighed-Køer-Besætningsdynamik
	Kontrol dato 13.04.11 7	Udskrevet 12.05.11 21.51 Side 1
	30-04-11	

Dødelighed-Køer-Besætningsdynamik

Udskriften relaterer kodødeligheden i besætningen til en række forhold omkring besætningsdynamikken

		Antal tilfælde per md. maj 2010 - april 2011												Sidste 12 md.	2010	2009
		Maj	Jun	Jul	Aug	Sep	Okt	Nov	Dec	Jan	Feb	Mar	Apr	Antal		
Gennemsn. ant. køer (årskøer) i besætningen i perioden	Total	102	99	98	96	100	98	98	92	92	88	88	88	94	97	92
	1. kalvs	41	41	41	39	44	43	44	40	43	41	41	39	41	40	38
	2. kalvs	27	23	23	22	22	21	23	22	19	18	18	19	21	25	29
	ældre	34	35	34	35	34	34	31	30	30	29	29	30	32	32	25
	Antal kælvinger	13	3	5	17	6	13	14	11	7	7	3	7	106	116	86
	Antal kælvinger 1. kalv	5	1	3	9	4	4	6	4	4	2	1	1	44	50	34
T	Antal indkøbte køer	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
i	Antal indkøbte kvier < 8 uger fra forv. kælving	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
l	Antal indkøbte drægtige kvier > 8 uger fra forv. kælving	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
g	Antal indkøbte ikke drægtige kvier	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A	Salg til levebrug	0	0	0	6	0	0	0	6	3	0	0	0	15	12	10
f	Slagtede	2	5	0	3	6	5	1	8	0	4	0	0	34	35	28
g	Aflivede	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0	1	4	2	0
a	Selvdøde	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	1
n	Procent døde køer samlet													5,3	5,2	1,1

Indsætningsprocent:

(antal kælvinger, 1. Kalvs + indkøbte køer) / antal årskøer: 46,8

Udsætningsprocent:

(antal slagtede + aflivede + selvdøde + solgte til levebrug) / antal årskøer: 57,4

Udskiftningsprocent:

$\frac{1}{2} \times (\text{antal kælvinger, 1 kalvs} + \text{indkøbte} + \text{slagtede} + \text{aflivede} + \text{selvdøde} + \text{solgte}) / \text{antal årskøer}: 52,1$

Den aktuelle kodødelighed (procent døde køer samlet) kan sættes op mod Dansk Kvægs eller besætningens egen målsætning

Dansk Kvæg	Malkekvæg	Dødelighed-Køer-Besætningsdynamik
	Kontrol dato 11.03.11 6	Udskrevet 28.03.11 22.42 Side 1
	28-02-11	

Dødelighed-Køer-Besætningsdynamik

Udskriften relaterer kodødeligheden i besætningen til en række forhold omkring besætningsdynamikken

		Antal tilfælde per md. marts 2010 - februar 2011												Sidste 12 md.	2010	2009
		Mar	Apr	Maj	Jun	Jul	Aug	Sep	Okt	Nov	Dec	Jan	Feb	Antal		
Gennemsn. ant. køer (årskøer) i besætningen i perioden	Total	140	139	139	140	137	138	138	133	124	119	116	118	131	136	143
	1. kalvs	60	60	60	57	53	51	52	48	43	39	37	44	50	54	55
	2. kalvs	34	34	36	37	39	42	42	39	38	39	40	37	38	37	37
	ældre	46	45	43	46	45	45	44	46	43	41	39	37	43	45	51
Antal kælvinger		11	10	18	8	10	15	9	10	7	8	9	8	123	123	138
Antal kælvinger 1. kalv		3	6	4	1	3	5	3	1	0	1	5	7	39	31	59
T	Antal indkøbte køer	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2	2	0
i	Antal indkøbte kvier < 8 uger fra forv. kælving	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23
g	Antal indkøbte drægtige kvier > 8 uger fra forv. kælving	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14
g	Antal indkøbte ikke drægtige kvier	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
A	Salg til levebrug	1	0	1	0	0	1	0	0	0	3	0	0	6	6	7
f	Slagtede	0	6	0	0	3	7	1	12	6	0	8	2	45	42	38
g	Aflivede	2	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	7	8	2
a	Selvdøde	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	4
n	Procent døde køer samlet													6,9	7,4	4,2

Indsætningsprocent:

(antal kælvinger, 1. Kalvs + indkøbte køer) / antal årskøer: 31,3

Udsætningsprocent:

(antal slagtede + aflivede + selvdøde + solgte til levebrug) / antal årskøer: 45,8

Udskiftningsprocent:

$\frac{1}{2} \times (\text{antal kælvinger, 1 kalvs} + \text{indkøbte} + \text{slagtede} + \text{aflivede} + \text{selvdøde} + \text{solgte}) / \text{antal årskøer: } 38,5$

Den aktuelle kodødelighed (procent døde køer samlet) kan sættes op mod Dansk Kvægs eller besætningens egen målsætning