



Kandidatspeciale

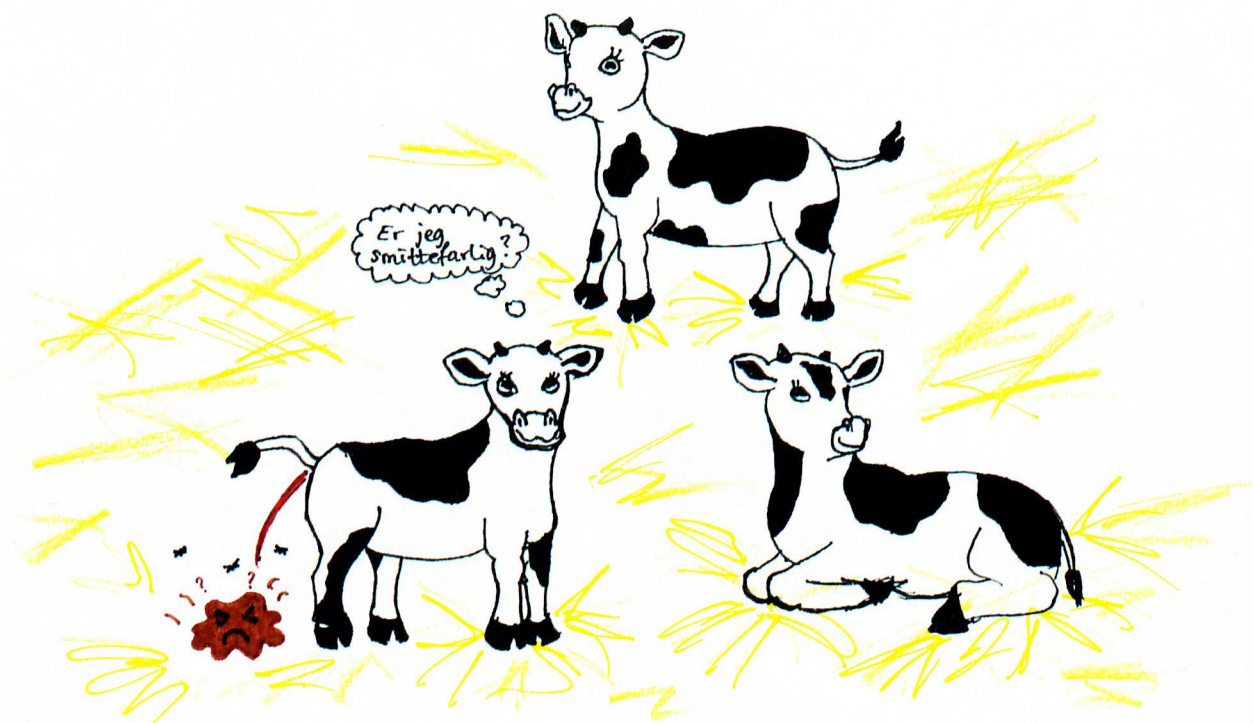
Nanna Noël Grønbæk

KCJ588

Tanja Klindt Christensen

ZMP394

Et retrospektivt kohortestudium om infektion og smitterisiko for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* hos kvier født af højrisiko- og lavrisikokøer i danske malkekvægsbesætninger



Vejleder: Søren Saxmose Nielsen

Afleveret den 29/06/2018

Institutnavn: Institut for Veterinær- og Husdyrvidenskab

Name of department: Sektion for Dyrevelfærd og sygdomsbekæmpelse

Forfatter(e): Tanja Klindt Christensen og Nanna Noël Grønbæk

Titel og evt. undertitel: Et retrospektivt kohortestudium om infektion og smitterisiko for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* hos kvier født af højrisiko- og lavrisiko-køer i danske malkekvægsbesætninger

Title / Subtitle: A retrospective cohort study on infection and infectiousness of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in heifers born to ELISA positive and ELISA negative dams in Danish dairy herds

Emnebeskrivelse: Undersøgelse af forekomsten og sammenhæng af antistoffer mod *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* i serum og MAP i fæces hos kvier i alderen 6-26 måneder født af henholdsvis høj- og lavrisiko-køer i danske malkekvægsbesætninger

Vejleder: Søren Saxmose Nielsen

Afleveret den: 29. juni 2018

Indholdsfortegnelse

Forord	5
Forkortelser og definitioner	6
Abstract	7
Resume	8
Introduktion	9
Teori	11
<i>Litteratursøgning</i>	11
<i>Patogenese for paratuberkulose</i>	11
<i>Udfordringer i bekæmpelse af paratuberkulose</i>	12
<i>Alder og infektionsdosis</i>	12
<i>Betydning af koens status</i>	14
<i>Påvisning af antistoffer</i>	15
<i>Anvendelse af ELISA til diagnostik af paratuberkulose</i>	16
<i>Udskillelse af MAP i fæces</i>	17
<i>Anvendelse af PCR til påvisning af MAP i fæces</i>	18
<i>Transmission mellem kalve</i>	19
Materialer og metoder	20
<i>Studiedesign</i>	20
<i>Rammer og population</i>	20
<i>Prøveindsamling</i>	22
<i>Forklarende variable</i>	22
<i>Diagnostiske tests og outcome</i>	22
<i>Bias</i>	24
<i>Stikprøvestørrelse</i>	24
Post hoc stikprøveberegning	26
Resultater	26
<i>Besætninger og dyr</i>	26
Kvierne	27
<i>Påvisning af antistoffer i serum ved brug af ELISA</i>	32
<i>Påvisning af MAP i fæces ved brug af qPCR</i>	32
<i>Post hoc stikprøveberegning</i>	33
Diskussion	34

<i>Opsummering af resultater</i>	34
<i>Smittede kvier</i>	34
Sandt negative - kvien er ikke smittet med paratuberkulose.....	35
Falsk negative - kvien er smittet med paratuberkulose.....	36
<i>Smittefarlige kvier</i>	36
Sandt negative - kvien er ikke smittefarlig.....	37
Falsk negative - kvien er smittefarlig.....	38
<i>Studiets begrænsninger</i>	39
<i>Generalisering</i>	40
Konklusion	41
Referencer	41
Bilag 1	50

Forord

Dette er et specialeprojekt som led i opnåelse af en kandidatgrad i veterinærmedicin ved Københavns Universitet. Projektet er udarbejdet fra februar til juni 2018 under vejledning af Søren Saxmose Nielsen.

I forbindelse med projektet har vi udover en masse viden om paratuberkulose tilegnet os en række praktiske færdigheder. Vi har haft stor andel i planlægningen og udformning af studie-designet herunder finansiering af projektet og planlægning af dataindsamling. I forbindelse med prøveindsamlingen har vi fået erfaring med håndtering af kvæg og udtagning af blodprøver og fæcesprøver. I planlægningen og udførelsen af prøveindsamlingen har vi fået et indblik i det at skulle begå sig i moderne malkekvægsbesætninger og kommunikere med besætningsejere.

Tak til Søren Saxmose Nielsen for god vejledning og finansiering af prøvemateriale. Tak for din hjælp med at få sat projektet i gang og for altid at komme med konstruktivt input.

Tak til Eurofins Steins for analyse af blodprøver og DNA Diagnostic for analyse af svabere og gødningsprøver. Specielt tak til Anne-Sofie Ladekjær-Mikkelsen fra Eurofins Steins og Dennis Berg Holt og Jørgen Katholm fra DNA Diagnostic for håndtering af vores prøver og besvarelse af alle vores spørgsmål omkring analysen.

Tak til *Forsøgsleder R. Nørtoft Thomsen Legat* for tildeling af legat til finansiering af projektet.

Tak til Lars Pedersen fra Seges for hjælp i forbindelse med oprettelse af kontakt til besætningerne.

Sidst men ikke mindst tak til alle besætningsejere for deltagelse i projektet og samarbejdet under prøveindsamlingen.

Forkortelser og definitioner

MAP	<i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i>
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
PCR	Polymerase Chain Reaction
IAC	Internal Amplification Control
cfu	Colony-forming unit

Definition på diagnostisk sensitivitet og specificitet

Diagnostisk sensitivitet (Se) angiver en tests evne til at påvise et sandt positivt resultat.

Diagnostisk specificitet (Sp) angiver en tests evne til at påvise et sandt negativt resultat (Houe 2004).

Abstract

Paratuberculosis is a chronic enteritis in ruminants caused by *Mycobacterium avium* sub-species *paratuberculosis* (MAP) and may result in reduced milk yield, loss of body condition, diarrhoea, and ultimately death. Calves are thought to be most susceptible whilst cows are considered most infectious. Control and eradication of paratuberculosis is beneficial because of economic losses and its possible role in Crohn's disease in humans.

The Danish control programme aims towards reducing the prevalence of paratuberculosis and providing tools to help prevent transmission to susceptible animals. Lactating cows are tested for MAP-antibodies using milk-ELISA and the results are used to assign the cows into risk groups for focused management for preventing transmission of MAP. ELISA-positive cows should calve in areas separated from ELISA-negative cows and the calf should be removed immediately after calving. Colostrum and milk from ELISA-positive cows should not be used for feeding calves and to minimize transmission between calves, the control programme recommends separating calves born to ELISA-positive dams from other calves for four months or culling them.

The objective of this study was to examine the occurrence and correlation of MAP-antibodies in serum and MAP-bacteria in faeces in heifers born to ELISA-positive dams and heifers born to ELISA-negative dams, and to assess the risk of transmission between youngstock. 63 heifers born to ELISA-positive dams and 61 heifers born to ELISA-negative dams in high-prevalent herds and 60 heifers born to ELISA-negative dams in low-prevalent herds were included in this study. Blood samples and faeces were collected and tested for MAP-antibodies and MAP-bacteria, respectively. All samples were negative. However, the occurrence of false negative results is probable, especially amongst heifers born to ELISA-positive dams due to increased risk of infection. In general, the probability to detect infected heifers using antibody-ELISA is considered low as a result of late onset of antibody response. This and the fact that many heifers probably are truly non-infected are regarded as the main reasons for the lack of detection of infected heifers in this study. Furthermore, it was not possible to detect any infectious heifers likely due to control of the infection and thereby minimal or no shedding of MAP in faeces. Based on the findings in this study, the level of shedding is not considered a risk for transmission of MAP amongst heifers. Culling of calves born to ELISA-positive dams may be considered due to increased risk of developing paratuberculosis and not because of the risk of transmission to other calves.

Resume

Paratuberkulose er en kronisk tarminfektion hos drøvtyggere, der skyldes *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) og kan give anledning til nedsat mælkeydelse, lav huld, diarre og sluttelig død. Kalve anses for at være mest modtagelige for smitten, mens især køer udgør den største smitterisiko. Paratuberkulose kan give anledning til økonomiske tab og er muligvis involveret i Crohns sygdom hos mennesker, hvormed bekæmpelse vil være fordelagtig. I Operation Paratuberkulose, et frivilligt dansk saneringsprogram, testes lakterende køer ved brug af en antistof-ELISA på mælkeprøver. På baggrund af resultaterne inddeles køerne i risikogrupper, hvilke bruges som redskab til at målrette management mod minimering af smitterisiko for paratuberkulose. Anbefalinger lyder på at udsætte gentagne ELISA-positive køer, separere ELISA-positive køer fra andre køer ved kælvning, hurtig fjernelse af kalven efter kælvning og ingen anvendelse af råmælk og mælk fra ELISA-positive køer. Endvidere anbefales det at isolere eller udsætte kalve født af højrisiko-køer, da disse mistænkes for at udgøre en smitterisiko for andre kalve.

Målet med dette studium var at undersøge forekomsten og sammenhæng af antistoffer mod MAP i serum og MAP-bakterien i fæces hos kvier født af henholdsvis høj- og lavrisiko-køer for at vurdere smitterisiko blandt ungdyr. 63 kvier født af højrisiko-køer og 61 kvier født af lavrisiko-køer i højprævalente besætninger samt 60 kvier født af lavrisiko-køer i lavprævalente besætninger blev undersøgt for antistoffer mod MAP i serum og MAP-bakterien i fæces. Alle prøver var negative. Det er sandsynligt, at der forekommer falsk negative resultater for påvisning af smittede kvier især blandt kvier født af højrisiko-køer på grund af øget risiko for infektion. Generelt anses sandsynligheden for påvisning af smittede kvier ved brug af antistof-ELISA som værende lav på grund af sen udvikling af antistofrespons, hvilket vurderes at være en betydelig årsag til den manglende påvisning af smittede kvier i studiet. Ydermere blev der ikke påvist smittefarlige kvier, hvilket kan skyldes kontrol over infektionen og dermed manglende eller minimal udskillelse af MAP-bakterien i fæces. På baggrund af disse fund formodes udskillelsen af MAP blandt kvier ikke tilstrækkelig høj til at udgøre en smitterisiko for andre ungdyr. Eventuel udsætning af højrisiko-kalve bør derfor ske på grund af øget risiko for at udvikle paratuberkulose og ikke på grund af smitterisiko for andre kalve.

Introduktion

Paratuberkulose er en kronisk tarminfektion, som skyldes bakterien *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP). Sygdommen kan give anledning til nedsat ydelse, diarre, afmagring og sluttelig død, hvis ikke køen udsættes før tid. Paratuberkulose har en lang inkubationstid, og de kliniske symptomer udvikler sig op til flere år efter den initiale udskillelse af bakterien i fæces (Sweeney 2011). Nyfødte kalve er mest modtagelige, og smitten sker primært ved oral optagelse af bakterien; enten i fækalt kontamineret miljø, via kolostrum eller via mælk. I nogle tilfælde kan transmissionen ske *in utero*, hvor den største risiko ses hos køer med klinisk paratuberkulose (Sweeney 1996). De økonomiske konsekvenser forbundet med paratuberkulose, både direkte tab i form af nedsat mælkeydelse og muligvis reduceret slagtevægt (Kudahl 2004) og indirekte tab som følge af reduceret foderudnyttelse, tidlig udsætning, smitte af andre dyr og tab af genetisk potentiale (Nielsen 2006; Nielsen og Nielsen 2007), er en motivationsfaktor for bekæmpelse af infektionen. MAP er mistænkt for at være en medvirkende faktor i Crohns sygdom hos mennesker (Uzoigwe et al. 2007), hvorfor bekæmpelse ligeledes er hensigtsmæssig ud fra et fødevarerisikomæssigt perspektiv. Sidst men ikke mindst bør muligheden for at forbedre dyrevelfærden også være motivation for bekæmpelse af paratuberkulose.

Operation Paratuberkulose er et frivilligt saneringsprogram i Danmark, hvor målet er at reducere prævalensen af paratuberkulose og give deltagerne redskaber til at kontrollere sygdommen i deres besætning. Deltagende besætninger anbefales fire årlige tests med en anti-stof-ELISA på mælk af alle lakterende køer, da dette sikrer, at alle køer testes minimum tre gange årligt (Nielsen og Nielsen 2007). Efter to års deltagelse og otte tests af alle lakterende køer er det muligt at vælge reduceret prøveudtagning, hvor køer, der har været test-negative på de seneste fire prøver og er mere end 180 dage fra kælvning, undlades i prøveudtagningen (Nielsen 2009a). På baggrund af ELISA-resultaterne inddeles køerne i risikogrupper, og disse bruges til at målrette management som led i bekæmpelsen af paratuberkulose. For at reducere smittespredning anbefales det, at køer med gentagne positive målinger udsættes før næste kælvning, og at ELISA-positive køer kælver i separate områder og ikke bidrager med kolostrum eller mælk til mælkefodring af kviekalve. Det anbefales, at kalven fjernes straks efter kælvning, og at kælvningsboksen rengøres mellem hver kælvning. For at mindske smitterisikoen mellem kalve anbefaler Operation Paratuberkulose at overveje slagting af kalve født af højrisiko-køer med høje værdier omkring kælvning og at adskille kalve født af højrisiko-køer

med moderate værdier omkring kælvning fra andre kalve i de første fire levemåneder (Nielsen og Nielsen 2007).

Bekæmpelsen af paratuberkulose fokuserer på management til afbrydelse af smitteveje til modtagelige dyr, da dette ved simulering har vist sig at være det mest effektive til reducere af prævalensen (Kudahl et al. 2007). Hvorvidt dette er den rette strategi til bekæmpelse af paratuberkulose er blevet udfordret af nyere simuleringmodeller. Kirkeby et al. (2016) finder, at udryddelse er mulig ved en kombination af hurtig fjernelse af kalven og ingen fodring med råmælk og mælk fra højrisiko-køer samt test-og-udsætning i besætninger med et gennemsnitligt hygiejne-niveau. Udryddelse er dog mulig alene ved test-og-udsætning, som samtidig er den mest omkostningseffektive strategi til bekæmpelse af paratuberkulose, mens de tre mest anvendte managementimplementeringer ikke er rentable.

Nogle af udfordringerne ved sanering for paratuberkulose er blandt andet infektionens lange inkubationstid og manglende viden omkring udskillelsesmønstre og alder ved serokonvertering. Det kan være relevant at lave flere studier med fokus på påvisning af bakterien og antistoffer hos naturligt inficerede ungdyr for at forstå udskillelsesmønstre og indsatsområder i forhold til bekæmpelse af paratuberkulose. Antistoffer mod MAP i serum er påvist tre-fire måneder efter eksponering især ved tidlig inokulation og ved høj dosis (Mortier et al. 2014a). Samtidig er der i flere eksperimentelle studier påvist udskillelse af MAP i fæces hos 50% af de eksponerede ungdyr tre måneder efter inokulation (Mitchell et al. 2012) og muligheden for transmission ungdyr imellem (van Roermund et al. 2007; Corbett et al. 2017). Observationelle studier har påvist udskillelse af MAP blandt kvier i malkekvægsbesætninger, og at udskillelsen er afhængig af besætningsprævalensen (Weber et al. 2010; Bolton et al. 2011). Kalve født af ELISA-positive køer har øget risiko for at blive inficeret med MAP (Nielsen et al. 2016), og påvisning af smittede og smittefarlige ungdyr og udsætning af disse vil i teorien kunne mindske smittepresset i besætningen og samtidig reducere omkostninger for landmanden.

Målet med vores studium var at undersøge forekomsten og sammenhæng af antistoffer mod *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* i serum og MAP i fæces hos kvier født af henholdsvis høj- og lavrisiko-køer i danske malkekvægsbesætninger.

Formålene med studiet var at undersøge forekomsten af antistoffer og MAP hos kvier i alderen 6-26 måneder født i danske malkekvægsbesætninger og vurdere, hvorvidt udskillelse af MAP fra kvier udgør en smitterisiko i besætningen.

Teori

Litteratursøgning

Litteratursøgningen blev indledt med en systematisk søgetilgang, hvor de søgeord, der blev brugt, ses i tabel 1. Søgeordene blev inddelt i tre grupper; sygdom, diagnostik og ungdyr. Søgeordene i de tre grupper blev kombineret med OR, og efterfølgende blev de tre grupper kombineret med AND.

	AND		
	Sygdom	Diagnostik	Ungdyr
OR	Paratuberculosis	ELISA	Calves
	Johne's disease	Antibody response	Calf
	Johnes disease	Shedding	Heifer/-s
	<i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i>	Susceptibility PCR	

Tabel 1: Oversigt over anvendte søgeord. Søgeordene i kolonnerne blev kombineret med OR, og de tre kolonner blev kombineret med AND.

Litteratursøgningen blev foretaget i Ovid-databaser og Web of Science. Søgningen i Ovid-databaserne gav 358 artikler fra Agricola (1970 til marts 2018), AGRIS (1975 til september 2017), CAB abstracts (1910 til marts 2018), Embase (1974 til marts 2018) og OVID medline (1946 til marts 2018) efter afgrænsning til artikler skrevet på engelsk og fjernelse af duplikater. På baggrund af gennemlæsning af titel og abstract blev 39 artikler fundet relevante.

Søgning i Web of Science resulterede i 248 artikler. Efter gennemlæsning af titel og abstract blev 53 artikler fundet relevante. De relevante artikler fra begge søgninger blev importeret til et referenceprogram, og efter fjernelse af duplikater og artikler, der ikke kunne findes online, var der 41 artikler til grundigere gennemlæsning. 26 artikler fra den systematiske litteratursøgning anvendes i opgaven. Ved gennemlæsning af artiklerne findes yderligere relevante artikler ved hjælp af kædesøgning ud fra artiklernes referenceliste.

Patogenese for paratuberkulose

Efter oral optagelse af MAP passerer bakterien tarmvæggen via M-celler og optages herefter i makrofager. MAP-bakterien kan ved hjælp af forskellige mekanismer forhindre nedbrydelse i makrofagen og er således i stand til at overleve og replikere sig inde i makrofagen (Sigurardóttir et al. 2004). Hvis det derimod lykkes makrofagen at nedbryde bakterien, præsenteres den på celleoverfladen og initierer et cellemedieret immunrespons (Stabel 2000). Det

er således i den tidlige fase af infektionen, at det cellemedierede immunrespons dominerer, mens et humoralt immunrespons først optræder ved mere fremskreden infektion.

Det cellemedierede immunrespons domineres af CD4⁺ Th1-celler, der producerer cytokiner, blandt andet interferon-gamma (IFN- γ), som er vigtig i aktiveringen af makrofager. Senere overtager CD4⁺ Th2-celler, som producerer cytokiner vigtige for et humoralt immunrespons (Stabel 2000; Sigurardóttir et al. 2004). Det cellemedierede immunrespons undertrykker progression af infektionen, men ved tab af kontrol overtager det humorale immunrespons, og produktionen af antistoffer begynder. Antistoffer ved infektion med mykobakterier har ingen beskyttende funktion og anses som indikation på fremskredent infektionsstadium (Stabel 2000), og en stigning i det humorale immunrespons er korreleret med øget fækal udskillelse (Ganusov et al. 2015).

Udfordringer i bekæmpelse af paratuberkulose

Bekæmpelse af paratuberkulose er udfordret ved manglende viden omkring diagnostiske tests, transmission og dyrenes modtagelighed. Den minimale infektionsdosis for de forskellige aldersgrupper er ukendt, og det samme gælder for konsekvenserne og omfanget af *in utero* transmission samt betydningen af andre transmissionsruter. Derudover har man ikke kunne præcisere udskillelsesmønstre for MAP-inficerede dyr i de forskellige infektionsstadier (Barkema HW, Orsel K, Nielsen SS et al. 2017).

Manglende viden omkring transmissionen af MAP giver nogle udfordringer i forbindelse med udformning af et saneringsprogram og kan være en af årsagerne til, at kontrolprogrammer ikke altid opnår den ønskede effekt. Ukendte transmissionsveje kan være med til at opretholde infektionen i en besætning, og ved at kende transmissionsdynamikken for infektionen, vil det være muligt at bekæmpe den mere effektivt i besætningen.

Alder og infektionsdosis

Kalve under seks måneder er de mest modtagelige for smitte med MAP, mens kalve over seks måneder kræver en højere infektionsdosis. Køer kan blive inficeret med MAP, men det kræver høj infektionsdosis og forekommer hyppigst i et kraftigt kontamineret miljø, hvor eksponeringen er højest. Blandt køer, der smittes som voksne, er risikoen for at udvikle kliniske symptomer lavere end for køer, der er blevet smittet som kalv. Det tilskrives gentagen eksponering gennem livet og dermed højere resistens mod bakterien hos køer, og at især neonatale kalve er mere modtagelige for infektionen, da tarmvæggen er mere permeabel på grund af overførslen af immunoglobuliner. Desuden kan vommen have indflydelse på køers modtage-

lighed ved at fortynde mængden af bakterier, før de når tarmen (Windsor and Whittington 2010).

Den sande infektiøse dosis er ukendt, men Sweeney (2006) finder tegn på infektion efter tre uger hos kalve inokuleret med to doser á $1,5 \times 10^6$ cfu, og ingen tegn på tidlig infektion hos kalve inokuleret med 2×10^5 cfu. I eksperimentelle studier er dosis generelt høje, og i en meta-analyse af Mitchell et al. (2012) inddeles dosis i tre kategorier; lav ($\leq 10^7$ cfu), mellem ($> 10^7$ til $< 10^9$ cfu) og høj ($\geq 10^9$ cfu). 122 af 173 kalve i de inkluderede studier i metaanalysen modtager en dosis i den høje kategori, og retningslinjer for studier med eksperimentel infektion af kalve anbefaler en dosis på 10^9 cfu på to hinanden følgende dage, svarende til omkring 100 mg vådvægt per dosis (Hines et al. 2007). I tabel 2 ses en oversigt over studier med eksperimentel infektion af kalve og de anvendte doser. Kun ét af studierne anvender doser i den lave kategori.

Studie	Dosis
Lepper et al. 1989	200mg vådvægt delt i fire doser svarende til ^a 2×10^9 cfu oralt
McDonald et al. 1999	6g vådvægt delt i tre doser svarende til ^a 6×10^9 cfu oralt
Waters et al. 2003	$6,4 \times 10^7$ cfu delt i 16 doser i tonsillære krypter
Van Roermund et al. 2007	Opstaldning mellem MAP-udskillende køer i tre måneder
Bannantine et al. 2008	$6,4 \times 10^7$ cfu delt i 16 doser i tonsillære krypter
Kawaji et al. 2012	Forsøg 1: $5,1 \times 10^{10}$ cfu delt i tre doser oralt Forsøg 2: $2,1 \times 10^8$ - $3,3 \times 10^8$ cfu delt i tre doser oralt
Santema et al. 2012	$1,8 \times 10^4$ - $3,6 \times 10^5$ cfu (estimat) fordelt på ni doser oralt
Mortier et al. 2013 og 2014a+b	Lav dosis: 1×10^8 cfu delt i to doser oralt Høj dosis: 1×10^{10} cfu delt i to doser oralt
Corbett et al. 2017	5×10^8 cfu delt i to doser oralt
Begg et al. 2018	Forsøg 1: $9,6 \times 10^9$ cfu delt i tre doser Forsøg 2: $9,5 \times 10^9$ cfu delt i tre doser Forsøg 3: $1,37 \times 10^{10}$ cfu delt i tre doser
Corbett et al. 2018	Lav dosis: 1×10^8 cfu delt i to doser oralt Mellem dosis: 5×10^8 cfu delt i to doser oralt Høj dosis: 1×10^{10} cfu delt i to doser oralt

Tabel 2: Oversigt over doser anvendt i eksperimentelle studier nævnt i opgaven.

^a: under antagelse af, at 1mg vådvægt svarer til 10^7 cfu (Whittington et al. 2004)

Ved inokulation af kalve under ét år i forskellige aldersgrupper og ved forskellig dosis blev der påvist positive vævsprøver i alle alders- og dosisgrupper. Højere dosis gav sværere læsioner og flere områder i tarmepitelet med positiv dyrkning. Der var tegn på, at kalve inokuleret

under seks-måneders alderen havde flere positive vævsdyrknings og sværere histologiske læsioner (Mortier et al. 2013), men opfølgingsperioden var længere end for de ældre dyr, hvormed sammenligning af aldersgrupperne er vanskelig.

Betydning af koens status

Smitte fra ko til kalv umiddelbart efter kælvning anses for at være den vigtigste transmissionsrute for paratuberkulose (Sweeney 1996), og oral optagelse af MAP kan ske via fækal kontamineret miljø, kolostrum eller mælk fra smittefarlige køer. Der er evidens for, at moderdyrets status påvirker kalvens risiko for at blive smittet med MAP, og studier har vist en øget risiko for seropositivitet hos køer født af en seropositiv ko (Aly and Thurmond 2005; Woodbine et al. 2009; Nielsen et al. 2016). Nielsen et al. (2016) finder, at risikoen for at udvikle et antistofrespons er 2,5 gange større for køer født af køer, der tester ELISA-positiv før eller op til otte måneder efter kælvning, end blandt køer født af køer, der aldrig tester ELISA-positiv. Der ses signifikant større odds-ratio for udvikling af antistofrespons mod MAP hos datteren, hvis koen tester positiv før kælvning eller op til 0,67 år efter kælvning. Risikoen er tre gange større for køer født af køer, der tester ELISA-positiv adskillige måneder før kælvning, end for køer født af køer, der aldrig tester ELISA-positiv. Antognoli et al. (2007) har påvist øget forekomst af cellemidieret immunrespons i form af IFN- γ blandt kalve født af køer, der udskiller MAP i fæces omkring kælvningstidspunktet, hvilket tyder på, at kalve født af smittefarlige køer har øget risiko for at blive smittet. Styrken i studiet er dog lav, hvorfor der er brug for en større stikprøvestørrelse.

Der er ikke entydig evidens for, hvorvidt moderens infektionsstatus påvirker kalvens udskillelse af MAP i fæces. Bolton et al. (2011) finder en tendens til, at MAP udskillelse forekommer 2,3 gange oftere hos kvier født af ELISA-positiv køer sammenlignet med kvier født af ELISA-negative mødre. I en besætning med en prævalens på 6,5% baseret på ELISA-målinger er der fundet signifikant forskel på fækal udskillelse hos kalve født af køer, der udskiller MAP omkring kælvningstidspunktet, sammenlignet med kalve født af køer, der ikke udskiller MAP omkring kælvningstidspunktet med en relativ risiko på 4,7. Størstedelen af de MAP-positive kalve udskiller MAP i fæces omkring dag 180, og MAP kunne detekteres i fæces hos de samme kalve omkring dag 360 (Wiszniewska-Laszczych et al. 2017). Pithua et al. (2010) finder derimod ingen evidens for, at kalve født af køer, der udskiller MAP i fæces omkring kælvning, har øget risiko for at udskille MAP i fæces de første 90 levedøgn. I studiet indgår 60 ko-kalve par, men blot fem af disse køer (8%) udskiller MAP i fæces omkring

kælvningstidspunktet. Dermed er den eksponerede kohorte betydelig mindre end den ueksponerede kohorte, hvormed studiet muligvis mangler statistisk styrke.

Hvorvidt koens MAP-status øger risikoen for, at kalven udskiller MAP i fæces, er afhængig af prævalensen i besætningen. I lavprævalente besætninger øger koens MAP-status kalvens risiko for at udskille MAP i fæces, mens kalve, der vokser op i et kontamineret miljø, er i risiko for at udskille MAP i fæces uafhængigt af koens status (Woodbine et al. 2009; Eisenberg et al. 2015), hvilket formentlig skyldes højere smittepres i besætninger med høj prævalens og flere MAP-bakterier i miljøet. Samtidig er risikoen for serokonvertering og for udskillelse af MAP i fæces højere for køer født i fælles kælvningsbokse sammenlignet med køer født i enkelt kælvningsbokse (Pithua et al. 2013), hvilket formentlig hænger sammen med øget miljøkontaminering i fælles kælvningsbokse.

Påvisning af antistoffer

Et humoralt immunrespons i form af antistoffer er blevet påvist regelmæssigt hos kalve fra 10-12 måneder efter eksperimentel infektion ved brug af ELISA (Lepper et al. 1989), og nyere studier har vist mulighed for tidligere påvisning af antistoffer. I et longitudinelt studie med eksperimentel infektion af kalve i forskellige aldersgrupper fandt man ved brug af en kommerciel ELISA minimum én positiv ELISA-måling hos 21 ud af de 50 kalve svarende til 42%. Positive resultater optrådte tre-fire måneder efter inokulation. Alder ved infektion og infektionsdosis påvirker antistofresponsen, hvor kalve, der inficeres op til seks-måneders alderen, har stærkere antistofrespons, end dem der inficeres senere, og høj infektionsdosis resulterer i stærkere antistofrespons. Hos kalve, der inokuleres ved 12-måneders alderen, starter antistofproduktionen derimod tidligere efter inokulation, end hos de kalve, der inficeres ved yngre alder (Mortier et al. 2014a). En mulig forklaring er, at immunsystemet endnu ikke er fuldt udviklet hos helt unge dyr (Chase et al. 2008).

Hos ungvæg er der fundet forskellige antistof-respons-profiler; persisterende respons, bimodalt respons og peak-respons, men det er ikke alle kalves antistof-respons, der passer ind i en af de tre kategorier. Der er stor individuel variation i antistof-respons, og der er ikke fundet nogen tydelig sammenhæng mellem dosis eller alder ved infektion og antistof-respons-profiler (Kawaji et al. 2012; Mortier et al. 2014a).

Få studier har undersøgt forekomsten af MAP-antistoffer blandt naturligt inficerede ungdyr, men Woodbine et al. (2009) fandt en seroprævalens på omkring 8% blandt kalve op til tre måneder gamle og en seroprævalens på 4% hos kalve mellem tre og seks måneder, hvorefter

seroprævalensen falder til 0%. Ungdyrene i studiet viser seropositivitet igen efter 13-15 måneder, og når de er over 19 måneder.

Flere studier har fokus på at identificere nye antigener til tidligere detektion af MAP-smittede individer. I et studie med lipoarabinomannan-baseret ELISA findes et antistofrespons 134 dage efter eksperimentel infektion, mens en kommerciel ELISA ikke finder antistofrespons i serum i løbet af studiets 320 dage hos de tre inkluderede kalve (Waters et al. 2003). Ved brug af protein-baserede immuno-assays er der fundet antistofrespons tidligt efter inokulation; 70 dage efter eksperimentel infektion findes antistofrespons hos begge kalve i studiet af Bannantine et al. (2008), og det giver mulighed for udvikling af andre antigener til tidligere påvisning af MAP. Et antistofrespons mod MAP stress-associerede proteiner er blevet påvist allerede to uger efter inokulation, og disse stress-associerede proteiner spiller muligvis en rolle i et tidligt humoralt immunrespons mod MAP. 14 ud af 16 inokulerede kalve havde et positivt antistofrespons mod mindst én af de nyfundne antigener i løbet af 30 uger, mens kun to af 16 inficerede kalve i studiet havde et positivt antistofrespons baseret på en kommerciel ELISA (Kawaji et al. 2012). På nuværende tidspunkt er det ved brug af kommercielle ELISA først muligt at påvise et antistofrespons forholdsvist sent i infektionen, mens der eksperimentelt er vist mulighed for tidligere påvisning ved brug af nyfundne antigener.

Anvendelse af ELISA til diagnostik af paratuberkulose

Tidlig diagnostik af paratuberkulose er udfordret af den lange inkubationstid og usikre diagnostiske tests. Antistof-ELISA på mælk anvendes hyppigt i forskellige kontrolprogrammer for paratuberkulose, da den er hurtig og forholdsvist billig (Nielsen 2009b).

En lang række studier har undersøgt sensitivitet og specificitet for en række forskellige kommercielle antistof-ELISA, og både sensitivitet og specificitet varierer markant afhængig af sygdomsstadiet. Der er store variationer i studiedesign, testkomponenter og den sygdomstilstand, man undersøger for, og det gør sammenligning vanskelig (Nielsen og Toft 2008).

Sandsynligheden for påvisning af smittede dyr ved brug af antistof-ELISA øges med alderen, og der ses en tilnærmelsesvis lineær stigning fra 0,06 ved to-års alderen til 0,50 ved fem-års alderen, mens sandsynligheden for påvisning af smittefarlige dyr ved antistof-ELISA ikke er afhængig af alderen (Nielsen og Toft 2006). Muligheden for at påvise smittede ungdyr ved brug af antistof-ELISA er således udfordret af en meget lav diagnostisk sensitivitet hos dyr under to år, da det humorale immunrespons udvikles sent. Den diagnostiske sensitivitet for antistof-ELISA er højere hos dyr med klinisk paratuberkulose sammenlignet med dyr med latent infektion, viser en undersøgelse af fem kommercielle antistof-ELISA (Köhler et al.

2008). Ved anvendelse af kommercielle ELISA er der fundet falsk positive resultater, som skyldes miljømykobakterier (Osterstock et al. 2007), hvilket fører til lavere specificitet.

I Lepper et al. (1989) indgår eksperimentelt inficerede kalve med månedlige blodprøver til ELISA og fæcesprøver til dyrkning. Her vises, at der sker en udskillelse af MAP i fæces i en tidlig alder med høj forekomst omkring tre måneder, syv-otte måneder og igen omkring 20 måneders alderen. Resultaterne viser, at nogle kalve med høj udskillelse af MAP i fæces kan være negative i en ELISA, og at ELISA har lav sensitivitet, når det gælder kalve uden kliniske tegn på paratuberkulose. Derfor bør serum-ELISA ikke være den eneste diagnostiske test, der anvendes til påvisning af MAP-infektion hos ungdyr.

Udskillelse af MAP i fæces

Kalve kan udskille MAP i fæces helt ned til to uger efter inokulation med høj dosis, og jo yngre kalven er ved inokulation jo hyppigere udskilles MAP i fæces. Ved tidlig inokulation vil en høj dosis resultere i hyppigere udskillelse sammenlignet med lav dosis, mens denne sammenhæng ikke ses ved inokulation ved seks-måneders alderen eller over. Samtidig starter udskillelsen senere ved inokulation ved høj alder (Mortier et al. 2014b). En meta-analyse af eksperimentelle studier finder, at størstedelen af kalve, der udskiller MAP tidligt, starter udskillelse i løbet af seks måneder, og halvdelen er startet før tre måneder (Mitchell et al. 2012). Der er påvist udskillelse af MAP tidligere end to uger efter inokulation, men denne anses for at være passiv udskillelse af bakterien (Mortier et al. 2014b). Passiv udskillelse er påvist i op til syv dage efter eksperimentel infektion (Sweeney et al. 1992), men det anbefales, at udskillelse først anses som værende aktiv 14 dage efter inokulation (Hines et al. 2007). Selvom kalven ikke nødvendigvis er inficeret, kan den ved passiv udskillelse være med til at sprede smitten til andre modtagelige kalve.

Inokulationsdosis påvirker hyppigheden for udskillelse af MAP, men ikke mængden af bakterier, der udskilles. Kalve inokuleret med tre forskellige doser i intervallet 10^8 - 10^{10} cfu viste ingen signifikant forskel i mængden af MAP-bakterier udskilt, da de alle havde en aktiv udskillelse omkring 10^5 MAP/g fæces (Corbett et al. 2018). Kalve udskiller ikke MAP kontinuerligt (Lepper et al. 1989; Santema et al. 2012; Mortier et al. 2014b; Corbett et al. 2017; Begg et al. 2018). Santema et al. (2012) finder hyppig udskillelse af MAP op til 200 dage efter inokulation efterfulgt af stagnering i udskillelsen indtil omkring dag 500 efter inokulation, hvorefter nogle af kvierne genoptager udskillelse af MAP. Begg et al. (2018) finder fækal udskillelse hos 14/20 kastrater i perioden ni til 56 uger efter inokulation med top efter 21

uger, og kun to af disse blev persisterende udskillere. Samtidig giver højere dosis en tidligere og kraftigere infektion.

Der er fundet stor forskel på udskillelsesmønstre og udvikling af paratuberkulose blandt eksperimentelt og naturligt inficerede kvæg (Mitchell et al. 2015), hvor naturligt inficerede kvæg starter udskillelse senere end de eksperimentelt inficerede. En stor andel eksperimentelt inficerede kvæg bliver højudskillere og har flere skift mellem højt og lavt udskillelsesniveau. De naturligt inficerede kvæg er ofte lavudskillere eller intermitterende udskillere og kun en lille andel bliver højudskillere, hvilket ofte resulterer i udsætning.

Weber et al. (2010) forsøger at kvantificere aldersgrupperne for begyndende fæcesudskillelse af MAP i malkekvægsbesætninger i Holland. Studiet konkluderer, at alderen for påbegyndt udskillelse af MAP er kraftigt associeret med besætningsprævalensen. Kvæg i højprævalente besætninger har et yngre aldersgennemsnit for start af udskillelse af MAP end kvæg i lavprævalente besætninger. I besætninger med en tilsyneladende prævalens på $\geq 20\%$ baseret på dyrkning af fæces er andelen af kvæg, der starter udskillelse før to-års alderen estimeret til omkring 20%, mens det for besætninger med en tilsyneladende prævalens på 5-10% kun er omkring 4% af dyrene.

Bolton et al. (2011) tester ligeledes for MAP ved dyrkning af fæces fra kvier under to år og finder lige over halvdelen af de positive prøveresultater at stamme fra kvier i alderen 7-14 måneder. Der er kun en lille andel af de inkluderede kvier, der udskiller MAP i fæces (2%), og størst risiko for at teste positiv findes ved en besætningsprævalens på over 10% baseret på årlige ELISA-målinger på mælk. De foreslår at starte prøveindsamling fra kvier i 7-14 måneders alderen, hvis man ønsker at påvise MAP i fæces efter naturlig infektion.

Anvendelse af PCR til påvisning af MAP i fæces

Dyrkning på fæces anses som referencestandard til detektion af MAP i fæces, men PCR kan bruges som et hurtigere alternativ. PCR baseret på IS900 target-sekvensen bruges hyppigt, da den længe har været anset for at være specifik for MAP og have en relativ høj diagnostisk sensitivitet (Fang et al. 2002). Dog tyder studier på, at andre Mykobakterier har gensekvenser, der ligner IS900 så meget, at det kan give anledning til falsk positive resultater og dermed lavere diagnostisk specificitet (Cousins et al. 1999; Englund et al. 2002; Tasara et al. 2005). Ved anvendelse af IS900 til påvisning af MAP findes langt flere dyr positive, end hvis targetsekvensen f57 eller dyrkning anvendes (Wolf et al. 2015), hvilket kan skyldes den lave detektionsgrænse for IS900 eller falsk positive reaktioner. Et alternativ til IS900 kan være ISMAP02, da den anses som værende MAP-specifik (Paustian et al. 2004; Sevilla et al.

2014). IS900 forekommer 14-18 gange i genomet, mens ISMAP02 forekommer 6 gange (Bull et al. 2000; Paustian et al. 2004; Stabel and Bannantine 2005), hvorfor den diagnostiske sensitivitet i teorien må være højere og den diagnostiske specificitet lavere ved brug af IS900 frem for ISMAP02. Ved at bruge IS900 og ISMAP02 som targetsekvenser samtidig vil man kunne øge den diagnostiske sensitivitet og specificitet ved påvisning af MAP, eventuelt i kombination med f57 (Irenge et al. 2009).

I en sammenligning af fækale DNA ekstraktionskits for IS900 og ISMAP02 i Leite et al. (2013) findes, at den diagnostiske sensitivitet for IS900 er op til 94,1% og for ISMAP02 76,5% alt efter, hvilket DNA ekstraktionskit, der anvendes. Generelt er der stor forskel i diagnostisk sensitivitet mellem de forskellige ekstraktionskits, så det har stor betydning, hvilken man anvender til detektion af MAP især ved lave koncentrationer. Ved lave koncentrationer af MAP anbefales det at køre prøverne gentagne gange for at øge sandsynligheden for påvisning af bakterien (Fock-Chow-Tho et al. 2017).

Transmission mellem kalve

Ifølge Mortier et al. (2014b, 2013) bør kalve op til ét år gamle anses som værende både modtagelige for smitten og smittefarlige, hvis man ønsker at bekæmpe paratuberkulose. McDonald et al. (1999) mener ikke, at kalve, der udskiller MAP, bidrager til kraftig miljøkontaminering, men at de stadig kan udgøre en smitterisiko for modtagelige kalve, hvis de står i gruppeopstaldning.

Under eksperimentelle forhold er der påvist transmission fra inficerede kalve til naive kalve i gruppeopstaldning. I 50% af de naive kalve kunne man, efter tre måneder i gruppeopstaldning med eksperimentelt inficerede kalve, påvise MAP fra vævsprøver ved dyrkning. De naive kalve udskilte MAP i fæces færre gange end de eksperimentelt inficerede dyr og havde samtidig færre positive vævsprøver. Efter gruppeopstaldningen blev de naive kalve opstaldet individuelt i yderligere tre måneder, og i denne periode udskilte ingen af kalvene MAP i fæces. Dette kan være tegn på, at den fækale udskillelse i gruppeopstaldningsperioden var passiv udskillelse og ikke aktiv udskillelse forårsaget af en infektion. Det kan dog være et resultat af nedsat hyppighed for prøveindsamling efter endt gruppeopstaldning (Corbett et al. 2017), eftersom den fækale udskillelse kan være intermitterende (Mortier et al. 2014b). De positive vævsprøver er en indikation på, at der er sket en infektion af naive kalve, men det er vanskeligt at afgøre, hvorvidt den fækale udskillelse er aktiv eller passiv. Selvom kalve er i stand til at udskille MAP til miljøet, udgør det kun en lille smitterisiko for de andre kalve i gruppen (Santema et al. 2012).

Naive kalve opstaldet i tæt kontakt med smittede køer, der udskiller MAP i fæces, kan efterfølgende overføre infektionen til andre naive kalve i gruppeopstaldning. Denne opsætning viser både horisontal transmission fra ko til kalv, men også transmission fra kalv til kalv (van Roermund et al. 2007). Kalvene eksponeres kraftigt i en lang periode, hvilket ikke afspejler de almindelige opstaldningsforhold i malkekvægsbesætninger. Således er betydningen for transmission mellem kalve under naturlige forhold stadig ukendt.

Materialer og metoder

Studiedesign

Studiet er et observationelt retrospektivt kohortestudium, hvor kvierne er inkluderet i studiet på baggrund af deres eksponeringsstatus (Houe 2004). I studiet indgår tre kohorter af kvier; en høj-eksponeret kohorte, en middel-eksponeret kohorte og en lav-eksponeret kohorte. Den høj-eksponerede kohorte består af højrisiko-kvier - kvier født af højrisiko-køer, som er køer med positive ELISA-reaktioner for MAP i mælk, i højprævalente besætninger. Den middel-eksponerede kohorte består af lavrisiko-kvier - kvier født af lavrisiko-køer, som er køer uden positive ELISA-reaktioner for MAP i mælk, i højprævalente besætninger. Den lav-eksponerede kohorte består af lavrisiko-kvier i lavprævalente besætninger. I tabel 3 ses en oversigt over de tre kohorter.

Kohorte	Høj-eksponeret	Middel-eksponeret	Lav-eksponeret
Besætningsprævalens	Høj (3-8%)	Høj (3-8%)	Lav (0-2%)
Moderdyrets status	Højrisiko-ko	Lavrisiko-ko	Lavrisiko-ko
Eksponering	Høj	Middel	Lav

Tabel 3: Oversigt over de tre kohorter med deres besætningsprævalens, moderdyrets status og eksponeringsgrad. En ko, der er testet ELISA-positiv, anses som en højrisiko-ko, mens en ko uden positive ELISA-resultater er en lavrisiko-ko.

Rammer og population

I februar 2018 blev inklusionskriterier formuleret og besætninger, der mødte disse kriterier, blev kontaktet. Prøverne blev indsamlet i perioden 5. – 9. marts 2018 i malkekvægsbesætninger i Midt- og Sydjylland.

Inklusionskriterierne er deltagelse i Operation Paratuberkulose, besætningsstørrelse på minimum 150 køer, Salmonella Dublin Niveau 1, fri for Bovin Virus Diarré og beliggende i en afstand på maksimalt 100 km fra Brørup eller Tinglev.

Høj-eksponeret kohorte

Kvierne i den høj-eksponerede kohorte blev udvalgt ud fra moderdyrets ELISA-målinger på mælk. Prøver med en ELISA-værdi på 0,0 til 0,3 anses som negative, mens prøver med en ELISA-værdi over 0,3 sandsynligvis er positive. Kvierne blev udvalgt til den høj-eksponerede kohorte ud fra udskriften *ParaTB Risikokalve*, hvor kalve født af højrisiko-køer samt moderdyrets ELISA-målinger før og i de første to målinger efter kælvning fremgår. Kvier i alderen 6-26 måneder født af køer med de højeste resultater i målingen før kælvning eller de to første målinger efter kælvning blev valgt til prøveindsamling.

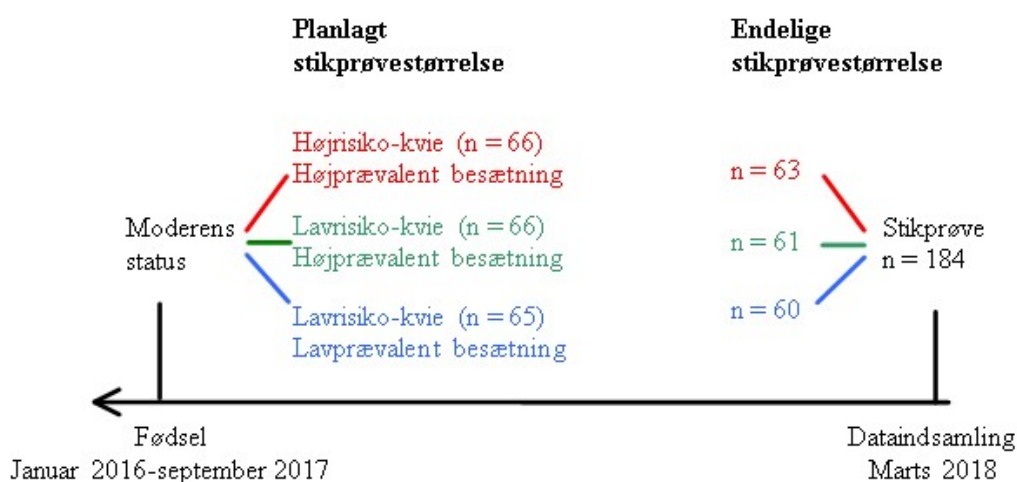
Middel-eksponeret kohorte

Fra de samme højprævalente besætninger som den høj-eksponerede kohorte blev udvalgt samme antal kvier født af lavrisiko-køer. Ved hjælp af CHR-registerets besætningsliste blev der for hver kvie i den høj-eksponerede kohorte udvalgt en jævnaldrende lavrisiko-kvie, der var født indenfor \pm fem dage. Lavrisiko-kvien var så vidt muligt født umiddelbart før højrisiko-kvien.

Lav-eksponeret kohorte

Ved hjælp af CHR-registerets besætningsliste blev der for hver kvie i den høj-eksponerede kohorte udvalgt en jævnaldrende lavrisiko-kvie i en lavprævalent besætning, der var født indenfor \pm fem dage. Så vidt muligt var lavrisiko-kvien født umiddelbart før højrisiko-kvien.

En oversigt over studiedesign er illustreret i figur 1.



Figur 1: Studiedesign og stikprøvestørrelse. Til venstre ses den forudsete stikprøvestørrelse i hver af de tre kohorter. Til højre ses den endelige stikprøvestørrelse for hver kohorte. Tidslinjen repræsenterer retrospektivt studiedesign, da kvierne er udvalgt 6-26 måneder efter fødsel ud fra deres eksponering ved fødsel. En højrisiko-kvie er en kvie født af en ko med positive ELISA-målinger omkring kælvning, og en lavrisiko-kvie er en kvie født af en ko uden positive ELISA-målinger omkring kælvning.

Prøveindsamling

Forud for prøveindsamlingen blev der telefonisk indsamlet information om kælvningsbokse, håndtering af paratuberkulose-køerne omkring kælvning og håndtering af mælken fra disse køer. Antal årskøer og ydelse blev indhentet fra DMS nøgletalstjek.

Der blev indsamlet fæcesprøve, rektalsvaber og blodprøve fra kvierne. Fæcesprøven blev indsamlet rektalt med engangshandske, og hvis der ikke kunne stimuleres fæcesafgang, blev prøven indsamlet fra toppen af en nylig afsat kokasse observeret afsat under prøveindsamling. Svaberprøven blev podet ved at indføre svaberen i endetarmsåbningen og køre rundt på slimhinden. Der blev anvendt ENat® svabere indeholdende 1ml Guanidin thiocyanat fra Copan (Brescia, Italien). Blodet blev udtaget i et 10 ml BD vacutainer® (New Jersey, USA) serumrør med clot activator. Før udtagning af blodprøven blev området klargjort med overfladedesinfektion. Praktiske forhold afgjorde, om blodprøven blev udtaget fra halevenen eller jugularvenen. Alle prøver blev opbevaret i termokasser ved temperatur mellem 2 og 12 grader, helst omkring 2-4 grader. Den 9. marts blev fæcesprøver og svabere afleveret hos DNA Diagnostic i Risskov, og blodprøverne blev afleveret hos Eurofins Steins laboratorium i Vejen.

Forklarende variable

De forklarende variable i studiet er alder i måneder, eksponering og besætningsprævalens. Eksponering er afgjort ud fra moderdyrets risikostatus og besætningsprævalens. En kvie født af en højrisiko-ko i en højprævalent besætning anses for at være høj-eksponeret, mens kvier født af lavrisiko-køer i højprævalente besætninger er middel-eksponerede, og kvier født af lavrisiko-køer i lavprævalente besætninger er lav-eksponerede.

Diagnostiske tests og outcome

Antistof-ELISA

Til påvisning af MAP-antistoffer i serum hos Eurofins Steins laboratorium blev der anvendt ID Screen® Paratuberculosis Indirect fra ID.vet (Grabels, Frankrig). Det er en indirekte absorberet ELISA med oprenset MAP ekstrakt som antigen. ELISA-resultaterne angives som en S/P%. Værdier under eller lig med 60% anses som negative, værdier over 60% og under 70% er inkonklusive, og værdier over eller lig med 70% anses som positive.

DNA Diagnostic MAP qPCR

Til analyse af svabere og fæcesprøver for MAP blev der anvendt en multiplex qPCR med targetsekvenserne IS900 og ISMAP02 under udvikling hos DNA Diagnostic (Risskov). Ana-

lysen indeholder en IAC (Internal Amplification Control), og der blev inkluderet en positiv og negativ kontrol.

Resultaterne angives i Ct-værdier, hvor prøver med en Ct-værdi under eller lig med 37 anses som positiv, mens prøver med en Ct-værdi over 37 anses som negative. Ct-værdi over eller lig med 35 for IAC gør prøven ugyldig, hvor den bør fortyndes med en faktor 10 og køres i qPCR igen. Der køres 40 runder. En oversigt over anvendt ekstraktionskit, lyseringsmetode og PCR kit i analysen ses i tabel 4.

	Ekstraktionskit	Lyseringsmetode	PCR kit
Alle fæces- og svaberprøver	DNA Diagnostic MAP DNA extraction (under udvikling – baseret på centrifugering)	DNA Diagnostic MAP lysis (enzymatisk lysis + varmelysis)	DNA Diagnostic MAP qPCR
Otte udvalgte højrisikoprøver	QIAamp® cador® Pathogen Mini Kit (spin-column baseret) (Qiagen, Tyskland)	Precellys 24 med Precellys VK01 rør (mekanisk lysis) (Bertin Corp., Rockville, MD)	Qiagen MAP qPCR

Tabel 4: Oversigt over ekstraktionskit, lyseringsmetode og PCR kit i de to qPCR-analyser for MAP. Alle fæces- og svaberprøver blev analyseret med DNA Diagnostics MAP qPCR, og otte prøver fra højrisiko-kvier blev udvalgt til yderligere analyse med Qiagen MAP qPCR.

Qiagen MAP qPCR

Efter første analyse af alle fæcesprøver med multiplex qPCR blev otte højrisikokvier med stor risiko for udskillelse udvalgt til analyse med Qiagen MAP qPCR. En oversigt over ekstraktionskit, lyseringsmetode og PCR kit ses i tabel 4. Kriterier for udvælgelse var en alder på 6-12 måneder eller over 20 måneder samt høje ELISA-målinger hos moderdyret omkring kælving.

Der blev inkluderet negativ og positiv kontrol samt en IAC i analysen. Med denne metode var prøver med en Ct-værdi under eller lig med 35 positive, mens prøver med en Ct-værdi over 35 anses som negative.

Definition af sygdomstilstande

Sygdomstilstandene smittet og smittefarlig er defineret af Nielsen og Toft (2008). Smittede kvier er inficeret med MAP og har udviklet et påviseligt immunrespons. De er dermed ELISA-positive. PCR-positive kvier kan være smittede, men da udskillelse kan være passiv, er et positivt PCR-resultat ikke ensbetydende med infektion.

Smittefarlige kvier udskiller MAP i fæces og udgør dermed en smitterisiko for modtagelige dyr. Smittefarlige kvier er PCR-positive, men ikke nødvendigvis ELISA-positive, da de kan være passive udskillere eller endnu ikke er serokonverteret.

Bias

Aldersbaseret selektionsbias er forsøgt elimineret ved at aldersmatche kvierne således, at aldersfordelingen bliver ens i alle tre kohorter. Aldersgruppen er valgt ud fra eksisterende litteratur.

Healthy-worker effekten er undersøgt for ved gennemgang af besætningernes udsættelser og salg af ungdyr. Ingen af de inkluderede besætninger udsætter systematisk risikokalve.

De tilgængelige diagnostiske tests til påvisning af paratuberkulose har varierende sensitivitet og specificitet. Det kan give risiko for misklassifikation af sygdomsstatus, hvilket er et generelt problem ved diagnostik af paratuberkulose.

Stikprøvestørrelse

Den planlagte stikprøvestørrelse i studiet var 197 kvier fordelt på tre kohorter; 66 kvier i den høj-eksponerede kohorte, 66 kvier i den middel-eksponerede kohorte og 65 kvier i den lav-eksponerede kohorte. Med antagelse om, at nogle kvier udgår under prøveindsamlingen, laves beregningerne med en stikprøvestørrelse på 60 kvier i hver kohorte.

Stikprøveberegninger til detektion af positive kvier i den høj-eksponerede kohorte

Risikoen for at være smittet med paratuberkulose er størst i den høj-eksponerede kohorte (Nielsen et al. 2016). Populationen af højrisiko-kvier i aldersgruppen 6-26 måneder i de inkluderede besætninger er 139 kvier. En stikprøvestørrelse til påvisning af sygdom i en population er givet ved (Houe 2004):

$$n = \left(1 - (1 - P)^{\frac{1}{D}}\right) * \left(N - \frac{D - 1}{2}\right)$$

Hvor n er stikprøvestørrelsen, P er sandsynligheden for at påvise minimum ét positivt dyr, D er forventet antal positive dyr i populationen, og N er populationsstørrelsen. I en population på 139 vil det kræve minimum fem positive dyr i populationen for med 95% sikkerhed at kunne påvise minimum ét positivt dyr med en stikprøve på 60.

$$60 = \left(1 - (1 - 0,95)^{\frac{1}{D}}\right) * \left(139 - \frac{D - 1}{2}\right)$$

↓

$$D = 5,2$$

Med fem positive dyr i en population på 139 vil prævalensen være:

$$p = \frac{D}{N} = \frac{5}{139} = 0,036$$

Med en stikprøvestørrelse på 60 skal prævalensen i den høj-eksponerede kohorte være minimum 3,6% for med 95% sikkerhed at kunne påvise minimum ét positivt dyr. En lavere prævalens vil dermed kræve en større stikprøve.

Beregningerne antager, at den diagnostiske sensitivitet og specificitet er 100%. Den diagnostiske specificitet anses generelt for at være høj (Nielsen og Toft 2008), mens sensitivitet varierer. Ved brug af PCR antages høj diagnostisk sensitivitet for påvisning af MAP i fæces og dermed påvisning af smittefarlige kvier (Fang et al. 2002; Taddei et al. 2004; Ireng et al. 2009).

For påvisning af smittede kvier ved brug af antistof-ELISA antages den diagnostiske sensitivitet at være lav på grund af sen udvikling af antistofrespons. Ved en sensitivitet på 0,06 til påvisning af smittede kvier omkring to-års alderen (Nielsen og Toft 2006) vil den tilsyneladende prævalens være $p * Se$ og dermed vil antal påviselige smittede dyr være (Houe 2004):

$$D = Se * p * N = 0,06 * 0,036 * 139 = 0,3$$

Hvor Se er testsensitivitet, p er prævalensen, D er forventet antal positive i populationen og N er populationsstørrelse. Stikprøvestørrelsen skal i dette tilfælde være langt større på grund af lav sandsynlighed for påvisning af smittede dyr.

$$n = \left(1 - (1 - 0,95)^{\frac{1}{0,3}}\right) * \left(139 - \frac{0,3 - 1}{2}\right) = 139$$

For at påvise smittede dyr i populationen kræves således alle dyr undersøgt.

Stikprøveberegning til test af relativ risiko

Stikprøvestørrelse til test af en given relativ risiko kan beregnes ved brug af følgende formel:

$$n = \frac{\left(Z_{1-\alpha} * \sqrt{\left(2 * \frac{p * (RR + 1)}{2}\right) * \left(1 - \frac{p * (RR + 1)}{2}\right)} + Z_{\beta} * \sqrt{RR * p * (1 - RR * p) + p * (1 - p)}\right)^2}{(RR - 1)^2 * p^2}$$

Hvor n er stikprøvestørrelse, p er prævalens, RR er relativ risiko, signifikansniveau er 5% i en ensidig test ($Z_{1-\alpha} = 1,64$), og styrken er 80% ($Z_{\beta} = 0,84$) (Houe 2004). I tabel 5 ses stikprøvestørrelser ved forskellig prævalens og relativ risiko.

Med en stikprøvestørrelse på 61 kvier i hver kohorte og en prævalens på 4% i referencegruppen kan påvises en relativ risiko på 4,5. Hvis den relative risiko er mindre, vil den derfor ikke kunne påvises med denne stikprøvestørrelse. Ønskes en relativ risiko på 2,5 (Nielsen et al. 2016) påvist, skal prævalensen i referencegruppen være 12,5% med en stikprøvestørrelse på 60 kvier i hver kohorte.

RR	Stikprøvestørrelse (n)						
	Prævalens (p)						
	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1	0,15	0,2
1,5	3013	1468	953	695	540	334	231
2,5	463	223	143	103	79	47	31
4	163	77	48	34	25	14	8
4,5	131	61	38	26	20	10	6
8	51	23	13	8	6	-	-

Tabel 5: Stikprøvestørrelser ved forskellige kombinationer af prævalens og relativ risiko.

Post hoc stikprøveberegning

På baggrund af negative resultater på samtlige prøver kan udføres beregninger til at finde, hvor mange positive kvier, der maksimalt kan være i den høj-eksponerede kohorte med følgende formel:

$$D = \left(1 - (1 - P)^{\frac{1}{n}}\right) \left(N - \frac{n - 1}{2}\right)$$

Hvor D er forventet antal positive, P er sandsynligheden for at påvise minimum ét positivt dyr, N er populationsstørrelse og n er stikprøvestørrelse (Houe 2004).

I tilfælde af at alle kvier tester negativt, vil den maksimale prævalens p i den høj eksponerede kohorte været givet ved (Houe 2004):

$$p = \frac{D}{N}$$

Resultater

Besætninger og dyr

22 højprævalente besætninger mødte inklusionskriterierne, og ud af dem var 13 interesseret i at deltage i projektet. Fem besætninger blev fravalgt; to på grund af deres beliggenhed, én besætning på grund af udsætning af højrisiko-kvier, én besætning på grund af manglende kontakt og den sidste på grund af manglende mulighed for deltagelse i dataindsamlingsperioden. De otte højprævalente besætninger har en tilsyneladende prævalens på 3-8% af ELISA-positive køer i seneste måling.

Ud fra inklusionskriterierne blev fem besætninger udvalgt med en prævalens på 0 for ELISA-positive køer i de to seneste målinger. Deraf blev tre kontaktet, hvoraf én besætning måtte udgå, da den havde højrisiko-kvier i besætningen. De to lavprævalente besætninger har en tilsyneladende prævalens på højst 2% og nul køer, der er testet positiv i de to seneste målinger. Kvier fra de to sidstnævnte besætninger udgør den lav-eksponerede kohorte.

Besætningerne har mellem 157 og 1082 årskøer og en årsydelse mellem 8992 og 11393 kg EKM pr ko. Syv besætninger har fælles kælvningsbokse, mens de resterende tre anvender enkelt kælvningsbokse. Én af besætningerne har separate kælvningsbokse til køer med paratuberkulose, og de resterende ni har ingen separate kælvningsbokse til højrisiko-køer. Én ud af ti af besætningerne bruger råmælk fra højrisiko-køer til fodring af kviekalvene. Tabel 7 viser en oversigt over de deltagende besætninger. Ydelse og antal årskøer stammer fra DMS nøgletalstjek for perioden marts 2017 til februar 2018.

Kvierne

Der blev indsamlet prøver fra 180 kvier og fire nykælvende i 10 forskellige besætninger deltagende i Operation Paratuberkulose. Figur 1 i afsnittet om materialer og metoder giver et overblik over den planlagte og endelige stikprøvestørrelse.

Høj-eksponerede kohorte

139 kvier i de højprævalente besætninger i aldersgruppen 6-26 måneder er født af en højrisiko-ko. Ud af de 139 blev der udvalgt 66 kvier født af køer med de højeste målinger, hvorfra tre kvier udgik; én var blevet solgt, og to kunne ikke findes. Således blev der i alt indsamlet prøver fra 63 høj-eksponerede kvier født af 62 højrisiko-køer, da der indgår et tvillingepar. Der blev indsamlet 63 fæcesprøver, 63 svabere og 62 blodprøver fra kohorten, da det ikke var muligt at få en blodprøve fra én af kvierne. To af svaberne blev ikke analyseret på grund af for lidt indhold i mediet.

Alle moder-køer har maksimalt én måling under 0,4 og resten over. Fem køer har ingen ELISA-måling før kælvning, men har høje værdier i de to målinger efter kælvning. Syv køer har kun én ELISA-måling; én på 0,8 og resten på 1,8 eller derover. Fire køer er ELISA-negative før kælvning, men positive efter kælvning, og fire andre køer har én negativ måling efter kælvning. I bilag 1 ses en oversigt over alle inkluderede kvier samt højrisiko-køernes ELISA-målinger.

Middel-eksponerede kohorte

Der blev udvalgt 66 kvier født af lavrisiko-køer i de otte højprævalente besætninger. Heraf udgik fem kvier; én var blevet solgt, og fire kunne ikke findes. Der blev indsamlet 61 fæcesprøver, 61 svabere, 61 blodprøver. Én af fæcesprøverne blev ikke afleveret og én af svaberne blev ikke analyseret på grund af for lidt indhold i mediet.

Lav-eksponerede kohorte

I de to lavprævalente besætninger blev der udvalgt 65 kvier, hvoraf der udgik fem kvier; én kunne ikke indfanges, og de andre fire kunne ikke findes. Der blev indsamlet 60 fæcesprøver, 60 svabere og 60 blodprøver fra den lav-eksponerede kohorte. I tabel 6 ses antal analyserede prøver for hver kohorte.

Antal prøver i hver kohorte	Svabere	Fæcesprøver	Blodprøver
Høj-eksponeret	61	63	62
Middel-eksponeret	60	60	61
Lav-eksponeret	60	60	60
I alt	181	183	183

Tabel 6: Oversigt over antal analyserede prøver i de tre kohorter.

Besætningsnummer	Racefordeling	Antal årskøer	Årsydelse pr. ko (kg EKM)	Tilsyneladende prævalens ^a	Sand prævalens ^b	Kælvningsboks	Kælvning højrisikokøer	Fjernelse af kalv	Håndtering af råmælk	Antal kvier i studiet	Reduceret prøveudtagning
1 ^c	51% Krydsning 47% Holstein 2 % RDM	493	10.491	4%	5%	Fælles	Ingen separat kælvningsboks til højrisikokøer.	Lige efter fødsel	Ingen råmælk fra højrisikokøer til kviekalve.	17	Siden 18.06.2009
2	89% Holstein 8% Krydsning 3% RDM	1082	11.168	3%	3%	Enkelt	Separate kælvningsbokse til højrisikokøer	Hurtigst muligt	Ingen hensyntagen til køens status	12	Siden 23.07.2009
3	78 % Holstein 19% Krydsning 3% RDM	313	10.234	6%	8%	Fælles	Ingen separat kælvningsboks til højrisikokøer. Mange højrisikokøer kælver i stalden.	Lige efter fødsel	Ingen råmælk fra højrisikokøer til kviekalve.	6	Siden 09.01.2014
4	99,5 % Jersey 0,5% krydsning	454	9.604	4%	5%	Enkelt	Ingen separat kælvningsboks til højrisikokøer.	Hurtigst muligt	Ingen råmælk fra højrisikokøer til kviekalve.	10	Siden 01.01.2010
5	94% Holstein 6 % krydsning	308	9.902	8%	12%	Fælles	Ingen separat kælvningsboks til højrisikokøer.	Indenfor 24 timer.	Ingen råmælk fra højrisikokøer til kviekalve.	8	-
6	98% Holstein 2% Krydsning	468	11.393	4%	5%	Enkelt	Ingen separat kælvningsboks til højrisikokøer.	Hurtigst muligt	Ingen råmælk fra højrisikokøer til kviekalve.	8	Siden 12.07.2009

7	97,5% Jersey 2,5% Krydsning	491	9.829	6%	8%	Fælles	Ingen separat kælvningsboks til højrisiko-køer.	Hurtigst muligt	Ingen råmælk fra højrisiko-køer til kviekalve.	10	-
8	96% Jersey 4% Krydsning	1068	9.240	7%	10%	Fælles	Ingen separat kælvningsboks til højrisiko-køer.	Hurtigst muligt	Ingen råmælk fra højrisiko-køer til kviekalve.	53	Siden 30.09.2015
9 ^c	97% Jersey 3% Krydsning	157	8.992	0%	2%	Fælles	Ingen separat kælvningsboks til højrisiko-køer. Strøer mellem kælvninger	Hurtigst muligt	Ingen råmælk fra højrisiko-køer til kviekalve.	33	Siden 01.12.2015
10	93% Holstein 7% Krydsning	371	10.956	2% ^d	2%	Fælles	Ingen separat kælvningsboks til højrisiko-køer.	Hurtigst muligt	Ingen råmælk fra højrisiko-køer til kviekalve.	27	-

Table 7: Oversigt over besætninger. Besætning 1-8 er de højprævalente besætninger, og 9-10 er de lavprævalente besætninger.

a. Prævalens for køer, der er testet positiv ved seneste kontrol.

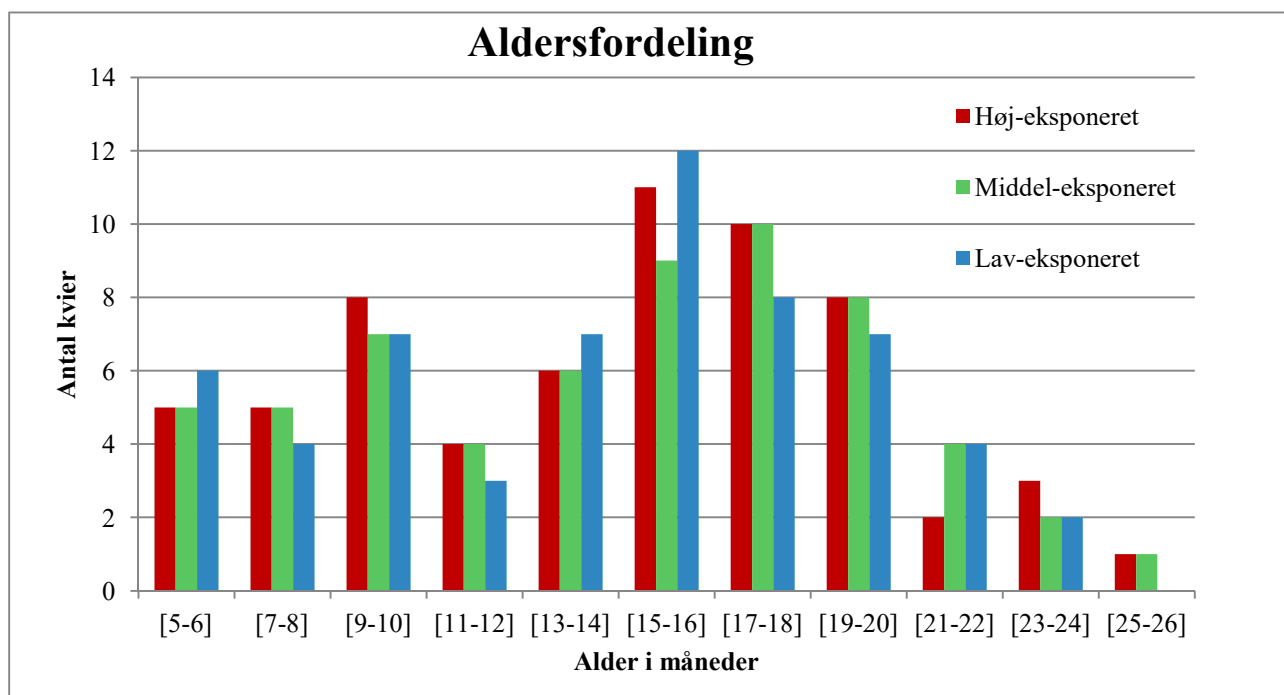
b. Udregnet ud fra $sand\ prævalens = \frac{tilsyneladende\ prævalens + Sp -}{Sp + Se - 1}$ og en diagnostisk sensitivitet på 60% (Kirkeby et al. 2015).

c. Økologiske besætninger.

d. Ingen køer, der er ELISA-positive i de seneste to målinger.

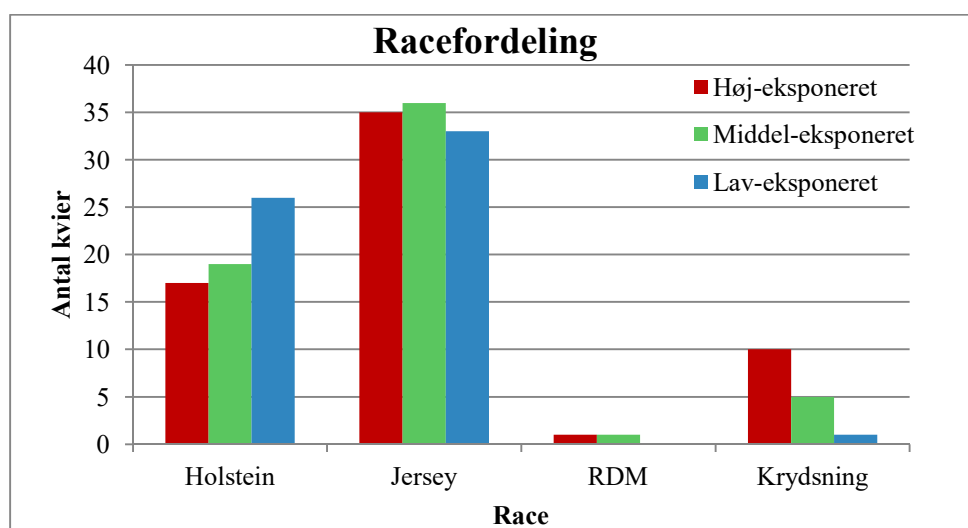
Alders- og racefordeling

Den yngste kvie var 5,9 måneder og den ældste 25,7 måneder ved prøveindsamling. Fordelingen af alderen i de tre kohorter er illustreret i figur 2. Medianen for høj-eksponeret, middel-eksponeret og lav-eksponeret er henholdsvis 15,1, 16,1 og 15,6 måneder.



Figur 2: Aldersfordeling for kvierne i den endelige stikprøve i de tre kohorter.

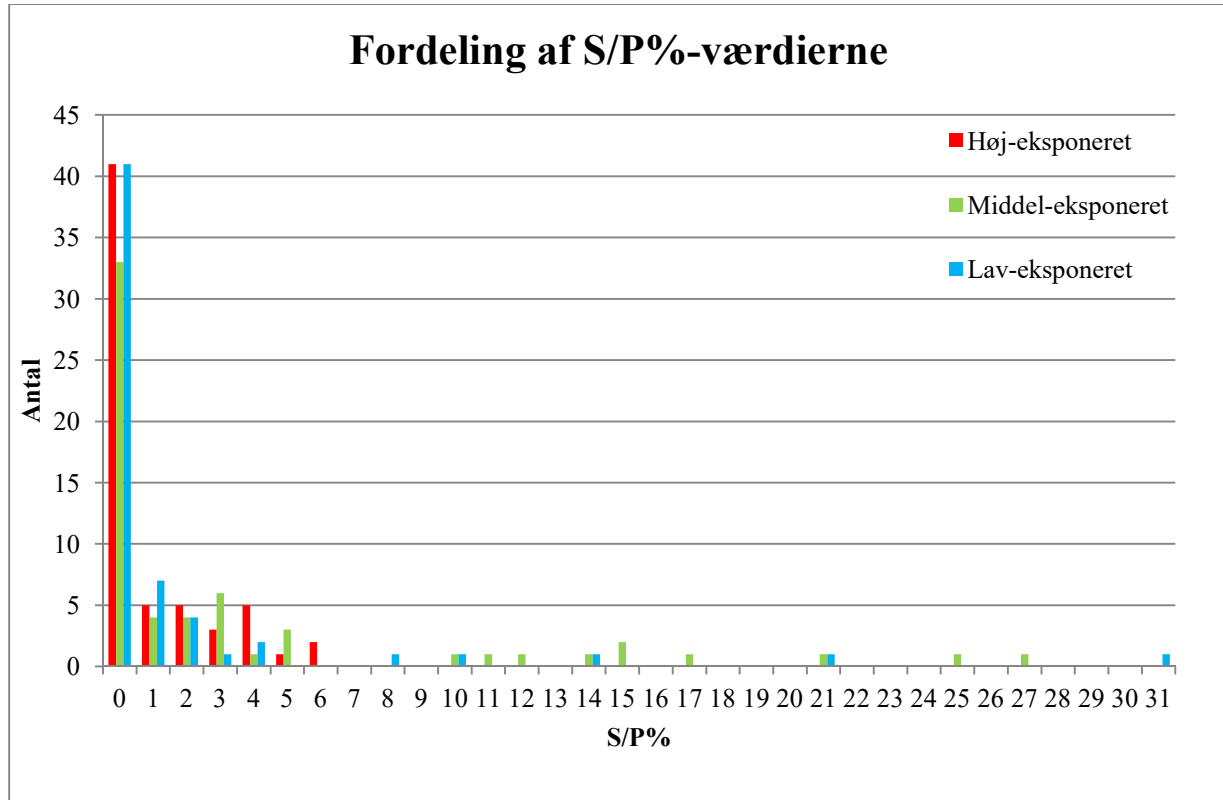
Racefordelingen var 104 Jersey, 62 Holstein, 16 krydsninger og to RDM. Racefordelingen for de tre kohorter ses i figur 3.



Figur 3: Racefordeling i den endelige stikprøve i de tre kohorter.

Påvisning af antistoffer i serum ved brug af ELISA

Alle antistof-ELISA på serum var negative. S/P%-værdierne ligger i intervallet 0-31 med en median i alle tre kohorter på 0. Fordelingen af S/P% ses i figur 4, og værdierne for de enkelte kvier ses i bilag 1.



Figur 4: Fordelingen af S/P% for serum-ELISA i de tre kohorter. Værdier under eller lig med 60% anses som negative.

Påvisning af MAP i fæces ved brug af qPCR

DNA Diagnostic MAP qPCR

Ud af de 184 rektalsvabere var 181 negative og tre ugyldige. Alle 183 fæcesprøver var negative. 65 af fæcesprøverne var ugyldige efter første analyse i qPCR, og efter fortynding med en faktor 10 blev de analyseret igen. Seks af de 65 krævede endnu en fortynding med en faktor 10, før de testede negative. Resultater på svabere og fæcesprøver for de tre kohorter ses i tabel 8 og i bilag 1 ses resultaterne for alle kvier på individniveau.

	Rektalsvabere				Fæcesprøver			
	Positive	Negative	Ugyldige	Ej analyseret	Positive	Negative	Ugyldige	Ej analyseret
Høj-eksponeret	0	60	1	2	0	63	0	0
Middel-eksponeret	0	60	0	1	0	60	0	1
Lav-eksponeret	0	58	2	0	0	60	0	0

Tabel 8: Oversigt over resultaterne for påvisning af MAP ved brug af DNA Diagnostic MAP qPCR for rektalsvabere og fæcesprøver fordelt på de tre kohorter.

Qiagen MAP qPCR

Alle prøver var negative. I én af de otte prøver blev der påvist lave mængder MAP DNA med en Ct-værdi på 36. De resterende syv prøver viste intet respons i løbet af 40 runder. Resultaterne for de enkelte kvier ses i tabel 9.

Kvien			Moderdyrets ELISA-værdier			Qiagen qPCR
Nr.	Alder i mdr.	Race	Før klvn.	1. efter klvn.	2. efter klvn.	
19	6,3	Holstein	1,5	1,6	-	Negativ
21	11,3	RDM	2,7	2,1	2,0	Negativ
27	24,1	Holstein	2,3	2,9	-	Negativ
49	12,2	Holstein	2,5	5,0	-	36,16
81	8,1	Jersey	1,6	2,8	3,1	Negativ
85	9,1	Jersey	3,1	2,8	3,8	Negativ
89	10,9	Jersey	1,8	0,8	5,1	Negativ
127	20,4	Jersey	2,3	2,9	3,1	Negativ

Tabel 9: Otte udvalgte højrisiko-kvier til analyse med Qiagen MAP qPCR. Ct-værdi under eller lig med 35 er positive, mens prøver med en Ct-værdi over 35 anses som negative.

Post hoc stikprøveberegning

Det mulige antal positive kvier, D , i en population på 139 ud fra negative resultater på alle 63 kvier i stikprøven beregnes med formlen:

$$D = \left(1 - (1 - 0,95)^{\frac{1}{63}}\right) \left(139 - \frac{63 - 1}{2}\right) = 5$$

$$p = \frac{5}{139} = 0,036$$

Med en stikprøvestørrelse på 63, hvor alle resultater er negative, kan der maksimalt være fem positive kvier i en populationsstørrelse på 139 højrisiko-kvier under antagelse af perfekt diagnostisk test svarende til en prævalens på 3,6%.

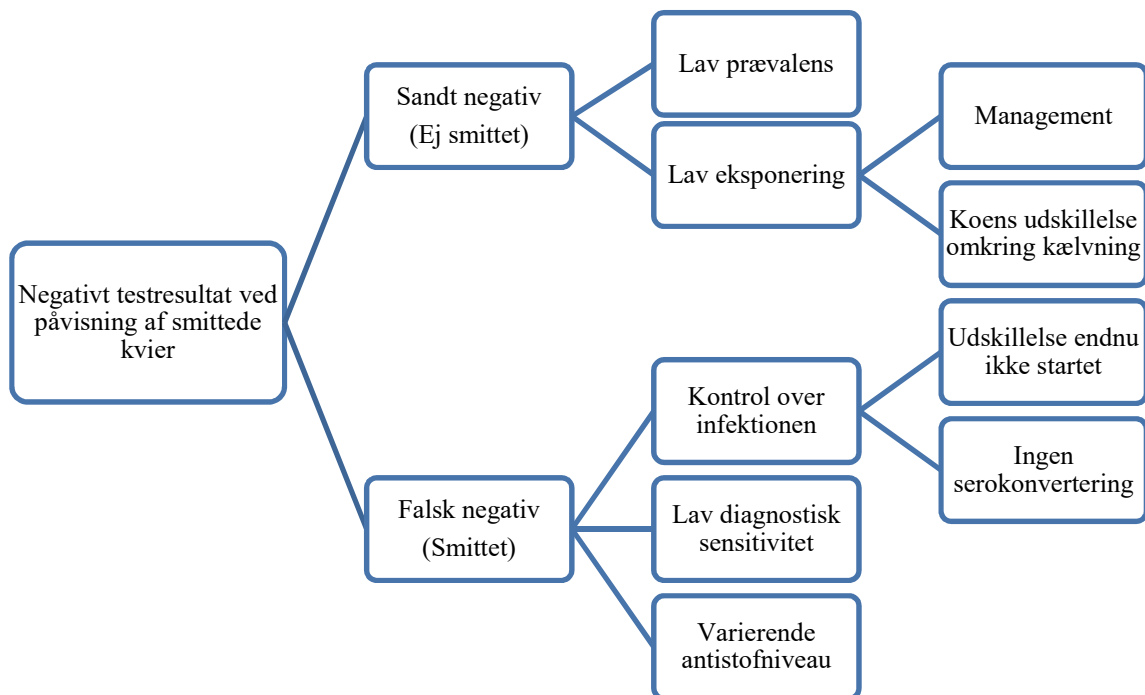
Diskussion

Opsummering af resultater

Det har ikke været muligt at påvise antistoffer mod MAP i serum ved brug af ELISA eller bakterien i fæces ved brug af DNA Diagnostic MAP qPCR i dette studium. Ved anvendelse af Qiagen MAP qPCR var det muligt at påvise et lavt antal MAP-bakterier hos én ud af otte højrisiko-kvier, dog med en Ct-værdi på 36, hvilket ligger under detektionsgrænsen for positive prøver. Den sidstnævnte qPCR med tilsvarende ekstraktions- og lysesmetode anses som den mest sensitive og derfor velegnet til påvisning af lave udskillelsesniveauer (Odumeru et al. 2001; Fock-Chow-Tho et al. 2017).

Smittede kvier

For påvisning af smittede kvier kan negative resultater enten være sandt negative - altså at kvien ikke er smittet - eller falsk negative, hvor kvien er smittet, men det ikke har været muligt at påvise det. De mulige årsager til de negative resultater for påvisning af smittede ungdyr ses i figur 5.



Figur 5: Oversigt over årsager til sandt negative og falsk negative, hvis måletilstanden er påvisning af smittede kvier.

Sandt negative - kvien er ikke smittet med paratuberkulose

En mulig årsag til sandt negative resultater er den lave prævalens på besætningsniveau i Danmark. Ifølge kvægvet er medianen for prævalensen af paratuberkulose i besætninger i Operation Paratuberkulose 1,6% pr. 25. juni 2018 (Seges 2018). Det må kunne antages, at en lav prævalens resulterer i et lavere smittepres i besætningen og dermed lavere risiko for at blive smittet. Prævalensen for ELISA-positive køer i seneste måling i de deltagende højprævalente besætninger ligger mellem 3 og 8%, hvormed smittepresset i besætningerne antages at være forholdsvis lavt.

En anden årsag til sandt negative resultater for påvisning af smittede kvier kan være lav eksponering på grund af managementfaktorer, såsom hurtig adskillelse af ko og kalv og ingen råmælksfodring med mælk fra MAP-positive køer, eller på grund af lav udskillelse hos moderdyret omkring kælvnings-tidspunktet. En positiv ELISA-måling er en indikator for, at koen udskiller MAP-bakterier eller begynder i den nærmeste fremtid (Nielsen 2008), og selvom ELISA-målingerne kan være fluktuerende, øger høje ELISA-målinger sandsynligheden for, at koen er højudskiller (Toft et al. 2005). Højrisiko-kvier født af køer med de højeste ELISA-målinger før eller i de første to målinger efter kælvning i hver besætning blev udvalgt for at opnå størst sandsynlighed for udskillelse af MAP omkring kælvning og dermed eksponering af kalven. Køer med høj fækal udskillelse af MAP i fæces har større risiko for at udskille MAP i kolostrum end dem med lavgradig fækal udskillelse, hvorfor de højtudskillende køer udgør den største risiko for transmission til kalven (Streeter et al. 1995). Den postnatale transmission til kalvene kan foregå via oral optagelse af MAP bakterier fra et kontamineret miljø eller direkte via kolostrum og mælk (Sweeney 1996). Ved at fjerne kalven hurtigt fra koen og ved kun at bruge råmælk fra lavrisiko-køer må man formode, at den postnatale eksponering minimeres i de deltagende besætninger og kan dermed være forklaring på sandt negative resultater. På trods af lavt smittepres og begrænset postnatal eksponering, er der stadig risiko for *in utero* transmission af kalve født af smittede køer - risikoen er dog højest for køer med klinisk paratuberkulose (Whittington og Windsor 2009).

Selvom lav prævalens og god management kan være med til at minimere smitterisikoen, synes det usandsynligt, at alle resultater er sandt negative. Ifølge Nielsen et al. (2016) er risikoen for at være smittet 2,5 gange så stor for køer født af højrisiko-køer, der tester ELISA-positiv før kælvning eller op til otte måneder efter kælvning, end for kalve født af lavrisiko-køer, hvorfor der sandsynligvis er smittede kvier i den høj-eksponerede kohorte.

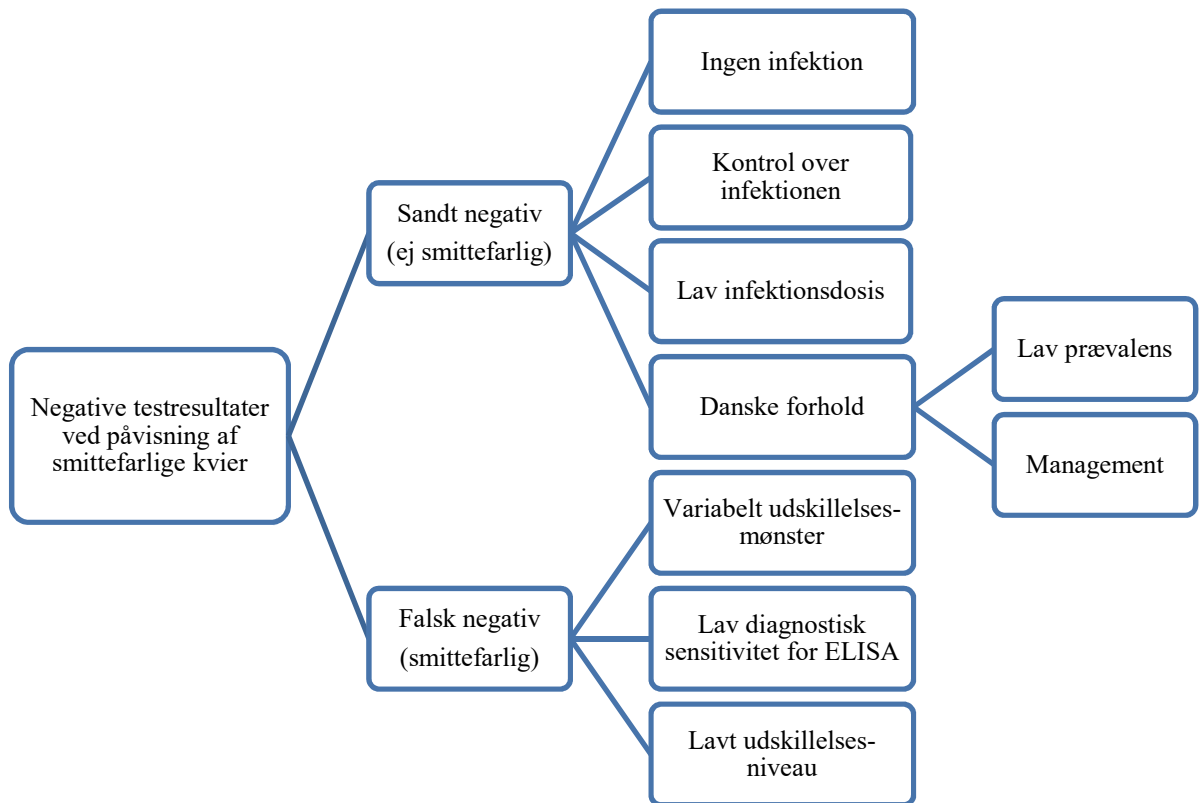
Falsk negative - kvien er smittet med paratuberkulose

Årsager til falsk negative resultater kan være, at kvien har kontrol over infektionen og derfor endnu ikke er serokonverteret og ikke udskiller bakterien i fæces (Sweeney 2011). Ved eksperimentel infektion med MAP giver højere dosis tidligere antistofrespons, mens lavere dosis giver et lavere antistofrespons og senere serokonvertering, når kalvene inficeres i de første seks levemåneder (Mortier et al. 2014a). De doser, der anvendes i Mortiers studie, kategoriseres som mellem eller høj dosis jævnfør de kategorier beskrevet i Mitchell et al. (2012). Dosis ved naturlig infektion i danske besætninger formodes at være lavere end de doser anvendt i eksperimentelle studier, hvilket kan føre til senere serokonvertering og dermed være årsag til de negative ELISA-resultater. Smittede kvier kan have varierende antistofniveau, der gør, at de ikke nødvendigvis er konstant positive i antistof-ELISA (Mortier et al. 2014a). Nogle af kvierne kan således tidligere have haft et positivt antistofrespons, som ikke kunne påvises på dagen for prøveindsamling.

En anden indspillende faktor er den diagnostiske sensitivitet. Sandsynligheden for at påvise smittede kvier ved brug af serum-ELISA og dyrkning af fæces er lav hos kvier i to-års alderen og øges med alderen, idet infektionsprogression øger den diagnostiske sensitivitet (Nielsen og Toft 2006). Samtidig er PCRs evne til at påvise smittede kvier antagelsesvis lav, så længe kvien ikke er smittefarlig.

Smittefarlige kvier

Der er ligeledes mange mulige årsager til de negative resultater for påvisning af smittefarlige ungdyr, hvilket er illustreret i figur 6.



Figur 6: Oversigt over årsager til sandt negative og falsk negative, hvis måletilstanden er påvisning af smittefarlige kvier.

Sandt negative - kvien er ikke smittefarlig

Sandt negative resultater betyder, at kvien ikke udskiller MAP i fæces og dermed ikke er smittefarlig. Mulige årsager hertil kan være, at kvien ikke er inficeret med MAP, eller at kvien har kontrol over infektionen og derfor endnu ikke udskiller bakterien i fæces (Sweeney 2011). Eksperimentelle studier har vist, at høj infektionsdosis resulterer i tidligere udskillelse af MAP i fæces end lav infektionsdosis. Infektionsdosis under naturlige forhold antages at være lav, hvilket giver senere start for udskillelsen af MAP i fæces (McDonald et al. 1999; Mortier et al. 2014b). Den lave prævalens i besætningerne og det korte tidsrum for eksponering, blandt andet på grund af hurtig fjernelse af kalv fra ko og opstaldning adskilt fra køer samt ingen anvendelse af kolostrum fra højrisiko-køer til kviekalvene, fører formodentlig til, at de inkluderede kvier som kalve blev eksponeret for et minimalt antal MAP-bakterier og dermed starter udskillelsen senere.

Besætningsprævalensen udgør en risikofaktor for udskillelse af MAP i fæces og for alder ved udskillelse blandt kvier, hvor der er øget risiko i besætninger med højere prævalens (Weber et al. 2010; Bolton et al. 2011). I besætninger med en prævalens på over 10%, baseret på årlige ELISA-målinger på mælk, er der fundet en odds ratio på 3,82 for udskillelse af MAP blandt kvier (Bolton et al. 2011). Samtidig vil en større andel kvier starte udskillelse før to-års

alderen i besætninger med en tilsyneladende prævalens på over 10%, baseret på dyrkning af fæces, sammenlignet med besætninger med en tilsyneladende prævalens under 10% (Weber et al. 2010). Med en tilsyneladende prævalens mellem 3 og 8% i de inkluderede højprævalente besætninger, baseret på ELISA-målinger på mælk, er risikoen for udskillelse af MAP i fæces blandt kvierne før to-års alderen dermed forholdsvis lav.

Falsk negative - kvien er smittefarlig

Studier, der undersøger udskillelsen af MAP hos ungvæg, viser, at de ikke udskiller bakterien kontinuerligt (Lepper et al. 1989; Mortier et al. 2014b; Corbett et al. 2017). En mulig årsag til falsk negative resultater kan derfor være det variable udskillelsesmønster, således at kvierne ikke udskiller bakterien på dagen for prøveindsamlingen, men stadig udgør en smitterisiko i besætningen. Nogle af de negative resultater kan være falsk negative på grund af det variable udskillelsesmønster i kombination med én enkelt prøveindsamling, hvilket kan være en begrænsning i studiet. Med den anvendte stikprøvestørrelse burde påvisning af smittefarlige kvier dog være muligt.

Hvis nogle kvier udskilte bakterier på dagen for prøveindsamling, har det muligvis været på så lavt niveau, at det ikke kunne detekteres ved en enkelt analyse i DNA Diagnostic MAP qPCR. Hos én af højrisiko-kvierne blev påvist meget lav udskillelse ved brug af Qiagen MAP qPCR. Ved lave udskillelsesniveauer vil selv meget sensitive ekstraktionsmetoder og MAP-specifik qPCR ikke altid være i stand til at påvise MAP-bakterier, og Ct-værdierne vil som regel være høje. Ved at køre prøverne flere gange i qPCR vil man øge sandsynligheden for påvisning af lavudskillere (Fock-Chow-Tho et al. 2017). Problemet er kun relevant for lave udskillelsesniveauer, og hvis kvierne udskiller MAP i så lave niveauer, er spørgsmålet så, om de reelt set udgør en smitterisiko for de andre kvier i besætningen.

Hos køer er der fundet en sammenhæng mellem positiv antistof-ELISA og efterfølgende udskillelse af MAP i fæces. ELISA kan derfor bruges til at udpege mulige smittefarlige køer, og køer der snart bliver smittefarlige. Blandt køer med forbigående eller intermitterende udskillelse er der større sandsynlighed for, at udskillelsen forekommer før serokonvertering (Nielsen 2008). Hvorvidt antistof-ELISA kan bruges til påvisning af smittefarlige kvier er således tvivlsomt på grund af den sporadiske udskillelse blandt ungvæg og på grund af sen start af antistofproduktion mod paratuberkulose.

Studiets begrænsninger

Udover lav diagnostisk sensitivitet og enkelt prøveindsamling er den udvalgte aldersgruppe og enkelt analyse af prøver mulige begrænsninger i studiet. Der er evidens for udskillelse af MAP i fæces hos ungkvæg helt ned til to uger efter eksponering (Mortier et al. 2014b) med en top omkring tre måneder efter eksponering (Lepper et al. 1989; Mitchell et al. 2012). De nævnte studier tager udgangspunkt i eksperimentelt inficerede kalve, mens der blandt naturligt inficerede kalve er størst risiko for udskillelse af MAP i fæces i alderen 7-14 måneder (Bolton et al. 2011). På trods af, at der kan være en top i fækal udskillelse før seks-måneders alderen, bør det i aldersintervallet 6-26 måneder være muligt at påvise smittefarlige kvier. Påvisning af antistoffer blandt naturligt inficerede kvier er ringe undersøgt, men Woodbine et al. (2009) har fundet antistoffer blandt ungdyr i alderen 0-6 måneder, 13-15 måneder og over 19 måneder, dog med lav seroprævalens. Dette kan være en udfordring ved påvisning af antistoffer i den valgte aldersgruppe i dette studie, men bør være muligt. Til fremtidig forskning kunne det være interessant at se på yngre kvier og følge dem med gentagen prøvetagning over en længere periode i et prospektivt kohortestudium.

Ved lave koncentrationer af MAP i fæces vil bakterierne formodentlig være fordelt ujævnt. Svaberprøverne repræsenterer en mindre mængde fæces, og man kan dermed argumentere for, at brugen af homogeniseret fæcesprøve versus svaber giver øget sandsynlighed for påvisning af lavudskillere på grund af større mængde fæces testet. Ved lave koncentrationer af MAP bør prøver analyseres flere gange for at øge den diagnostiske sensitivitet (Fock-Chow-Tho et al. 2017). Fæces fra hver kvie blev analyseret to gange – både som fæcesprøve og svaberprøve, hvilket kan anses som en styrke i studiet sammenlignet med analyse af blot én prøve. Studiet er begrænset ved kun at analysere fæcesprøverne en enkelt gang i qPCR, da der på den måde kan overses kvier med lavt udskillelsesniveau. Hvis kvierne dog har så lave udskillelsesniveauer, anses de ikke for at udgøre en betydelig smitterisiko for de andre kvier.

Den lave prævalens i kombination med lav diagnostisk sensitivitet kan give anledning til designfejl. Ved en stikprøvestørrelse på 60 kvier ud af en population på 139 høj-eksponerede kvier kræves minimum fem positive individer for med 95% sikkerhed at kunne påvise minimum ét, hvilket svarer til en prævalens på 3,6%. Dette er under forudsætning af perfekt diagnostisk test. Sandsynligheden for påvisning af smittefarlige kvier ved brug af qPCR på fæces anses som højere end sandsynligheden for påvisning af smittede kvier ved brug af ELISA især ved højt udskillelsesniveau, hvor de samtidig udgør en større smitterisiko. Sandsynlighed for påvisning af smittede kvier ved to-års alderen er lav og ved at tage højde for dette,

falder antallet af påviselige tilfælde til 0,3 ved en stikprøvestørrelse på 60. Med den valgte stikprøvestørrelse vil det være vanskeligt med sikkerhed at påvise smittede kvier, men det bør være muligt at påvise smittefarlige kvier, hvis de er i populationen.

Ved negative resultater fra samtlige 63 kvier i den høj-eksponerede kohorte vil der maksimalt kunne være fem smittefarlige kvier og en prævalens på 3,6% i en population på 139 kvier under antagelse af perfekt diagnostisk test.

Generalisering

Det er sandsynligt, at nogle af resultaterne for påvisning af smittede kvier er falsk negative især i den høj-eksponerede kohorte, da risikoen for at være smittet er 2,5 gange så høj for kvier født af højrisiko-køer, der tester ELISA-positiv omkring kælvning, end kvier født af lavrisiko-køer (Nielsen et al. 2016). Mange af kvierne vil dog være sandt negative, men smittede kvier er svære at påvise på grund af den lave diagnostiske sensitivitet for påvisning af smittede dyr under to år.

En vigtig årsag til manglende påvisning af både smittede og smittefarlige kvier er, at kvien stadig har kontrol over infektionen og dermed endnu ikke er serokonverteret og ikke udskiller bakterien i fæces. På baggrund af dette er usikkerheden forbundet med at undersøge kvier for paratuberkulose for stor.

For smittefarlige kvier er intermitterende udskillelse og lavt udskillelsesniveau de bedste bud på årsager til falsk negative resultater, og igen må det formodes, at mange af resultaterne er sandt negative.

De danske anbefalinger lyder på at overveje slagting af kalve født af højrisiko-køer med høje ELISA-målinger omkring kælvning og at adskille kalve født af højrisiko-køer med moderate ELISA-målinger omkring kælvning fra andre kalve i de første fire levemåneder, fordi de udgør en smitterisiko for andre kalve. Disse anbefalinger baseres på transmission mellem kalve, som er påvist under eksperimentelle forhold (van Roermund et al. 2007). Den praktiske betydning af transmission mellem kalve kendes ikke, og ud fra resultaterne i dette studium kan der sættes spørgsmålstejn ved disse anbefalinger, da der ikke påvises nogle smittefarlige kvier. Kvierne bør ikke udsættes på grund af smitterisikoen for andre kvier, men kan overvejes udsat på grund af øget risiko for udvikling af paratuberkulose.

De tilsyneladende prævalenser (0-8%) i de inkluderede besætninger repræsenterer omkring 90% af besætningerne i Operation Paratuberkulose (Seges 2018), og resultaterne vurderes at være repræsentative for denne gruppe. De resterende besætninger i Operation Paratuberkulose

har en højere prævalens og dermed et højere smittepres, hvorfor resultaterne muligvis ikke kan overføres til denne gruppe.

I et eksperimentelt studium er der fundet tegn på, at nogle kvæg med succes har bekæmpet infektion med MAP (Begg et al. 2018). Blandt naturligt eksponerede får er der fundet evidens for, at de er i stand til at bekæmpe infektionen, da de ved vævsbiopsier viser tegn på infektion med MAP, mens der ved obduktion ikke findes tegn på infektion (Dennis et al. 2011). Det er ukendt, hvorvidt naturligt eksponerede kvæg er i stand til at bekæmpe infektionen, men på baggrund af ovenstående viden er det en mulighed, der bør undersøges i fremtidig forskning. Hvis det viser sig at være muligt, kan dette være en af årsagerne til de negative resultater i dette studium, og udgør således en ny sygdomstilstand.

Konklusion

Der blev ikke påvist antistoffer mod *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* i serum hos nogen kvier i aldersgruppen 6-26 måneder. Alle fæcesprøver var negative for MAP i qPCR, men hos én af kvierne var det muligt at påvise et lavt antal MAP-bakterier. Det er sandsynligt, at der forekommer falsk negative resultater for påvisning af smittede kvier især i den høj-eksponerede kohorte. Sene antistofrespons som følge af kontrol over infektionen nedsætter sandsynligheden for påvisning af smittede kvier ved brug af en antistof-ELISA, hvilket vurderes at være hovedårsagen til manglende påvisning af smittede kvier. Manglende påvisning af smittefarlige kvier kan have flere mulige årsager, blandt andet at de ikke er smittet, stadig har kontrol over infektionen, har intermitterende udskillelse eller har lavt udskillelsesniveau. Ingen af kvierne formodes at udskille et tilstrækkeligt højt niveau af bakterier, at de udgør en smitterisiko for andre kvier.

Referencer

- Aly, S.S., and M.C. Thurmond. 2005. 'Evaluation of *Mycobacterium Avium* Subsp Paratuberculosis Infection of Dairy Cows Attributable to Infection Status of the Dam'. *J.Am.Vet.Med Assoc.* 227 (0003–1488 (Print)): 450–54.
- Antognoli, M.C., H.L. Hirst, F.B. Garry, and M.D. Salman. 2007. 'Immune Response to and Faecal Shedding of *Mycobacterium Avium* Ssp. Paratuberculosis in Young Dairy Calves, and the Association between Test Results in the Calves and the Infection Status of Their Dams'. *Zoonoses and Public Health* 54 (3–4): 152–59.

- Bannantine, J.P., D.O. Bayles, W.R. Waters, M.V. Palmer, J.R. Stabel, and M.L. Paustian. 2008. 'Early Antibody Response against Mycobacterium Avium Subspecies Paratuberculosis Antigens in Subclinical Cattle'. *Proteome Science* 6 (1): 5.
- Barkema, H.W., K. Orsel, S.S. Nielsen, A.P. Koets, V.P.M.G. Rutten, J.P. Bannantine, G.P. Keefe, et al. 2017. 'Knowledge Gaps That Hamper Prevention and Control of Mycobacterium Avium Subspecies Paratuberculosis Infection'. *Transboundary and Emerging Diseases*, no. May: 1–24.
- Begg, D.J., K.M. Plain, K. de Silva, R. Gurung, A. Gunn, A.C. Purdie, and R.J. Whittington. 2018. 'Immunopathological Changes and Apparent Recovery from Infection Revealed in Cattle in an Experimental Model of Johne's Disease Using a Lyophilised Culture of Mycobacterium Avium Subspecies Paratuberculosis'. *Veterinary Microbiology* 219 (March). Elsevier: 53–62.
- Bolton, M.W., R.B. Pillars, J.B. Kaneene, W.A. Mauer, and D.L. Grooms. 2011. 'Detection of Mycobacterium Avium Subspecies Paratuberculosis in Naturally Exposed Dairy Heifers and Associated Risk Factors'. *Journal of Dairy Science* 94 (9). Elsevier: 4669–75.
- Bull, T.J., J. Hermon-Taylor, I. Pavlik, F. El-Zaatari, and M. Tizard. 2000. 'Characterization of IS900 Loci in Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis and Development of Multiplex PCR Typing'. *Microbiology* 146 (9): 2185–97.
- Chase, C.C.L., D.J. Hurley, and A.J. Reber. 2008. 'Neonatal Immune Development in the Calf and Its Impact on Vaccine Response'. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* 24 (1): 87–104.
- Corbett, C.S., H.W. Barkema, and J. De Buck. 2018. 'Quantifying Fecal Shedding of Mycobacterium Avium Ssp. Paratuberculosis from Calves after Experimental Infection and Exposure'. *Journal of Dairy Science* 101 (2). American Dairy Science Association: 1478–87.
- Corbett, C.S., J. De Buck, K. Orsel, and H.W. Barkema. 2017. 'Fecal Shedding and Tissue Infections Demonstrate Transmission of Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis in Group-Housed Dairy Calves'. *Veterinary Research* 48 (1). BioMed Central: 1–10.
- Cousins, D.V., R.J. Whittington, I.B. Marsh, A. Masters, R.J. Evans, and P. Kluver. 1999. 'Mycobacteria Distinct from Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis Isolated from the Faeces of Ruminants Possess IS900-like Sequences Detectable by IS900 Polymerase Chain Reaction: Implications for Diagnosis'. *Molecular and Cellular Probes*

13 (6): 431–42.

- Dennis, M.M., L.A. Reddacliff, and R.J. Whittington. 2011. ‘Longitudinal Study of Clinicopathological Features of Johne’s Disease in Sheep Naturally Exposed to *Mycobacterium Avium* Subspecies Paratuberculosis’. *Veterinary Pathology* 48 (3): 565–75.
- Eisenberg, S.W.F., V.P.M.G. Rutten, and A.P. Koets. 2015. ‘Dam *Mycobacterium Avium* Subspecies Paratuberculosis (MAP) Infection Status Does Not Predetermine Calves for Future Shedding When Raised in a Contaminated Environment: A Cohort Study’. *Veterinary Research* 46 (1). *Veterinary Research*: 1–8.
- Englund, S., G. Bolske, and K.E. Johansson. 2002. ‘An IS900-like Sequence Found in a *Mycobacterium* Sp. Other than *Mycobacterium Avium* Subsp. Paratuberculosis’. *FEMS Microbiol Lett* 209 (2): 267–71.
- Fang, Y., W. Wu, J.L. Pepper, J.L. Larsen, S.E. Marras, E. Nelson, W.B. Epperson, and J. Christopher-hennings. 2002. ‘Comparison of Real-Time , Quantitative PCR with Molecular Beacons to Nested PCR and Culture Methods for Detection of *Mycobacterium Avium* Subsp . Paratuberculosis in Bovine Fecal Samples’. *Society* 40 (1): 287–91.
- Fock-Chow-Tho, D., E. Topp, E.A. Ibeagha-Awemu, and N. Bissonnette. 2017. ‘Comparison of Commercial DNA Extraction Kits and Quantitative PCR Systems for Better Sensitivity in Detecting the Causative Agent of Paratuberculosis in Dairy Cow Fecal Samples’. *Journal of Dairy Science* 100 (1): 572–81.
- Ganusov, V.V., D. Klinkenberg, D. Bakker, and A.P. Koets. 2015. ‘Evaluating Contribution of the Cellular and Humoral Immune Responses to the Control of Shedding of *Mycobacterium Avium* Spp. Paratuberculosis in Cattle Modeling Johne’s Disease: From the inside out Dr Ad Koets and Prof Yrjo Grohn’. *Veterinary Research* 46 (1). *Veterinary Research*: 1–13.
- Hines, M.E., J.R. Stabel, R.W. Sweeney, F. Griffin, A.M. Talaat, D. Bakker, G. Benedictus, et al. 2007. ‘Experimental Challenge Models for Johne’s Disease: A Review and Proposed International Guidelines’. *Veterinary Microbiology* 122 (3–4): 197–222.
- Houe, H. 2004. *Introduction to Veterinary Epidemiology*. Edited by Hans Houe, Annette Kjær Ersbøll, and Nils Toft. København: Biofolia.
- Ireng, L.M., K. Walravens, M. Govaerts, J. Godfroid, V. Rosseels, K. Huygen, and J.L. Gala. 2009. ‘Development and Validation of a Triplex Real-Time PCR for Rapid

- Detection and Specific Identification of *M. Avium* Sub Sp. Paratuberculosis in Faecal Samples'. *Veterinary Microbiology* 136 (1–2): 166–72.
- Kawaji, S., R. Nagata, R.J. Whittington, and Y. Mori. 2012. 'Detection of Antibody Responses against Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis Stress-Associated Proteins within 30 Weeks after Infection in Cattle'. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 150 (1–2). Elsevier B.V.: 101–11.
- Kirkeby, C., K. Græsbøll, T. Halasa, N. Toft, and S.S. Nielsen. 2015. 'Mean Effective Sensitivity for Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis Infection in Cattle Herds'. *BMC Veterinary Research* 11 (1). BMC Veterinary Research: 1–6.
- Kirkeby, C., K. Græsbøll, S.S. Nielsen, L.E. Christiansen, N. Toft, E. Rattenborg, and T. Halasa. 2016. 'Simulating the Epidemiological and Economic Impact of Paratuberculosis Control Actions in Dairy Cattle'. *Frontiers in Veterinary Science* 3 (October): 1–13. <https://doi.org/10.3389/fvets.2016.00090>.
- Kudahl, A.B. 2004. 'Economic Consequences of Paratuberculosis Control in Dairy Cattle Herds'. Edited by Anne Braad Kudahl. Copenhagen: The Royal Veterinary and Agricultural University, Department of Animal Science and Animal Health.
- Kudahl, A.B., S. Østergaard, J.T. Sørensen, and S.S. Nielsen. 2007. 'A Stochastic Model Simulating Paratuberculosis in a Dairy Herd'. *Preventive Veterinary Medicine* 78 (2): 97–117. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2006.05.015>.
- Köhler, H., B. Burkert, I. Pavlik, R. Diller, L. Geue, F. Conraths, and G. Martin. 2008. 'Evaluation of Five ELISA Test Kits for the Measurement of Antibodies against Mycobacterium Avium Subspecies Paratuberculosis in Bovine Serum'. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 121 (5/6): 203–10.
- Leite, F.L., K.D. Stokes, S. Robbe-Austerman, and J.R. Stabel. 2013. 'Comparison of Fecal DNA Extraction Kits for the Detection of Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis by Polymerase Chain Reaction'. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 25 (1): 27–34.
- Lepper, A.W., C.R. Wilks, M. Kotiw, J.T. Whitehead, and K.S. Swart. 1989. 'Sequential Bacteriological Observations in Relation to Cell-Mediated and Humoral Antibody Responses of Cattle Infected with Mycobacterium Paratuberculosis and Maintained on Normal or High Iron Intake.' *Australian Veterinary Journal*.
- McDonald, W.L., S.E. Ridge, A.F. Hope, and R.J. Condrón. 1999. 'Evaluation of Diagnostic Tests for Johne's Disease in Young Cattle'. *Aust Vet J* 77 (2): 113–19.

- Mitchell, R.M., G.F. Medley, M.T. Collins, and Y.H. Schukken. 2012. 'A Meta-Analysis of the Effect of Dose and Age at Exposure on Shedding of Mycobacterium Avium Subspecies Paratuberculosis (MAP) in Experimentally Infected Calves and Cows'. *Epidemiology and Infection* 140 (2): 231–46.
- Mitchell, R.M., Y.H. Schukken, A.P. Koets, M.F. Weber, D. Bakker, J.R. Stabel, R.H. Whitlock, and Y. Louzoun. 2015. 'Differences in Intermittent and Continuous Fecal Shedding Patterns between Natural and Experimental Mycobacterium Avium Subspecies Paratuberculosis Infections in Cattle Modeling Johne's Disease: From the inside out Dr Ad Koets and Prof Yrjo Grohn'. *Veterinary Research* 46 (1). *Veterinary Research*: 1–10.
- Mortier, R.A.R., H.W. Barkema, J.M. Bystrom, O. Illanes, K. Orsel, R. Wolf, G. Atkins, and J. De Buck. 2013. 'Evaluation of Age-Dependent Susceptibility in Calves Infected with Two Doses of Mycobacterium Avium Subspecies Paratuberculosis Using Pathology and Tissue Culture'. *Veterinary Research* 44 (1): 1–9.
- Mortier, R.A.R., H.W. Barkema, M.E. Negron, K. Orsel, R. Wolf, and J. De Buck. 2014. 'Antibody Response Early after Experimental Infection with Mycobacterium Avium Subspecies Paratuberculosis in Dairy Calves'. *Journal of Dairy Science* 97 (9). Elsevier: 5558–65.
- Mortier, R.A.R., H.W. Barkema, K. Orsel, R. Wolf, and J. De Buck. 2014. 'Shedding Patterns of Dairy Calves Experimentally Infected with Mycobacterium Avium Subspecies Paratuberculosis.' *Veterinary Research* 45 (1): 71.
- Nielsen, S.S. 2006. 'Produktionstab Som Følge Af Paratuberkulose'. [Besøgt den 31.05.2018] Paratuberkulose.Dk. 2006. https://www.landbrugsinfo.dk/Kvaeg/Sundhed-og-dyrevelfaerd/Veterinaert-beredskab/Paratuberkulose/Sider/Produktionstab_som_foelge_af_paratuberku.aspx.
- Nielsen, S.S. 2008. 'Transitions in Diagnostic Tests Used for Detection of Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis Infections in Cattle'. *Veterinary Microbiology* 132 (3–4): 274–82.
- Nielsen, S.S. 2009a. 'Muligt at Vælge Reduceret Prøveudtagning'. *Paratuberkulose Nyhedsbrev 03/09 Dansk Kvæg*, 2009.
- Nielsen, S.S. 2009b. 'Use of Diagnostics for Risk-Based Control of Paratuberculosis in Dairy Herds'. *In Pract.* 31: 150–54.
- Nielsen, S.S., K.F. Hansen, L. Kvist, and P. Kostoulas. 2016. 'Dam's Infection Progress and within-Herd Prevalence as Predictors of Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis

- ELISA Response in Danish Holstein Cattle'. *Preventive Veterinary Medicine* 125. Elsevier B.V.: 54–58.
- Nielsen, S.S., and L.R. Nielsen. 2007. *Indsats Mod Paratuberkulose Og Salmonella Dublin, Del 2*. Edited by S.S. Nielsen and L.R. Nielsen. 5. udgave. Københavns Universitet og Dansk kvæg.
- Nielsen, S.S., and N. Toft. 2006. 'Age-Specific Characteristics of ELISA and Fecal Culture for Purpose-Specific Testing for Paratuberculosis'. *Journal of Dairy Science* 89 (2). Elsevier: 569–79.
- Nielsen, S.S., and N. Toft. 2008. 'Ante Mortem Diagnosis of Paratuberculosis: A Review of Accuracies of ELISA, Interferon- γ Assay and Faecal Culture Techniques'. *Veterinary Microbiology* 129 (3–4): 217–35.
- Odumeru, J., A. Gao, S. Chen, M. Raymond, and L. Mutharia. 2001. 'Use of the Bead Beater for Preparation of Mycobacterium Paratuberculosis Template DNA in Milk'. *Canadian Journal of Veterinary Research* 65 (4): 201–5.
- Osterstock, J.B., G.T. Fosgate, and B. Norby. 2007. 'Contribution of Environmental Mycobacteria to False-Positive Serum ELISA Results' 230 (6).
- Park, H.T., H.E. Park, Y.H. Jung, and H.S. Yoo. 2018. 'An ISMap02-like Insertion Sequence in Mycobacterium Spp. Interferes with Specific Detection of Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis'. *Veterinary Microbiology* 216 (January). Elsevier: 1–6.
- Paustian, M.L., A. Amonsin, V. Kapur, and J.P. Bannantine. 2004. 'Characterization of Novel Coding Sequences Specific to Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis: Implications for Diagnosis of Johne's Disease' 42 (6): 2675–81.
- Pithua, P., L.A. Espejo, S.M. Godden, and S.J. Wells. 2013. 'Is an Individual Calving Pen Better than a Group Calving Pen for Preventing Transmission of Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis in Calves? Results from a Field Trial.' *Research in Veterinary Science* 95 (2). Oxford: 398–404.
- Pithua, P., S.J. Wells, S. Sreevatsan, and S.M. Godden. 2010. 'Lack of Evidence for Fecal Shedding of Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis in Calves Born to Fecal Culture Positive Dams'. *Preventive Veterinary Medicine* 93 (2–3): 242–45.
- Roermund, H.J.W. van, D. Bakker, P.T.J. Willemsen, and M.C.M. De Jong. 2007. 'Horizontal Transmission of Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis in Cattle in an Experimental Setting: Calves Can Transmit the Infection to Other Calves'. *Veterinary Microbiology* 122 (3–4): 270–79. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.01.016>.

- Santema, W.J., J. Poot, R.P.A.M. Segers, D.J.P. Van den Hoff, V.P.M.G. Rutten, and A.P. Koets. 2012. 'Early Infection Dynamics after Experimental Challenge with Mycobacterium Avium Subspecies Paratuberculosis in Calves Reveal Limited Calf-to-Calf Transmission and No Impact of Hsp70 Vaccination'. *Vaccine* 30 (49): Elsevier Ltd: 7032–39.
- Seges. 2018. 'Prævalens Af Paratuberkulose i Besætninger'. [besøgt d. 28.06.2018] Kvaegvet.Dk. 2018. <http://www.kvaegvet.dk/ParaTB/PrevGraf7.html>.
- Sevilla, Iker A., Joseba M. Garrido, Elena Molina, María V. Geijo, Natalia Elguezabal, Patricia Vázquez, and Ramón A. Juste. 2014. 'Development and Evaluation of a Novel Multicopy-Element-Targeting Triplex PCR for Detection of Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis in Feces'. *Applied and Environmental Microbiology* 80 (12): 3757–68.
- Sigurardóttir, Ó.G., M. Valheim, and C.McL. Press. 2004. 'Establishment of Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis Infection in the Intestine of Ruminants'. *Advanced Drug Delivery Reviews* 56 (6): 819–34.
- Stabel, J.R. 2000. 'Transitions in Immune Responses to Mycobacterium Paratuberculosis. Veterinary Microbiology'. *Veterinary Microbiology* 77 (3–4): 465–73.
- Stabel, J.R., and J.P. Bannantine. 2005. 'Development of a Nested PCR Method Targeting a Unique Multicopy Element , ISMap 02 , for Detection of Mycobacterium Avium Subsp . Paratuberculosis in Fecal Samples'. *Journal of Clinical Microbiology* 43 (9): 4744–50.
- Streeter, R.N, G.F. Hoffsis, S. Bech-Nielsen, W.P. Shulaw, and D.M. Rings. 1995. 'Isolation of Mycobacterium Paratuberculosis from Colostrum and Milk of Subclinically Infected Cows.' *American Journal of Veterinary Research* 56 (10): 1322–24.
- Sweeney, R.W. 1996. 'Transmission of Paratuberculosis.' *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice* 12 (2). Elsevier Masson SAS: 305–12.
[https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30408-4](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30408-4).
- Sweeney, R.W. 2011. 'Pathogenesis of Paratuberculosis'. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* 27 (3). Elsevier Inc.: 537–46.
- Sweeney, R.W., J. Uzonna, R.H. Whitlock, P.L. Habecker, P. Chilton, and P. Scott. 2006. 'Tissue Predilection Sites and Effect of Dose on Mycobacterium Avium Subs. Paratuberculosis Organism Recovery in a Short-Term Bovine Experimental Oral Infection Model'. *Research in Veterinary Science* 80 (3): 253–59.

- Sweeney, R.W., R.H. Whitlock, A.N. Hamir, A.E. Rosenberger, and S.A. Herr. 1992. 'Isolation of Mycobacterium Paratuberculosis after Oral Inoculation in Uninfected Cattle.' *American Journal of Veterinary Research* 53 (8). United States: 1312–14.
- Taddei, S, C Robbi, C Cesena, I Rossi, E Schiano, N Arrigoni, G Vicenzoni, and S Cvirani. 2004. 'Detection of Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis in Bovine Fecal Samples: Comparison of Three Polymerase Chain Reaction-Based Diagnostic Tests with a Conventional Culture Method'. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 16 (6): 503–8. <https://doi.org/10.1177/104063870401600603>.
- Tasara, T., L.E. Hoelzle, and R. Stephan. 2005. 'Development and Evaluation of a Mycobacterium Avium Subspecies Paratuberculosis (MAP) Specific Multiplex PCR Assay'. *International Journal of Food Microbiology* 104 (3): 279–87.
- Toft, N., S.S. Nielsen, and E. Jørgensen. 2005. 'Continuous-Data Diagnostic Tests for Paratuberculosis as a Multistage Disease'. *Journal of Dairy Science* 88 (11). Elsevier: 3923–31.
- Uzoigwe, J.C., M.L. Khaita, and P.S. Gibbs. 2007. 'Epidemiological Evidence for Mycobacterium Avium Subspecies Paratuberculosis as a Cause of Crohn's Disease'. *Epidemiology and Infection* 135 (07): 1057–68.
- Waters, W.R., J.M. Miller, M.V. Palmer, J.R. Stabel, K.A. Koistinen, E.M. Steadham, M.J. Hamilton, C. Davis, J.P. Bannantine, and D.E. Jones. 2003. 'Early Induction of Humoral and Cellular Immune Responses during Experimental Mycobacterium Avium Subsp . Paratuberculosis Infection of Calves Early Induction of Humoral and Cellular Immune Responses during Experimental Mycobacterium Avium Subsp . Paratube'. *Infection and Immunity* 71 (9): 5130–38.
- Weber, M.F., J. Kogut, J. de Bree, G. van Schaik, and M. Nielen. 2010. 'Age at Which Dairy Cattle Become Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis Faecal Culture Positive'. *Preventive Veterinary Medicine* 97 (1). Elsevier B.V.: 29–36.
- Whittington, R.J., D.J. Marshall, P.J. Nicholls, I.B. Marsh, and L.A. Reddacliff. 2004. 'Survival and Dormancy of Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis in the Environment'. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 2989–3004.
- Whittington, R.J., and P.A. Windsor. 2009. 'In Utero Infection of Cattle with Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis: A Critical Review and Meta-Analysis'. *Veterinary Journal* 179 (1). Elsevier Ltd: 60–69.

- Windsor, P.A., and R.J. Whittington. 2010. 'Evidence for Age Susceptibility of Cattle to Johne's Disease'. *Veterinary Journal* 184 (1). Elsevier Ltd: 37–44.
- Wiszniewska-Łaszczych, A., J. Szteyn, K. Liedtke, B. Wysok, J. Wojtacka, and M. Gomółka-Pawlicka. 2017. 'Occurrence of Faecal Shedding of Mycobacterium Avium Subs. Paratuberculosis by Calves'. *Medycyna Weterynaryjna* 73 (3): 166–70.
- Wolf, R., K. Orsel, J. De Buck, and H.W. Barkema. 2015. 'Calves Shedding Mycobacterium Avium Subspecies Paratuberculosis Are Common on Infected Dairy Farms Modeling Johne's Disease: From the inside out Dr Ad Koets and Prof Yrjo Grohn'. *Veterinary Research* 46 (1). Veterinary Research: 1–8.
- Woodbine, K.A., Y.H. Schukken, L.E. Green, A. Ramirez-Villaescusa, S. Mason, St.J. Moore, C. Bilbao, N. Swann, and G.F. Medley. 2009. 'Seroprevalence and Epidemiological Characteristics of Mycobacterium Avium Subsp. Paratuberculosis on 114 Cattle Farms in South West England'. *Preventive Veterinary Medicine* 89 (1–2): 102–9.

Bilag 1

Kvien					Moderdyrets ELISA-værdier			Resultater				Kommentarer
Besætning	Nr.	Kohorte	Alder i mdr.	Race	Før klvn.	1. efter klvn.	2. efter klvn.	ELISA S/P%	Svaber	Fæces	Qiagen-qPCR	
1	1	Høj-eksponeret	6,1	Krydsning	0,8	1,1		0	Negativ	Negativ		
1	2	Middel-eksponeret	6,1	Holstein				0	Negativ	Negativ		
1	3	Høj-eksponeret	7,9	Holstein	2,6	2,1		0	Negativ	Negativ		
1	4	Middel-eksponeret	7,9	Holstein				3	Negativ	Negativ		
1	5	Høj-eksponeret	8,1	Krydsning	0,3	0,6	1,4	0	Negativ	Negativ		
1	6	Middel-eksponeret	8,2	Krydsning				0	Negativ	Negativ		
1	7	Høj-eksponeret	8,2	Krydsning	3,4			0	Negativ	Negativ		
1	8	Middel-eksponeret	8,2	Krydsning				0	Negativ	Negativ		
1	9	Høj-eksponeret	10,5	Krydsning	1,1	2,1	2,5	0	Negativ	Negativ		
1	10	Middel-eksponeret	10,5	Krydsning				0	Negativ	Negativ		
1	11	Høj-eksponeret	10,9	Krydsning	0,6	1,5	2,7	-	Negativ	Negativ		Ingen blodprøve
1	13	Høj-eksponeret	19,8	Krydsning	0,4	1,9	3,3	0	Negativ	Negativ		
1	14	Middel-eksponeret	19,9	Holstein				0	Negativ	Negativ		
1	15	Høj-eksponeret	20,7	Krydsning	2,6			0	Negativ	Negativ		
1	16	Middel-eksponeret	20,7	Holstein				1	Negativ	Negativ		
1	17	Høj-eksponeret	21,8	Krydsning	3,1			3	Negativ	Negativ		
1	18	Middel-eksponeret	21,8	Krydsning				4	Negativ	Negativ		
2	19	Høj-eksponeret	6,3	Holstein	1,5	1,6		3	Negativ	Negativ	Negativ	
2	20	Middel-eksponeret	6,2	Holstein				0	Negativ	Negativ		
2	21	Høj-eksponeret	11,3	RDM	2,7	2,1	2	0	Negativ	Negativ	Negativ	
2	22	Middel-eksponeret	11,3	Holstein				0	-	Negativ		Svaber ej analyseret

Kvien					Moderdyrets ELISA-værdier			Resultater				Kommentarer
Besætning	Nr.	Kohorte	Alder i mdr.	Race	Før klvn.	1. efter klvn.	2. efter klvn.	ELISA S/P%	Svaber	Fæces	Qiagen-qPCR	
2	25	Høj-eksponeret	19,7	Holstein		0,4	1,6	0	Negativ	Negativ		
2	26	Middel-eksponeret	19,9	Holstein				5	Negativ	Negativ		
2	27	Høj-eksponeret	24,1	Holstein	2,3	2,9		1	Negativ	Negativ	Negativ	
2	28	Middel-eksponeret	24,1	Holstein				1	Negativ	Negativ		
2	29	Høj-eksponeret	24,9	Holstein	0,5	1,7	0,4	0	Negativ	Negativ		Nykælver
2	30	Middel-eksponeret	24,9	Holstein				0	Negativ	Negativ		
2	31	Høj-eksponeret	25,7	Holstein	0,3	1,1	0,5	6	Negativ	Negativ		Nykælver, ingen lavprævalent aldersmatch
2	32	Middel-eksponeret	25,7	RDM				15	Negativ	Negativ		
3	33	Høj-eksponeret	12,4	Holstein	0,9	2,9		0	ugyldig	Negativ		
3	34	Middel-eksponeret	12,5	Holstein				17	Negativ	Negativ		
3	35	Høj-eksponeret	16,1	Holstein	0,3	1,7		0	Negativ	Negativ		
3	36	Middel-eksponeret	16,1	Holstein				12	Negativ	Negativ		
3	37	Høj-eksponeret	17,6	Holstein	0,5	0,7	0,7	4	-	Negativ		Svaber ej analyseret
3	38	Middel-eksponeret	17,7	Krydsning				0	Negativ	Negativ		
4	39	Høj-eksponeret	6,1	Jersey	1,1	0,8		0	Negativ	Negativ		
4	40	Middel-eksponeret	6,1	Jersey				0	Negativ	Negativ		
4	41	Høj-eksponeret	14,7	Jersey	1,1	2,6		0	-	Negativ		Svaber ej analyseret
4	42	Middel-eksponeret	14,7	Jersey				27	Negativ	Negativ		
4	43	Høj-eksponeret	15,5	Jersey	0,9	0,7	1,1	4	Negativ	Negativ		
4	44	Middel-eksponeret	15,4	Jersey				21	Negativ	Negativ		
4	45	Høj-eksponeret	16,3	Jersey	2,3	3,4	5,7	2	Negativ	Negativ		
4	46	Middel-eksponeret	16,4	Jersey				3	Negativ	Negativ		
4	47	Høj-eksponeret	23,0	Jersey	1,9	1,8		0	Negativ	Negativ		Nykælver
4	48	Middel-eksponeret	23,0	Jersey				0	Negativ	Negativ		Nykælver

Kvien					Moderdyrets ELISA-værdier			Resultater				Kommentarer
Besætning	Nr.	Kohorte	Alder i mdr.	Race	Før klvn.	1. efter klvn.	2. efter klvn.	ELISA S/P%	Svaber	Fæces	Qiagen-qPCR	
5	49	Høj-eksponeret	12,2	Holstein	2,5	5		2	Negativ	Negativ	36,16	
5	50	Middel-eksponeret	12,2	Holstein				0	Negativ	Negativ		
5	51	Høj-eksponeret	17,3	Holstein		1,5	2	0	Negativ	Negativ		
5	52	Middel-eksponeret	17,3	Holstein				15	Negativ	Negativ		
5	53	Høj-eksponeret	18,0	Holstein		4		6	Negativ	Negativ		
5	54	Middel-eksponeret	18,0	Holstein				5	Negativ	Negativ		
5	55	Høj-eksponeret	18,0	Holstein		3		5	Negativ	Negativ		
5	56	Middel-eksponeret	18,0	Holstein				0	Negativ	Negativ		
6	57	Høj-eksponeret	10,7	Holstein	0,5	1,8	0,8	0	Negativ	Negativ		Ingen lavprævalent aldersmatch
6	58	Middel-eksponeret	10,8	Holstein				0	Negativ	Negativ		
6	59	Høj-eksponeret	11,0	Holstein	1,6	2,5		0	Negativ	Negativ		
6	60	Middel-eksponeret	11,0	Holstein				0	Negativ	Negativ		
6	61	Høj-eksponeret	18,2	Holstein	2	2,1	2,6	4	Negativ	Negativ		
6	62	Middel-eksponeret	18,2	Holstein				0	Negativ	Negativ		
6	63	Høj-eksponeret	20,7	Holstein	0,8			1	Negativ	Negativ		
6	64	Middel-eksponeret	20,7	Holstein				2	Negativ	Negativ		
7	67	Høj-eksponeret	8,5	Jersey	0,4	0,9	0,5	0	Negativ	Negativ		
7	68	Middel-eksponeret	8,5	Jersey				0	Negativ	Negativ		
7	69	Høj-eksponeret	13,3	Jersey	2,3	1,3	2,4	0	Negativ	Negativ		
7	70	Middel-eksponeret	13,4	Jersey				0	Negativ	Negativ		
7	71	Høj-eksponeret	13,8	Jersey	0,4	1,5	1,7	0	Negativ	Negativ		
7	72	Middel-eksponeret	13,8	Jersey				0	Negativ	Negativ		
7	73	Høj-eksponeret	16,5	Jersey	3	3		4	Negativ	Negativ		
7	74	Middel-eksponeret	16,3	Jersey				2	Negativ	-		Ingen gødningsprøve afleveret.

Kvien					Moderdyrets ELISA-værdier				Resultater			Kommentarer
Besætning	Nr.	Kohorte	Alder i mdr.	Race	Før klvn.	1. efter klvn.	2. efter klvn.	ELISA S/P%	Svaber	Fæces	Qiagen-qPCR	
7	75	Høj-eksponeret	19,0	Jersey	0,2	0,6	1	0	Negativ	Negativ		
7	76	Middel-eksponeret	19,1	Jersey				3	Negativ	Negativ		
8	77	Høj-eksponeret	5,9	Jersey	0,9	0,8		0	Negativ	Negativ		
8	78	Middel-eksponeret	5,9	Jersey				1	Negativ	Negativ		
8	79	Høj-eksponeret	6,9	Krydsning	0,6	0,9	2,1	1	Negativ	Negativ		
8	80	Middel-eksponeret	6,9	Jersey				0	Negativ	Negativ		
8	81	Høj-eksponeret	8,1	Jersey	1,6	2,8	3,1	0	Negativ	Negativ	Negativ	
8	82	Middel-eksponeret	8,1	Jersey				0	Negativ	Negativ		
8	83	Høj-eksponeret	9,1	Jersey	1,5	1,1	2,2	2	Negativ	Negativ		
8	84	Middel-eksponeret	9,1	Jersey				10	Negativ	Negativ		
8	85	Høj-eksponeret	9,1	Jersey	3,1	2,8	3,8	0	Negativ	Negativ	Negativ	
8	86	Middel-eksponeret	9,2	Jersey				5	Negativ	Negativ		
8	87	Høj-eksponeret	10,0	Jersey	1,5	0,5	0,6	0	Negativ	Negativ		
8	88	Middel-eksponeret	10,1	Jersey				3	Negativ	Negativ		
8	89	Høj-eksponeret	10,9	Jersey	1,8	0,8	5,1	2	Negativ	Negativ	Negativ	
8	90	Middel-eksponeret	10,9	Jersey				0	Negativ	Negativ		
8	91	Høj-eksponeret	12,7	Jersey	1,1	2,3		0	Negativ	Negativ		
8	92	Middel-eksponeret	12,7	Jersey				1	Negativ	Negativ		
8	94	Middel-eksponeret	14,3	Jersey				2	Negativ	Negativ		
8	95	Høj-eksponeret	14,3	Krydsning	1,1	0,7	1,8	4	Negativ	Negativ		
8	97	Høj-eksponeret	14,8	Jersey	0,9	0,5	0,6	0	Negativ	Negativ		
8	98	Middel-eksponeret	14,8	Jersey				14	Negativ	Negativ		
8	99	Høj-eksponeret	14,8	Jersey	0,9	1	0,9	1	Negativ	Negativ		
8	100	Middel-eksponeret	14,8	Jersey				0	Negativ	Negativ		

Kvien					Moderdyrets ELISA-værdier			Resultater				Kommentarer
Besætning	Nr.	Kohorte	Alder i mdr.	Race	Før klvn.	1. efter klvn.	2. efter klvn.	ELISA S/P%	Svaber	Fæces	Qiagen-qPCR	
8	101	Høj-eksponeret	15,0	Jersey	0,8	0,8	0,2	1	Negativ	Negativ		
8	103	Høj-eksponeret	15,1	Jersey	0,6	0,8	0,2	0	Negativ	Negativ		
8	104	Middel-eksponeret	15,1	Jersey				3	Negativ	Negativ		
8	105	Høj-eksponeret	16,0	Jersey	2	1,9	2,8	2	Negativ	Negativ		
8	106	Middel-eksponeret	16,1	Jersey				11	Negativ	Negativ		
8	108	Middel-eksponeret	16,5	Jersey				3	Negativ	Negativ		
8	109	Høj-eksponeret	16,7	Jersey	2,8	3,4	3,7	0	Negativ	Negativ		
8	110	Middel-eksponeret	16,7	Jersey				0	Negativ	Negativ		
8	111	Høj-eksponeret	16,9	Jersey	1,6	1,1	0,8	0	Negativ	Negativ		
8	112	Middel-eksponeret	16,9	Jersey				0	Negativ	Negativ		
8	113	Høj-eksponeret	17,0	Jersey	1,8			0	Negativ	Negativ		
8	114	Middel-eksponeret	17,1	Jersey				0	Negativ	Negativ		
8	115	Høj-eksponeret	17,1	Jersey	1,4	1,9	2,7	0	Negativ	Negativ		
8	116	Middel-eksponeret	17,2	Jersey				0	Negativ	Negativ		
8	117	Høj-eksponeret	17,9	Jersey	1,8	1,5	2,5	3	Negativ	Negativ		
8	118	Middel-eksponeret	17,9	Jersey				2	Negativ	Negativ		
8	119	Høj-eksponeret	18,7	Jersey	3,2	3,2	3,8	0	Negativ	Negativ		
8	120	Middel-eksponeret	18,7	Jersey				0	Negativ	Negativ		
8	121	Høj-eksponeret	19,0	Jersey		2,2	2,1	0	Negativ	Negativ		
8	122	Middel-eksponeret	19,0	Jersey				0	Negativ	Negativ		
8	123	Høj-eksponeret	20,1	Jersey	1,1	0,6	1,4	0	Negativ	Negativ		
8	124	Middel-eksponeret	20,1	Jersey				0	Negativ	Negativ		
8	125	Høj-eksponeret	20,2	Jersey	0,9	0,8	1,2	0	Negativ	Negativ		
8	126	Middel-eksponeret	20,2	Jersey				0	Negativ	Negativ		

Kvien					Moderdyrets ELISA-værdier			Resultater				Kommentarer
Besætning	Nr.	Kohorte	Alder i mdr.	Race	Før klvn.	1. efter klvn.	2. efter klvn.	ELISA S/P%	Svaber	Fæces	Qiagen-qPCR	
8	127	Høj-eksponeret	20,4	Jersey	2,3	2,9	3,1	0	Negativ	Negativ	Negativ	
8	128	Middel-eksponeret	20,4	Jersey				0	Negativ	Negativ		
8	130	Middel-eksponeret	21,3	Jersey				0	Negativ	Negativ		
8	131	Høj-eksponeret	21,7	Jersey	1,8	0,9		0	Negativ	Negativ		
8	132	Middel-eksponeret	21,7	Jersey				25	Negativ	Negativ		
8	198	Høj-eksponeret	15,0	Jersey	0,4	0,7	0,1	0	Negativ	Negativ		Tvilling
8	199	Høj-eksponeret	15,0	Jersey	0,4	0,7	0,1	0	Negativ	Negativ		Tvilling
9	133	Lav-eksponeret	5,9	Jersey				0	Negativ	Negativ		
9	134	Lav-eksponeret	6,0	Jersey				0	Negativ	Negativ		
9	135	Lav-eksponeret	6,2	Jersey				0	Negativ	Negativ		
9	136	Lav-eksponeret	7,8	Jersey				0	Negativ	Negativ		
9	137	Lav-eksponeret	8,1	Jersey				0	Negativ	Negativ		
9	138	Lav-eksponeret	8,5	Jersey				10	Negativ	Negativ		
9	139	Lav-eksponeret	12,2	Jersey				1	Negativ	Negativ		
9	140	Lav-eksponeret	12,4	Jersey				0	Negativ	Negativ		
9	141	Lav-eksponeret	14,2	Jersey				0	Negativ	Negativ		
9	142	Lav-eksponeret	14,6	Jersey				0	Ugyldig	Negativ		
9	143	Lav-eksponeret	14,7	Jersey				0	Negativ	Negativ		
9	144	Lav-eksponeret	14,7	Jersey				0	Negativ	Negativ		
9	145	Lav-eksponeret	15,0	Jersey				2	Negativ	Negativ		
9	146	Lav-eksponeret	15,1	Jersey				0	Negativ	Negativ		
9	147	Lav-eksponeret	15,8	Jersey				4	Negativ	Negativ		
9	148	Lav-eksponeret	15,9	Jersey				0	Negativ	Negativ		
9	149	Lav-eksponeret	16,1	Jersey				2	Negativ	Negativ		

Kvien					Moderdyrets ELISA-værdier			Resultater				Kommentarer
Besætning	Nr.	Kohorte	Alder i mdr.	Race	Før klvn.	1. efter klvn.	2. efter klvn.	ELISA S/P%	Svaber	Fæces	Qiagen-qPCR	
9	150	Lav-eksponeret	16,9	Jersey				0	Negativ	Negativ		
9	151	Lav-eksponeret	17,0	Jersey				14	Negativ	Negativ		
9	152	Lav-eksponeret	17,5	Jersey				0	Negativ	Negativ		
9	153	Lav-eksponeret	17,9	Jersey				0	Negativ	Negativ		
9	154	Lav-eksponeret	17,9	Jersey				3	Negativ	Negativ		
9	155	Lav-eksponeret	18,8	Jersey				0	Negativ	Negativ		
9	156	Lav-eksponeret	19,0	Jersey				0	Negativ	Negativ		
9	157	Lav-eksponeret	19,8	Jersey				0	Negativ	Negativ		
9	158	Lav-eksponeret	20,2	Jersey				0	Negativ	Negativ		
9	159	Lav-eksponeret	20,4	Jersey				0	ugyldig	Negativ		
9	160	Lav-eksponeret	20,6	Jersey				0	Negativ	Negativ		
9	161	Lav-eksponeret	20,6	Jersey				0	Negativ	Negativ		
9	162	Lav-eksponeret	21,2	Jersey				1	Negativ	Negativ		
9	163	Lav-eksponeret	21,7	Jersey				0	Negativ	Negativ		
9	164	Lav-eksponeret	22,9	Jersey				21	Negativ	Negativ		
9	165	Lav-eksponeret	24,8	Jersey				0	Negativ	Negativ		
10	166	Lav-eksponeret	5,8	Holstein				1	Negativ	Negativ		
10	167	Lav-eksponeret	6,1	Holstein				1	Negativ	Negativ		
10	168	Lav-eksponeret	6,9	Holstein				1	Negativ	Negativ		
10	169	Lav-eksponeret	8,1	Holstein				0	Negativ	Negativ		
10	171	Lav-eksponeret	9,1	Holstein				0	Negativ	Negativ		
10	172	Lav-eksponeret	9,2	Holstein				0	Negativ	Negativ		
10	173	Lav-eksponeret	9,9	Holstein				1	Negativ	Negativ		
10	174	Lav-eksponeret	10,5	Holstein				0	Negativ	Negativ		

Kvien					Moderdyrets ELISA-værdier			Resultater				Kommentarer
Besætning	Nr.	Kohorte	Alder i mdr.	Race	Før klvn.	1. efter klvn.	2. efter klvn.	ELISA S/P%	Svaber	Fæces	Qiagen-qPCR	
10	175	Lav-eksponeret	10,9	Krydsning				0	Negativ	Negativ		
10	176	Lav-eksponeret	10,9	Holstein				0	Negativ	Negativ		
10	177	Lav-eksponeret	10,9	Holstein				0	Negativ	Negativ		
10	178	Lav-eksponeret	11,2	Holstein				0	Negativ	Negativ		
10	180	Lav-eksponeret	13,2	Holstein				2	Negativ	Negativ		
10	181	Lav-eksponeret	13,7	Holstein				2	Negativ	Negativ		
10	182	Lav-eksponeret	14,3	Holstein				31	Negativ	Negativ		
10	183	Lav-eksponeret	15,4	Holstein				1	Negativ	Negativ		
10	184	Lav-eksponeret	16,2	Holstein				0	Negativ	Negativ		
10	185	Lav-eksponeret	16,5	Holstein				0	Negativ	Negativ		
10	186	Lav-eksponeret	16,5	Holstein				4	Negativ	Negativ		
10	187	Lav-eksponeret	16,7	Holstein				0	Negativ	Negativ		
10	188	Lav-eksponeret	17,1	Holstein				0	Negativ	Negativ		
10	190	Lav-eksponeret	18,0	Holstein				0	Negativ	Negativ		
10	191	Lav-eksponeret	18,1	Holstein				0	Negativ	Negativ		
10	192	Lav-eksponeret	18,9	Holstein				0	Negativ	Negativ		
10	194	Lav-eksponeret	20,1	Holstein				0	Negativ	Negativ		
10	195	Lav-eksponeret	21,8	Holstein				8	Negativ	Negativ		
10	197	Lav-eksponeret	24,1	Holstein				0	Negativ	Negativ		
Udgået												
2	12	Middel-eksponeret	10,9	Holstein								Ej fundet
6	23	Høj-eksponeret	15,9	Holstein	0,5	2	2,5					Ej fundet
6	24	Middel-eksponeret	15,9	Holstein								Ej fundet
8	65	Høj-eksponeret	6,2	Jersey		2,4						Solgt

8	66	Middel-eksponeret	6,3	Jersey								Solgt
1	93	Høj-eksponeret	14,2	Jersey	0,8	0,5	0,6					Ej fundet
1	96	Middel-eksponeret	14,3	Jersey								Ej fundet
1	102	Middel-eksponeret	15	Jersey								Ej fundet
1	107	Høj-eksponeret	16,5	Krydsning	1	1,5	1,4					Ej fundet
1	129	Høj-eksponeret	21,3	Jersey	0,4	1	1,7					Ej fundet
10	170	Lav-eksponeret	8,3	Holstein								Ej fundet
10	179	Lav-eksponeret	12,6	Holstein								Ej fundet
10	189	Lav-eksponeret	17,3	Holstein								Ej fundet
10	193	Lav-eksponeret	19,6	Krydsning								Ej fundet
10	196	Lav-eksponeret	22,6	Holstein								Ej fundet