



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap**
Institutionen för kliniska vetenskaper

Utvärdering av provtagningsmetodiken vid luftvägsinfektion hos kalv

Sandra Gustavsson

*Uppsala
2017*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2017:21*

Utvärdering av provtagningsmetodiken vid luftvägsinfektion hos kalv

Evaluation of the sampling method of bovine respiratory disease

Sandra Gustavsson

Handledare: Madeleine Trävén, institutionen för kliniska vetenskaper

Biträdande handledare: Virpi Welling, Gård & Djurhälsan

Biträdande handledare: Helle Ericsson Unnerstad, SVA

Examinator: Jonas Johansson Wensman, institutionen för kliniska vetenskaper

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0736

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2017

Delnummer i serie: Examensarbete 2017:21

ISSN: 1652-8697

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: luftvägsinfektion, kalv, provtagningsmetodik, bakteriologi

Key words: respiratory disease, calf, sampling method, bacteriology

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper

SAMMANFATTNING

Luftvägsinfektioner är vanligt förekommande hos svenska kalvar, framför allt i specialiserad slaktnötsuppfödning. Vid utredning av problematiken är provtagning, isolering av bakterier och resistensbestämning väsentliga delar. Provtagning med en provtagningspinne i kalvens näshåla är den provtagningsmetod som rutinemässigt används. En förbättrad provtagningsmetodik, till exempel vilken provtagningspinne som används, skulle kunna öka chanserna att isolera de sjukdomsframkallande bakterierna.

I studien besöktes tio besättningar med specialiserad slaktnötsuppfödning för provtagning av totalt 100 kalvar. Varje kalv provtogs med 3-4 olika provtagningspinnar (A-svabb, E-svabb, uteruspinne och MWE-svabb) med syftet att jämföra de olika provtagningspinnarnas förmåga att ge relevanta bakteriefynd. A-svabben som oftast används påvisades ge signifikant sämre isoleringsfrekvens än övriga svabbar. E-svabben var den svabb som upplevdes vara den bästa kompromissen mellan isoleringsfrekvens, pris och användarvänlighet. Studien påvisade inga signifikanta skillnader mellan bakteriefloran hos kalvar med respektive utan luftvägssjukdom.

Resistensbestämning av isolerade bakteriestammar påvisade penicillin- och ampicillinresistent *Pasteurella multocida* i tre besättningar, en egenskap som endast påvisats vid två tillfällen tidigare i Sverige. *Mycoplasma bovis*, en förhållandevis ny bakterie i Sverige som riskerar att orsaka svårbehandlad luftvägssjukdom, påvisades i två besättningar. Dessa fynd talar för betydelsen av provtagning och smittskyddsarbete.

SUMMARY

Respiratory infection is common among Swedish calves, not least in specialized beef production. While investigating the issue, sampling, bacterial isolation and antimicrobial susceptibility testing are essential elements. Sampling with a swab into the nasal cavity of the calf, is the method of sampling routinely used. An improved methodology of sampling, by such as choice of swab, has the potential to increase the ability to isolate the disease-causing bacteria.

The study included ten herds of beef cattle for sampling of in total one hundred calves. Each calf was sampled with 3-4 different types of swabs (A-swab, E-swab, uterine swab and MWE-swab) with the aim of comparing the capacity of the swabs to yield relevant bacteriological findings. The swab mainly used in practice, the A-swab, was found to give a significantly lower isolation frequency than the other swabs tested. The E-swab was perceived to be the best compromise between isolation rate, cost and ease of use. The study showed no significant difference between the nasal bacterial flora of calves with and without respiratory symptoms.

Antimicrobial susceptibility testing of isolated bacterial strains demonstrated penicillin and ampicillin resistant *Pasteurella multocida* in three herds, a property only found twice before in Sweden. *Mycoplasma bovis*, a relatively rare bacterium in Sweden and which is known to cause respiratory disease that is hard to cure, was detected in two herds. These findings highlight the importance of sampling and of preventive disease control.

INNEHÅLL

INLEDNING	1
LITTERATURÖVERSIKT	1
Pneumoni hos kalv	1
Provtagning vid pneumoni	2
Alternativa provtagningsmetoder	2
Jämförelse mellan de olika metoderna	3
Kalvens normalflora i luftvägarna.....	4
Flora i luftvägarna vid pneumoni	5
Antibiotikaresistens	7
MATERIAL OCH METODER	7
RESULTAT	12
Jämförelse av provtagningspinnarna.....	12
Isolering av bakterier.....	13
Jämförelse av bakteriella fynd hos sjuk, lindrigt sjuk respektive frisk	13
Fynd i relation till hälsostatus	13
Förekomst av M. bovis.....	16
Kartläggning av antibiotikaresistens	16
DISKUSSION	17
Jämförelse av provtagningspinnarna.....	17
Isolering av bakterier.....	22
Jämförelse av bakteriella fynd hos sjuk, lindrigt sjuk respektive frisk	23
Fynd i relation till hälsostatus	23
Förekomst av M. bovis.....	24
Kartläggning av antibiotikaresistens	24
KONKLUSION.....	25
Tack.....	25
REFERENSER.....	26

INLEDNING

Luftvägsinfektioner är vanligt förekommande hos svenska kalvar, framför allt i specialiserad slaktnötsuppfödning eftersom den inkluderar blandning av kalvar från flera besättningar. Vid utredning av luftvägsproblem är det betydelsefullt att kunna bestämma orsakande mikrobiellt agens, för att kunna välja rätt behandling och anpassa förebyggande åtgärder.

För att uppnå goda resultat vid medicinsk behandling av kalvar med luftvägsinfektion är det viktigt att fastställa vilka de orsakande mikroorganismerna är samt att de orsakande bakterierna är känsliga för de antibiotika som används. Provtagning och resistensbestämning är därför en viktig del av utredningen av besättningsproblematik.

Provtagning med en provtagningspinne i kalvens näshåla är den provtagningsmetod som rutinemässigt används. Det är en enkel metod jämfört med provtagning djupare ner i luftvägarna såsom i luftstrupe och lungor och metoden passar därför bra under fältmässiga förhållanden. Dessvärre hittar man inte relevanta bakterier i den utsträckning som vore tillfredställande, utan får alltför många negativa odlingssvar, trots att sjukdomsalstrande bakterier sannolikt finns i kalvens luftvägar. Provtagningsmetodiken, till exempel provtagningsdjupet i näshålan, kan ha betydelse för chanserna att isolera de sjukdomsframkallande bakterierna.

Syftet med arbetet var att jämföra olika provtagningspinnar vid provtagning i näshålan på kalvar med luftvägsinfektion, för att se om pinnens längd och utformning har betydelse för möjligheten att isolera relevanta bakterier. Ytterligare syften var att jämföra de bakteriella fynden hos kalvar med respektive utan luftvägssymptom, undersöka isolerade bakteriers mönster av antibiotikaresistens samt att studera förekomsten av bakterien *Mycoplasma bovis*.

Om det visar sig att en annan provtagningspinne jämfört med dagens standard, ökar möjligheterna till att isolera relevanta bakterier så kan byte av pinne bidra till en utveckling av provtagningsmetodiken.

LITTERATURÖVERSIKT

Pneumoni hos kalv

Luftvägsinfektion hos kalv är en multifaktoriell sjukdom, där faktorer hos djuret, hos de patogena mikroorganismerna, i omgivningen och i djurhållningen påverkar. Det finns många etiologiska agens som kan orsaka sjukdomen (Radostits *et al.*, 2007). Samtidig infektion med flera agens är vanligt vid lunginflammation (Kusiluka *et al.*, 2000).

Luftvägsinfektioner hos kalv ger ofta hög morbiditet. Det yttrar sig ofta som ett besättningsproblem, värst drabbas besättningar med specialiserad uppfödning av köttdjur, men även mjölkproducerande besättningar drabbas (Bengtsson & Viring, 2000).

Luftvägsinfektioner hos nötkreatur i Sverige är primärt orsakade av en virusinfektion, men förvärras ofta av en bakterieinfektion sekundärt (Fall, 2013). Bovint respiratoriskt syncytialt virus (RS-virus), bovint coronavirus (BCV), parainfluensavirus typ 3 (PIV-3), bovina adenovirus (BAV), samt även bovint virusdiarré virus (BVDV), är virus som orsakar luftvägsinfektion och som har påvisats i Sverige (Bengtsson & Viring, 2000). Hägglund *et al.* (2006) visade att de tre förstnämnda av dessa virus är vanligt förekommande i svenska besättningar. En liknande situation föreligger i vårt grannland Finland (Härtel *et al.*, 2004). RS-

virus orsakar generellt klinisk sjukdom, medan övriga viroser är mildare, trots det banar viroserna väg för sekundära bakterieinfektioner genom att skada luftvägarna och i vissa fall ge immunosuppression (Bengtsson & Viring, 2000). Sedan år 2014 anses Sverige vara fritt från BVDV (SVA, 2016a).

Hos nötkreatur i Sverige är den vanligaste bakteriella luftvägspatogenen *Pasteurella multocida* (*P. multocida*), men även *Mannheimia haemolytica* (*M. haemolytica*) och *Histophilus somni* (*H. somni*) förekommer (Fall, 2013). Ytterligare en viktig bakterie är *Mycoplasma bovis* (*M. bovis*), som under 2011 påvisades i tre besättningar med luftvägssjukdom hos kalv i Sverige. Infektion med *M. bovis* ger upphov till en varierad sjukdomsbild, som ofta är svårbehandlad och detta agens bör framför allt misstänkas när bristfälliga behandlingsresultat mot lunginflammation föreligger. Även kombinationen av luftvägsinfektion och led- och/eller mellanöreinflammation hos kalvar indikerar *M. bovis*-problematik. Ett viktigt symptom på mellanöreinflammation är så kallad head-tilt, det vill säga att huvudet hålls på sned (Ericsson Unnerstad *et al.*, 2012).

Enligt Läkemedelsverkets rekommendationer sätts behandling mot lunginflammation hos kalv i Sverige bara in vid klinisk sjukdom med behandling av enskilda djur och bara undantagsvis som metafylaktisk gruppbehandling (Läkemedelsverket, 2013). Antibiotikabehandling ordineras med i första hand bensylpenicillin i doseringen 20 mg/kg intramuskulärt två gånger per dygn, alternativt 40 mg/kg (<100 kg kroppsvikt) eller 30 mg/kg (>100 kg kroppsvikt) en gång per dygn. Vid infektion med *M. bovis* är istället tetracyklin förstahandsval eftersom mykoplasma är naturligt okänslig för bensylpenicillin. Rekommenderad behandlingstid är fem dygn. Vid terapivikt ska, enligt samma rekommendation, anledningen till denna undersökas och vid misstanke om mykoplasmaförekomst bör detta utredas genom provtagning (Läkemedelsverket, 2013).

Enligt Läkemedelsverkets rekommendation kring NSAID-användning till nötkreatur, får, get och gris rekommenderas NSAID-behandling som komplement till antibiotika vid fall av akut pneumoni med kraftigt nedsatt allmäntillstånd. Vid fall av lindrig till måttlig nedsättning av allmäntillståndet förväntas däremot effekten av NSAID inte vara kliniskt betydelsefull (Läkemedelsverket, 2009).

Provtagning vid pneumoni

Vid utredning av besättningsproblematik med luftvägssjukdom hos kalv är både provtagning och resistensbestämning viktigt. När det gäller de vanliga bakteriesläktena *Pasteurella* och *Mannheimia* är antibiotikakänsligheten det som är mest intressant. Dock är provtagning och isolering av bakterien en förutsättning för att kunna göra en resistensbestämning. Därför redovisas här olika provtagningsmetoder. Resistensbestämning kan sedan göras på de erhållna isolaten oberoende av vilken metod som användes vid provtagning.

Alternativa provtagningsmetoder

Nässvabb

Provtagning med hjälp av en nässvabb innebär att en svabb (en tops-liknande provtagningspinne) förs upp i nashålan och roteras mot slemhinnan.

Nasofaryngeal svabb

En liknande provtagningsmetod är nasofaryngeal (faryngeal) svabb, vilket är en längre topsliknande pinne som används för att ta prov via nashålan längre bak i svalgområdet. Denna svabb kan vara täckt av ett hölje när den förs in till provtagningsstället, vilket ökar tillförlitligheten i provresultatet i jämförelse med en nässvabb genom att minska graden av kontamination (Radostits *et al.*, 2007).

Trakealinspirat och trakealsvabb

Trakealinspirat (trakealsköljning, TTW) används för att utvärdera de stora luftvägarna mikrobiologiskt. Provet tas antingen transtrakealt eller via endoskop. Ett transtrakealt trakealinspirat innebär att provet tas i trakea (luftstrupen) genom en kirurgisk gjord ingång till luftstrupen, medan ett trakealinspirat via endoskop innebär provtagning på samma anatomiska plats men med ingång genom de övre luftvägarna. Själva provtagningen innebär att vätska sprutas in och sedan aspireras för att erhålla provet. Alternativa metoder till dessa är att på motsvarande sätt istället använda en svabb; transtrakealsvabb eller trakealsvabb beroende på ingångsväg (Radostits *et al.*, 2007).

Bronkoalveolärt lavage

Bronkoalveolärt lavage (bronkoalveolär sköljning, BAL) är ytterligare en provtagningsmetod för de nedre luftvägarna, nämligen de mest distala delarna. Provtagningen innebär att provtagningsutrustningen, antingen blint eller med hjälp av ett endoskop med fiberoptik, förs in så långt det går i luftvägarna där vätska sedan sprutas in och aspireras för att erhålla provet (Radostits *et al.*, 2007).

Jämförelse mellan de olika metoderna

Hotchkiss *et al.* (2010) hänvisar till opublicerade observationer i sitt laboratorium som visade överensstämmelse mellan bakteriefynd erhållna med nässvabb (15 cm lång) respektive nasofaryngeal svabb (30 cm lång); samtliga fynd av *P. multocida* erhållna med lång pinne påvisades också med kort pinne, hos kliniskt friska djur. Detta resultat är i enlighet med Doyle *et al.* (2015) som visade att både nässvabb och nasofaryngeal svabb hade väldigt bra överensstämmelse med referensmetoden TTW.

Provtagning med nässvabb och faryngealsvabb är metoder som är enkla att utföra (Godinho *et al.*, 2007; Doyle *et al.*, 2015). TTW är däremot en invasiv metod som kräver kirurgisk sterilitet, lokalbedövning och kunskap hos utövaren. Även BAL är relativt avancerat att utföra (Doyle *et al.*, 2015).

TTW anses enligt Doyle *et al.* (2015) vara den föredragna metoden för att erhålla högsta möjliga kvalitet på proverna, för analys av luftvägspatogener. Detta eftersom vid provtagning med nässvabb, faryngeal svabb liksom BAL finns risk för kontamination från de övre luftvägarnas flora.

Enligt Radostits *et al.* (2007) är nässvabbprover bara användbart när fynd görs av ett kliniskt relevant agens som inte förekommer i normalfloran. Däremot är nässvabbprover enligt Radostits *et al.* (2007) en otillräcklig metod för att utvärdera lungornas hälsostatus eftersom nashålan innehåller både patogena och icke-patogena mikroorganismer, vilket ger bakteriella

odlingsresultat som är svårtolkade till följd av blandflora. Detta kan jämföras med den slutsats som Taylor *et al.* (2015) drar, nämligen att provtagning med svabb i de övre luftvägarna är ett användbart diagnostiskt verktyg vid luftvägssjukdom hos kalv förutsatt att det används i kombination med bedömning av kliniska symptom. Samtidigt har flera studier på friska (Hotchkiss *et al.*, 2010) respektive sjuka (DeRosa *et al.*, 2000; Godinho *et al.*, 2007; Doyle *et al.*, 2015) kalvar visat att odlingsresultat från nässvabbprov är en god indikator på bakterieförekomsten i lungvävnaden.

Vid provtagning med nässvabb bör ett storleksmässigt representativt urval av individer i en grupp provtas (Allen *et al.*, 1991; Bengtsson & Viring 2000; Godinho *et al.*, 2007), eftersom det ger bättre överensstämmelse mellan odlingsvar och mikrobiologisk status.

Vid misstanke om *M. bovis*-orsakad pneumoni hos kalv rekommenderar SVA nässvabbprovtagning med en E-svabb för PCR-analys (SVA, 2016b). Nässvabbprov kan dock vara opålitligt enligt Nicholas (2011) på grund av intermittent utsöndring av *M. bovis*. Enligt Thomas *et al.* (2002b) är BAL en bättre metod än nässvabbprovtagning för att påvisa *M. bovis* hos nötkreatur med pneumoni.

Kalvens normalflora i luftvägarna

Bakteriefloran i de övre luftvägarna är rik och diversifierad (Lima *et al.*, 2016) samt är dynamisk och fluktuerar över tid (Magwood *et al.*, 1969).

Potentiellt patogena bakterier finns i näshåla och lunga hos både friska och sjuka kalvar (Allen *et al.*, 1991). Angen *et al.* (2009) visade att potentiellt patogena bakterier fanns i trakea hos 68 % av friska djur, varav hos 32 % i förvånansvärt stor mängd utan att orsaka sjukdom.

Avsaknad av bakterier vid odling av trakeobronkiala sköljprover visades vara vanligare hos kalvar utan luftvägssjukdom jämfört med hos kalvar med luftvägssymptom (Autio *et al.*, 2007). Liknande resultat erhöles Barbour *et al.* (1997) som påvisade en högre förekomst av ett antal bakterier i övre luftvägarna hos djur med luftvägssymptom jämfört med hos friska djur.

M. haemolytica

Prevalensen av *M. haemolytica* hos friska djur har varierat i olika studier: den bestämdes med provtagningsmetoden transtrakealsvabb till 23 % bland kalvar i Danmark (Angen *et al.*, 2009); till 31,6 % med hjälp av nasofaryngealsvabb hos till synes friska kalvar i Kanada (Allen *et al.*, 1991) samt till en något lägre frekvens nämligen 9,8 % i en studie med nässvabbprovtagning utförd i Belgien (Catry *et al.*, 2006). Vidare visade Klima *et al.* (2011) med hjälp av nasofaryngealsvabb att prevalensen av *M. haemolytica* var mellan 13 och 20 % vid olika tidpunkter i feedlots i Kanada, utan att i studien inkludera djurens kliniska status.

P. multocida

Prevalensen av *P. multocida* har också varierat mellan olika studier: i en skotsk studie (Hotchkiss *et al.*, 2010) där nässvabbprover togs visades prevalensen av bärarskap av *P. multocida* hos kalvar utan luftvägssymptom vara 17 %. Detta fynd är storleksmässigt hyfsat i enlighet med Autio *et al.* (2007) som med hjälp av trakeobronkiala sköljprover påvisade en förekomst av *P. multocida* på 26 % hos finska kalvar utan luftvägssymptom samt med Bengtsson & Viring (2000) som genom nässvabbprovtagning påvisade en frekvens

av *Pasteurella* spp. (dock inte artbestämda) på 32 % hos svenska friska kalvar. Markant högre prevalens av *P. multocida* har påvisats av Angen *et al.* (2009) med hjälp av transtrakeal aspirat, nämligen 48 % hos friska djur i Danmark; av Allen *et al.* (1991) med hjälp av nasofaryngealsvabbprover, nämligen 46,7 % hos friska kalvar i Kanada; samt av Catry *et al.* (2006) som med hjälp av provtagning med nässvabbar påvisade en prevalens på 57,4 % hos friska kalvar i Belgien.

M. bovis

Även *M. bovis* påvisas, enligt Thomas *et al.* (2002a) som i Belgien använde provtagningsmetoden BAL, hos såväl friska som sjuka individer. Det har även Gagea *et al.* (2006) visat i Kanada, som vid studier av lungor funnit *M. bovis* i såväl patologiskt förändrade som i normala lungor. Studier kring förekomsten av *M. bovis* hos till synes friska djur har påvisat förekomsten 0 % med trakeobronkiala sköljprover (och inte heller några fynd hos sjuka individer i Finland (Autio *et al.*, 2007), 0 % med transtrakeal aspirat (och inte heller där några fynd hos sjuka individer) i Danmark (Angen *et al.*, 2009) samt 3 % i en kalvgrupp i Nederländerna när prover från nashålan togs (ter Laak *et al.*, 1992).

Flora i luftvägarna vid pneumoni

Den bakteriella floran i de övre luftvägarna hos kalvar vid några dagars ålder visar inget samband med senare utveckling av pneumoni, eftersom de potentiellt patogena bakterierna kan finnas i luftvägarna oavsett senare hälsa eller sjukdom (Lima *et al.*, 2016). Även Fulton *et al.* (2002) har visat att uppsättningen av bakterier i nashålan inte förutsäger senare utveckling av lunginflammation. Däremot uppvisar en stor bakteriemängd vid ung ålder, enligt Lima *et al.* (2016) ett samband med senare utveckling av pneumoni. Holman *et al.* (2015) visade att respiratorisk sjukdom medförde en minskad diversitet hos bakteriefloran i de övre luftvägarna.

Magwood *et al.* (1969) visade att enzootisk pneumoni inte var associerat till någon specifik nasal bakteriell flora, tvärt om var de potentiella patogenerna *P. multocida* och *P. haemolytica* [numera *M. haemolytica*] en del av basalfloran och visade stor spridning i populationen. Inte heller aktiv kolonisation och dominans av *Pasteurella*-arter under flera dagars tid visade samband med utveckling av pneumoni. Likaså visade Bengtsson & Viring (2000) att framför allt sjuka men även friska kalvar bär *Pasteurellabakterier* i nashålan.

M. haemolytica

Prevalensen av *M. haemolytica* har i en amerikansk studie med hjälp av nässvabbprovtagning visats vara signifikant högre hos djur med klinisk sjukdom jämfört med hos friska djur (Taylor *et al.*, 2015). Även Lima *et al.* (2016) i USA har med faryngeal svabb visat att förekomsten av bakterier av släktet *Mannheimia* var signifikant högre hos kalvar med pneumoni jämfört med hos friska kalvar.

Ytterligare amerikanska studier har bestämt prevalensen av *M. haemolytica*: nämligen Doyle *et al.* (2015) som med hjälp av transtrakealsköljprover kom fram till prevalensen 16 % hos kalvar med klinisk luftvägssjukdom och Fulton *et al.* (2009) som visade en förekomst av *M. haemolytica* på 25 % i lungvävnad från fall av lunginflammation med dödlig utgång.

P. multocida

Bengtsson & Viring (2000) som undersökte förekomsten av *Pasteurella* spp. i nashålan hos svenska kalvar fann sådana bakterier hos 41 % av kalvar med luftvägssjukdom, vilket innebär att bakterierna var signifikant vanligare hos kalvar med luftvägssjukdom jämfört med kalvar utan luftvägssymptom. Detta resultat är i enlighet med Allen *et al.* (1991) som också visat att isolering av *P. multocida* från nässvabbprover och BAL-vätska är korrelerat med klinisk sjuklighet. Å andra sidan har Taylor *et al.* (2015) med hjälp av nässvabbprovtagning påvisat likvärdig förekomst av *P. multocida* hos kalv med klinisk sjukdom respektive hos kontrolldjur.

Vidare såg Taylor *et al.* (2015) ett samband mellan fynd av *P. multocida* med hjälp av nässvabbprovtagning och minskad risk för behov av behandling mot pneumoni, vilket författaren har svårt att förklara men teorier som nämns i artikeln är att *P. multocida* i den aktuella djurpopulationen var ett inkonsekvent agens respektive att betydelsen av *P. multocida* i den multifaktoriella sjukdomen lunginflammation beror på samtidig förekomsten av andra agens. Den teorin, att *P. multocida* bara orsakar sjukdom i kombination med andra faktorer, har också visats av Autio *et al.* (2007) med hjälp av trakeobronkiala sköljprover. De konstaterade nämligen ett samband mellan klinisk respiratorisk sjukdom och *P. multocida* i kombination med andra bakteriella patogener men inte som ensamt agens (Autio *et al.*, 2007).

Ytterligare studier har berört prevalensen av *P. multocida* bland kalvar med luftvägssjukdom: i Finland påvisades prevalensen 14,3 % då trakeobronkiala sköljprover användes (Nikunen *et al.*, 2007); i USA påvisades prevalensen 24,5 % med hjälp av lungprover tagna postmortalt (Fulton *et al.*, 2009); samt i USA konstaterades en prevalens på 59 % då sköljprover tagna transtrakealt användes (Doyle *et al.*, 2015).

M. bovis

I Danmark drabbades år 2011 40 besättningar av *M. bovis*-associerat sjukdomsutbrott eller misstanke därom. Åren därefter (2012-2014) var antalet diagnosticerade *M. bovis*-utbrott omkring 40-60 stycken per år, vilket motsvarar 1-2 % av Danmarks nötkreatursbesättningar. Symptomens allvarlighetsgrad tycks ha förvärrats jämfört med tiden före 2011 (Rosenbaum Nielsen, 2015). Den kliniska sjukdomsbilden har varierat med förekomst av lunginflammation hos vuxna djur i 60 % av utbrotten, lunginflammation hos unga djur i 43 %, artrit hos unga djur i 37 %, mastit i 33 % samt mellanöreinflammation hos unga djur i 28 % av utbrotten (Bisgaard Petersen *et al.*, 2015).

I Finland påträffades *M. bovis* för första gången i november 2012, därefter har infektionen spridits vidare i landet och hade i maj år 2016 konstaterats i 88 besättningar med nötkreatur (Syrjälä *et al.*, 2016). I Finland har nyligen ett frivilligt kontrollprogram mot *M. bovis* upprättats (Tuunainen, 2016).

År 2011 påvisades *M. bovis* i en besättning i Sverige i samband med mastit samt i tre besättningar i samband med luftvägssjukdom hos kalv (Ericsson Unnerstad *et al.*, 2012). Sedan dess har mikroorganismen påvisats i fler svenska besättningar, men i dagsläget är det ingen vanlig orsak till luftvägsinfektion hos kalvar i Sverige (SVA, 2016b).

H. somni

Studien gjord av Bengtsson & Viring (2000) antyder att *H. somni* inte är en vanligt förekommande bakterie hos svenska kalvar. Hos danska kalvar däremot är *H. somni* ett vanligt agens (Tegtmeier *et al.*, 1999; Angen *et al.*, 2009), likaså i USA (Fulton *et al.*, 2009).

Antibiotikaresistens

Inom övervakningsprogrammet Svarm (Svensk veterinär antibiotika resistens monitorering) följs förekomsten av antibiotikaresistens hos bakterier från svenska djur. Den årliga rapporten år 2015 visade att resistens mot penicillin är väldigt ovanligt hos *P. multocida* och *M. haemolytica* hos nötkreatur i Sverige. Det kumulativa antalet fynd på besättningsnivå var då nämligen ett fynd av penicillinresistent *P. multocida* i en kalvbesättning 2003 samt två fynd av penicillinresistent *M. haemolytica* i kalvbesättningar år 2010 respektive 2015 (Svedres-Svarm 2015, 2016). Därefter har ytterligare ett fynd av penicillinresistent *P. multocida* gjorts, nämligen i en mjölkbesättning år 2016 (Ericsson Unnerstad, H., SVA, pers. medd., 2016).

MATERIAL OCH METODER

Studiedesign

Provtagning utfördes i tio besättningar med specialiserad slaktnötsuppfödning, under tidsperioden september och oktober 2016. Besättningarna valdes inte slumpmässigt och utan hänsyn till sjukdomsstatus. Urvalet baserades istället på personlig kännedom, geografisk lokalisering och en positiv inställning till att delta. Besättningarna fanns i Skåne, Södermanland, Närke, Västmanland och Uppland. I varje besättning valdes, i den mån det var möjligt, fem kalvar med och fem kalvar utan luftvägssymptom. Helst undveks kalvar som fått antibiotikabehandling eftersom det minskar möjligheten att påvisa bakterier. Därför prioriterades en obehandlad kalv med mildare symptom före en sjukare kalv med pågående behandling eller som nyligen fått antibiotika. Provtagningen förlades (med ett undantag) till gårdens mottagningsstall, det vill säga det stall där kalvarna först hölls efter inköp till besättningen, vilket innebar att besättningens yngsta åldersgrupp av djur provtogs. Åldern på provtagna kalvar var mellan 14 dagar och 4 månader.

Vid besöket inhämtades grundläggande information om djurhållningen, till exempel antal kalvar som djurhållningen omfattar, antal besättningar som kalvar köps från, mellangårdsavtal/förmedling med mera.

Vid besöket fylldes en tabell i med:

- kalvarnas identitet
- allmäntillstånd (AT) (gott, lindrigt nedsatt, nedsatt)
- aptit (normal, nedsatt) om djurägaren kunde uppge detta
- kroppstemperatur mätt rektalt
- dyspné (kraftig, lindrig, ingen)
- hosta (spontan, ingen)
- näsflöde (mucopurulent, seröst, inget)
- tårflöde (ja, nej)
- klinisk bedömning (sjuk, lindrigt sjuk, frisk). Bedömningen sjuk innebär någon av följande kombinationer: 1) nedsatt AT och feber. 2) gott AT, dyspné, nosflöde och hosta. 3) nedsatt AT, nosflöde och hosta. Bedömningen frisk innebär att AT är gott,

kroppstemperaturen är < 39,5 grader samt avsaknad av dyspné och hosta. Lindrig hypertermi eller nosflöde accepteras hos en frisk individ. Bedömningen lindrigt sjuk innebär att någon/några parametrar avviker, men kalven lever inte upp till bedömningen sjuk. Symptomen hängande öra respektive nedsatt AT ger alltid klassificeringen lindrigt sjuk alternativt sjuk, vilket av dessa beroende på övriga symptom.

- placering (box, luftkub). Noterar huruvida de provtagna kalvarna har direktkontakt eller indirekt kontakt via luft.
- ungefärlig kroppsvikt, visuellt uppskattad
- eventuell behandling (preparat, dos, behandlingstid, datum, behandlingssvar)

Studien bedömdes vara undantaget kravet på godkännande från en regional djurförsöksetisk nämnd enligt 2 kap. 15-21 §§ Statens jordbruksverks föreskrifter och allmänna råd (SJVFS 2015:38) om försöksdjur, saknr 150. Vidare har SVAs djurskyddsorgan gett godkännande till studien (beslut SVA31310). För att minimera skaderisken på kalvarna hjälptes minst två personer åt vid provtagningen, genom att en person tog proverna och minst en person fixerade kalvarna.

Varje kalv som valdes ut provtogs med tre till fyra provtagningspinnar, se tabell 1 med information om provtagningspinnarna samt bilder 1-3.

Tabell 1. Information om provtagningspinnarna. Se även kompletterande information i brödtexten

Benämning	A-svabb	E-svabb	Uteruspinne	MWE-svabb
Användning idag i Sverige	ja, används rutinmässigt	ja	i livmoder på häst	inte i Sverige*
Längd (exkl ev handtag)	13 cm	13 cm	76 cm	27 cm
Material i tipp	rayon	flockad med nylonfibrer*	viskos	rayon
Pris	7,1 kr (i 50-pack)	13,5 kr (i 50-pack)	Ca 32 kr	Ca 70 kr (billigare utan ledare)
Medium	kolat Amies	flytande Amies	kolat Amies (här)	kolat Amies (här)
Användning i studien	bakt. odling	bakt. odling + mykoplasmaanalys	bakt. odling	bakt. odling
Ledare	-	-	silikonslang (här)*	silikonslang*
Tillverkare	Copan	Copan	tillhandahålls av Kruise	Medical wire and equipment (MWE), Storbritannien

* se kompletterande information i brödtexten.

Kompletterande information om provtagningspinnarna:

- Att E-svabbens tip är flockad, innebär att den är täckt av korta utstående fibrer av nylon. Det medför en bra uppsugningsförmåga och att materialet som fås vid provtagningen frigörs bra till mediet.
- Uteruspinnen tillhandahålls i Sverige av företaget Kruise och dess benämning på pinnen är Equivet uterine culture swab. Pinnen säljs med dubbla skyddsrör som ska skydda topsen mot kontamination på väg in i livmodern, dessa nyttjades inte i denna studie. Istället användes separat inköpt silikonslang med en innerdiameter på 6 mm och en ytterdiameter på 10 mm. MWE-svabben säljs med en ledare av silikonslang i samma dimension.
- MWE-svabben är gjord för provtagning i näshåla på kalv, men den används inte i Sverige. I Finland däremot har den använts sedan 2012 och den tycks fungera bra (Pohjanvirta, T., Livsmedelssäkerhetsverket Evira, pers. medd., 2016).



Bild 1. Samtliga provtagningspinnar i sina förpackningar: E-svabb, A-svabb, MWE-svabb samt uterus-pinnen längst ner. Foto: Sandra Gustavsson.

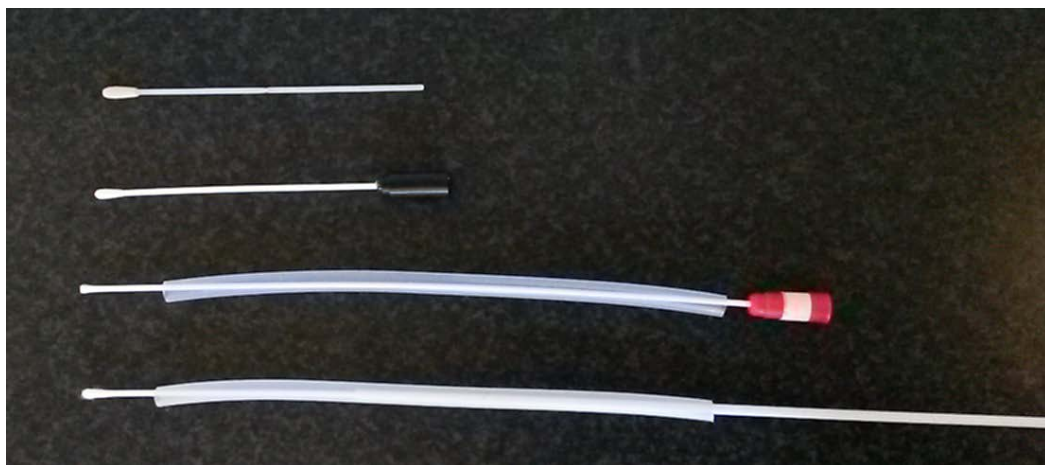


Bild 2. Samtliga provtagningspinnar: E-svabb, A-svabb, MWE-svabb samt uterus-pinnen längst ner. Foto: Sandra Gustavsson.



Bild 3. Tippen på samtliga provtagningspinnar: E-svabb, A-svabb, MWE-svabb samt uterus-pinnen längst till höger. Foto: Sandra Gustavsson.

Provtagning

Provtagningen utfördes på följande sätt:

1. Om kalven hade mycket synligt sekret i de yttre delarna av nosen, torkades detta bort för att minska risken att provtagningspinnarna skulle kontamineras med omgivningsflora från den yttre delen av näsborren.
2. De två korta pinnarna fördes tillsammans upp i kalvens näshåla via den ena näsborren och roterades mot slemhinnan. Detta moment ses i bild 4. Provtagningspinnarna placerades sedan i sitt respektive transportmedium.
3. Uteruspinnens ledare av silikonslang trädde på pinnen bakifrån. Dessa fördes upp i kalvens näshåla via den andra näsborren till den längd som utgjorde kalvens anatomiska begränsning, det vill säga tills det tog stopp på ett djup som kan antas vara



Bild 4. Provtagning pågår. Foto: Virpi Welling.

kalvens svalg. Där fördes topsen ur ledaren och roterades. Om möjligt så drogs topsen in i höljet igen innan uttagande ur näshålan. På de minsta kalvarna (ca <70 kg kroppsvikt) användes uterus-pinnen utan ledare eftersom ledaren var för grov för att kunna föras in i näshålan. Då fördes istället uterus-pinnen in oskyddat så långt det gick och roterades där.

4. MWE-svabben användes i sex av besättningarna. Anledningen till att den inte användes i alla besättningar var att leveransen av pinnarna blev försenad. Pinnen dold av dess ledare fördes in i kalvens näshåla via näsborren till kalvens anatomiska begränsning, det vill säga tills det tog stopp på ett djup som kan antas vara kalvens svalg. Där fördes pinnen ut ur höljet och roterades. Om möjligt så drogs topsen in i höljet igen innan uttagande ur näshålan. På de minsta

kalvarna (ca <70 kg kroppsvikt) användes även MWE-svabben utan ledare och fördes då in i nashålan oskyddad.

5. Punkterna tre och fyra utfördes i varierande ordning sinsemellan. Dessa prover togs ofta via samma näsborre, eftersom det förenklade genomförandet.

Leveransen av proverna till SVA skedde huvudsakligen med post, undantagsvis direkt med bil. Eventuell förvaring innan postning skedde i kylskåp.

Bakterieodling

Bakterieproverna odlades på SVA:s bakteriologiska laboratorium enligt gängse rutiner som innebär odling på hästblodagar (5 % hästblod), blåagar, hematinagar samt hästblodagar (5% hästblod) inkuberad i 5 % koldioxid. Odlingsplattorna inkuberades i 37 grader och avlästes efter ett och två dygn. Kolonier som enligt utseende misstänktes vara *Pasteurella* spp. eller *Mannheimia* spp. artbestämdes med metoden MALDI-TOF MS (matrix-assisted-laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry), med utrustningen MALDI Biotyper av märket Bruker och masspektra jämfördes mot Brukers bibliotek version 6903 med tillägg av 6 stammar av *Mannheimia* spp. och 24 stammar av *Pasteurella* spp.

Resistensbestämning

Isolerade stammar av *P. multocida*, *M. haemolytica* och *H. somni* resistensundersöktes med en mikrodilutionsmetod, VetMIC Stordjur, för att erhålla MIC-värden (minimum inhibitory concentration) (SVA, 2013). Gränsvärden för resistens hämtades från Svarm (Svedres-Svarm 2015, 2016), med undantag för gränsvärdet för ceftiofur som hämtades från CLSI (2015) där det anges vara gränsvärdet mellan känslig och intermediär. I tabell 7 framgår vilka antibiotika som användes, testade koncentrationer samt gränsvärden för resistens. Isolat som visades ha MIC-värden för penicillin >0,5 mg/l testades för produktion av betalaktamas med cefinastest.

Resistensundersökta stammar sparades i frys.

Provtagningsförfarandet för mykoplasma var detsamma som för bakteriologisk undersökning, men bara E-svabben användes för ändamålet. Proverna analyserades separat på SVA med hjälp av en PCR-metod som hämtats från Sachse *et al.* (2010).

Statistiska analyser

Förekomsten av olika bakterier hos kalvarna i relation till hälsostatus beräknades utifrån antalet kalvar vars prover gav positiva odlingssvar för respektive bakterie, oberoende av vilken/vilka provtagningspinnar som gav odlingsfynden. Statistisk utvärdering gjordes genom jämförelse av medelvärden i förhållande till 95 %-konfidensintervall. Medelvärden med icke överlappande konfidensintervall betraktades som signifikant skilda. Konfidensintervall beräknades med utgångspunkt från sambandet mellan F-distributionen, beta-distributionen och binomial-distributionen på samma sätt som i Svarmrapporterna (Svedres-Svarm 2011, 2012).

Vid jämförelse av de olika provtagningspinnarnas (A-svabb, E-svabb, uteruspinne, MWE-svabb) resultat hos samma kalv användes förutom konfidensintervall enligt ovan dessutom McNemar-test. Testet används för att jämföra proportioner då man har par av resultat (i detta

fall flera prover från samma kalv) av en binär (i detta fall fynd eller inte fynd) variabel. Statistisk signifikans fastslogs om p-värdet var <0,05. På samma sätt utvärderades betydelsen av provtagningspinnarnas längd (kort: A-svabb och E-svabb; lång: uteruspinne och MWE-svabb).

RESULTAT

Jämförelse av provtagningspinnarna

I tabell 2 redovisas provtagningspinnarnas isoleringsfrekvens. Med relevanta bakterier menas fynd av *P. multocida*, *M. haemolytica*, *H. somni* eller *M. varigena*. Tabellen visar exempelvis att provtagningspinnarnas respektive isoleringsfrekvens var 24 % för A-svabben, 39 % för E-svabben, 43 % för uteruspinne samt 40 % för MWE-svabben, vilket innebär att A-svabbens resultat var signifikant sämre än övriga provtagningspinnars.

Tabell 2. *Isoleringsfrekvens av relevanta bakterier, utom M. bovis, med de olika provtagningspinnarna. Proportionen av prov med relevant växt med olika svabbar, vid provtagning av samma kalv, undersöktes med McNemar-test. Statistiska skillnader mellan svabbarna anges med index (a;b) och värden med olika index är signifikant skilda (p<0,05). 95-procentigt konfidensintervall (KI) för isoleringsfrekvensen redovisas*

Provtagningspinne	Antal prov	Antal prov med relevant växt	Isoleringsfrekvens (%)	KI (95 %)
A-svabb	100	24	24 ^a	16,0; 33,6
E-svabb	99	39	39 ^b	29,7; 49,7
Uteruspinne	92	40	43 ^b	33,2; 54,2
MWE-svabb	50	20	40 ^b	26,4; 54,8

Tabell 3 visar en analys av odlingsresultaten utifrån provtagningspinnarnas längd (kort = A- och E-svabb, lång = uteruspinne och MWE-svabb), baserat på alla besättningar respektive bara de fem sist provtagna besättningarna. Anledningen till att olika antal besättningar inkluderades i analysen var att MWE-svabben bara användes i andra hälften av besättningarna. Tabellen visar att när resultaten från alla tio besättningarna inkluderades gav kort svabb isoleringsfrekvensen 45 % (konfidensintervall 35,0-55,3) medan lång svabb gav isoleringsfrekvensen 48 % (konfidensintervall 37,9-58,2). När istället bara resultaten från andra hälften av besättningarna inkluderades, alltså de där alla provtagningspinnarna användes, gav de korta svabbarna isoleringsfrekvensen 32 % (konfidensintervall 19,5-46,7) medan de långa svabbarna gav isoleringsfrekvensen 44 % (konfidensintervall 30,0-58,7). Skillnaderna var inte statistiskt signifikanta.

När resultaten från bakterieodlingarna granskades sågs inga tecken på att de olika längderna på provtagningspinne gav fynd av olika bakteriearter. Inte heller sågs några tecken på att de olika pinnlängderna skiljde sig i resultat när odlingarna från de större djuren granskades separat.

Tabell 3. *Isoleringsfrekvens av relevanta bakterier, utom M. bovis, relaterat till provtagningspinnarnas längd; kort (A-svabb och E-svabb) respektive lång (uteruspinne och MWE-svabb). 95-procentigt konfidensintervall (KI) för isoleringsfrekvensen redovisas*

Inkluderade besättningar	Antal kalvar	Kort svabb			Lång svabb			p-värde
		Antal positiva	Andel positiva	KI (95%)	Antal positiva	Andel positiva	KI (95%)	
Alla tio besättningar	100	45	45 %	35,0; 55,3	48	48 %	37,9; 58,2	0,85
De fem sist provtagna besättningarna	50	16	32 %	19,5; 46,7	22	44 %	30,0; 58,7	0,30

Isolering av bakterier

Under projektets gång odlades totalt 341 prover bakteriologiskt. Andelen av dessa som gav relevanta odlingsresultat var 36 %. Med relevanta odlingsresultat menas att en specifik bakterie odlades fram, i detta projekt *P. multocida*, *M. haemolytica*, *H. somni* eller *Mannheimia varigena* (*M. varigena*).

Tabell 4 visar påvisad prevalens av olika bakterier hos kalvarna. Till exempel visar tabellen att 55 % av kalvarna var positiva för *P. multocida*, medan 7 % av kalvarna var positiva för *M. haemolytica*. Övriga bakterier som isolerades var *H. somni* och *M. varigena*. Vidare påvisades *M. bovis* med hjälp av PCR-analys.

Jämförelse av bakteriella fynd hos sjuk, lindrigt sjuk respektive frisk

Antal sjuka kalvar som provtogs i studien var bara fem stycken, detta eftersom få kalvar i besättningarna levde upp till kriterierna för klassificeringen sjuk samt att kalvar under antibiotikabehandling undveks. Eftersom antalet kalvar i den gruppen var så litet slogs klassificeringarna sjuk och lindrigt sjuk ihop i analysen av resultaten.

Tabell 4 visar andelen av djuren i vardera klassificeringen frisk respektive sjuk/lindrigt sjuk som visade positivt odlingsresultat för de olika luftvägsbakterierna. Till exempel påvisades växt av någon relevant bakterie, utom *M. bovis*, hos 52 % (KI 37,4-66,3) av de friska kalvarna respektive hos 68 % (KI 53,3-80,5) av sjuka/lindrigt sjuka kalvar.

Fynd i relation till hälsostatus

Gårdarna som besöktes under detta projekt är alla högriskgårdar för luftvägssjukdom, i och med att deras produktion bygger på inköp av kalvar. På vissa gårdar upplevdes kalvarna i grunden symptomfria, medan på andra ställen var det mer generellt spridda luftvägssymptom hos kalvarna. Tabell 5 innehåller grundläggande uppgifter om besättningarna som ingått i studien. Tabellen kategoriserar besättningarna efter deras hälsostatus hos kalvarna i stallet/avdelningen där provtagningen utfördes vid provtagningstillfället, vilket syftar till att relatera detta till bakterieförekomsten. Hälsostatus 1 innebär att så gott som alla djur var till synes fria

från luftvägssymptom. Hälsostatus 2 innebär att det var mer spridda luftvägssymptom, främst iakttaget genom att det hördes diffus hosta från djurgruppen.

Tabell 4. Påvisade bakteriearter i olika kategorier kalvar (frisk respektive sjuk och lindrigt sjuk), oberoende av vilken/vilka provtagningspinnar som gav odlingsfynden. Från varje kalv togs flera prover och hos några kalvar påvisades flera bakteriearter. Tabellen anger antal och andel positiva kalvar samt 95 procentigt konfidensintervall(KI) inom parentes

Odlingsresultat	Alla kalvar (n=100)		Friska kalvar (n=50)		Sjuka och lindrigt sjuka kalvar (n=50)	
	Antal	Andel (KI)	Antal	Andel (KI)	Antal	Andel (KI)
Växt av någon relevant bakterie, utom <i>M. bovis</i>	60	60,0 (49,7; 69,7) %	26	52 (37,4; 66,3) %	34	68 (53,3; 80,5) %
<i>P. multocida</i>	55	55,0 (44,7; 65,0) %	26	52 (37,4; 66,3) %	29	58 (43,2; 71,8) %
<i>M. haemolytica</i>	7	7,0 (2,9; 13,9) %	3	6 (1,3; 16,5) %	4	8 (2,2; 19,2) %
<i>H. somni</i>	2	2,0 (0,2; 7,0) %	1	2 (0,0; 5,5) %	1	2 (0,1; 10,6) %
<i>M. varigena</i>	2	2,0 (0,2; 7,0) %	0	0 (0,0; 7,1) %	2	4 (0,5; 13,7) %
Växt av flera relevanta bakterier, utom <i>M. bovis</i>	6	6,0 (2,2; 12,6) %	4	8 (2,2; 19,2) %	2	4 (0,5; 13,7) %
<i>M. bovis</i>	16	16,0 (9,4; 24,7) %	9	18 (8,6; 31,4) %	7	14 (5,8; 26,7) %
<i>M. bovis</i> och annan relevant bakterie	7	7,0 (2,9; 13,9) %	4	8 (2,2; 19,2) %	3	6 (1,3; 16,5) %

Tabell 5. Information för respektive gård: antal kalvar gårdarna köper per år, antal insättningar av kalvar per år, antal gårdar som kalvar köps in från, de provtagna kalvarnas ungefärliga vikt (medelvärde och spann) och antibiotikum som gården använder för behandling av luftvägssjukdom.

Dessutom upplevd hälsostatus i stallet vid provtagningstillfället, antalet kalvar som påvisades vara positiva för någon relevant bakterie samt förekomst av *M. bovis* och penicillinresistent *P. multocida*.

Besättning	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Antal kalvar per år	379	503	190	235	451	465	250	208	365	555
Antal insättningar per månad	2	0,5	1	1	2	1-2	2	2	1	2
Antal gårdar kalvar köps från	6	Många, förmedling	2	4	5	6	4	2	5	5
Vikt ^a : medel (spann)	72 (50-90)	58 (50-100)	117 (60-180)	72 (60-90)	84 (70-100)	80 (60-90)	73 (60-100)	69 (50-110)	150 (150)	65 (60-70)
Antibiotika som används ^b	f	pc	pc	pc	pc och tc	pc och tc	pc och f	tc	pc	pc och tc
Hälsostatus-kategori 1-2	1	2	2	2	1	2	1	1	2	2
Antal positiva kalvar ^c	2/10	10/10	7/10	7/10	8/10	7/10	7/10	5/10	2/10	4/10
<i>M. bovis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Pc-resistens	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-

^a De provtagna kalvarnas vikt vid provtagningstillfället, visuellt uppskattad

^b f=florfenikol, pc=penicillin och tc= tetracyklin

^c positiv för *P. multocida*, *M. haemolytica*, *H. somni* eller *M. varigena*

Tabell 6 visar prevalensen av bakterier hos djuren i hälsostatus 1 och 2, det vill säga när besättningarna delats upp efter upplevd hälsostatus i stallet vid provtagningstillfället. Till exempel visar tabellen att växt av någon relevant bakterie, utom *M. bovis*, påvisades hos 55 % (KI 38,5-70,7) av kalvarna i hälsostatus 1 och hos 63 % (KI 49,9-75,4) av kalvarna i hälsostatus 2.

Tabell 6. Påvisade bakteriearter, inklusive *M. bovis*, hos kalvar i olika kategorier baserade på upplevd hälsostatus i stallet vid provtagningstillfället. Bakteriefyndet är oberoende av vilken/vilka

provtagningsspinnar som gav odlingsfynden. Hos några kalvar påvisades flera bakteriearter. Tabellen anger antal och andel positiva kalvar samt 95 procentigt konfidensintervall (KI) inom parentes

Odlingsresultat	Hälsostatus 1 (n=40)		Hälsostatus 2 (n=60)	
	Antal	Andel (KI 95%)	Antal	Andel (KI 95%)
Växt av någon relevant bakterie, utom <i>M. bovis</i>	22	55 (38,5; 70,7) %	38	63 (49,9; 75,4) %
<i>P. multocida</i>	20	50 (33,8; 66,2) %	34	57 (43,2; 69,4) %
<i>M. haemolytica</i>	1	3 (0,1; 13,2) %	6	10 (3,8; 20,5) %
<i>H. somni</i>	0	0 (0,0; 8,8) %	2	3 (0,4; 11,5) %
<i>M. varigena</i>	2	5 (0,6; 16,9) %	0	0 (0,0; 6,0) %
Växt av flera relevanta bakterier, utom <i>M. bovis</i>	1	3 (0,1; 13,2) %	5	8 (2,8; 18,4) %
<i>M. bovis</i>	0	0 (0,0; 8,8) %	16	27 (16,1; 39,7) %
<i>M. bovis</i> och annan relevant bakterie	0	0 (0,0; 8,8) %	7	12 (10,8; 32,3) %

Under projektets gång provtogs en kalv under antibiotikabehandling mot luftvägssjukdom och fem kalvar som genomgått antibiotikabehandling. Bakteriefynd hos dessa kalvar utmärkte sig inte från övriga individer. Kalvarnas provsvar var: tre individer (bland annat den under pågående behandling) med ”ingen specifik infektion påvisad”, två individer med *P. multocida* samt en individ med *M. haemolytica*. Inga av dessa isolat uppvisade antibiotikaresistens. Tre av kalvarna som genomgått antibiotikabehandling uppvisade förändrat andningsmönster och en individ uppvisade kvarstående seghet.

Förekomst av *M. bovis*

M. bovis påvisades i två av tio besättningar. De drabbade besättningarna var belägna i Skåne. I båda dessa besättningar var åtta av tio kalvar positiva. Således var 16 av 100 provtagna kalvar positiva för *M. bovis*, vilket gav prevalensen 16 %. I dessa besättningar var båda friska djur (9 av 12 friska individer) och djur klassificerade som lindrigt sjuka djur (7 av 8 lindrigt sjuka individer) positiva för *M. bovis*, några sjuka djur provtogs inte i dessa besättningar.

Kartläggning av antibiotikaresistens

Tabell 7 visar andelen resistenta isolat samt fördelningen av MIC-värden för *P. multocida*. Antalet isolat av *P. multocida* som påvisades vara resistenta mot penicillin och ampicillin var 11 stycken, erhållna från lika många individer. Dessa individer fanns i tre besättningar, varav två besättningar i Skåne och en i Södermanland. Att andelen som dessa isolat utgör, redovisas som 20 respektive 21 % i tabellen, är en effekt av avrundning av värdena, men isolaten är alltså desamma.

Isolat som påvisades ha MIC-värden för penicillin >0,5 testades för betalaktamasproduktion och samtliga isolat var positiva.

Inga isolat av varken *M. haemolytica* (n=7), *M. varigena* (n=2) eller *H. somni* (n=1) uppvisade resistens mot testade antibiotika.

Tabell 7. Andel resistent isolat samt fördelning av MIC-värden för *P. multocida*.

Testade antibiotika	Resistens (%)	Fördelning (%) av MIC-värden ^a (mg/l)									
		≤0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	>16
	n=54										
Ampicillin	21				76	4		2	19		
Ceftiofur	0			98	2						
Enrofloxacin	0		100								
Florfenikol	0						98	2			
Penicillin	20	6	56	19		20					
Tetracyklin	0					100					
Trimetoprim/sulfametoxazol ^b	0				100						

^a Vita rutor symboliserar testad koncentration av antibiotika. Värden placerade utanför spannet (i blå rutor) innebär MIC-värden högre än den högsta testade koncentrationen. MIC-värden lika med eller lägre än den lägsta testade koncentrationen anges som den lägsta testade koncentrationen. Vertikala linjer symboliserar gränsvärden för resistens.

^b Testade koncentrationer är 0,5/9,5, 1/19, 2/38 och 4/76 av trimetoprim/sulfametoxazol.

DISKUSSION

Jämförelse av provtagningspinnarna

Odlingsresultat

Ett av syftena med detta projekt var att jämföra olika provtagningspinnar vid provtagning i näshålan på kalvar med luftvägsinfektion, för att se om pinnens längd och utformning har betydelse för möjligheten att isolera relevanta bakterier.

Vid det första provtagningsstillfället som MWE-svabben användes skickades dessa prover torrt (utan transportmedium) till labbet, vilket gav dåliga odlingsresultat. Därför exkluderades resultaten från MWE-svabben vid dess första provtagningsstillfälle.

A-svabben är den provtagningspinne som i Sverige oftast används för bakteriologisk provtagning av kalvar med luftvägssymptom. Studien visar att A-svabben ger signifikant färre fynd av relevanta bakterier jämfört med övriga tre provtagningspinnar. Övriga provtagningspinnar skiljer sig däremot inte signifikant i detta avseende. Detta bekräftar teorin att provtagningsmetodiken har betydelse för chanserna att isolera de sjukdomsframkallande bakterierna.

Det är intressant att spekulera kring vilken egenskap hos A-svabben som orsakar dessa skillnader i resultat. Både A- och E-svabben är korta provtagningspinnar. Att E-svabben har en betydligt bättre isoleringsfrekvens än A-svabben trots att den är kort, talar för att A-svabbens längd inte är den egenskap som förklarar A-svabbens sämre resultat. Skillnaden i isoleringsfrekvens mellan kort (A-svabb och E-svabb) och lång (uteruspinne och MWE-svabb) provtagningspinne var inte heller statistiskt signifikant. Analysen av provtagningspinnarnas längd var dock påverkad av en sammanblandning av faktorer, på så sätt att olika egenskaper hos provtagningspinnarna samverkade. Likväl har även tidigare studier visat överensstämmelse mellan odlingsfynd erhållna från olika provtagningsdjup i näshålan (Hotchkiss *et al.*, 2010; Doyle *et al.*, 2015). A-svabben skickades i kolat Amies medium, i likhet med uteruspinnen och MWE-pinnen, och således är inte heller det en förklaring till skillnaden i resultat. Tiden för förvaring av proverna, tiden för transport till laboratoriet, förvaringsmiljön och liknande är detsamma för alla provtagningspinnar och således inte heller annorlunda för A-svabben. Provtagningspinnarnas tipp är av olika material: E-svabbens tipp är flockad med nylonfibrer, A- och MWE-svabbens tipp är gjord av rayon medan uteruspinnens tipp är av viskos. Därmed är inte heller det något som utmärker A-svabben. Vidare kan en kombination av faktorer diskuteras. För det första att det trots allt är A-svabbens längd som är en nackdel (vilket resultatet dock talar emot) och att det då är något annat som gör att E-svabben trots samma längd uppnår bra resultat. E-svabbens flockade tipp kanske är bättre. För det andra att A-svabbens medium förklarar dess dåliga resultat, men då är det något annat som ger uteruspinnen och MWE-svabben deras bättre resultat trots samma medium. Det som förenar dessa provtagningspinnar är deras längd. För det tredje att det är A-svabbens tipp som är en nackdel och att det då är något annat som gör att MWE-svabben får bättre resultat trots samma tipp. Det som skiljer dem åt är återigen längden. Sammanfattningsvis går det inte utifrån denna studie att avgöra vilken egenskap hos A-svabben som orsakar skillnaden i isoleringsfrekvens.

I denna studies resultat gick det inte att se att de olika svabbarna gav fynd av olika bakteriearter, för att kunna dra en sådan slutsats behövs ett större material i och med att odlingsfynden av andra bakterier än *P. multocida* var relativt få.

Provtagningspinnarnas praktiska användarvänlighet

Den praktiska användarvänligheten är en viktig aspekt vid val av provtagningspinne. Bild 5 visar provtagningsutrustningen under pågående provtagning.

Provtagning med näs- eller faryngealsvabb är provtagningsmetoder som är enkla och snabba att utföra. Därför tycker jag att dessa metoder passar för fältmässiga förhållanden. De mer



Bild 5. Provtagningsutrustning. Foto: Sandra Gustavsson.

avancerade metoderna TTW och BAL anser jag inte vara rimliga i rutinmässig fältmässig diagnostik.

Kalven reagerar när en provtagningspinne eller liknande förs upp i dess nos, den slänger med huvudet och försöker komma loss. Avväjningsreaktionen är värst de första fem centimetrarna i näshålan, därefter på större djup är kalven mer oberörd. När en kort pinne används tas provet snabbt under tiden kalven försöker göra undanflykter. Även när en längre pinne används reagerar kalven, men en skillnad är att då hinner kalven lugna sig när pinnen nått ett större djup i näshålan, sedan kan topsen hanteras mer kontrollerat.

En oskyddad provtagningspinne, det vill säga utan ledare/hölje, är oavsett dess längd svår att föra in i näshålan utan att topsen nuddar de yttre delarna av nosen, vilket medför en kontaminationsrisk. Den risken minskar när en ledare används. Silikon som material i en ledare upplevs som mjukt och följsamt och därmed som ett passande material, att föra upp i näshålan på en kalv. Inga tecken på skador eller blödningar uppstod heller vid provtagning. Att kalven reagerar när ledaren förs in men sedan är lugn när provet tas genom slangen upplever jag öka kvaliteten på utförandet av provtagningen, eftersom provet kan tas mer kontrollerat.

Silikonslangen som ledare har en begränsning i att den fysiskt måste få plats i kalvens luftvägar. Det innebär att den är för grov till de minsta kalvarna, men fungerar bra till kalvar över omkring 70 kg kroppsvikt.

Vid provtagningen upplevdes att nyttan av pinnens längd varierar med kalvens storlek. På en liten kalv (<50 kg) når en kort pinne maximalt djup i näshålan och en längre pinne ger därför ingen extra nytta. Däremot på en större kalv (>100 kg) upplever jag att det finns fysiskt utrymme att nå längre med en lång pinne, vilket talar för dess nytta. Denna upplevelse bekräftas av bild 6-7, där obduktionsmaterial används för att visa hur djupt pinnarna når. Analysen av odlingsresultaten kunde dock inte påvisa någon fördel med en lång provtagningspinne och dess större provtagningsdjup när resultaten från de större djuren granskades separat. För att kunna visa ett sådant samband skulle fler stora djur behöva provtas, i detta material var det bara 24 kalvar som vägde över 100 kg vilket är för få för att visa något samband.

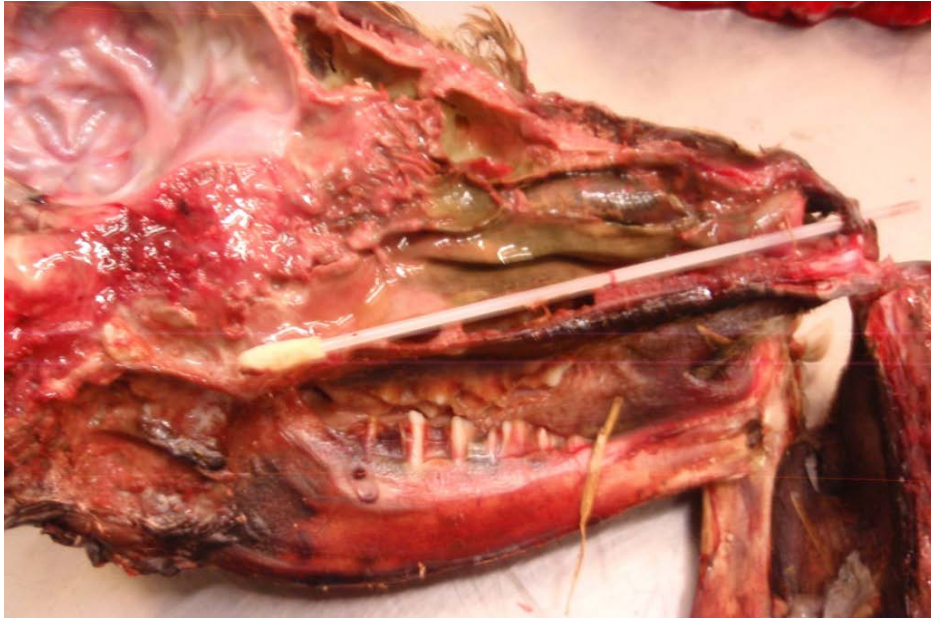


Bild 6. Obduktionsmaterial från kalv på 75 kg visar att en E-svabb når långt bak i näshålan på det djuret. Foto: Åsa Lundgren, Obduktion Gård & Djurhälsan Karlskoga.

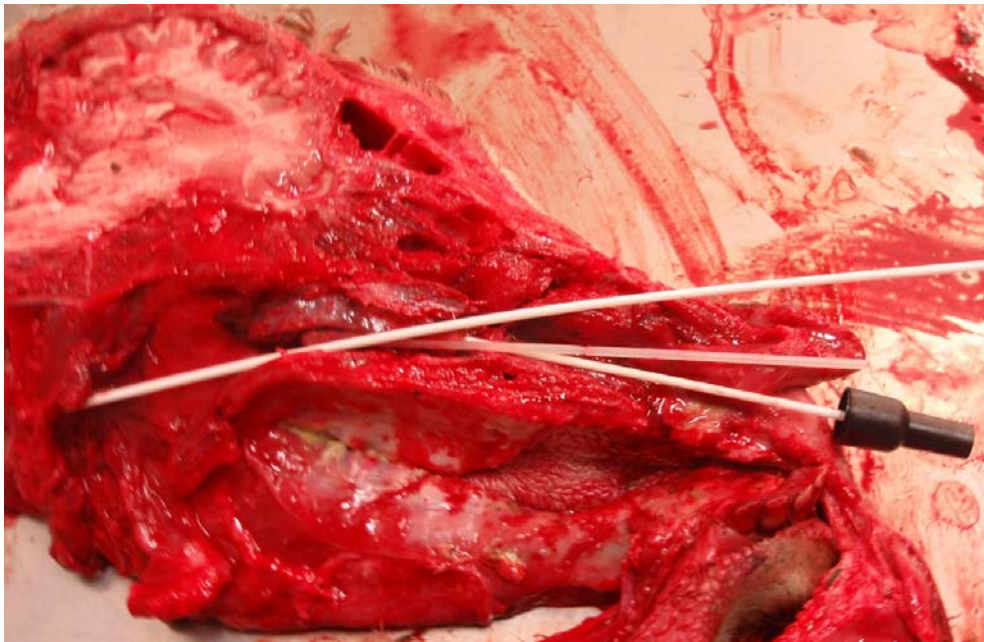


Bild 7. Obduktionsmaterial från en kalv på 150 kg visar att en A- och E-svabb inte når maximalt djup i näshålan och att det finns utrymme för en längre provtagningspinne att nå djupare. Foto: Åsa Lundgren, Obduktion Gård & Djurhälsan Karlskoga.

De två korta provtagningspinnarna A- och E-svabben känns båda användarvänliga, genom att vara smidiga och lätta att hantera. Under studiens provtagningar var det en E-svabb som gick av och inte kunde nås i näshålan. Att en pinne av 100 går av tycker jag är en godkänd frekvens. Dock är det så att E-svabben fick stöd av A-svabben eftersom dessa användes tillsammans. Om E-svabben hade använts separat hade sannolikt fler pinnar gått av vid provtagning. Tidigare erfarenheter från praktisk verksamhet talar nämligen för att E-svabbens skaft behöver stöd vid provtagningen.

Uteruspinnen är som sagt gjord för bakteriologisk undersökning i livmodern på häst. Dess medföljande skydds rör är hårda, saknar böjbarhet och deras kanter är nästan vassa. Därför känns inte de passande att föra upp i nashålan på en kalv. Istället provades att använda själva provtagningspinnen helt utan hölje. Det hade fördelen att den når längre i nashålan jämfört med en kortare provtagningspinne. Senare användes också en bit silikon slang som ledare runt uteruspinnen. Idén kom från MWE-svabben, vilken säljs med en sådan ledare. Troligen är silikon slangens grovlek viktig ur denna aspekt, grovleken är en balansgång mellan att vara tunn nog för att få plats i luftvägarna och att vara grov nog för att provtagningspinnen ska löpa lätt. Förutom grovleken är materialen avgörande för hur lätt en provtagningspinne löper i sin ledare, MWE-svabben löper lättare i en silikon slang jämfört med uteruspinnen som går lite besvärande trögt.

Att använda silikon slang som ledare även till kortare provtagningspinnar är en intressant tanke, då naturligtvis en kortare bit silikon slang. Syften skulle vara att minska risken för kontamination vid provtagning, att göra provtagningen mer kontrollerad (genom att kalven reagerar när ledaren förs in i nosen och mindre när provet tas) samt att minska risken att provtagningspinnen går av och blir kvar i nashålan.

En funnen nackdel med uteruspinnen är att den har en skör punkt en dryg decimeter upp (där man bryter av den när provet ska ner i provröret) där den riskerar att gå av vid provtagning. Totalt gick 19 stycken uteruspinnar av vid provtagningarna. Vid sex av dessa tillfällen hamnade topsen på ett sådant djup i nashålan att den inte kunde nås utan den fick lämnas kvar i nashålan, med förhoppning om att kalven själv nyser ut pinnen. Även om den kvarvarande pinnen sannolikt nyses ut eller blir kvar utan att ge skada, så känns det inte bra när detta händer. Som provtagare är man då inte nöjd med förfarandet. Det förekom att pinnen gick av både när ledare användes och inte. Oavsett så hör man ljudet av att pinnen går av. När man hör det ljudet och använder ledare finns chans att änden ligger kvar i ledaren och följer med ut, men så är inte alltid fallet. Många gånger får man dock önskat prov när ledare används trots att pinnen går av, eftersom man kan försöka putta fram dess ände ut ur ledaren lagom mycket för att få ett prov men ändå få änden kvar i ledaren på utvägen. Sammantaget tycker jag att det faktum att 19 % av uteruspinnarna går av vid provtagning, varav cirka en tredjedel blir kvar i nashålan, är för många för att den provtagningspinnen ska vara funktionell i detta sammanhang.

MWE-svabben upplevs som väldigt användarvänlig. För det första är den trevlig att jobba med, eftersom den är smidig och följsam. För det andra är den böjbar utan att gå av, vilket är en stor fördel. Det gör provtagningen betydligt okänsligare för rörelser hos kalven. Dessutom är den förpackad i liten smidig förpackning och känns ändamålsenlig. Vidare löper den lätt i silikon slang. I studien valdes att skicka dessa prover i Amies medium, trots att de är gjorda för att skickas torra. De knappa odlingsresultaten från det första tillfället då MWE-svabben användes (och skickades torrt) indikerar att det var rätt beslut. Således måste man vid provtagning ha extra rör med Amies medium, vilket är en nackdel jämfört med om svabben vore komplett.

Vid provtagning av större djur krävs förstås mer fasthållande kraft jämfört med ett mindre djur, i studien har djur upp till 150 kg provtagits vilket har gått bra. När de större djuren i det spannet

provatas så när inte ledaren/provtagningspinne näshålans botten/svalget, därför upplevs det lite svårare att rulla topsen lika kontrollerat mot vävnaden.

Sammanfattning kring val av provtagningspinne

Sammanfattningsvis var A-svabben den provtagningspinne som gav minst andel odlingsfynd. Samtidigt var A-svabben lättillgänglig, smidig och väldigt billig. E-svabben, uteruspinne och MWE-svabben gav alla bättre isoleringsfrekvens än A-svabben, sinsemellan ungefär på likvärdig nivå. E-svabbens fördelar var att den var smidig att använda, lättillgänglig och dessutom kan samma pinne användas till både bakteriologisk odling och mykoplasmaanalys. Dess nackdel var att skafte behövde stöd av en annan provtagningspinne för att inte gå av, vilket i praktiken åstadkoms genom att flera prover ofta tas (många gånger virusprovtagning samtidigt). Uteruspinnen hade den stora nackdelen att alltför många pinnar gick av vid provtagning. Dessutom är den inte gjord för provtagning i näshålan och upplevdes otymplig att arbeta med. MWE-svabben däremot var trevlig att jobba med och den går att få tag på men det krävs framförhållning vid beställning. Vidare var MWE-svabben klart dyrast och förbrukade ytterligare en svabb (förslagsvis en A-svabb) för att erhålla transportmedium till provet. Sammantaget resulterade detta i att E-svabben, med stöd av en annan provtagningspinne eller en ledare av silikonslang, är den pinne som jag skulle välja att rekommendera för provtagning vid luftvägssjukdom på kalv.

Isolering av bakterier

Studiens resultat är i enlighet med tidigare kunskap att *P. multocida* är den vanligaste bakteriella luftvägspatogenen bland svenska kalvar och att även *M. haemolytica*, *M. bovis* och *H. somni* förekommer (Fall, 2013).

En problematik i dagens diagnostik är att man vid bakteriologisk odling får alltför många negativa odlings svar (eller snarare irrelevanta fynd av blandflora) och därmed att relevanta bakterier inte påvisas i önskvärd utsträckning. Detta är frustrerande för kliniskt verksamma veterinärer i fält. Tänkbara orsaker till irrelevanta odlings svar är till exempel suboptimal provtagningsutrustning, dåligt utförd provtagning, prover som är kontaminerade av normalflorbakterier, felaktig förvaring av tagna prover samt för lång tid för transport av proverna till laboratorium. Inom Svarm, under åren 2012-2015, har omkring 20-30 % av inskickade kliniska nässvabbprover gett relevanta isoleringsfynd (Ericsson Unnerstad, H., SVA, pers.medd., 2016). Andelen utav denna studies samtliga prover för bakteriologisk odling som gett relevanta odlingsresultat var 36 %. En annan studie fann att 25 respektive 40 % av tagna nässvabbprover gav relevanta bakteriefynd (Bengtsson & Viring., 2000). Det finns anledning att tro att fler av de provtagna kalvarna härbärger relevanta bakterier i sina luftvägar och därmed finns sannolikt förbättringspotential i diagnostiken.

Andelen av studiens prover för bakteriologisk odling som gett relevanta odlingsresultat var alltså 36 %. Det kan jämföras med påvisad prevalens av den mest frekventa bakterien *P. multocida*, vilken isolerades från 54 % av individerna. Den skillnaden förklaras av att flera prover togs på varje individ vilket visar att flera prover per individ ökar chansen att påvisa relevanta bakterier.

Prevalensen av *P. multocida* har varierat mycket mellan olika studier, hos friska såväl som sjuka djur (Allen *et al.*, 1991; Bengtsson & Viring, 2000; Catry *et al.*, 2006; Autio *et al.*, 2007; Nikunen *et al.*, 2007; Angen *et al.*, 2009; Fulton *et al.*, 2009; Hotchkiss *et al.*, 2010; Doyle *et al.*, 2015). Den här studiens resultat ligger inom spannet av andra studiers resultat. Att den här studiens fastställda prevalens av *P. multocida* hör till de högre som presenterats kan bero på att flera prover tagits på varje individ, vilket ökar antalet individer med positiva odlingsresultat.

Graden av bakteriell saminfektion var låg; hos 6 % av kalvarna påvisades två relevanta bakterier utom *M. bovis*. Symptombilden hos dessa kalvar var att fyra av dem inte uppvisade några luftvägssymptom vid provtagningen, en kalv visade spontan hosta och en kalv uppvisade spontan hosta och lindrig dyspné. Detta innebär att det inte kan fastslås något samband mellan saminfektion och symptombild.

Jämförelse av bakteriella fynd hos sjuk, lindrigt sjuk respektive frisk

Att klassificeringarna sjuk och lindrigt sjuk slogs ihop i analysen av resultaten gör att spannet mellan sjukdomsbilden i de två kalvgrupperna är litet och möjligheten att påvisa skillnader i bakteriefloran mellan grupperna blir begränsad. Hade ett större antal sjuka kalvar provtagits är det möjligt att skillnaderna hade varit större.

Det finns en tendens till högre bakterieförekomst hos sjuka/lindrigt sjuka kalvar jämfört med hos friska kalvar, framför allt av bakterien *P. multocida*. Dock överlappar konfidensintervallen för de olika bakteriernas förekomst varandra och skillnaderna är inte statistiskt signifikanta. Andra studier visar oeniga resultat kring huruvida bakterieförekomsten skiljer mellan friska djur och djur med klinisk luftvägssjukdom; någon studie visar likvärdig förekomst av *P. multocida* i dessa djurgrupper (Taylor *et al.*, 2015), medan andra visar högre förekomst av *P. multocida* hos djur med luftvägssymptom (Allen *et al.*, 1991; Bengtsson & Viring, 2000) liksom av *M. haemolytica* (Taylor *et al.*, 2015) respektive *Mannheimia* spp. (Lima *et al.*, 2016). Att det inte påvisas någon signifikant skillnad mellan bakterieförekomst i näshåla/svalg hos sjuka/lindrigt sjuka och friska kalvar innebär att det sannolikt är andra faktorer än bakteriefloran som avgör huruvida klinisk sjukdom utvecklas. Avgörande faktorer är istället bland annat virusförekomst och immunologisk motståndskraft.

Fynd i relation till hälsostatus

Besättningarna som ingår i projektet driver alla en djurhållning som bygger på inköp av kalvar och har därför en hög risk för luftvägssjukdom som en gemensam faktor. Att kalvarnas hälsoläge ändå skiljer mellan gårdarna kan bero på faktorer såsom antalet besättningar djur köps in ifrån, kalvarnas ålder vid inköp, huruvida mellangårdsavtal finns eller om djur köps via förmedling, djurhållningens storlek, stallbyggnadernas förutsättningar för en sektionerad djurhållning, rutiner för smittskydd med mera.

Det är svårt att dra någon slutsats utifrån tabell 5 där uppgifter om besättningarna presenteras i relation till kalvarnas hälsostatus och de bakteriologiska fynden. Tabellen kan omöjligt täcka in alla de faktorer som påverkar hälsoläget i en besättning. Luftvägsinfektion är ju dessutom en multifaktoriell sjukdom, där alla inblandade faktorer samverkar.

Tabell 6 visar att det finns en tendens till högre bakterieförekomst hos kalvar i hälsostatus 2, det vill säga i sådana besättningar där kalvarna hade diffust spridda luftvägssymptom.

Bakteriefynden från de kalvar som genomgått antibiotikabehandling skiljde sig inte från fynden från övriga kalvar. Det kan bero på att tiden som passerat sedan de erhöll behandlingen (varierar mellan 0 och 17 dagar) är tillräcklig för att normalfloran i näshålan återetablerats. I det fallet där noll dagar passerat, det vill säga att behandlingen pågick, kan de fynd av blandflora som erhöles förklaras av att näshålan kontinuerligt återkoloniserar från kalvens miljö. Majoriteten av de behandlade kalvarna var inte symptomfria efter avslutad behandling, utan uppvisade främst förändrat andningsmönster. Orsaken till detta är troligen inte att en infektion kvarstår, utan att lunginflammationen orsakat skador i luftvägarna som orsakar symptomen och som tar lång tid att läka alternativt är bestående.

Förekomst av *M. bovis*

M. bovis har hittills inte varit en vanlig bakterie bland svenska kalvar (SVA, 2016b), men resultaten visar att *M. bovis* förekommer i landets population av nötkreatur. Eftersom *M. bovis* orsakar svårbehandlade luftvägsinfektioner hos kalv (Ericsson Unnerstad *et al.*, 2012) så är förekomsten ett observandum. Vårt grannland Finland har nyligen upprättat ett kontrollprogram mot *M. bovis* (Tuunainen, 2016), något som kan övervägas även i Sverige.

De två besättningar som i studien visats ha kalvar med *M. bovis* är belägna i Skåne. Att fynden sker där är inte oväntat eftersom Skåne är ett djurtätt landskap samt geografiskt ligger nära övriga Europa, vilket medför en risk för införsel av nya bakterier därifrån via besökare, inköp av djur, transporter med mera. Båda gårdarna har varit positiva för *M. bovis* vid tidigare provtagning (Welling, V., Gård & Djurhälsan, pers. medd., 2016).

M. bovis påvisades både hos djur med och utan luftvägssymptom, vilket är i enlighet med Thomas *et al.* (2002a) och Gagea *et al.* (2006). Upplevelsen när denna studie genomfördes var att förekomst av *M. bovis* inte medförde en påtagligt allvarlig sjuklighet på individnivå och inte heller en påtagligt hög eller allvarlig sjuklighet på besättningsnivå. Analysen av resultaten, visar dock att *M. bovis* bara påvisades hos kalvar i hälsostatus 2 (det vill säga i sådana besättningar där kalvarna hade diffust spridda luftvägssymptom) och att förekomsten av saminfektion med *M. bovis* och någon annan relevant bakterie således var vanligare i dessa besättningar.

Kartläggning av antibiotikaresistens

Det kumulativa antalet fynd av penicillinresistent *P. multocida* respektive *M. haemolytica* i svenska nötkreatursbesättningar var inför detta projekt två fynd av vardera (Svedres-Svarm 2015, 2016; Ericsson Unnerstad, H., SVA, pers. medd., 2016). Resultaten i denna studie ökar det kumulativa antalet av penicillinresistent *P. multocida* till fem fynd.

Att penicillinresistent *P. multocida* påvisas i tre av tio besättningar som ingår i denna studie är oväntat och förvånande. Eftersom penicillin är vårt förstahandsval av antibiotika vid fall av luftvägssjukdom hos kalv, innebär förekomst av denna resistens risk för dåliga behandlingsresultat. Studiens resultat talar för att provtagning och resistensbestämning är viktigt, både i övervakning och vid val av behandling. Vidare innebär förekomsten av resistens att betydelsen av smittskydd ökar, både internt inom besättningen och externt från besättningen, för att undvika spridning av resistensegenskapen hos bakterierna.

De isolat som påvisats vara okänsliga för penicillin är också resistenta mot ampicillin, vilket förklaras av att det är samma resistensmekanism, produktion av beta-laktamas, som ger båda dessa egenskaper.

KONKLUSION

Studien innebar bakteriologisk provtagning i nashålan på kalvar upp till fyra månaders ålder och därmed är det den kategorin av djur som resultaten berör. Om större djur provtas blir resultatet kanske ett annat, bland annat till följd av att provtagningspinnens längd i relation till kalvens storlek blir annorlunda.

Provtagning med kort jämfört med lång provtagningspinne uppvisade inga signifikanta skillnader i resultat. Inte heller påvisades några signifikanta skillnader mellan bakteriefloran hos kalvar med respektive utan luftvägssjukdom.

E-svabben, med stöd av en annan provtagningspinne eller en ledare av silikon slang, är den provtagningspinne som jag skulle välja att rekommendera för provtagning vid luftvägssjukdom på kalv. Detta eftersom den upplevdes vara den bästa kompromissen mellan isoleringsfrekvens, pris och användarvänlighet.

M. bovis påvisades i två besättningar, vilket talar för att bakterien fortsatt förekommer i Sverige. Vidare påvisades ampicillin- och penicillinresistent *P. multocida* i tre besättningar, vilket är förvånande och indikerar att denna resistens förekommer bland svenska kalvar. Fynden belyser vikten av provtagning, övervakning och smittskydd.

Tack

Studien finansierades av SvarmPat, som är ett samarbetsprojekt mellan SVA och Gård & Djurhälsan med finansiering från Jordbruksverket.

Avslutningsvis vill jag varmt tacka gårdarna som deltog i denna studie; tack för att jag fick komma och provta kalvar hos er och för att ni gav mig ett trevligt bemötande. Tack till Åsa Lundgren på Gård & Djurhälsans obduktion i Karlskoga som bidragit med obduktionsbilder. Jag vill också verkligen tacka min handledare Madeleine Tråvén, biträdande handledare Virpi Welling på Gård & Djurhälsan, biträdande handledare Helle Ericsson Unnerstad på SVA samt Björn Bengtsson på SVA; för vägledning och bra samarbete under hela projektets gång.

REFERENSER

- Allen, J.W., Viel, L., Bateman, K.G., Rosendal, S., Shewen, P.E. & Physick-Sheard, P. (1991). The microbial flora of the respiratory tract in feedlot calves: associations between nasopharyngeal and bronchoalveolar lavage cultures. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 55: 341–346.
- Angen, Ø., Thomsen, J., Larsen, L.E., Larsen, J., Kokotovic, B., Heegaard, P.M.H. & Enemark, J.M.D. (2009). Respiratory disease in calves: microbiological investigations on trans-tracheally aspirated bronchoalveolar fluid and acute phase protein response. *Veterinary Microbiology*, 137: 165–171.
- Autio, T., Pohjanvirta, T., Holopainen, R., Rikula, U., Pentikäinen, J., Huovilainen, A., Rusanen, H., Soveri, T., Sihvonen, L. & Pelkonen, S. (2007). Etiology of respiratory disease in non-vaccinated, non-medicated calves in rearing herds. *Veterinary Microbiology*, 119: 256–265.
- Barbour, E.K., Nabbut, N.H., Hamadeh, S.K. & Al-Nakhli, H.M. (1997). Bacterial identity and characteristics in healthy and unhealthy respiratory tracts of sheep and calves. *Veterinary Research Communications*, 21: 421–430.
- Bengtsson, B. & Viring, S. (2000). Luftvägsinfektioner – 'Projekt, panorama och behandlingsstrategier'. *Veterinärkongressen*, 9-10 november 2000, Uppsala, 153–157.
- Bisgaard Petersen, M., Bruun Svendsen, M., Krogh, K., Rosenbaum Nielsen, L. & Jensen, L. (2015). Characterisation of *Mycoplasma bovis* associated disease in Danish dairy herds 2010-2014. *ISVEE*, 3-7 november 2015, Mexiko.
https://projekter.vfl.dk/Projekter/Kvaegafgiftsfonden/2015/Styrket-indsats-mod-Mycoplasma-Bovis_2097/Sider/Characterisation-of-Mycoplasma-bovis-associated-disease-Mette-B_2097.pdf
- Catry, B., Decostere, A., Schwarz, S., Kehrenberg C., de Kruif, A. & Haesebrouck, F. (2006). Detection of tetracycline-resistant and susceptible *Pasteurellaceae* in the nasopharynx of loose group-housed calves. *Veterinary Research Communications*, 30: 707–715.
- CLSI (2015). *Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; third edition*. CLSI supplement VET01S. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, USA.
- DeRosa, D.C., Mechor, G.D., Staats, J.J., Chengappa, M.M. & Shryock, T.R. (2000). Comparison of *Pasteurella* spp. simultaneously isolated from nasal and transtracheal swabs from cattle with clinical signs of bovine respiratory disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 327–332.
- Doyle, D.J., Woolums, A.R., Credille, B.C., Berghaus, R.D., Lehenbauer, T.W. & Aly, S.S. (2015). Agreement of nasal swabs, guarded nasopharyngeal swabs, and bronchoalveolar lavage relative to transtracheal wash for the diagnosis of viral and bacterial pathogens in dairy calves with bovine respiratory disease (BRD). 48th Conference American Association of Bovine Practitioners. <http://portal.nifa.usda.gov/web/crisprojectpages/1002606-comparision-of-nasopharyngeal-swabs-pharyngeal-recess-swabs-bronchoalveolar-lavage-and-transtracheal-wash-for-detecting-bacterial-and-viral-pathogens-in-dairy-calves-with-bovine-respiratory-disease.html>
- Ericsson Unnerstad, H., Fungrbrant, K., Persson Waller, K. & Persson, Y. (2012). *Mycoplasma bovis* hos kor och kalvar i Sverige. *Svensk veterinärtidning*, 13: 17–20.
- Fall, N. (2013). *Dosering av antibiotika till nötkreatur och får – luftvägsinfektioner*. Information från Läkemedelsverket 2013: 24 (supplement 1):19-22.
- Fulton, R.W., Blood, K.S., Panciera, R. J., Payton, M.E., Ridpath, J.F., Confer, A.W., Saliki, J.T., Burge, L.T., Welsh, R.D., Johnson, B.J. & Reck, A. (2009). Lung pathology and infectious agents in fatal feedlot pneumonias and relationship with mortality, disease onset, and treatments. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 21: 464–477.
- Fulton, R.W., Cook, B.J., Step, D.L., Confer, A.W., Saliki, J.T., Payton, M.E., Burge, L.J., Welsh, R.D. & Blood, K.S. (2002). Evaluation of health status of calves and the impact on feedlot

performance: assessment of a retained ownership program for postweaning calves. *The Canadian Journal of Veterinary Research* 66: 173–180.

Gagea, M.I., Bateman, K.G., Shanahan, R.A., van Dreumel, T., McEwen, B.J., Carman, S., Archambault, M. & Caswell, J.L. (2006). Naturally occurring *Mycoplasma bovis*-associated pneumonia and polyarthritis in feedlot beef calves. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 18: 29–40.

Godinho, K.S., Sarasola, P., Renoult, E., Tilt, N., Keane, S., Windsor, G.D., Rowan, T.G. & Sunderland, S.J. (2007). Use of deep nasopharyngeal swabs as a predictive diagnostic method for natural respiratory infections in calves. *Veterinary Record*, 160: 22–25.

Holman, D.B., McAllister, T.A., Topp, E., Wright, A-D.G. & Alexander T.W. (2015). The nasopharyngeal microbiota of feedlot cattle that develop bovine respiratory disease. *Veterinary Microbiology*, 180: 90–95.

Hotchkiss, E.J., Dagleish, M.P., Willoughby, K., McKendrick, I.J., Finlayson, J., Zadoks, R.N., Newsome, E., Brulisauer, F., Gunn, G.J. & Hodgson, J.C. (2010). Prevalence of *Pasteurella multocida* and other respiratory pathogens in the nasal tract of Scottish calves. *Veterinary Record*, 167: 555–560.

Hägglund, S., Svensson, C., Emanuelson, U., Valarcher, J.F. & Alenius, S. (2006). Dynamics of virus infections involved in the bovine respiratory disease complex in Swedish dairy herds. *The Veterinary Journal*, 172: 320–328.

Härtel, H., Nikunen, S., Neuvonen, E., Tanskanen, R., Kivelä, S.-L., Aho, P., Soveri, T. & Saloniemi, H. (2004). Viral and bacterial pathogens in bovine respiratory disease in Finland. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 45: 193–200.

Klima, C.L., Alexander, T.W., Read, R.R., Gow, S.P., Booker, C.W., Hannon, S., Sheedy, C., McAllister, T.A. & Selinger, L.B. (2011). Genetic characterization and antimicrobial susceptibility of *Mannheimia haemolytica* isolated from the nasopharynx of feedlot cattle. *Veterinary Microbiology*, 149: 390–398.

Kusiluka, L.J., Ojeniyi, B. & Friis, N.F. (2000). Increasing prevalence of *Mycoplasma bovis* in Danish cattle. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 41: 139-146.

Lima, S.F., Teixeira, A.G.V., Higgins, C.H., Lima, F.S. & Bicalho, R.C. (2016). The upper respiratory tract microbiome and its potential role in bovine respiratory disease and otitis media. *Scientific Reports* 6: 29050.

Läkemedelsverket (2009). *Behandling med NSAID till nötkreatur, får, get och gris*. Information från Läkemedelsverket 2009; 20 (supplement 1): 4-12.

Läkemedelsverket (2013). *Dosering av antibiotika till nötkreatur och får – ny rekommendation*. Information från Läkemedelsverket 2013; 24 (supplement 1): 4-11.

Magwood, S.E., Barnum, D.A. & Thomson, R.G. (1969). Nasal bacterial flora of calves in healthy and in pneumonia-prone herds. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 33: 237–243.

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

Nikunen, S., Härtel, H., Orro, T., Neuvonen, E., Tanskanen, R., Kivälä, S.-L., Sankari, S., Aho, P., Pyörälä, S., Saloniemi, H. & Soveri, T. (2007). Association of bovine respiratory disease with clinical status and acute phase proteins in calves. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious diseases*, 30: 143–151.

Radostits, O.M., Gay, C.C., Kenneth, W.H. & Constable, P.D. (Eds.) (2007). *Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats, and horses*. 10:e upplagan. New York: Elsevier Saunders.

Rosenbaum Nielsen, L. (2015). Bliv klogere på *Mycoplasma bovis*. *Kvæg kongres*, 23-24 februari 2015, Herning, Danmark. <https://projekter.vfl.dk/Projekter/Kvaegafgiftsfonden/2015/Styrket->

indsats-mod-Mycoplasma-Bovis_2097/Sider/Bilag-Liza-Rosenbaum-Bliv-klogere-paa-Mycoplasma_2097.pdf

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

Statens jordbruksverks föreskrifter och allmänna råd (SJVFS 2015:38) om försöksdjur, saknummer L150.

SVA (2013 april). *VetMIC Stordjur*.

http://www.sva.se/globalassets/redesign2011/pdf/analyser_produkter/vetmic/vetmic-stordjur-vetmic-smadjur.pdf [2016-11-01]

SVA (2016-02-01a). *BVD - bovin virusdiarré*.

<http://www.sva.se/djurhalsa/notkreatur/endemiska-sjukdomar-notkreatur/bvd-bovin-virusdiarre-notkreatur> [2016-10-20]

SVA (2016-02-16b). *Mycoplasma bovis hos kalvar*.

<http://www.sva.se/djurhalsa/notkreatur/endemiska-sjukdomar-notkreatur/luftvagsinfektioner-hos-kalvar-och-ungdjur/mycoplasma-bovis-hos-kalv> [2016-10-10]

Swedres-Svarm 2011 (2012). *Consumption of antibiotics and occurrence of antibiotic resistance in Sweden*. Folkhälsomyndigheten och SVA . Solna/Uppsala. ISSN 1650-6332.

Swedres-Svarm 2015 (2016). *Consumption of antibiotics and occurrence of antibiotic resistance in Sweden*. Folkhälsomyndigheten och SVA . Solna/Uppsala. ISSN 1650-6332.

Syrjälä, P., Brockmann, A., Nylund, M., Collin, K., Kokkonen, T., Haapala, V., Autio, T. & Pohjanvirta, T. (2016). *Lesions and microbiological findings associated with Mycoplasma bovis infection in Finland*.

<https://www.evira.fi/globalassets/tietoa-evilasta/esittely/toiminta/tieteellinen-tutkimus/posterit/lesions-and-microbiological-findings-associated-with-mycoplasma-bovis-infection-in-finland.pdf> [2016-10-20]

Taylor, J.D., Holland, B.P., Step, D.L., Payton, M.E. & Confer, A.W. (2015). Nasal isolation of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* as predictors of respiratory disease in shipped calves. *Research in Veterinary Research*, 99: 41–45.

Tegtmeier, C., Uttenthal, A., Friis, N.F., Jensen, N.E. & Jensen H.E. (1999). Pathological and microbiological studies on pneumonic lungs from Danish calves. *Zentralblatt für Veterinärmedizin*, 46:693-700.

ter Laak, E.A., Noordergraaf, J.H. & Boomsluiters, E. (1992). The nasal mycoplasmal flora of healthy calves and cows. *Zentralblatt für Veterinärmedizin*, 39: 610–616.

Thomas, A., Ball, H., Dizier, I., Trolin, A., Bell C., Mainil, J. & Linden A. (2002a). Isolation of *Mycoplasma* species from the lower respiratory tract of healthy cattle and cattle with respiratory disease in Belgium. *Veterinary Record*, 151: 472-476.

Thomas, A., Dizier, I., Trolin, A., Mainil, J. & Linden, A. (2002b). Comparison of sampling procedures for isolating pulmonary mycoplasmas in cattle. *Veterinary Research Communications*, 26, 333–339.

Tuunainen, E. (2016). *M. bovis* control program. *NMSM meeting*. Seinäjoki, Finland, 2016-06-08.