



Påverkas totalproteinnivåer i blodprov från kalvar av att blodprovet inte centrifugeras samt av hemolys?

Linn Ambjörnsson

Självständigt arbete • 30 hp
Sveriges lantbruksuniversitet, SLU
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Veterinärprogrammet

Uppsala 2023



Påverkas totalproteinnivåer i blodprov från kalvar av att blodprovet inte centrifugeras samt av hemolys?

Are total protein levels in blood samples from calves affected by not centrifuging the blood sample and by hemolysis?

Linn Ambjörnsson

Handledare: Madeleine Tråven, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska vetenskaper
Examinator: Karin Alvåsen, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska vetenskaper

Omfattning: 30 hp
Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E
Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin
Kurskod: EX1003
Program/utbildning: Veterinärprogrammet
Kursansvarig inst.: Institutionen för kliniska vetenskaper
Utgivningsort: Uppsala
Utgivningsår: 2023
Omslagsbild: Privat foto
Upphovsrätt: Alla bilder används med upphovspersonens tillstånd.
Nyckelord: råmjölk, refraktometer, blodprov, kalvhälsa, Brix

Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Veterinärprogrammet

Sammanfattning

Råmjölken innehåller livsviktiga antikroppar som ger kalven dess immunförsvar under de första månaderna i livet. För att kontrollera att kalven fått i sig en tillräcklig mängd antikroppar tas ett blodprov och detta serum analyseras med avseende på antikroppar. Det finns olika metoder för att mäta mängden antikroppar, direkta och indirekta. Två exempel på indirekta metoder är optisk refraktometer och Brix-refraktometer. Dessa metoder mäter brytningsindex i serum vilket korrelerar med torrsubstansen och därmed totalproteinet, vilket är en markör för antikroppsupptag. Inom detta arbete undersöktes om det är möjligt att utföra dessa analyser på serum från ocentrifugerade blodprover. Eftersom hemolys, att de röda blodkropparna går sönder, är vanligt vid provtagning och ofta stör olika analysmetoder så undersöktes även om hemolys kan störa resultatet. Syftet var även att få praktisk erfarenhet av hantering av ocentrifugerade blodprover. Analys av ocentrifugerat blodprov skulle kunna möjliggöra analys av antikroppar direkt på gården av lantbrukaren själv.

Kalven klassas som att ha ett bristfälligt upptag av antikroppar, på engelska failure of passive transfer (FPT), om den har ett immunoglobulin G-värde (IgG-värde) i serum under 10 g/l. Mätt med indirekta metoder har gränsvärdena i Sverige bestämts till 55 g/l med optisk refraktometer och 8,4 Brix%.

I detta arbete har serumprover från 50 kalvar, 2–8 dagar gamla samlats in på försöksgården Lövsta. Från varje kalv samlades tre provrör in. Ena röret centrifugerades och användes som basvärde, andra röret centrifugerades inte utan tilläts självsedimentera och i det tredje röret framkallades hemolys. De första tio ocentrifugerade blodproverna förvarades i kylskåp men då detta inte fungerade, på grund av att koaglet lade sig som en plugg överst i provröret, så ändrades strategin till att de fick stå framme i rumstemperatur i 48 timmar. Hemolys framkallades genom skakning samt att rören fick stå i nio dagar och blodprovet centrifugerades innan analysering. Alla prover analyserades med en optisk refraktometer och en Brix-refraktometer.

Ocentrifugerat prov jämfört med centrifugerat prov uppmätt med optisk refraktometer gav en Pearsons korrelationskoefficient på 0,98. Differensen mellan metoderna fick ett medelvärde på 1,2 g/l. Vid utvärdering av differenserna kring gränsvärdet 55 g/l var medelvärdet 2 g/l. Parat t-test visade på en skillnad mellan metoderna och därför rekommenderas en höjning av gränsvärdet till 57 g/l vid analysering av ocentrifugerat blodprov med en optisk refraktometer. Ocentrifugerat prov jämfört med centrifugerat prov uppmätt med Brix-refraktometer gav en Pearsons korrelationskoefficient på 0,99. Differensen mellan metoderna fick ett medelvärde på 0,02 Brix%. Parat t-test visade att det inte finns en signifikant skillnad mellan metoderna. Detta betyder att gränsvärdet för Brix-refraktometern inte bör ändras och att metoden förmodligen kan användas men en djupare undersökning av denna metod är önskvärd. Framför allt bör kalvar med ett lågt upptag av antikroppar undersökas för att titta närmare på hur det ser ut kring gränsvärdet. Detta hade även varit önskvärt för den optiska refraktometern.

Resultaten visar också att måttligt och kraftigt hemolyserade blodprov inte bör analyseras då det ger osäkra resultat. Blodprov med lindrig hemolys kan antagligen användas men på grund av för lite statistiskt underlag i frågan så är mer undersökning önskvärd. Av de 50 kalvar som provtogs på Lövsta klassades ca 16 % som FPT.

Nyckelord: råmjölk, refraktometer, blodprov, kalvhälsa, Brix

Abstract

Calves are born without a functional immune system and are dependent on the antibodies in the colostrum provided by the cow to get protection from pathogens. To verify the uptake, it is possible to take a blood sample from the calf and analyse it for antibodies. There are different methods to measure antibodies, both direct and indirect. Two indirect methods are using the optical refractometer and the Brix-refractometer. These methods of analysis measure the refractive index in the serum which correlates with the dry matter content and can be correlated to the total protein concentration in the serum. In this essay the possibility to analyse non-centrifuged blood samples with refractometry is evaluated as well as to what extent haemolysis affects the results. The purpose was also to get practical experience of handling non-centrifuged blood samples. The possibility to analyse non-centrifuged blood samples would enable on-farm analysis.

To get an overview of the calf management in a herd it is recommended in Sweden today that a veterinarian collects blood samples from 3-4 calves, centrifuges and analyses them. The calf is classified as having an inadequate uptake of antibodies, also called failure of passive transfer, if the levels of serum IgG, which is the dominating antibody in colostrum, are below 10 g/L. With indirect methods, limit values in Sweden have been set to 55 g/L with the optical refractometer and 8.4 Brix% with the Brix-refractometer.

Serum samples were collected from 50 calves, 2-8 days old, at Lövsta farm. Three blood samples were collected from each calf. The first sample was centrifuged and used as the base value, the second blood sample was not centrifuged but let to self-settle and in the third one haemolysis was generated. The first ten non-centrifuged blood samples were refrigerated with no success, the blood clot ended up at the top of the sample and made it difficult to access clean serum. The strategy was changed so the blood samples were left in room temperature for 48 hours instead. Haemolysis was generated by shaking of the samples and letting them sit for 9 days at room temperature. All the samples were analysed by both optical refractometer and Brix-refractometer.

Non-centrifuged vs centrifuged blood samples using optical refractometer gave a Pearson's correlation coefficient of 0.98. The difference between the methods had an average value of 1.2 g/L. When only the values around the limit value, 55 g/L were evaluated, the average value was 2 g/L. The paired t-test showed a difference between the methods and therefore adjusting the limit from 55 g/L to 57 g/L is recommended.

Non-centrifuged vs centrifuged blood samples using the Brix-refractometer gave a Pearson's correlation coefficient of 0.99. The difference between the methods had an average value of 0.02 Brix%. The paired t-test showed that there was no difference between the methods. This means that the limit should not be adjusted, and that the method could probably be used. However, more research would be preferable.

The results show that moderately and severely haemolyzed samples should not be used as they provide uncertain results. Mildly haemolyzed samples can possibly be used. Out of the 50 calves tested at Lövsta, 16% suffered from FPT.

Keywords: colostrum, refractometer, blood sample, calf health, Brix

Innehållsförteckning

Tabellförteckning	9
Figurförteckning	10
Förkortningar	11
1. Inledning	13
2. Litteraturoversikt.....	15
2.1 Råmjölk	15
2.1.1 Definition	15
2.1.2 Produktion av råmjölk	15
2.1.3 Innehåll i råmjölk.....	15
2.1.4 Kontroll av råmjölk	16
2.2 Metod för att mäta antikroppar i serum	16
2.2.1 Teori refraktometer	16
2.2.2 Optisk och Brix-refraktometer	16
2.3 Bristande råmjölksupptag	17
2.3.1 Ålder vid provtagning	17
2.3.2 Nytt klassificeringssystem.....	18
2.4 Sjukdomar kopplade till bristande råmjölksupptag	18
2.4.1 Studier i Sverige	19
2.5 Studier om ocentrifugerade blodprov på kalvar	19
2.6 Hemolys och dess påverkan vid analys av blodprov	20
3. Material och metod	21
3.1 Försöksgård Lövsta lantbruksforskning	21
3.2 Blodprovtagning och analys av prover.....	21
3.2.1 Uppdelning av prover.....	21
3.2.2 Analysering av prover.....	22
3.2.3 Bakgrundsinformation om kalvarna	22
3.3 Klassificering av hemolys.....	23
3.4 Statistiska analyser	23
4. Resultat	24
4.1 Praktisk erfarenhet vid hantering av ocentrifugerat blodprov	24
4.2 Ocentrifugerat vs centrifugerat blodprov.....	26
4.2.1 Optisk refraktometer	26
4.2.2 Brix-refraktometer	27
4.3 Hemolyserat vs icke-hemolyserat blodprov	28
4.3.1 Optisk refraktometer	28
4.3.2 Brix-refraktometer	29
4.4 Förekomst av FPT på Lövsta enligt olika klassificeringssystem.....	31
4.4.1 Failure of passive transfer	31
4.4.2 Lombard et al. klassificeringssystem	31
5. Diskussion	33
5.1 Praktisk erfarenhet vid hantering av ocentrifugerat blodprov	33
5.2 Ocentrifugerat vs centrifugerat blodprov.....	34
5.2.1 Optisk refraktometer	34

5.2.2	Brix-refraktometer	35
5.3	Hemolyserat vs icke-hemolyserat blodprov	36
5.4	Förekomst av FPT på Lövsta enligt olika klassificeringssystem.....	37
5.4.1	Failure of passive transfer	37
5.4.2	Lombard et al. klassificeringssystem	38
5.5	Konklusion.....	39
	Referenser.....	40
	Populärvetenskaplig sammanfattning	44
	Tack	46
	Bilaga 1.....	47
	Bilaga 2.....	50
	Bilaga 3.....	52

Tabellförteckning

Tabell 1. Kategorisk indelning av kalvars råmjölk- och totalproteinnivåer enligt Lombard et al. (2020). Serum IgG uppmätt med RID. Gränsvärden för totalprotein och Brix% som matchar serum IgG-nivåerna. Visar andelen kalvar på besättningsnivå som bör finnas i varje kategori.....	18
Tabell 2. Klassificering av hemolys enligt Koseoglu et al.(2011)	20
Tabell 3. Egen klassificering av hemolys	23
Tabell 4. Andelen kalvar på Lövsta enligt Lombard et al. (2020) klassificeringssystem. Andelen kalvar i de olika kategorierna, uppmätt med optisk refraktometer och Brix-refraktometer i centrifugerat blodprov.	31
Tabell 5. Andelen kalvar på Lövsta enligt Lombard et al. (2020) klassificeringssystem. Andelen kalvar i de olika kategorierna, uppmätt med optisk refraktometer och Brix-refraktometer i ocentrifugerat blodprov.	32
Tabell 6. Tabellen visar bakgrundsinformation om de 50 kalvar som deltagit i studien. Den visar kalvnummer, födelsevikt, värdet på råmjölken i Brix% samt från vilken ko råmjölken kom ifrån, moder till kalven och vilket datum den föddes och dess ålder i dagar. Den visar även mängden råmjölk vid första givan och de fem påföljande givorna samt om kalven diät kon eller inte. Kalvarna är sorterade i ordningen som de provtogs.	47
Tabell 7. Uppmätta värden med optisk refraktometer. (C)=centrifugerat blodprov, (E)=ej centrifugerat, (R)=blodprov med hemolys som förvarats i rumstemperatur. Hemolysgraden varierar mellan 0–3.....	50
Tabell 8. Uppmätta värden med Brix-refraktometer. (C)=centrifugerat blodprov, (E)=ej centrifugerat, (R)=blodprov med hemolys som förvarats i rumstemperatur. Hemolysgraden varierar mellan 0–3.....	52

Figurförteckning

Figur 1. Klassificering av hemolys, från vänster: ingen, lindrig, måttlig och kraftig hemolys.	23
Figur 2. Blodprov rör som har förvarats i kylskåp i 24 h, allt blod koagulerade inte och koaglet sedimenterade inte utan hamnade högt upp i provröret.	24
Figur 3. Blodprov som förvarats i rumstemperatur i 48 h.	25
Figur 4. Hur blodprov röret vinklades för att komma åt serumet.	25
Figur 5. Pearsons korrelationskoefficient för totalprotein (g/l) i centrifugerat (C) och ej centrifugerat (E) blodprov uppmätt med optisk refraktometer. Det ljusblå området kring strecket visar det 95 % konfidensintervallet.	26
Figur 6. Ett stapeldiagram över skillnaden i totalprotein (g/l) mellan ej centrifugerat (E) och centrifugerat (C) blodprov uppmätt med optisk refraktometer.	27
Figur 7. Pearsons korrelationskoefficient för torrsubstanshalt (Brix%) i centrifugerat (C) och ej centrifugerat (E) blodprov uppmätt med Brix-refraktometer. Det ljusblå området kring strecket visar det 95 % konfidensintervallet.	27
Figur 8. Ett stapeldiagram över skillnaden (Brix%) mellan ej centrifugerat (E) och centrifugerat (C) blodprov uppmätt med Brix-refraktometer.	28
Figur 9. Pearsons korrelationskoefficient för totalprotein (g/l) i centrifugerat (C) och hemolyserat (R) blodprov uppmätt med optisk refraktometer. Det ljusblå området kring strecket visar det 95 % konfidensintervallet.	29
Figur 10. Ett stapeldiagram över skillnaden i mätvärde (g/l) mellan hemolyserat (R) och centrifugerat (C) blodprov uppmätt med optisk refraktometer. De grå markerade staplarna visar hemolysgrad 0,5–1,5 och de orangea hemolysgrad 2–3.	29
Figur 11. Pearsons korrelationskoefficient för torrsubstanshalt (Brix%) i centrifugerat (C) och hemolyserat (R) blodprov uppmätt med Brix-refraktometer. Det ljusblå området kring strecket visar det 95 % konfidensintervallet.	30
Figur 12. Ett stapeldiagram över skillnaden i mätvärde (Brix%) mellan hemolyserat (R) och centrifugerat (C) blodprov uppmätt med Brix-refraktometer. De grå markerade staplarna visar hemolysgrad 0,5–1,5 och de orangea hemolysgrad 2–3.	30

Förkortningar

Brix	Brytningsindex
FPT	Failure of passive transfer
IgG	Immunoglobulin G
IgM	Immunoglobulin M
RID	Radial immunodiffusion
SLU	Sveriges lantbruksuniversitet

1. Inledning

Övervakning av kalvars maternala antikroppsuptag är en viktig åtgärd för att främja god kalvhälsa och öka överlevnaden för neonatala kalvar (Godden et al. 2019). Det finns olika sätt att mäta antikroppar i blodet på. Många studier är gjorda under laboratorieförhållanden där prover centrifugerats innan analys. Det är ovanligt att en gård har tillgång till en centrifug varför möjligheten att analysera ocentrifugerat blodprov skulle öka tillgängligheten (Pisello et al. 2021). Om ocentrifugerat blodprov kan analyseras skulle det medföra att lantbrukaren själv kan ta blodprov och analysera på gården vilket skulle göra analysen betydligt billigare. Det skulle även möjliggöra att en veterinär som inte har tillgång till en centrifug kan analysera prover. En billigare och mer tillgänglig analys medför både att fler kalvar provtas men möjliggör även att analyserna sker mer utspritt över året. I den här studien gjordes mätningar med både optisk och brytningsindex-refraktometer (Brix-refraktometer) som är möjliga mätmetoder. Detta därför att Brix-refraktometern är ett instrument som ofta redan finns på mjölkgårdar då de används för att mäta totalprotein i råmjölken, medan veterinären vanligtvis har en optisk refraktometer då den även kan användas för att mäta till exempel densiteten i urin.

Möjligheten att analysera ocentrifugerat blodprov undersöktes av Wallace et al. (2006). Studien påvisade en stark positiv korrelation mellan ocentrifugerat och centrifugerat blodprov. Några andra artiklar om huruvida det fungerar att analysera ocentrifugerat blodprov har dock inte hittats vilket indikerar att det inte har undersökts vidare. I detta arbete undersöks möjligheten att analysera ocentrifugerat blodprov med refraktometer. Målet är även att få praktisk erfarenhet av eventuella problem vid hantering av ocentrifugerat blodprov.

Vid blodprovtagning finns det alltid en risk för hemolys i provröret, speciellt om provtagaren är ovan. Vid en undersökning där stallpersonal tog blodprover blev en stor andel av proverna hemolyserade (de Haan 2018). Hemolys är känt för att störa många analysmetoder och är en stor anledning till att många blodprov kasseras inom humanvården (Simundic et al. 2020). I detta arbete undersöks om hemolys påverkar analys med refraktometer.

Vidare bedöms en kalv ha misslyckats med upptaget om den har en serum immunoglobulinhalt (IgG-halt) som är lägre än 10 g/l. Då indirekta metoder används har gränserna i Sverige bestämts till till 55g/l med optisk refraktometer och 8,4 Brix%. Detta benämns failure of passive transfer (FPT) (Godden 2008). Lombard et al. (2020) föreslår ett nytt klassificeringssystem med fyra kategorier i stället för två. I detta arbete undersöks hur kalvarna i studien, ligger till i förhållande till de båda klassificeringssystemen.

Syftet med arbetet kan sammanfattas i fyra punkter

- 1) Att få praktisk erfarenhet vid hantering av ocentrifugerat blodprov
- 2) Undersöka om ocentrifugerat blodprov skiljer sig från centrifugerat med avseende på totalproteinnivåer som markör för antikroppsnehåll.
- 3) Undersöka om hemolyserat blodprov skiljer sig från icke-hemolyserat blodprov med avseende på totalproteinnivåer som markör för antikroppsnehåll.
- 4) Undersöka hur kalvarna på Lövsta kategoriseras utifrån klassificeringen FPT samt det nya klassificeringssystemet enligt Lombard et al. (2020) vid användande av blodprov som är centrifugerat och ocentrifugerat.

2. Litteraturöversikt

2.1 Råmjölk

2.1.1 Definition

Råmjölk innehåller livsviktiga antikroppar för den nyfödda kalven eftersom kalven föds med ett outvecklat immunförsvar då antikroppar inte kan transporteras till kalvens blod via moderkakan (Waller et al. 2013). Att tidigt efter födseln få i sig en tillräcklig mängd av högkvalitativ råmjölk är den viktigaste parametern för kalvars överlevnad i den neonatala perioden (Godden 2008). Det finns flera olika definitioner av råmjölk, i det här arbetet definieras råmjölken enligt Waller et al. (2013) som mjölken från den första urmjölkningsen av kon efter kalvning. Den första urmjölkningsen bör helst göras inom två timmar efter kalvning och max inom sex timmar. Mjölken från de nästkommande mjölkningarna definieras som övergångsmjölk.

2.1.2 Produktion av råmjölk

Råmjölken produceras i juvret de sista veckorna innan förlossningen, då transporten av antikroppar från kons serum till juvret initieras (Weaver et al. 2000). Den största transporten sker en till tre dagar före förlossning. Produktionen av råmjölken upphör abrupt efter förlossning och övergår successivt i vanlig mjölkproduktion (Godden 2008). Koncentrationen av antikroppar är som högst vid första urmjölkningsen och minskar stadigt de sex kommande mjölkningarna.

2.1.3 Innehåll i råmjölk

Näringsinnehållet i råmjölken skiljer sig från vanlig mjölk (Godden 2008). Den viktigaste komponenten i råmjölken är antikroppar och den främsta antikroppen är immunoglobulin G (IgG). IgG står för ca 85–90 % av totalhalten immunoglobuliner. Råmjölken har även en hög fetthalt på 6–7 % och en totalproteinhalt på ca 14 %. Den innehåller en hög halt mineraler, vitamin A, E, B2, B6 och B12 samt insulin och tillväxtfaktorn IGF-1.

2.1.4 Kontroll av råmjölk

För att kontrollera att råmjölken har en tillräckligt hög kvalitet bör lantbrukaren göra en mätning av råmjölken innan den ges till kalven (SVA u.å.). För att råmjölken ska ha tillräckligt med antikroppar i sig och anses vara av god kvalitet bör den ha ett brytningsindex-värde (Brix-värde) på ≥ 22 Brix% (Bielmann et al. 2010). Vid värden under 18 Brix% bör kalven även få annan råmjölk med ett högre värde, färsk eller upptinad (SVA u.å.).

2.2 Metod för att mäta antikroppar i serum

För att få veta om kalven fått i sig tillräckligt med antikroppar rekommenderas i Sverige att ett blodprov tas när kalven är två till sju dagar gammal och att serumet analyseras med avseende på antikropps nivåer (SVA u.å.). SVA rekommenderar att blodprov på 3–4 friska kalvar tas.

Det finns flera olika metoder att mäta antikropps nivåerna i serum (Weaver et al. 2000). För att direkt mäta IgG-koncentrationen används radial immunodiffusion (RID) som anses vara golden standard (Bielmann et al. 2010). Även kvantitativ ELISA kan mäta IgG-koncentrationen i serum (Weaver et al. 2000). Dessa metoder kräver ett laboratorium och är kostsamma (Godden 2008). IgG-koncentrationen kan även uppskattas med indirekta metoder till exempel genom att mängden totalprotein mäts med någon typ av refraktometer (Weaver et al. 2000). Att mäta totalprotein är billigt, enkelt, snabbt och kan användas på gården (de Souza et al. 2021).

2.2.1 Teori refraktometer

En refraktometer mäter ljusstrålens brytning mellan två olika medier (Auxilabs 2010). När ljusstrålen når övergången mellan två medier kommer delar av ljusstrålen att reflekteras och delar refrakteras. Den delen av strålen som refrakteras kommer att fortsätta i det andra mediet med en annan vinkel och hastighet jämfört med första mediet. Hastighetsändringen och vinkeln bestämmer brytningsindexet, även kallat refraktionsindex som är ett specifikt värde för varje medium. Refraktionsindex är relaterat till antalet partiklar i vätskan och representerar därmed vätskans torrs substans. Torrs substansen kan relateras till vätskans innehåll av proteiner vilket i sin tur kan relateras till mängden antikroppar.

2.2.2 Optisk och Brix-refraktometer

Det finns både optiska och digitala refraktometrar. På en optisk refraktometer visas resultatet genom att en linje uppkommer när instrumentet riktas mot en ljuskälla.

Linjen avläses mot en skala som representerar totalproteinet. Den digitala refraktometern ger ett värde i Brix% på en digital skärm varför den kallas Brix-refraktometer. Brix-refraktometern mäter torrsubstanshalten i Brix%. Ett antal tidigare studier har visat på en god korrelation mellan Brix-refraktometer, optisk refraktometer och koncentrationen av IgG-antikroppar uppmätt med RID (Deelen et al. 2014; Thornhill et al. 2015; Pisello et al. 2021).

Deelen et al. (2014) såg en hög korrelation mellan Brix-värden och IgG-koncentrationen uppmätt med RID ($r = 0,93$). McCracken et al. (2017) såg en måttlig korrelation mellan Brix-värden och IgG-koncentrationen uppmätt med RID ($r = 0,79$). Elsohaby et al. (2019) fick en korrelation mellan RID och optisk refraktometer till $r = 0,75$ och mellan RID och Brix till $r = 0,80$. Pisello et al. (2021) fann en positiv korrelation mellan RID och Brix ($r = 0,84$, $p < 0,0001$).

Lombard et al. (2020) delade upp kalvarnas IgG-nivåer i fyra olika kategorier. I statistiska modeller jämförde de kategorierna gällande totalprotein och Brix% med serum IgG. Där de fick R^2 -värden på 0,803 för totalprotein och 0,797 för Brix% vilket är en god korrelation.

2.3 Bristande råmjölksupptag

Om en kalv får i sig råmjölk under dess första levnadsdygn kommer en absorption av maternala antikroppar ske i tunntarmen. Historiskt har man bedömt absorptionen som misslyckad vid en IgG-serumkoncentration på mindre än 10 g/l om provet tas när kalven är mellan 24 och 48 timmar gammal. Detta benämns failure of passive transfer (FPT) (Godden 2008). Vid mätning med en optisk refraktometer har gränsvärden på 50–55 g/l använts och för Brix värden på 8,1–8,5 Brix% (Godden et al. 2019). I Sverige rekommenderas ett värde på 55 g/l vid mätning med optisk refraktometer och ett Brix-värde på 8,4 Brix% (SVA u.å.). Gränsvärdet för den optiska refraktometern styrks av Buczinski et al. (2018) som menar att ett värde på 55 g/l bör användas för att ha marginal och för att öka sensitiviteten, alltså att inte kalvar med FPT missas. Gränsvärdet för Brix-refraktometern styrks av Deelen et al. (2014) och Akköse et al. (2022).

2.3.1 Ålder vid provtagning

Vid analys av totalproteinvärde kan blodprover tas mellan 24 timmar efter första råmjölksgivan och upp till nio dagars ålder (Wilm et al. 2018). Ju tidigare prover tas desto mer exakt representeras det sanna IgG-värdet och desto mindre risk är det att värdet påverkas av distribution av IgG och dehydrering (Godden et al. 2019). Det gör att det i olika studier är olika åldrar på kalvarna.

2.3.2 Nytt klassificeringssystem

Att definiera kalvar som FPT eller inte har i USA använts i mer än 35 år vilket har minskat kalvdödligheten i landet kraftigt, men sjukligheten hos kalvar har inte minskat nämnvärt (Lombard et al. 2020). Detta fick kalvforskare i USA att gå samman för att utforma nya rekommendationer om råmjölksupptag och kalvars totalproteinnivå. I stället för att dela upp kalvarna i två grupper, FPT och inte, förslogs fyra grupper. Grupperna kategoriserades som excellent, good, fair och poor vilket kan översättas till mycket väl godkänt, väl godkänt, godkänt och ej godkänt. För att reducera risken för sjukdom gjordes en bedömning på hur många kalvar som bör finnas inom varje kategori på besättningsnivå, se tabell 1.

Tabell 1. Kategorisk indelning av kalvars råmjölk- och totalproteinnivåer enligt Lombard et al. (2020). Serum IgG uppmätt med RID. Gränsvärden för totalprotein och Brix% som matchar serum IgG-nivåerna. Visar andelen kalvar på besättningsnivå som bör finnas i varje kategori

Kategori	Totalprotein (g/l)	Serum IgG (g/l)	Brix%	Andelen kalvar i varje kategori
Excellent	≥62,0	≥25,0	≥9,4	>40 %
Good	58,0 – 61,0	18,0 – 24,9	8,9 – 9,3	~ 30 %
Fair	51,0 – 57,0	10,0 – 17,9	8,1 – 8,8	~ 20 %
Poor	<51	<10	<8,1	<10 %

Implementering av den nya standarden bör enligt författarna ytterligare minska risken för både mortalitet och sjuklighet samt öka kalvhälsan och djurvälståndet (Lombard et al. 2020).

2.4 Sjukdomar kopplade till bristande råmjölksupptag

Sjukdomar som har kopplats till FPT är framför allt diarré och luftvägssjukdomar men även kopplingar till blodförgiftning har setts (Donovan et al. 1998; Virtala et al. 1999; Furman-Fratczak et al. 2011). Risken att utveckla lunginflammation var signifikant högre om man hade en lägre mängd IgG-antikroppar i blodet (Virtala et al. 1999). Furman-Fratczak et al. (2011) såg en skillnad på sjukdomsincidensen vad gäller diarré och luftvägsinfektioner vid jämförelse mellan kalvar med olika nivåer av serum antikroppar, IgG och IgM. De använde metoden RID. Kalvar med en nivå under 5 g/l hade 81,8 % sjukdomsincidens jämfört med kalvar med en nivå över 15 g/l som hade en sjukdomsincidens på 26,7%. Kalvar med en antikropps-nivå över 15 g/l undvek luftvägsinfektioner ända fram till första insemination och kalvar med en nivå över 10 g/l var skyddade från sjukdom de första 14 dagarna i livet.

Donovan et al. (1998) rapporterade i en prospektiv kohortstudie en dramatisk ökad mortalitet vid 40 g/l serumtotalprotein jämfört med vid 50 g/l. De visade även att kalvar med en lägre serumtotalproteinkoncentration hade en signifikant högre risk att insjukna i septikemi och lunginflammation.

2.4.1 Studier i Sverige

Sjukdomar som är vanliga hos kalvar i Sverige är diarré, luftvägssjukdomar, ringorm, navelinfektion och artrit (Svensson et al. 2003). I deras undersökning av kalvar upp till 90 dagar gamla fann de en odds ratio på 1,6–1,7 för kalvar att få diarré och kraftig diarré om de fick mjölk från kvigor jämfört med råmjölk från en äldre ko. Forskarna jämförde sitt resultat med studier som visat på att kvigor har en lägre halt IgG-antikroppar i sin råmjölk än äldre kor. De drog slutsatsen att den högre förekomsten av diarré kan bero på att kalven fått råmjölk från en kvinga.

Vid ett examensarbete som gjordes vid Sveriges lantbruksuniversitet (SLU) 2018 sågs en tydlig och signifikant koppling mellan FPT och lunginflammation på en av tre gårdar (de Haan 2018). Av 11 insjuknade kalvar hade åtta ett serumtotalprotein på under 55 g/l. På den andra gården som var med i försöket kunde dock inte samma slutsats dras och på den tredje gården samlades inte sjukdomsstatus in.

2.5 Studier om ocentrifugerade blodprov på kalvar

I en artikel av Wallace et al. (2006) undersöktes möjligheten att analysera totalprotein i ocentrifugerade blodprover från kalvar. Undersökningen gjordes på 234 kalvar på gårdar i södra Ontario, Kanada. Två blodprov samlades från varje kalv (1–7 dagar gamla), som tilläts koagulera. Ett av proven centrifugerades och serumet hölls av och kylades ner. Det andra provet kylades ner efter koagulering och serumet aspirerades runt om koaglet vid analysering. Proverna analyserades med en digital refraktometer som mäter totalprotein, 1–6 dagar efter blodprovstagningen. Färgen på serumet användes som indikator för hemolys, 6 % av de centrifugerade proverna och 6 % av de ocentrifugerade proverna hade hemolys. Även hemolyserade prover var inkluderade i studien utan att hänsyn togs till detta. Resultaten för de båda blodproven plottades mot varandra och erhöll korrelationen $R^2=0,95$. De beräknade även Spearmans rangkoefficient till 0,95.

Det är många studier som refererar till Wallace et al. (2006) resultat angående ocentrifugerat blodprov (Deelen et al. 2014; Hogan et al. 2015; Thornhill et al. 2015; Stojić et al. 2017; Renaud et al. 2018; Mugnier et al. 2020) och utgår från att blodprover kan tas och analyseras på gården. De har dock själva inte undersökt detta vidare och inga ytterligare studier angående ocentrifugerat blodprov kan i skrivande stund hittas.

2.6 Hemolys och dess påverkan vid analys av blodprov

Hemolys innebär att de röda blodkropparnas cellmembran skadas och det sker en frisättning av intracellulära komponenter till omgivande vätska (Simundic et al. 2020). Hemolys kan uppkomma antingen i kroppen på grund av patologiska processer eller i blodprovsröret. I blodprovsröret kan hemolys uppkomma vid inkorrekt provtagning, transporter, preparering och förvaring (Larrán et al. 2022). Exempel på problem som kan skapa hemolys efter provtagning är kraftig skakning provröret, centrifugering innan koagulation har skett, positiv eller negativt tryck i provröret samt frysning och tining av helblod (Thomas 2002). Hemolys kan påverka analysresultat genom en ökning av intracellulära komponenter, en utspädning eller genom spektrofotometriska och kemiska interferenser (Larrán et al. 2022). Parametrar som setts påverkas är till exempel albumin, totalt protein, glukos, totalt bilirubin, urea och kalcium.

Hemoglobin som frigörs vid ruptur av röda blodkroppar färgar serumet rött (Larrán et al. 2022). Beroende på grad av hemolys färgas serumet på en skala mellan ljus orange och mörkt rött. Graden av hemolys kan klassificeras enligt Koseoglu et al. (2011) i fem grupper beroende på fri hemoglobinkoncentrationen i plasma, se tabell 2.

Tabell 2. Klassificering av hemolys enligt Koseoglu et al.(2011)

Klassificering	Koncentration fritt hemoglobin
Ingen	0–0,1 g/L
Obetydlig	0,10–0,50 g/L
Lindrig	0,51–1,00 g/L
Måttlig	1,01–2,50 g/L
Kraftig	2,51–4,5 g/L

Det är viktigt att ha i åtanke att djurslag, metod och instrument är parametrar som kan påverka hur mycket hemolys stör resultatet (Larrán et al. 2022).

3. Material och metod

Blodprover från 50 kalvar på Lövsta lantbruksforskning samlades in under hösten 2022.

3.1 Försöksgård Lövsta lantbruksforskning

Sveriges lantbruksuniversitets forskningsgård Lövsta lantbruksforskning är belägen 10 km utanför Uppsala. Mjölkbesättningen utgörs av 280–290 kor varav 240–250 är lakterande där 60–70 % är av rasen SRB och resterande av rasen holstein.

Rutinen vid kalvning är att kon får slicka kalven torr och sedan mjölkas hon ur. Råmjölkens värde kontrolleras med en Brix-refraktometer. Kalven ges råmjölk, se mängd i bilaga 1, så snart som möjligt och övergångsmjölk i tre efterföljande dagar, två gånger om dagen. Om råmjölken inte har tillräcklig kvalitet eller inte räcker kompletteras givan med fryst råmjölk som har ett bra Brix-värde. Målet är att kalven ska få kompletterande fryst råmjölk vid ett Brix-värde <20 Brix%. Råmjölk med ett Brix-värde >20 Brix% kan frysas in. Kalven inhyses sedan i kalvhyddor under tak utomhus, enskilt eller i par. De avvänjs från mjölkgiva vid åtta veckors ålder.

3.2 Blodprovtagning och analys av proverna

Blodprover samlades in under åtta veckor från augusti till oktober 2022. Kalvarna var 2–8 dagar gamla då provtagning av praktiska skäl gjordes en gång i veckan. Blodprover togs i serumrör från jugularvenen med vacutainer (BD vacutainer, clot activator tube). Tre blodprovsrör samlades från varje kalv. Vid blodprovstagningen hölls kalvarna i ett stadigt grepp av en medhjälpare. Totalt togs prover från 50 kalvar i studien.

3.2.1 Uppdelning av prover

Efter provtagning transporterades provrören till laboratoriet vid idisslarmedicinkliniken på SLU. Provrören från varje kalv delades upp i tre grupper.

- 1) Prov som centrifugerades inom 1–3 h efter provtagning och analyserades direkt efter centrifugering. Benämns som prov (C). C = centrifugering

- 2) Prov som spontansedimenterat och analyserades utan centrifugering. Benämns som prov (E). E = ej centrifugering
- 3) Prov som förvarades i rumstemperatur till hemolys uppkommit, och analyserades efter centrifugering. Benämns som prov (R). R = hemolys (förvarande i rumstemperatur)

Angående prov (E) provades först förvaring i kylskåp. Provet fick då koagulera 1–3 timmar innan det sattes in i kylskåp i minst 22 timmar. Eftersom proverna separerade dåligt ändrades metoden till att prov (E) i stället fick stå framme i rumstemperatur i 48 timmar innan analysering. För att framkalla hemolys skakades Prov (R) om ordentligt precis efter provtagning och två gånger till utspritt över nio dagar. Analys efter centrifugering skedde efter nio dagar. Detta påbörjades efter de 25 första proverna då enbart lindrig hemolys uppkom utan omskakning. Centrifugering gjordes i 3–5 minuter i prov (C) och prov (R).

3.2.2 Analysering av prover

Serumet pipetterades upp från provröret med en pipett och analyserades med en optisk refraktometer och en Brix-refraktometer. Den optiska refraktometern kalibrerades med 2–3 droppar destillerat vatten innan analysering påbörjades varje dag. Vid analys med den optiska refraktometern pipetterades 2–3 droppar serum på avläsningsplattan och instrumentet riktades mot en lampa och lästes av. Mellan varje analys tvättades den av med destillerat vatten och torkades av med en icke-luddande pappersduk. Proceduren utfördes två gånger och medelvärdet av mätningarna användes.

Brix-refraktometern kalibrerades med kranvatten varje dag och 300 µl pipetterades sedan i avläsningsgropen. Avläsning startades och värdet noterades. Mellan varje analys tvättades Brix-refraktometern med kranvatten och torkades av med pappersdukar. Proceduren utfördes två gånger per prov. Om svaren skiljde sig åt upprepades proceduren igen tills två lika svar uppkom och det svaret användes.

Den optiska refraktometern hade en noggrannhet på 0,1 g/l och Brix-refraktometern 0,1 Brix%.

3.2.3 Bakgrundsinformation om kalvarna

Bakgrundsinformation om kalvarna såsom födelsedatum, födelsevikt, mor, värde på råmjölken och från vilken ko, första råmjölksmängden, resterande mängd råmjölk/övergångsmjölk, huruvida de hade diat eller inte inhämtades från kalvpärmen på Lövsta. Information om kalvarna återfinns i bilaga 1.

3.3 Klassificering av hemolys

Med hjälp av skalan i Koseoglu et al. (2011) och figur 1 i Larrán et al. (2022) skapades en skala för hemolys.

Tabell 3. Egen klassificering av hemolys

Klassificering	Gradering
Ingen	0
Ingen-lindrig	0,5
Lindrig	1
Lindrig-måttlig	1,5
Måttlig	2
Måttlig-kraftig	2,5
Kraftig	3

I figur 1 visas skalan i bildformat med ingen, lindrig, måttlig och kraftig hemolys. Halvgraderingar, ingen-lindrig, lindrig-måttlig och måttlig till kraftig användes om provet bedömdes vara mitt emellan de hela graderingarna.



Figur 1. Klassificering av hemolys, från vänster: ingen, lindrig, måttlig och kraftig hemolys.

3.4 Statistiska analyser

I denna studie har Excel 365 version 16.64 använts samt statistikprogrammen Minitab version 19.2020.2.0 och R version 4.2.0. Pearsons korrelationskoefficient beräknades och visualiserades i R. Spearmans korrelationskoefficient beräknades i Minitab. Deskriptiv statistik, så som stapeldiagram, medelvärde och median utfördes i Excel 365.

4. Resultat

Födelsevikterna på kalvarna varierade mellan 24,2 och 55,7 kg med ett medelvärde på 38,5 kg. I genomsnitt var kalvarna 4,9 dagar gamla vid provtagningstillfället.

4.1 Praktisk erfarenhet vid hantering av ocentrifugerat blodprov

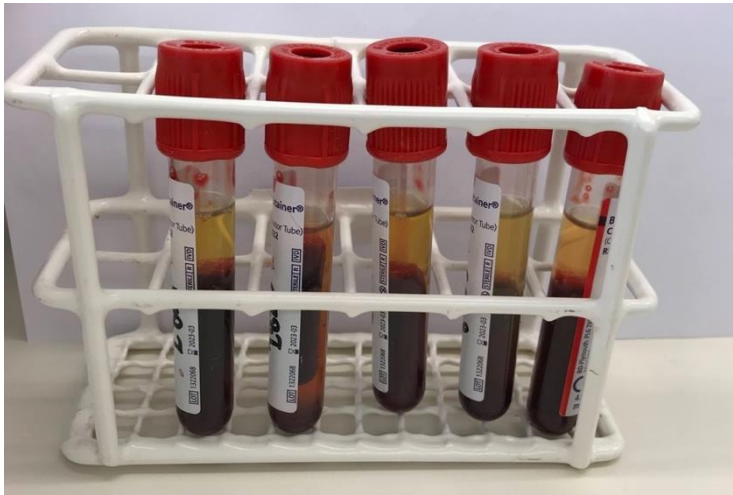
Arbetshypotesen var att de ocentrifugerade blodproverna (E) skulle analyseras efter att de först koagulerat i rumstemperatur i en timme och sedan stått i kylskåp i 24 timmar. Därför ställdes de tolv första proverna i kylskåp. Efter 24 timmar i kylskåp såg proverna ut enligt figur 2. Koaglet lade sig som en plugg överst i provröret så att serumet blev svåråtkomligt. Detta hände även om provrören noggrant vändes upp och ner tre gånger direkt efter provtagning så att "clot activator" i provröret fördelades jämnt. Blodet koagulerade inte heller fullständigt och det var svårt att komma åt rent serum.



Figur 2. Blodprovrör som har förvarats i kylskåp i 24 h, allt blod koagulerade inte och koaglet sedimenterade inte utan hamnade högt upp i provröret.

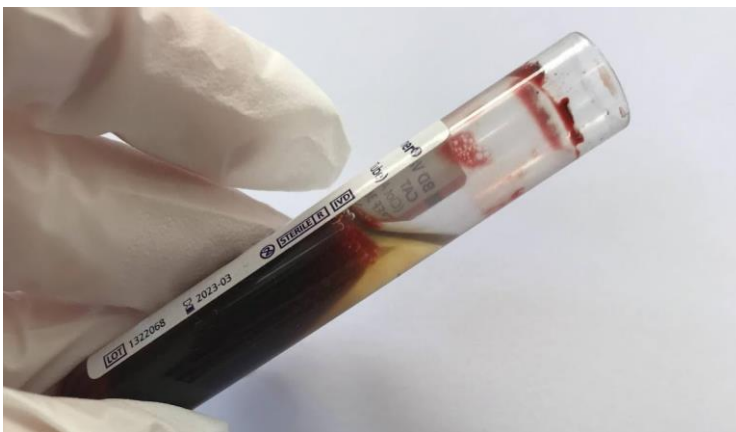
Eftersom koaglet hamnade högt upp i provröret ändrades strategin till att låta provrören stå framme i rumstemperatur vid ca 25 °C. Efter 17 och 24 timmar

kollades provrören och då hade det mesta koagulerat men det var fortfarande rödfärgat i ungefär halva provröret, proverna hade inte heller sedimenterat, alltså sjunkit ner mot botten ordentligt. Efter 48 h såg proven ut enligt figur 3 och då analyserades proverna.



Figur 3. Blodprov som förvarats i rumstemperatur i 48 h.

Vid några tillfällen fastnade koaglet i luftbubblorna längs med kanten på röret och sedimenterade därmed inte. Det gick dock bra att gå ner med pipetten längs sidan av koaglet alternativt vinkla röret för att nå serumet, se figur 4.



Figur 4. Hur blodprovöröret vinklades för att komma åt serumet.

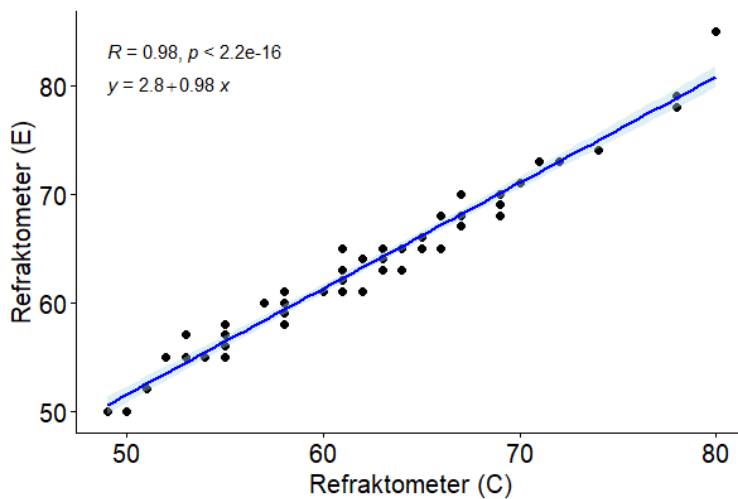
Då de ocentrifugerade proverna stod och sedimenterade i 48 h blev det ingen synlig hemolys längst upp i provröret om det inte sedan tidigare var hemolys. Nere vid botten kunde det dock vara lite okoagulerat blod men om endast en eller två pipetteringar behövde göras så kom inte det okoagulerade blodet med. Om tre eller flera pipetteringar behövde göras hände det ibland att lite okoagulerat blod oavsiktligt kom med.

4.2 Ocentrifugerat vs centrifugerat blodprov

Uppmätta värden för optisk refraktometer och Brix-refraktometer återfinns i bilaga 2 respektive bilaga 3.

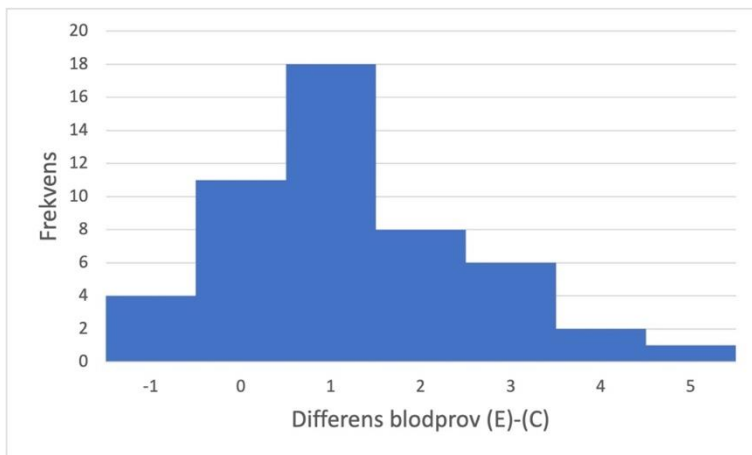
4.2.1 Optisk refraktometer

Medelvärdet för differensen mellan ocentrifugerat och centrifugerat blodprov mätt med refraktometer var 1,2 g/l och medianen 1,0 g/l totalprotein. Värdena var normalfördelade varför Pearson korrelationskoefficient användes och ett korrelationsvärde på 0,98 erhöles, se figur 5.



Figur 5. Pearsons korrelationskoefficient för totalprotein (g/l) i centrifugerat (C) och ej centrifugerat (E) blodprov uppmätt med optisk refraktometer. Det ljusblå området kring strecket visar det 95 % konfidensintervallet.

För att visualisera skillnaden mellan metoderna gjordes ett stapeldiagram över differensen där värdet på blodprov (C) subtraherades från blodprov (E), se figur 6. Differensen varierade mellan - 1 och + 5.

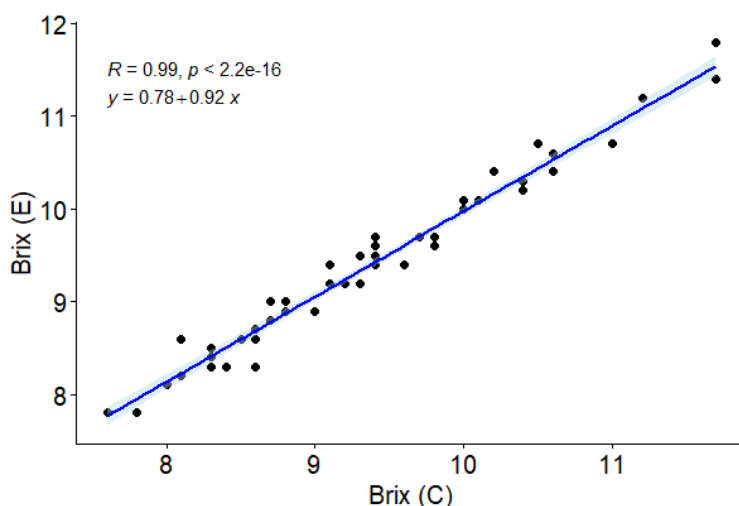


Figur 6. Ett stapeldiagram över skillnaden i totalprotein (g/l) mellan ej centrifugerat (E) och centrifugerat (C) blodprov uppmätt med optisk refraktometer.

De flesta blodprov skilde sig med 1 g/l (18 av 50 stycken). I blodprovet som skiljde sig med 5 g/l så var det ingen-lindrig hemolys i blodprov (E). Ett parat t-test gjordes även där t-värdet blev 6,3 och p-värdet <0,001 vilket visar att det finns en signifikant skillnad mellan metoderna.

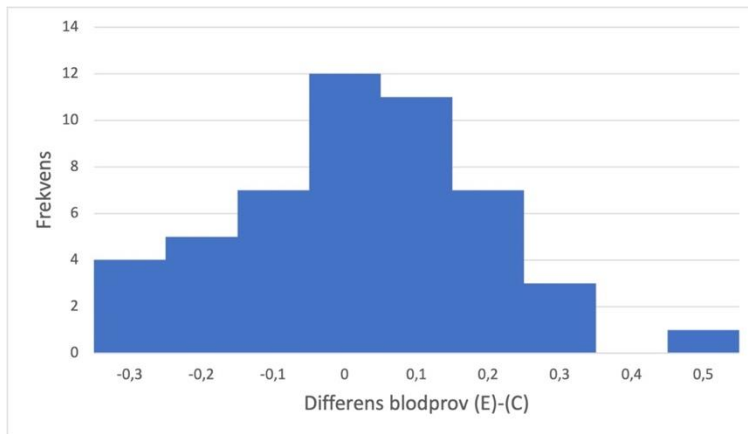
4.2.2 Brix-refraktometer

Medelvärdet för differensen mellan ocentrifugerat och centrifugerat blodprov uppmätt med Brix-refraktometer var 0,02 Brix% och medianen 0 Brix%. Värdena var relativt normalfördelade varför Pearsons korrelationskoefficient användes och ett korrelationsvärde på 0,99 erhöles, se figur 7.



Figur 7. Pearsons korrelationskoefficient för torrsubstanshalt (Brix%) i centrifugerat (C) och ej centrifugerat (E) blodprov uppmätt med Brix-refraktometer. Det ljusblå området kring strecket visar det 95 % konfidensintervallet.

Ett stapeldiagram över differensen mellan värdet på blodprov (E) och (C) uppmätt med Brix-refraktometer visas i figur 8. Differensen varierade mellan -0,3 och +0,5 Brix%. Ett parat t-test gjordes även där t-värdet blev 0,8 och p-värdet 0,43 vilket visar att det inte finns en signifikant skillnad mellan metoderna.



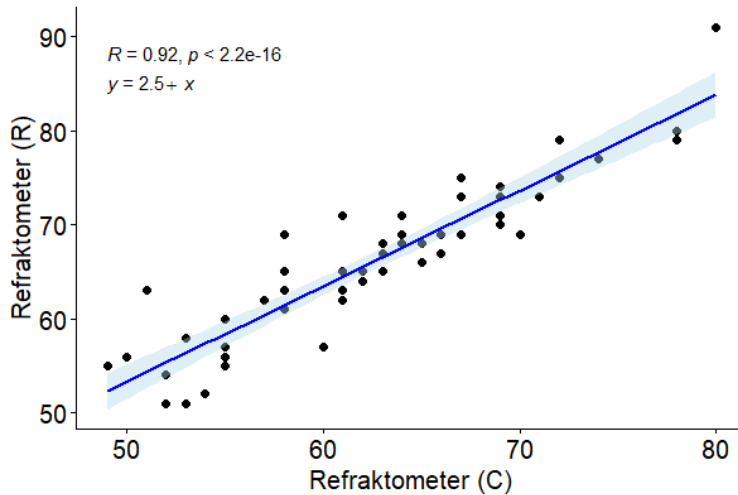
Figur 8. Ett stapeldiagram över skillnaden (Brix%) mellan ej centrifugerat (E) och centrifugerat (C) blodprov uppmätt med Brix-refraktometer.

4.3 Hemolyserat vs icke-hemolyserat blodprov

Uppmätta värden för optisk refraktometer och Brix-refraktometer återfinns i bilaga 2 respektive bilaga 3.

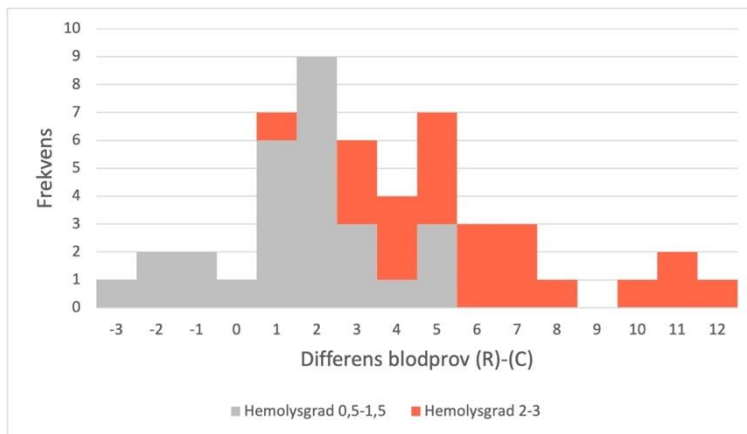
4.3.1 Optisk refraktometer

Medelvärdet för differensen mellan hemolyserat och centrifugerat blodprov uppmätt med refraktometer var 3,5 g/l och medianen 3,0 g/l totalprotein. Värdena var relativt normalfördelade varför Pearsons korrelationskoefficient användes och ett korrelationsvärde på 0,92 erhöles.



Figur 9. Pearsons korrelationskoefficient för totalprotein (g/l) i centrifugerat (C) och hemolyserat (R) blodprov uppmätt med optisk refraktometer. Det ljusblå området kring strecket visar det 95 % konfidensintervallet.

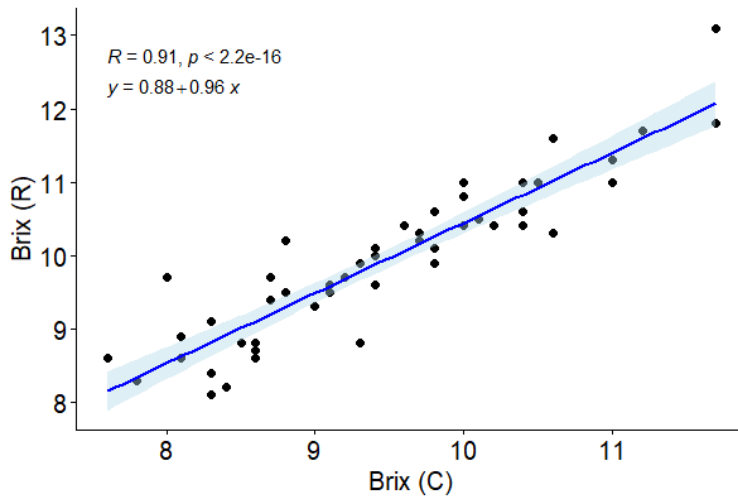
För att visualisera skillnaden mellan metoderna gjordes ett stapeldiagram över differensen där värdet på blodprov C subtraherades från blodprov R, se figur 10. Differensen varierade mellan -2 och +12 g/l totalprotein. I stapeldiagrammet är alla grader av hemolys inkluderade, grad 0,5–3. Det visar en tydlig ökning av differensen när hemolysgraden är högre.



Figur 10. Ett stapeldiagram över skillnaden i mätvärde (g/l) mellan hemolyserat (R) och centrifugerat (C) blodprov uppmätt med optisk refraktometer. De grå markerade staplarna visar hemolysgrad 0,5–1,5 och de orangea hemolysgrad 2–3.

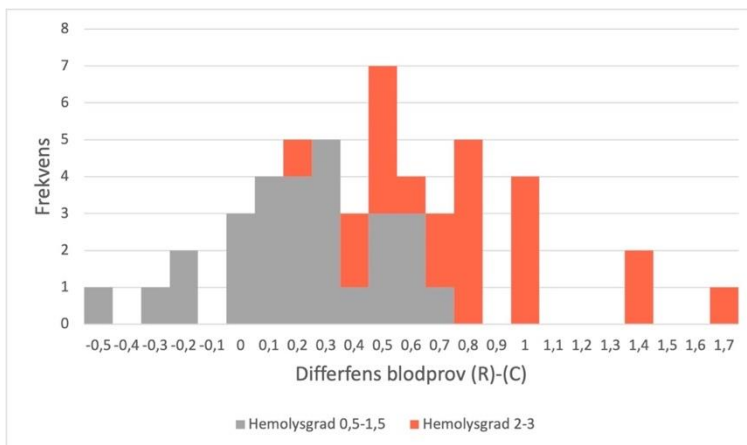
4.3.2 Brix-refraktometer

Medelvärdet för differensen mellan hemolyserat och centrifugerat blodprov uppmätt med Brix-refraktometer var 0,47 Brix% och medianen 0,50 Brix%. Värdena var relativt normalfördelade varför Pearsons korrelationskoefficient användes och ett korrelationsvärde på 0,92 erhöles, se figur 11.



Figur 11. Pearsons korrelationskoefficient för torrsubstanshalt (Brix%) i centrifugerat (C) och hemolyserat (R) blodprov uppmätt med Brix-refraktometer. Det ljusblå området kring strecket visar det 95 % konfidensintervallet.

För att visualisera skillnaden mellan metoderna gjordes ett stapeldiagram över differensen där värdet på blodprov (C) subtraherades från blodprov (R), se figur 12. Differensen varierade mellan -0,5 och +2 Brix%. I stapeldiagram är alla grader av hemolys inkluderade, grad 0,5–3.



Figur 12. Ett stapeldiagram över skillnaden i mätvärde (Brix%) mellan hemolyserat (R) och centrifugerat (C) blodprov uppmätt med Brix-refraktometer. De grå markerade staplarna visar hemolysgrad 0,5–1,5 och de orangea hemolysgrad 2–3.

4.4 Förekomst av FPT på Lövsta enligt olika klassificeringssystem

4.4.1 Failure of passive transfer

Vid mätning med optisk refraktometer var det 16 % av Lövstas kalvar som klassades ha FPT vid centrifugerat blodprov då gränsvärdet 55 g/l användes. Vid ocentrifugerat blodprov var det 6 %. Vid mätning med Brix-refraktometer var det 16 % respektive 14 % som klassades ha FPT vid centrifugerat blodprov respektive ocentrifugerat då gränsvärdet på 8,4 Brix% användes.

4.4.2 Lombard et al. klassificeringssystem

I tabell 4 presenteras andelen kalvar på Lövsta enligt Lombard et al. (2020) föreslagna klassificeringssystem. Vid uppdelningen användes blodprov (C). I tabell 4 visas även Lombard et al. (2020) gränsvärden. ’

Tabell 4. Andelen kalvar på Lövsta enligt Lombard et al. (2020) klassificeringssystem. Andelen kalvar i de olika kategorierna, uppmätt med optisk refraktometer och Brix-refraktometer i centrifugerat blodprov.

Kategori	Totalprotein (g/l) ^a	Andelen kalvar uppmätt med optisk refraktometer (totalprotein)	Brix% ^a	Andelen kalvar uppmätt med Brix	Andelen kalvar som bör vara i varje kategori ^a
Excellent	≥62,0	54 %	≥9,4	54 %	>40 %
Good	58,0 – 61,0	16 %	8,9 – 9,3	12 %	~ 30 %
Fair	51,0 – 57,0	26 %	8,1 – 8,8	28 %	~ 20 %
Poor	<51	4 %	<8,1	6 %	<10 %

^a Gränsvärden enligt Lombard et al. (2020)

Det bör noteras att deras nedre gräns för fair (godkänt) är lägre än Sveriges gräns för FPT som är 55 g/l. För att se om det blev någon skillnad om klassificeringen i stället gjordes på ocentrifugerat blodprov gjordes samma uppdelning på blodprov (E), se tabell 5.

Tabell 5. Andelen kalvar på Lövsta enligt Lombard et al. (2020) klassificeringssystem. Andelen kalvar i de olika kategorierna, uppmätt med optisk refraktometer och Brix-refraktometer i ocentrifugerat blodprov.

Kategori	Totalprotein (g/l) ^a	Andelen kalvar uppmätt med optisk refraktometer (totalprotein)	Brix% ^a	Andelen kalvar uppmätt med Brix	Andelen kalvar som bör vara i varje kategori ^a
Excellent	≥62,0	58 %	≥9,4	58 %	>40 %
Good	58,0 – 61,0	18 %	8,9 – 9,3	14 %	~ 30 %
Fair	51,0 – 57,0	20 %	8,1 – 8,8	22 %	~ 20 %
Poor	<51	4 %	<8,1	6 %	<10 %

^a Gränsvärden enligt Lombard et al. (2020)

5. Diskussion

5.1 Praktisk erfarenhet vid hantering av ocentrifugerat blodprov

Metoden som testades i detta arbete vad gäller att förvara proverna i kylskåp fungerade inte. Blodproverna tilläts koagulera i en timma innan de kylde ner. Wallace et al. (2006) lät också proverna koagulera innan de kylde ner dem i kylskåp men det är inte specificerat hur länge de fick koagulera. Det är möjligt att metoden hade fungerat om blodproverna hade fått koagulera en längre tid och sedan kylts ner. Vid första provtagningsomgången lades proverna ner i en påse i stället för att ställas i ett ställ vilket misstänkes vara anledningen till att koaglet lade sig högt upp i provröret och ibland även längs kanten av provröret, se figur 2. Detta åtgärdades dock till andra provtagningsomgången och koaglet hamnade då inte längre längs med kanten men fortfarande högt upp i provröret som en plugg. Det är ändå viktigt att blodprovvrören ställs upp direkt efter provtagning för att undvika att koaglet hamnar längs sidan av provröret.

Eftersom förvaring i kylskåp inte fungerade ändrades strategin efter två provtagningsomgångar till att låta blodproverna stå framme i rumstemperatur i stället. Efter 48 timmar var proverna redo att analyseras då det fanns klart serum. Eftersom blodproven inte bör förvaras i kylskåp utan i rumstemperatur så är det en viktig instruktion att ge till lantbrukaren då det i stall på vintern kan vara väldigt kyligt. Provrören måste alltså förvaras i ett uppvärmt rum och inte ute i ladugården.

För att provtagning och analys ska vara praktiskt genomförbart på en gård så är det viktigt med upplärning av lantbrukaren vilket bör ske av en veterinär. Lantbrukaren måste lära sig ta blodprov på ett rent och säkert sätt. Det är även viktigt att så rent serum som möjligt används vid mätning och att lantbrukaren instrueras om hur mätning bör utföras. Med fördel kan en skriftlig instruktion lämnas ut efter upplärning.

Proceduren bör gå till så att blodprov tas i venen på halsen på kalvarna, provvrören vänds upp och ner några gånger direkt efter provtagning och ställs sedan i ett ställ.

Det räcker med ett provrör från varje kalv. Provrören förvaras i 48 timmar i rumstemperatur (ca 25 °C) och sedan analyseras så rent serum som möjligt med en refraktometer.

5.2 Ocentrifugerat vs centrifugerat blodprov

5.2.1 Optisk refraktometer

Vid uträkning av Pearsons korrelation fås ett högt R-värde och ett p-värde som innebär att det finns en god överensstämmelse mellan mätvärdena från ocentrifugerade och centrifugerade blodprover. Resultatet stämmer väl överens med Wallace et al. (2006) som också fick en stark korrelation i sin undersökning.

Generellt ses ett högre totalprotein vid mätning av ocentrifugerat blod (figur 6). Staplarna är förskjutna åt höger i förhållande till noll-värdet. Om metoderna hade stämt helt överens med varandra så hade differensen legat precis vid noll. Medeldifferensen mellan ocentrifugerat och centrifugerat prov för alla kalvar är 1,2 g/l. Om enbart differenser av totalproteinvärden mellan 50–60 g/l analyseras så blir medelvärdet i stället 2,0 g/l. Värden mellan 50–60 g/l är intressanta eftersom de ligger nära gränsen på 55 g/l. Om en kalv i ett ocentrifugerat blodprov har ett värde på 56 g/l men i det centrifugerade blodprovet har 54 g/l så innebär det att kalven klassas felaktigt, den bedöms alltså inte som FPT i det ocentrifugerade. Med stöd av att det parade t-testet som visar att det finns en signifikant skillnad mellan metoderna tyder det på att gränsen för FPT bör höjas med 1–2 g/l.

Om gränsen för klassificering av FPT med optisk refraktometer för ocentrifugerat blodprov höjs från 55 g/l till 56 eller 57 g/l så skulle det innebära att fler av proverna klassificeras rätt. När mätningar gjordes på centrifugerade blodprover var det 16 % av kalvarna som klassades som FPT och på ocentrifugerade prover 6 %. Vid en flytt av gränsen till 56 g/l respektive 57 g/l skulle 18 % respektive 20 % av kalvarna klassas som FPT. Detta är således närmare procenten vid centrifugerade blodprover och till och med lite över. Om gränsen bör flyttas 1 eller 2 g/l beror på vad som vill uppnås med flytten. Huruvida det viktigaste är att ha en hög sensitivitet eller specificitet. Alltså att kalvar med låga värden fångas upp eller att alla värden blir så nära korrekt som möjligt. I och med att det får större konsekvenser om kalvar felaktigt klassas ligga över gränsen men egentligen ligger under gränsen så föreslås 57 g/l. Det är bland annat det som de diskuterar i Lombard et al. (2020), att gränsen 10 g/l har minskat mortaliteten kraftigt men att morbiditeten inte minskat nämnvärt vilket hade varit önskvärt. En förhöjd gräns hade kunnat generera en minskad sjuklighet varför en höjning till 57 g/l föreslås i det här arbetet.

Det ska tas i beaktning att det av 50 kalvar var 5 kalvar som klassades fel avseende FPT när 55 g/l användes som gränsvärde för ocentrifugerade prover. För att säkerställa att flytten av gränsvärdet blir bra så bör fler kalvar provtas och gärna fler kalvar som ligger runt gränsvärdet.

Det som är svårt att veta är huruvida det är förhållandena i blodprovet som har förändrats eller om det är mätmetoden som är sämre på att mäta ocentrifugerat blodprov. Till exempel skulle det kunna vara så att det är för ögat ej synlig hemolys, blodkroppar, cellrester eller fibrin i det ocentrifugerade blodprovet som gör att man får ett annat mätvärde. Ehsani et al. (2008) undersökte effekten på 17 olika parametrar vid olika lagringstid och lagringstemperatur på koagulerade blodprover. De hade blodprover från 12 mjölkkor med i studien och använde Biuretmetoden. De kom fram till att totalprotein inte påverkades av att proverna förvarades på is eller i rumstemperatur i upp till 24 timmar. En tidigare studie gjord på människor visade dock på signifikant förändringar av totalprotein efter 48 timmar vid förvaring vid 30 °C (Ono et al. 1981). De båda studierna ovan nämnda använde dock inte samma metod som använts i detta arbete.

5.2.2 Brix-refraktometer

Brix-differenserna varierade mer än vid mätning med optisk refraktometer då både högre och lägre Brix-värden uppmättes i ocentrifugerat blodprov, 16 lägre och 22 högre än i centrifugerat prov. Det innebär att Brix-refraktometern är mer inkonsekvent i sitt resultat. Den ger till exempel inte konsekvent ett högre värde. Brix-refraktometern visar ändå på en god korrelation mellan centrifugerat och ocentrifugerat prov med Pearsons korrelationskoefficient på 0,99. Därför bör det gå att även använda Brix-refraktometer på ocentrifugerat blodprov men det bör ha i åtanke att ocentrifugerat blodprov även kan få ett lägre värde än det centrifugerade blodprovet. Det innebär att kalvar som egentligen inte har FPT ändå klassas som det. Totalt var det åtta prover som klassades FPT av centrifugerat och sju prover som klassades FPT av ocentrifugerat blodprov.

En möjlig förklaring till att Brix-refraktometern var mer osäker i sitt resultat är att mätningen sker genom ett tjockare lager av vätska jämfört med den optiska refraktometern. Den optiska refraktometern fungerar så att dropparna trycks ut i en tunn film vilket resulterar i att det blir ett väldigt tunt lager som mäts. Ifall det då är med för ögat osynliga partiklar i serumet så betyder det att mer partiklar kommer med vid användning av Brix-refraktometern.

Eftersom Brix-differenserna varierar mer så hade det varit fördelaktigt med vidare undersökning huruvida den går att använda eller inte. Speciellt på värden kring gränsvärdet. Det går inte att hitta någon tydlig förklaring varför Brix% minskar i vissa ocentrifugerade blodprover. Det som märktes generellt var att Brix-refrakto-

metern var mer instabil i sin mätning jämfört med den optiska refraktometern. Om flera mätningar gjordes på samma vätska kunde Brix-refraktometern ibland ge olika mätvärden.

5.3 Hemolyserat vs icke-hemolyserat blodprov

Generellt ses ett högre totalprotein-värde vid hemolys, mätt med båda typerna av refraktometer. Differensen skiljer särskilt vid måttlig och kraftig hemolys vilket kan ses i figur 10 och figur 11 där de orangea staplarna är förskjutna åt höger.

Av misstag centrifugerades inte 13 av de hemolyserade blodproverna före analysering. De värdena är fortfarande med i de statistiska beräkningarna. Om differensen för de värdena studeras lite närmare så noteras att alla differenser som är negativa förutom en är bland de blodprov som inte centrifugerats. Att differensen är negativ betyder att värdet i det hemolyserade blodprovet är lägre än det än det icke-hemolyserade blodprovet. Alla utom ett av de 13 blodproven hade lindrig hemolys så det påverkar inte resultaten från proverna med måttlig och kraftig hemolys. Om dessa 13 blodprover tas bort så skulle staplarna i stapeldiagrammen i figur 10 och 12 i princip enbart vara vid noll och över noll. Hemolyserade blod-prover skulle alltså inte ha lägre värden än icke-hemolyserade.

För att framkalla hemolys i denna undersökning så fick blodproverna stå i nio dagar så även andra processer i blodprovet kan ha påverkat resultatet. Det går inte att garantera att det hade blivit exakt samma resultat om blodproven hade fått hemolys direkt vid provtagning. Ett annat sätt att framkalla hemolys är att göra som Reimers et al. (1991) då de drog blodprovet genom en smal nål med en spruta två till fyra gånger för att framkalla olika grader av hemolys. Det finns även en metod där de röda blodkropparna separeras från blodprovet, fryses och tinas, centrifugeras och sedan används supernatanten som hemolyserare (Stokol & Nydam 2006). I det här arbetet fanns inte möjlighet att utföra någon mer komplicerad metod för att framkalla hemolys.

Måttlig till kraftig hemolys i blodprovet har setts påverka analysen av nonesterified fatty acid som används som indikator för negativ energibalans på besättningsnivå för mjölkkor, till den grad att sådana prover inte bör analyseras (Stokol & Nydam 2006). I samma studie undersöktes även β -hydroxybutyrat som är en annan indikator för negativ energibalans, den analysen sågs inte påverkas av hemolys. I de artiklar där författarna jämför olika metoder för att mäta totalprotein som indikator för serum IgG i blod från kalvar så kommenterar de inte huruvida det skulle ha varit hemolys i blodproven eller hur det skulle kunna påverka (Deelen et

al. 2014; Thornhill et al. 2015; McCracken et al. 2017; Elsohaby et al. 2019; Pisello et al. 2021).

Korrelationen mellan hemolyserat och inte hemolyserat prov är fortfarande att betrakta som god för både den optiska refraktometern och Brix-refraktometern. Det bör dock tas i beaktande att alla hemolysgrader är med i de statistiska beräkningarna. När ett parat t-test gjordes på dessa erhöles ett p-värde $<0,001$ vilket visar att det finns en signifikant skillnad mellan icke-hemolyserat och hemolyserat blodprov. Det betyder att antingen bör gränsen flyttas eller så bör inte hemolyserade blodprover användas. Det är svårt att korrigera för hemolysgrad då samma hemolysgrad inte alltid ger samma differens. Det bör även has i åtanke att en visuell bedömning av hemolysgraden gjordes. Det finns studier som visar att visuell bedömning är opålitlig och att objektiva mätmetoder i stället bör övervägas (Hawkins 2002; Simundic et al. 2020). Därför är det inte säkert att alla blodprover hamnade i exakt rätt hemolysgrad.

Om bara differenserna för hemolysgrad 0,5–1 förutom de 13 som inte centrifugerades studeras vad gäller mätmetod optisk refraktometer så ligger de flesta differenserna runt 1 och 2 g/l vilket tyder på att blodprov med endast lindrig hemolys eventuellt kan användas. Dock är det statistiska underlaget för litet för att säkerställa detta. Måttligt och kraftigt hemolyserade blodprover bör inte användas då mätvärdena skiljer sig mycket från blodprov utan hemolys.

5.4 Förekomst av FPT på Lövsta enligt olika klassificeringssystem

5.4.1 Failure of passive transfer

Vid mätning på centrifugerat blodprov var det totalt 9 av 50 kalvar som klassades som FPT, om både den optiska refraktometern och Brix-refraktometern värden togs i beaktande. Metoderna klassade 8 kalvar var som FPT men skiljde sig åt på två olika prover. Vid jämförelse mot bakgrundsinformation om kalvarna noterades att sex av dessa kalvar hade fått råmjölk med ett Brix-värde på <20 Brix%. De hade även fått i sig <3 liter råmjölk, mellan 2–2,5 liter. Av de kalvar som hade fått råmjölk med ett Brix-värde >20 Brix% hade två fått i sig för liten mängd. En kalv gavs råmjölk flera timmar efter födseln eftersom den föddes på natten och antagligen hade diat kon och därmed inte ville äta vid nappning på morgonen. Det är alltså tydligt att det är går att hitta en förklaring till varför en kalv har lägre totalproteinsnivåer vilket stämmer överens med vad tidigare forskning visat (Bielmann et al. 2010).

Wallace et al. (2006) använde ett gränsvärde på 50 g/l för FPT i stället för 55 g/l som rekommenderas i Sverige. I den studien klassades 25 % som FPT vid mätning på centrifugerat blodprov och 28 % på ocentrifugerat blodprov. Det var alltså fler som klassades ha FPT när blodprovet var ocentrifugerat. I detta arbete var det i stället färre som klassades som FPT vid ocentrifugerat blodprov vid mätning med optisk refraktometer.

Godden et al. (2019) skriver att ju tidigare i kalvens liv blodproverna tas desto mer exakt representerar blodprovet dess IgG-halt. Därför kontrollerades om det kunde vara så att de kalvar, i denna studie, som bedöms ha FPT på centrifugerat blodprov hade en högre ålder. Så var dock inte fallet. Det var en god spridning i ålder, mellan 2–8 dagar där alla åldrar utom ålder ”tre dagar” var representerade.

5.4.2 Lombard et al. klassificeringssystem

Lövsta ligger relativt bra till avseende klassificeringen av råmjölksupptag enligt Lombard et al. (2020). En stor andel av kalvarna hamnar i excellent-gruppen. Dock har de för många, 6–8 procentenheter för många, som hamnar i fair-gruppen jämfört med vad som rekommenderas. Om däremot de ocentrifugerade blodproven används (tabell 5) så ser man att metoderna generellt överskattar protein-nivåerna. Detta gäller även Brix-refraktometern vilket inte är uppenbart när enbart medelvärde, median och gräns för FPT studeras.

Jämfört med de svenska riktlinjerna är Lombard et al. (2020) mål ganska lågt satta. Deras fair-grupp går ända ner till 51 g/l vilket är betydligt lägre än gränsen för FPT på 55 g/l som används i Sverige. Det hade varit intressant med en liknande klassificering för svenska förhållanden.

I Lombard et al. (2020) är det inte specificerat hur många kalvar som bör provtas men antagande kan göras att de tycker att relativt många kalvar bör provtas. Om gårdens personal själva kan ta proverna, vilket skulle vara möjligt vid analys av ocentrifugerade blodprover, så kan de ta fler prover utan att det kostar mer och därmed lättare avgöra hur det ser ut på besättningsnivå. Det är önskvärt med ett större antal testade kalvar eftersom när man bara tar prov på 3–4 kalvar så som rekommenderas i Sverige (SVA u.å.) så kan man ha otur att missa kalvar som ligger dåligt till. Det blir även begränsat till endast ett tillfälle om en veterinär provtar en gång.

5.5 Konklusion

Ocentrifugerade blodprover kan användas för utvärdering av råmjölksupptag i fält om proverna får koagulera 48 h i rumstemperatur och rent serum noggrant pipetteras. Gränsvärdet för FPT föreslås ökas från 55 g/l till 57 g/l vid mätning med optisk refraktometer. Resultatet för ocentrifugerat blodprov uppmätt med Brix-refraktometern är mer varierande, den bör kunna användas men mer forskning på det hade varit att föredra. Måttligt och kraftigt hemolyserade blodprov bör inte analyseras då det ger osäkra resultat. Blodprov med lindrig hemolys kan eventuellt användas men mer forskning behövs. Av de 50 kalvar som provtogs på Lövsta klassades ca 16 % som FPT. Enligt Lombard et al. nya klassificeringssystem ligger Lövsta relativt bra till när det gäller antikroppsupptag.

Referenser

- Akköse, M., Kutsal, H.G., Kurban, M., Çinar, E.M., Polat, Y. & Cengiz, M. (2022). Diagnostic accuracy of digital Brix and serum total protein refractometers in estimating different passive immunity levels in dairy calves. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 249, 110442. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2022.110442>
- Auxilabs, S.L. (2010). *Multiscale refractometer Zuzi serie 300*. Instruktion, Berian Spanien.
- Bielmann, V., Gillan, J., Perkins, N.R., Skidmore, A.L., Godden, S. & Leslie, K.E. (2010). An evaluation of Brix refractometry instruments for measurement of colostrum quality in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 93 (8), 3713–3721. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2943>
- Buczinski, S., Gicquel, E., Fecteau, G., Takwoingi, Y., Chigerwe, M. & Vandeweerd, J. m. (2018). Systematic review and meta-analysis of diagnostic accuracy of serum refractometry and Brix refractometry for the diagnosis of inadequate transfer of passive immunity in calves. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 32 (1), 474–483. <https://doi.org/10.1111/jvim.14893>
- de Haan, T. (2018). *Hur råmjölkskvalité och upptag av immunoglobulin påverkar kalvhälsa*. (Examensarbete). Sveriges lantbruksuniversitet. Veterinärprogrammet. <https://stud.epsilon.slu.se/13666/> [2022-10-06]
- Deelen, S.M., Ollivett, T.L., Haines, D.M. & Leslie, K.E. (2014). Evaluation of a Brix refractometer to estimate serum immunoglobulin G concentration in neonatal dairy calves. *Journal of Dairy Science*, 97 (6), 3838–3844. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-7939>
- Donovan, G.A., Dohoo, I.R., Montgomery, D.M. & Bennett, F.L. (1998). Associations between passive immunity and morbidity and mortality in dairy heifers in Florida, USA. *Preventive Veterinary Medicine*, 34 (1), 31–46. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(97\)00060-3](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(97)00060-3)
- Ehsani, A., Afshari, A., Bahadori, H., Mohri, M. & Seifi, H.A. (2008). Serum constituents analyses in dairy cows: Effects of duration and temperature of the storage of clotted blood. *Research in Veterinary Science*, 85 (3), 473–475. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2008.02.004>
- Elsohaby, I., McClure, J.T., Waite, L.A., Cameron, M., Heider, L.C. & Keefe, G.P. (2019). Using serum and plasma samples to assess failure of transfer of passive

- immunity in dairy calves. *Journal of Dairy Science*, 102 (1), 567–577.
<https://doi.org/10.3168/jds.2018-15070>
- Furman-Fratczak, K., Rzasa, A. & Stefaniak, T. (2011). The influence of colostral immunoglobulin concentration in heifer calves' serum on their health and growth. *Journal of Dairy Science*, 94 (11), 5536–5543. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3253>
- Godden, S. (2008). Colostrum management for dairy calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 24 (1), 19–39.
<https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2007.10.005>
- Godden, S.M., Lombard, J.E. & Woolums, A.R. (2019). Colostrum management for dairy calves. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 35 (3), 535–556.
<https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.07.005>
- Hawkins, R. (2002). Discrepancy between visual and spectrophotometric assessment of sample haemolysis. *Annals of Clinical Biochemistry*, 39 (5), 521–522.
<https://doi.org/10.1258/000456302320314575>
- Hogan, I., Doherty, M., Fagan, J., Kennedy, E., Conneely, M., Brady, P., Ryan, C. & Lorenz, I. (2015). Comparison of rapid laboratory tests for failure of passive transfer in the bovine. *Irish Veterinary Journal*, 68 (1), 18. <https://doi.org/10.1186/s13620-015-0047-0>
- Koseoglu, M., Hur, A., Atay, A. & Cuhadar, S. (2011). Effects of hemolysis interference on routine biochemistry parameters. *Biochemia Medica*, 21 (1), 79–85.
<https://doi.org/10.11613/BM.2011.015>
- Larrán, B., López-Alonso, M., Miranda, M., Pereira, V., Rigueira, L., Suárez, M.L. & Herrero-Latorre, C. (2022). Measuring haemolysis in cattle serum by direct UV–VIS and RGB digital image-based methods. *Scientific Reports*, 12 (1), 13523.
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-17842-4>
- Lombard, J., Urie, N., Garry, F., Godden, S., Quigley, J., Earleywine, T., McGuirk, S., Moore, D., Branan, M., Chamorro, M., Smith, G., Shivley, C., Catherman, D., Haines, D., Heinrichs, A.J., James, R., Maas, J. & Sterner, K. (2020). Consensus recommendations on calf- and herd-level passive immunity in dairy calves in the United States. *Journal of Dairy Science*, 103 (8), 7611–7624.
<https://doi.org/10.3168/jds.2019-17955>
- McCracken, M.M., Morrill, K.M., Fordyce, A.L. & Tyler, H.D. (2017). Technical note: Evaluation of digital refractometers to estimate serum immunoglobulin G concentration and passive transfer in Jersey calves. *Journal of Dairy Science*, 100 (10), 8438–8442. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12847>
- Mugnier, A., Pecceu, K., Schelcher, F. & Corbiere, F. (2020). A parallel evaluation of 5 indirect cost-effective methods for assessing failure of passive immunity transfer in neonatal calves. *JDS Communications*, 1 (1), 10–14.
<https://doi.org/10.3168/jdsc.2019-17931>

- Ono, T., Kitaguchi, K., Takehara, M., Shiiba, M. & Hayami, K. (1981). Serum-constituents analyses: effect of duration and temperature of storage of clotted blood. *Clinical Chemistry*, 27 (1), 35–38. <https://doi.org/10.1093/clinchem/27.1.35>
- Pisello, L., Boccardo, A., Forte, C., Pravettoni, D., D’Avino, N., Passamonti, F. & Rueca, F. (2021). Evaluation of digital and optical refractometers for assessing failure of transfer of passive immunity in Chianina beef–suckler calves reared in Umbria. *Italian Journal of Animal Science*, 20 (1), 315–323. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2021.1884007>
- Reimers, T.J., Lamb, S.V., Bartlett, S.A., Matamoros, R.A., Cowan, R.G. & Engle, J.S. (1991). Effects of hemolysis and storage on quantification of hormones in blood samples from dogs, cattle, and horses. *American Journal of Veterinary Research*, 52 (7), 1075–1080
- Renaud, D.L., Duffield, T.F., LeBlanc, S.J. & Kelton, D.F. (2018). Short communication: Validation of methods for practically evaluating failed passive transfer of immunity in calves arriving at a veal facility. *Journal of Dairy Science*, 101 (10), 9516–9520. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14723>
- Simundic, A.-M., Baird, G., Cadamuro, J., Costelloe, S.J. & Lippi, G. (2020). Managing hemolyzed samples in clinical laboratories. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 57 (1), 1–21. <https://doi.org/10.1080/10408363.2019.1664391>
- de Souza, R.S., dos Santos, L.B.C., Melo, I.O., Cerqueira, D.M., Dumas, J.V., Leme, F. de O.P., Moreira, T.F., Meneses, R.M., de Carvalho, A.U. & Facury-Filho, E.J. (2021). Current diagnostic methods for assessing transfer of passive immunity in calves and possible improvements: A literature review. *Animals*, 11 (10), 2963. <https://doi.org/10.3390/ani11102963>
- Stojić, M., Fratrić, N., Kovačić, M., Ilić, V., Gvozdić, D., Savić, O. & Đoković, R. (2017). Brix refractometry of colostrum from primiparous dairy cows and new-born calf blood serum in the evaluation of failure of passive transfer. *Acta Veterinaria*, 67 (4), 508–524. <https://doi.org/10.1515/acve-2017-0041>
- Stokol, T. & Nydam, D.V. (2006). Effect of hemolysis on nonesterified fatty acid and beta-hydroxybutyrate concentrations in bovine blood. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 18 (5), 466–469. <https://doi.org/10.1177/104063870601800507>
- SVA (u.å). *Råmjölk och utfodring av kalv*. Statens veterinärmedicinska anstalt. <https://www.sva.se/produktionsdjur/notkreatur/kalvhalsa/ramjolk-och-utfodring-av-kalv/> [2022-09-05]
- Svensson, C., Lundborg, K., Emanuelson, U. & Olsson, S.-O. (2003). Morbidity in Swedish dairy calves from birth to 90 days of age and individual calf-level risk factors for infectious diseases. *Preventive Veterinary Medicine*, 58 (3), 179–197. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(03\)00046-1](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(03)00046-1)

- Thomas, L. (2002). Haemolysis as influence & interference factor. *EJIFCC*, 13 (4), 95–98
- Thornhill, J., Krebs, G. & Petzel, C. (2015). Evaluation of the Brix refractometer as an on-farm tool for the detection of passive transfer of immunity in dairy calves. *Australian Veterinary Journal*, 93 (1–2), 26–30. <https://doi.org/10.1111/avj.12287>
- Virtala, A.-M.K., Gröhn, Y.T., Mechor, G.D. & Erb, H.N. (1999). The effect of maternally derived immunoglobulin G on the risk of respiratory disease in heifers during the first 3 months of life1This report presents a portion of a dissertation submitted by the first author to the graduate school of Cornell University as partial fulfillment of the requirements for the Ph.D. degree.1. *Preventive Veterinary Medicine*, 39 (1), 25–37. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(98\)00140-8](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(98)00140-8)
- Wallace, M.M., Jarvie, B.D., Perkins, N.R. & Leslie, K.E. (2006). A comparison of serum harvesting methods and type of refractometer for determining total solids to estimate failure of passive transfer in calves. *The Canadian Veterinary Journal*, 47 (6), 573–575
- Waller, K.P., Verdier, K.D. & Persson, Y. (2013). Råmjölkskvalitet och kalvhälsa. *Svensk veterinärtidning*, 2013 (11), 29–33
- Weaver, D.M., Tyler, J.W., VanMetre, D.C., Hostetler, D.E. & Barrington, G.M. (2000). Passive transfer of colostral immunoglobulins in calves. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 14 (6), 569–577. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2000.tb02278.x>
- Wilm, J., Costa, J.H.C., Neave, H.W., Weary, D.M. & von Keyserlingk, M.A.G. (2018). Technical note: Serum total protein and immunoglobulin G concentrations in neonatal dairy calves over the first 10 days of age. *Journal of Dairy Science*, 101 (7), 6430–6436. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13553>

Populärvetenskaplig sammanfattning

Kalvar föds utan immunförsvar eftersom de inte kan ta upp antikroppar från modern när de ligger i livmodern. Det gör att den första mjölken som mjölkas från kon efter kalvning är extremt viktig för kalven att få i sig. Mjölken från första mjölkningen kallas råmjölk vilken innehåller antikroppar och mycket näring. En kalv bör få i sig en tillräcklig mängd råmjölk av god kvalitet så snart som möjligt efter födseln. Kalvhälsan är otroligt viktig eftersom en dålig start kan påverka resten av djurets liv.

För att kontrollera att kalven har fått i sig tillräckligt med antikroppar kan ett blodprov tas från kalven som sedan analyseras med avseende på antikroppsinnehåll. Det finns olika metoder för att analysera antikroppar. En metod är att använda en refraktometer. En refraktometer mäter brytningsindex för ljus som passerar genom provet, vilket korrelerar med totalproteinet i vätskan vilket kan användas som en markör för antikroppsinnehållet i blodet. I dagsläget behöver blodprovet centrifugeras innan analys. Centrifugering innebär att blodprovörret sätts i en maskin som snurrar runt i hög hastighet vilket medför att blodkropparna i blodprovet hamnar i botten av röret. I detta arbete undersöks om det är möjligt att i stället göra analyserna på ocentrifugerat blodprov där blodkropparna sjunkit till botten av sig själva. Om ocentrifugerat blodprov kan analyseras skulle det medföra att lantbrukaren själv kan ta blodprov och analysera på gården vilket skulle göra analysen betydligt billigare. Det skulle även möjliggöra att en veterinär som inte har tillgång till en centrifug kan analysera prover. En billigare och mer tillgänglig analys medför både att fler kalvar provtas och möjliggör även att analyserna sker mer utspritt över året. Refraktometer är dessutom ett instrument som ofta redan finns på mjölkgårdar då de används för att mäta totalprotein i råmjölken.

Vid blodprovtagning händer det ibland att de röda blodkropparna går sönder och att innehållet i blodkropparna läcker ut och färgar omgivande vätska röd. Det kallas hemolys vilket kan ses när blodprovet centrifugerats, genom att vätskan ovanför blodkropparna antagit en röd färg. Hemolys medför att många blodprov kasseras inom humanvården eftersom det stör olika analyser. I detta arbete undersöks om hemolys påverkar analys med refraktometer.

Två olika typer av refraktometer har använts i det här arbetet. Den optiska refraktometern ger sitt resultat i gram protein per liter (g/l) och Brix-refraktometern i Brix%. Kalven klassas som att ha ett bristfälligt upptag av antikroppar, på engelska failure of passive transfer (FPT), om blodprovet har ett värde under 55 g/l med optisk refraktometer och 8,4 Brix%. Av de 50 kalvar som provtogs på Lövsta klassades ca 16 % ha ett bristfälligt upptag av antikroppar vid analys av centrifugerat blodprov.

När de ocentrifugerade provet jämfördes mot centrifugerat blodprov med den optiska refraktometern sågs en signifikant skillnad på 1–2 g/l mellan metoderna varför en förflyttning av gränsen från 55 g/l till 57 g/l föreslås vid mätning på ocentrifugerat blodprov. Det skulle medföra att fler kalvar klassas rätt i förhållande till FPT. När samma jämförelse gjordes med Brix-refraktometer sågs ingen statistisk säkerställd skillnad mellan ocentrifugerat och centrifugerat blodprov. Ocentrifugerat blodprov bör gå att använda, dock varierade värdena mer varför en djupare undersökning av denna metod är önskvärd.

Resultaten visade att blodprov med mycket hemolys inte bör analyseras då det ger osäkra resultat. Värdena skiljde sig mycket från blodprov utan hemolys. Samma grad av hemolys gav inte samma skillnad mellan proverna därför är det svårt att korrigera för hemolys. Blodprov med bara lite hemolys kan antagligen användas men på grund av för lite statistiskt underlag i frågan så är mer undersökning önskvärd.

För att provtagning och analys ska vara praktiskt genomförbart på en gård så är det viktigt med upplärning av lantbrukaren vilket bör ske av en veterinär. Lantbrukaren måste lära sig ta blodprov på ett rent och säkert sätt. Det är även viktigt att så rent serum som möjligt används vid mätning och att lantbrukaren instrueras om hur mätning bör utföras. Med fördel kan en skriftlig instruktion lämnas ut efter upplärning.

Proceduren bör gå till så att blodprov tas i venen på halsen på kalvarna, provrören vänds upp och ner några gånger direkt efter provtagning och ställs sedan i ett ställ. Det räcker med ett provrör från varje kalv. Provrören förvaras i 48 timmar i rumstemperatur (ca 25 °C) och så rent serum som möjligt analyseras med refraktometer. Att ocentrifugerat blodprov går att använda är väldigt positivt eftersom det ökar tillgängligheten markant för lantbrukaren.

Tack

Jag vill tacka min handledare Madeleine Tråven för stöttning, korrekturläsning och snabba svar på mejl. Jag vill även tacka personalen på Lövsta som hjälpte till att hålla kalvarna vid provtagning. Sen vill jag tacka mina vänner som stått ut, korrekturläst och hejat på!

Bilaga 1

Tabell 6. Tabellen visar bakgrundsinformation om de 50 kalvar som deltagit i studien. Den visar kalvnummer, födelsevikt, värdet på råmjölken i Brix% samt från vilken ko råmjölken kom ifrån, moder till kalven och vilket datum den föddes och dess ålder i dagar. Den visar även mängden råmjölk vid första givan och de fem påföljande givorna samt om kalven diat kon eller inte. Kalvarna är sorterade i ordningen som de provtogs.

Kalv nr	Födelsevikt [kg]	Råmjölksvärde Brix% (fr vilken ko)	Mor	Född datum kl (ålder)	Första råmjölk mängd [L] kl	Resterande mängd 5 påföljande måltider [L]	Diat
8680	42,3	19,3 (2063)	2063	23/8 19:30 (7d)	3,7 20:30	2,5; 2; 3; 3; 3	Nej
8681	46,5	26,2 (2113) + 25,1 (869)	2113	26/8 11:15 (4d)	3,4 (1,9 +1,5) 13:00	2,5; 3; 3; 3; 3	Nej
2797	39,5	19,4 (2123)	2123	27/8 13:30 (3d)	3,5 15:30	2,5; 3; 3; 3;3	Nej
2796	33,2	27,4 (2431) + 23,4 (2388)	2431	23/8 11:25 (7d)	2,4 (0,7 +1,7) 12:40	3; 3; 3; 3; 3	Nej
2795	30,1	22,7 (2444)	2444	22/8 12:07 (8d)	1,9 14:00	2,5; 2,5; 3; 2,5; 3	Nej
2800	36	18,2 (2259)	2259	31/8 12:25 (6d)	2,5 14:30	2,5; 2,5; 3; 3; 3)	Nej
2801	36,6	34,2 (2231)	2231	1/9 08:45 (5d)	3,5 10:30	2,5; 3; 2; 3; 3;	Nej
2802	32,4	23,9 (2427)	2427	3/9 06:30 (3d)	3,3 07:15	2; 3; 2,9; 2,8; 3	Nej
8683	42,3	18,2 (2259)	2259	31/8 12:25 (6d)	2,5 14:30	2,5; 2,5; 3; 3; 3	Nej
8685	45	19 (2275)	2275	4/9 00:01 (2d)	Di + 2 sond 04:15	0; 3; 3; 3	Ja
8686	39	29,4 (2454)	2454	4/9 09:55 (2d)	4,5 10:38	2; 2; 2,9; 3	Nej
2799	39	28,2 (890)	890	31/8 07:00 (6d)	3,75 08:40	3; 2,7; 2,5; 3; 3	Nej
2804	32,6	26,8 (2242) + 24,0 (2226)	2442	6/9 12:15 (7d)	1,25 + 1,5 13:20 + 13:50	1; 2; 3; 2,5; 3	Nej

2805	44,6	25,9 (2143)	2143	6/9 20:00 (7d)	4 21:15	3, 3; 3; 3; 3	Nej
2806	45,5	21,2 (2090)	2090	7/9 00:01 (6d)	Di + 2 sond 05:00	0,1; 3; 3; 3; 3	Ja
2807	34,5	24,0 (2226)	2465	8/9 13:56 (5d)	2,5 15:50	3; 3; 3; 3; 2,5	Nej
2809	42	19,3 (2262)	2262	11/9 12:55 (2d)	2 14:40	3; 3; 3	Nej
8690	37,8	27,3 (2111)	2111	6/9 19:50 (7d)	4,5 20:45	3; 3; 3; 3; 3	Nej
8691	47	18 (2084)	2084	7/9 08:52 (6d)	4 10:00	2,5; 3; 3; 3; 3	Nej
8692	37,5	25,3 (906)	906	7/9 10:48 (6d)	3,5 11:47	1,2; 3; 3; 3; 3	Nej
8693	37	21,4 (2252)	2252	7/9 12:35 (6d)	4 13:20	2; 3; 3; 3; 3	Nej
8694	31	19,2 (2415) + 22 (2465)	2415	9/9 00:01 (4d)	Di + 0,2 06:00 + 08:30	3; 3; 3; 2,5; 3	Ja
8695	48,5	18,6 (804)	804	9/9 15:15 (4d)	2 16:50	3; 3; 3; 3; 3	Nej
8696	34,5	30,1 (2470)	2470	9/9 17:50 (4d)	2 19:00	2,5; 3; 2,5; 3; 3	Nej
8697	30,5	23,0 (2471) + 25,6 (2456)	2471	10/9 10:40 (3d)	0,7 (2471) + 1,2 (2456) 14:20	3; 3; 3; 3; 3	Nej
2810	30,5	26,3 (2067)	2101	13/9 00:01 (7d)	3 05:40	2,5; 3; 2; 1; 3	Nej?
2811	36,0	26,4 (2090)	2290	15/9 06:30 (5d)	3 07:05	1,5; 3; 3; 3; 3	Nej
2812	42,9	28,8 (2462)	2462	18/9 16:20 (2d)	4 18:30	3; 2,8; 2	Nej
8698	43,4	21,8 (2269)	2269	17/9 18:50 (3d)	0,3 20:00	2,8; 2,7; 2,3; 3; 3	Ja?
8699	40,0	22,3 (2130)	2130	18/9 05:50 (2d)	2 07:45	3; 3; 3; 3	Nej
8700	55,7	25,5 (2092)	2092	21/9 13:30 (6d)	4,75 15:10	3; 3; 3; 3; 3	Nej?
2813	42,4	24,3 (2283)	2283	19/9 11:20 (8d)	2 12:50	3; 3; 3; 3; 3	Nej
2814	32,4	19,6 (2394)	2394	19/9 14:16 (8d)	2 16:12	3; 3; 3; 3; 3	Nej
2815	31,1	20,5 (2449)	2449	23/9 14:45 (4d)	3 17:00	3; 3; 3; 3; 3	Nej
2316	28,0	23,0 (2447)	2447	24/9 05:00 (3d)	2,5 09:40	3; 2; 3; 3; 3	Nej
2817	36,5	28,8 (2389) + 23,5 (2100)	2389	25/9 16:30 (2d)	2,9 (1,3 + 1,6) 19:20	3; 3	Nej

2818	33,7	22,1 (2446)	2446	2/10 14:35 (2d)	3,1	3; 3; 3; 3; 3	Nej
8702	47	22,8 (2104)	2294	26/9 00:01 (8d)	3,7 06:45	2; 3; 3; 3; 3	Nej
8703	36,6	29,5 (2277)	2277	27/9 00:01 (7d)	4,5 07:00	2,5; 1,3; 3; 3; 3	Nej
8704	47,3	29,0 (558)	558	1/10 16:10 (3d)	3,7	2,1; 1,3; 1,5; 2,5; 3	Nej
2819	38,5	23,1 (2292)	2292	9/10 09:00 (2d)	3,7 10:30	2,7; 2,5; 2,5; 3	Ja
2820	36,0	21,1 (2284)	2284	9/10 19:20 (2d)	2,4 20:30	2,5; 2; 3	Nej
8705	43,9	19,3 (2079)	2079	9/10 06:30 (2d)	6 07:45	3; 3; 3; 3	Nej
8706	41,6	19,1 (2068)	2068	9/10 12:35 (2d)	2,1 14:00	3; 2,5; 3	Nej
2821	38,5	21,5 (2480)	2480	10/10 16:50 (8d)	2 18:00	3	Nej
2822	37,7	18,1 (2075) + 22,3 (2108)	2075	11/10 00:01 (7d)	3,5 (1 + 2,5) 13:30	2; 3; 3; 3; 3	Ja
2823	24,2	26,3 (2067)	2467	11/10 16:50 (7d)	3,5 19:00	2; 2,8; 2,4; 3; 2,4	Nej
2824	35,2	23,8 (2476)	2476	11/10 20:55 (7d)	4 21:50	2,5; 3; 3; 3	Nej
2825	35,5	28,6 (2278)	2278	16/10 09:30 (2d)	4 11:00	1; 2,2; 3; 3	Nej
8707	45,6	25,3 (457)	457	13/10 07:30 (5d)	3,5 08:15	3; 3; 3; 3; 3	Nej

Bilaga 2

Tabell 7. Uppmätta värden med optisk refraktometer. (C)=centrifugerat blodprov, (E)=ej centrifugerat, (R)=blodprov med hemolys som förvarats i rumstemperatur. Hemolysgraden varierar mellan 0–3.

Kalv nr	Optisk refraktometer (C) [g/l]	Optisk refraktometer (E) [g/l]	Optisk refraktometer (R) [g/l]	Hemolysgrad
8680	62	61	64	1
8681	69	70	74	1,5
2797	55	55	56	0,5
2796	64	65	68	1
2795	55	55	55	1
2800	53	55	51	1
2801	61	61	63	0,5
2802	61	63	62	1
8683	52	55	54	1
8685	63	64	65	1
8686	78	79	80	1
2799	71	73	73	1
2804	65	66	66	1
2805	66	68	69	2
2806	74	74	77	1,5
2807	70	71	69	1
2809	54	55	52	1
8690	69	70	71	1
8691	55	58	56	0
8692	67	70	69	0,5
8693	58	60	61	2
8694	55	57	57	1
8695	52	55	51	1
8696	69	69	70	1
8697	60	61	57	1
2810	64	65	69	1,5
2811	58	58	65	2,5
2812	72	73	75	1,5
8698	67	68	75	2,5
8699	58	59	69	3
8700	69	68	73	2,5
2813	63	63	68	2,5
2814	50	50	56	2
2815	64	63	71	2,5
2316	61	62	65	2
2817	62	64	65	2,5
2818	65	65	68	2
8702	63	65	67	2
8703	58	61	63	1,5
8704	80	85	91	3
2819	72	73	79	2
2820	53	57	58	2

8705	78	78	79	2
8706	51	52	63	3
2821	55	56	60	2
2822	49	50	55	2
2823	66	65	67	1
2824	57	60	62	2
2825	61	65	71	2,5
8707	67	67	73	2

Bilaga 3

Tabell 8. Uppmätta värden med Brix-refraktometer. (C)=centrifugerat blodprov, (E)=ej centrifugerat, (R)=blodprov med hemolys som förvarats i rumstemperatur. Hemolysgraden varierar mellan 0–3.

Kalv nr	Brix-refraktometer (C) [Brix%]	Brix-refraktometer (E) [Brix%]	Brix-refraktometer (R) [Brix%]	Hemolys
8680	9,2	9,2	9,7	1
8681	10,4	10,3	11	1,5
2797	8,5	8,6	8,8	0,5
2796	9,7	9,7	10,3	1
2795	8,6	8,3	8,7	1
2800	8,1	8,2	8,6	1
2801	9,1	9,2	9,5	0,5
2802	9,4	9,4	9,6	1
8683	8,3	8,4	8,4	1
8685	9,8	9,6	10,1	1
8686	11,7	11,4	11,8	1
2799	11	10,7	11	1
2804	9,8	9,7	9,9	1
2805	10	10	10,4	2
2806	11	10,7	11,3	1,5
2807	10,6	10,4	10,3	1
2809	8,4	8,3	8,2	1
8690	10,4	10,2	10,6	1
8691	8,6	8,6	8,6	0
8692	10,2	10,4	10,4	0,5
8693	9	8,9	9,3	2
8694	8,6	8,7	8,8	1
8695	8,3	8,3	8,1	1
8696	10,4	10,2	10,4	1
8697	9,3	9,2	8,8	1
2810	9,4	9,7	10	1,5
2811	8,7	8,8	9,7	2,5
2812	10,5	10,7	11	1,5
8698	10	10,1	11	2,5
8699	8,8	9	10,2	3
8700	10,1	10,1	10,5	2,5
2813	9,3	9,5	9,9	2,5
2814	7,8	7,8	8,3	2
2815	9,6	9,4	10,4	2,5
2316	9,1	9,4	9,6	2
2817	9,4	9,6	9,6	2,5
2818	9,7	9,7	10,2	2
8702	9,4	9,5	10,1	2
8703	8,8	8,9	9,5	1,5
8704	11,7	11,8	13,1	3
2819	10,6	10,6	11,6	2
2820	8,1	8,6	8,9	2

8705	11,2	11,2	11,7	2
8706	8	8,1	9,7	3
2821	8,3	8,5	9,1	2
2822	7,6	7,8	8,6	2
2823	9,8	9,7	10,1	1
2824	8,7	9	9,4	2
2825	9,8	9,7	10,6	2,5
8707	10	10	10,8	2

Publicering och arkivering

Godkända självständiga arbeten (examensarbeten) vid SLU publiceras elektroniskt. **Som student äger du upphovsrätten** till ditt arbete och behöver godkänna publiceringen. Om du kryssar i **JA**, så kommer fulltexten (pdf-filen) och metadata bli synliga och sökbara på internet. Om du kryssar i **NEJ**, kommer endast metadata och sammanfattning bli synliga och sökbara. Även om du inte publicerar fulltexten kommer den arkiveras digitalt. Om fler än en person har skrivit arbetet gäller krysset för samtliga författare. Läs om SLU:s publiceringsavtal här:

- <https://www.slu.se/site/bibliotek/publicera-och-analysera/registrera-och-publicera/avtal-for-publicering/>.

JA, jag ger härmed min tillåtelse till att föreliggande arbete publiceras enligt SLU:s avtal om överlåtelse av rätt att publicera verk.

NEJ, jag ger inte min tillåtelse att publicera fulltexten av föreliggande arbete. Arbetet laddas dock upp för arkivering och metadata och sammanfattning blir synliga och sökbara.