



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper

Kalvars upptag av immunoglobuliner och specifika antikroppar från Locatim®

Erika Hagberg

Uppsala

2009

Examensarbete inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2010:5*

Kalvars upptag av immunoglobuliner
och specifika antikroppar från
Locatim®

Erika Hagberg

*Handledare: Charina Gånheim, Institutionen för kliniska vetenskaper
Biträdande handledare: Kerstin de Verdier, SVA
Examinator: Bernt Jones, Institutionen för kliniska vetenskaper*

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2009
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper
Kurskod: EX0239, Nivå X, 30hp*

Nyckelord: kalv, immunoglobulin, råmjölk, Locatim

*Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>
ISSN 1652-8697
Examensarbete 2010:5*

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	2
Inledning	3
Litteraturoversikt	3
Råmjölkens sammansättning	3
Överföring passiv immunitet	4
Råmjölkens betydelse för kalvhälsan	5
Material och metoder	6
Kalvar	6
Provtagning	7
Analyser	7
Resultat	8
Träckprover	8
Passiv immunitet	8
Specifika antikroppar	9
Diskussion	10
Litteraturförteckning	13

SAMMANFATTNING

Locatim® är ett receptbelagt råmjölkstillägg för kalv. Preparatet framställs av råmjölk från schweiziska kor, vilka aktivt immuniserats mot bland annat *Escherichia coli* F5, rotavirus samt coronavirus. Syftet med försöket var att med hjälp av serologiska analyser undersöka huruvida användning av Locatim® resulterar i tillfredsställande antikropps nivåer hos kalv. Avsikten var också att ta reda på om eventuella antikroppar mot bovint virusdiarré virus (BVDV) i preparatet kan överföras.

Fyra tjurkalvar ingick i försöket. Två av dessa utgjorde kontroller och gavs vanlig råmjölk. Två kalvar fick istället för råmjölk enbart Locatim® blandat med sötmjölk. Blodprov togs från samtliga kalvar vid 24 timmar, 48 timmar, en vecka, två veckor samt tre veckor post partum. Med samma tidsintervall samlades träckprover från respektive djur. Träckprover undersöktes med avseende på rotavirus och *E. coli* F5. Totalprotein och koncentrationen immunoglobulin i serum analyserades. Förekomst av specifika antikroppar mot rotavirus, bovint coronavirus (BCV), bovint respiratoriskt syncytialt virus (BRSV) samt bovint virusdiarré virus (BVDV) i serum fastställdes.

Rotavirus eller *E. coli* F5 detekterades inte i något träckprov. Försöket visar att de kalvar som fått Locatim® uppnår lägre passiv immunitet, färre immunoglobuliner och lägre nivåer specifika antikroppar mot rotavirus, BCV och BRSV än kalvar som fått normal råmjölk. Antikroppar mot BVDV noterades dock enbart hos kalvar som fått Locatim®.

Användning av Locatim® resulterar inte i tillfredsställande nivåer av antikroppar och försöket visar att antikroppar mot BVDV kan överföras till kalvar som ges produkten. Resultaten tyder på att behållningen av läkemedlet vid kalvhälsostörningar torde vara mycket begränsad.

SUMMARY

Locatim® is a milk-derived colostrum supplement for calves. It originates from Swiss donor cows. The product contains specific IgG-antibodies against *Escherichia coli* F5 but it may also contain antibodies to other microorganisms as a result of vaccination or acquired immunity. The objective of this study was to determine passive transfer of immunoglobulins and absorption of specific antibodies in calves fed Locatim®.

Four newborn bull calves were included. Two calves received maternal colostrum whereas two calves deprived of colostrum were fed Locatim® with milk. Faecal and blood samples were collected from all calves at 24 hours, 48 hours, one week, two weeks and three weeks postpartum. Faecal samples were analysed for the presence of rotavirus and *E. coli* F5. Blood samples were analysed for the concentrations of total protein and immunoglobulins. Serum contents of specific antibodies against rotavirus, bovine coronavirus (BCV), bovine respiratory syncytial virus (BRSV) and bovine viral diarrhoea virus (BVDV) were established.

Rotavirus was not detected in any faecal sample nor was *E. coli* F5. Serum immunoglobulins and total protein measures were higher in calves fed maternal colostrum compared with calves fed the supplement. Calves fed Locatim® also had lower levels of specific antibodies against rotavirus, BCV and BRSV than calves fed normal colostrum. Antibodies against BVDV were only detected in calves given Locatim®.

The levels of immunoglobulins in the product are low and does not result in acceptable passiv transfer of IgG. Locatim® is inadequate when used to enhance low colostrum quality.

INLEDNING

Läkemedlet Locatim® introducerades nyligen på den svenska marknaden. Locatim® är ett receptbelagt kommersiellt råmjölkskoncentrat avsett att användas som ett komplement till ordinarie råmjölksmjölk. Enligt tillverkarens svenska ombud uppges 60 ml av läkemedlet vara lika med sex liter råmjölk (N-vet AB). Produkten framställs av råmjölk från schweiziska kor, vilka aktivt immuniserats mot *E. coli* F5, *E. coli* F17, *E. coli* CS31A samt rotavirus och coronavirus. Locatim® är dock enbart registrerat med indikationen enterotoxikos orsakad av *E. coli* F5 hos kalv. Studier visar att infektion med *E. coli* F5 utgör en mindre andel av neonatala diarréer hos svenska kalvar (de Verdier Klingenberg & Svensson, 1998, Björkman et al., 2003), varför preparatets betydelse ifrågasätts. Tillverkaren garanterar inte att preparatet är fritt från BVDV-antikroppar. Det är okänt om dessa kan komma att interagera vid serologisk diagnostik inom det svenska kontrollprogrammet mot BVDV.

Syftet med försöket var att med hjälp av serologiska analyser undersöka huruvida användning av läkemedlet Locatim® resulterar i tillfredsställande antikropps nivåer hos kalv. Initialt följer en litteraturgenomgång med fokus på den naturliga råmjölkens sammansättning, upptag och inverkan på kalvhälsan.

LITTERATURÖVERSIKT

Råmjölkens sammansättning

Placentans utformning hos nötkreatur medger ingen transport av antikroppar från moder till avkomma. Detta får till följd att kalven vid födseln helt saknar maternella antikroppar. Dessa måste överföras via råmjölken och utgör grunden för kalvens tidiga immunitet. Råmjölkens sammansättning skiljer sig från mjölken under övrig laktation. Innehållet av fett och protein är högre i råmjölk, medan laktoshalten är lägre (Sandholm et al., 1995). Den höga halten protein beror framför allt på den ökade mängden immunoglobuliner, vilka aktivt överförs från serum till råmjölk (Larson et al., 1980). Tre klasser av immunoglobuliner förekommer i råmjölk IgG, IgM samt IgA. Av dessa överförs IgG helt från serum medan IgM och IgA till viss del bildas lokalt i juvervävnaden (Tizard, 2004). Transporten av antikroppar är störst under dräktighetens sista 2-3 veckor (Brandon et al., 1971). Barrington et al (1997) registrerade ett ökat uttryck av selektiva IgG1-receptorer hos celler i juvervävnaden under denna period.

Andelen IgG dominerar och utgör 85-90 % av antikroppsinnehållet. Två former av IgG finns i råmjölk IgG1 och IgG2, varav IgG1 utgör 80-90 % av den totala mängden IgG (Larson et al., 1980). Halten immunoglobulin är vanligen 50-150 g/l, men varierar mellan individer (Larson et al., 1980, Pritchett et al., 1991). I en norsk studie där koncentrationen IgG i råmjölk analyserats hos 1250 mjölkkor varierade nivån från 4 g/l till 235 g/l (Gulliksen et al., 2008). Undersökningar av svenska mjölkkor indikerar liknande diversitet i råmjölkskvalitet (Liberg, 2000). Liberg (2000) fann spridning i koncentrationen IgG från 4 g/l till 174 g/l.

Högst koncentration av immunoglobuliner har observerats i första urmjölkningen (Pritchett et al., 1991, Morin et al., 1997, Liberg, 2000). Det har undersökts om

råmjölkens sammansättning kan förändras i juvervävnaden över tid. Enligt Prichett et al (1991) noterades ingen förändring av kvaliteten inom åtta timmar efter kalvning, medan Moore et al (2005) fann att koncentrationen IgG var signifikant lägre om första urmjölkningen skedde sex timmar respektive två timmar efter kalvning.

I råmjölk finns, utöver antikroppar, andra proteiner och celler av immunologisk vikt. Trypsininhibitorer bevarar immunoglobulinerna från enzymatisk nedbrytning i tarmen hos kalven. Transferrin och laktoferrin binder järn och utövar därmed en bakteriostatisk effekt (Reiter et al., 1975). Leukocyter hos kalvar som fått råmjölk har en högre fagocyterande förmåga än de som inte fått råmjölk enligt Menge et al (1998) och maternella leukocyter i råmjölken har visat sig kunna migrera över tarmepitelet och påverka utvecklingen av cellulär immunitet hos den neonatala kalven (Reber et al., 2008). Under senare tid har allt fler av dessa komponenter i råmjölk identifierats, såsom höga nivåer av inflammatoriska cytokiner (Hagiwara et al., 2000); dock kvarstår många frågetecken gällande deras funktion och relevans för utveckling av kalvens immunitet.

Överföring passiv immunitet

Initialt är den proteolytiska aktiviteten i den nyfödda kalvens mag-tarmkanal låg varför immunoglobuliner når tunntarmen intakta (Tizard, 2004). Absorptionen av immunoglobuliner är icke-selektiv och upptaget av respektive antikropp motsvarar fördelningen i den givna råmjölken (Brandon & Lascelles, 1971).

Forskning indikerade tidigt att kalvens förmåga att absorbera maternella antikroppar förändras över tid. Hansen et al (1947) noterade att upptag av immunoglobuliner uteblev hos kalvar som fick råmjölk efter 24 timmars ålder. Senare studier visade att slutningen av tarmen kunde initieras av råmjölksgivan och att processen kunde senareläggas till närmare 36 timmar om första råmjölksgivan gavs sent (Stott et al., 1979). Slutning av tarmepitelet har dock visat sig vara komplex och ännu är inte mekanismen helt klarlagd. Det finns dessutom antydningar att utebliven råmjölksgiva eller råmjölk med lågt antikroppsinnehåll till viss del kan kompenseras med högkvalitativ råmjölk trots att processen initierats (Michanek, P., 1994). Trots oklarheter kring tarmens övergående permeabilitet råder enighet gällande tiden för optimalt upptag inom 4-6 timmar post partum (Fallon, R.J., 1978, Stott et al., 1979, Matte et al., 1982, Chigerwe et al., 2009).

För att erhålla en god passiv immunitet bör kalven uppnå en serumnivå ≥ 10 g IgG1/l efter första råmjölksgivan. Detta motsvarar 100 g IgG1 i råmjölken (Besser et al., 1991, Tyler, et al., 1996). Volymen råmjölk för att tillgodose denna mängd varierar följaktligen med koncentrationen IgG i den givna råmjölken. Besser et al (1991) påvisade att risken för otillräcklig passiv immunitet minskar om första råmjölksgivan är 3-4 l. Detta stöds av B.A. Hopkins och J.D. Quigley (1997) samt Morin et al (1997). I ett försök där råmjölk gavs med flaska noterades dock att dessa volymer sällan uppnås i en giva (Urday et al., 2008). Omfattande studier visar att tillfredsställande nivåer inte erhålls om kalven själv lämnas att dia (Besser et al., 1991, Brignole et al., 1980). Då den volym som kan ges till kalven

därtill är fysiologiskt begränsad bör koncentrationen inte understiga 50 g IgG/l råmjölk (Besser et al., 1991).

Råmjölk med hög koncentration antikroppar resulterar i ett bättre upptag av immunoglobuliner än råmjölk med låg koncentration om given volym förblir oförändrad (Prichett et al., 1991, Morin et al., 1997, Liberg, 2000). I motsats till tidigare rekommendationer där råmjölk från kvigor generellt ansetts vara av lägre kvalitet, visar studier att koncentrationen IgG inte skiljer sig signifikant mellan förstagångs- och andragångskalvare (Prichett et al., 1991, Tyler et al., 1999, Gulliksen et al., 2008). Då förstakalvare och andrakalvare jämfördes med tredjekalvare eller kor med högre laktationsnummer sågs dock en signifikant högre koncentration antikroppar hos kor med laktationsnummer tre eller högre (Gulliksen et al., 2008, Tyler et al., 1999). Med en så kallad kolostrometer kan råmjölkskvaliteten hos den enskilda individen bedömas i fält. Tekniken grundar sig på det samband mellan råmjölkens densitet och innehåll av immunoglobuliner som W.A. Fleenor och G.H. Stott redovisade 1980. Trots vissa begränsningar med metoden (Pritchett et al., 1994) kan en kolostrometer vara ett användbart hjälpmedel för att identifiera råmjölk av god kvalitet det vill säga över 50 g IgG/l (Liberg, 2000, Chigerwe et al., 2008).

För att bedöma graden av passiv immunitet används vanligen totalprotein framför den faktiska koncentrationen IgG i serum. Detta grundas på den positiva korrelationen mellan protein- och IgG-innehåll (Nocek et al., 1984). Metoden är kostnadseffektiv och används framför allt för att utvärdera råmjölksrutinerna på besättningsnivå. Normalt anges 50 g/l totalprotein i serum som lägsta nivå för acceptabel passiv immunitet (Tyler et al., 1996, Tyler et al., 1998).

Passivt överförda immunoglobuliner metaboliseras successivt hos kalven. Den fysiologiska halveringstiden för maternella IgG är cirka tre veckor (Sasaki et al., 1976, Tizard, 2004).

Råmjölkens betydelse för kalvhälsan

Under kalvens tidiga levnad initieras bildningen av endogena antikroppar. Detta sker redan under de första levnadsveckorna sedan kalven exponerats för smittämnen i sin omgivning (Sasaki et al., 1976). R.G. Hansen och P.H. Phillips (1947) noterade normala antikropps nivåer först vid åtta veckors ålder bland kalvar som inte fått råmjölk. Studier visar dock att den kroppsegna produktionen initieras tidigare hos kalvar vilka inte uppnått en god passiv immunitet (Tizard, 2004).

Utveckling av sjukdom är vanligen multifaktoriell och följaktligen en samverkan av miljö, agens och individens egen motståndskraft. Bra passiv immunitet garanterar inte en frisk kalv medan kalven inte måste utveckla sjukdom till följd av låga antikropps nivåer i blodet. Studier visar dock att kalvar som inte uppnår god passiv immunitet riskerar i större utsträckning att drabbas av sjukdom och ökad dödlighet. Otillräcklig överföring av maternella antikroppar utgör en riskfaktor för sjukdomsutveckling hos den neonatala kalven (Brignole & Stott, 1980, Nocek et al., 1984, Tyler et al, 1998, Svensson et al, 2003). Omkring 50 g/l totalprotein i serum beskrivs av T.J. Brignole och G.H. Stott (1980) som en kritisk punkt av betydelse för kalvhälsan. Tyler et al (1998) observerade optimal

överlevnad bland kalvar vilka uppnådde 55 gram totalprotein per liter eller högre. Hos mjölkkraskalven anses låg koncentration IgG i första råmjölksgivan vara den dominerade orsaken till låg passiv immunitet (Barrington et al., 2002).

Diarréer och luftvägssjukdomar utgör de vanligaste problemen bland svenska kalvar under mjölkperioden. Under de första tre levnadsveckorna ses framför allt enteriter (Olsson et al., 1993, Svensson et al., 2003). Olsson et al (1993) fastställde prevalensen till 7,2 % inom de första 90 levnadsdagarna. Denna frekvens stöds av senare data (Svensson et al., 2003). Flera studier visar att vanligaste orsaken är infektioner och att rotavirus är det agens som i de flesta fall associeras med neonatal diarré hos svenska kalvar (Viring et al., 1993, de Verdier Klingenberg & Svensson, 1998, Björkman et al., 2003).

Enterotoxiska *E. coli* kan orsaka allvarlig diarré under första levnadsveckan. F5, med tidigare benämning K99, är en adhesionsfaktor som kan binda mikroorganismen till receptorer i kalvens tarmslemhinna redan de första tre dagarna. Under denna tidiga levnad är den endogena produktionen ännu mycket begränsad, varför kalvens skydd mot infektion i detta skede i huvudsak utgörs av maternella antikroppar (Barrington et al., 2002). Undersökningar visar att en liten andel av neonatala diarréer kopplats till förekomst av *E. coli* F5 i svenska mjölkbesättningar (de Verdier Klingenberg & Svensson, 1998, Björkman et al., 2003). I dessa studier noterades också att saminfektioner är vanligt förekommande vid diarréer. Viring et al (1993) registrerade ingen korrelation mellan diarré och enbart fynd av *E. coli* F5.

Flera författare är eniga angående råmjölkens lokalt skyddande effekter efter att tarmen mist sin förmåga att absorbera antikroppar (Nocek et al., 1984, Barrington et al., 2002, Berge et al., 2009). Riedel-Caspari (1993) visade i sin studie att kalvar som fått naturlig råmjölk innehållande leukocyter utsöndrade mindre mängd *E. coli* i träcken samt hade en högre nivå specifika antikroppar mot enteropatogena *E. coli* än de kalvar som fick råmjölk utan leukocyter.

MATERIAL OCH METODER

Kalvar

Endast tjurkalvar inkluderades i studien. Eventuella negativa effekter av försöket skulle därmed inte affektera framtida rekryteringsdjur. Övriga inkluderingskriterier var okomplicerad kalvning, normal födelsevikt samt en till synes frisk individ.

Studien omfattade fyra SRB-kalvar på Kungsängens försöksgård, Sveriges lantbruksuniversitet, Uppsala. Av dessa utgjorde två kontroldjur, vilka fick normal råmjölksgiva. För att kunna bedöma överföring av antikroppar hos kontrollkalvarna undersöktes första råmjölksgivan med en så kallad kolostrometer; immunoglobulinhalt över 50 g/l eftersträvades. Vardera kontrollkalv fick en första giva om 2,5 liter råmjölk. Istället för råmjölk gavs två kalvar Locatim® enligt produktens angivna dosering 60 ml per kalv. Läkemedlet blandades med sötmjolk till en total volym om 2,5 liter. Råmjölk respektive Locatim® gavs aktivt med nappförsedd flaska så snart kalvarna var mottagliga.

En grundläggande förutsättning för försöket var att miljö och skötselrutiner skulle motsvara den normala mjölkraskalvens livsvillkor. De tre första levnadsdagarna vistades kalven i enkelbox. Kontrollkalvarna gavs 2,5 liter råmjölk två gånger dagligen. Under samma period utfodrades de kalvar som fått Locatim® med motsvarande mängd sötmjök. Dag fyra introducerades kalven i gruppbox med amma. Vid insättandet i gruppbox gavs fem liter mjölkersättning per dag i tre dagar, sedan ökades mjölkgiven successivt med 0,5 liter dagligen till dess maxgiven tio liter per dag uppnåts.

Provtagning

Från samtliga kalvar togs blodprov via jugularven vid fem tillfällen; vid 24 timmar, 48 timmar, en vecka, två veckor samt tre veckor post partum. Med samma tidsintervall samlades också från rektum träckprover från respektive djur. I samband med provtagning gjordes en allmän klinisk undersökning av kalven.

Analyser

I direkt anslutning till respektive provtagning undersöktes, med hjälp av refraktometer, totalprotein i serum. Resterande serum frystes in kontinuerligt för att vidare analyseras gemensamt.

Klinisk kemiska laboratoriet vid Sveriges lantbruksuniversitet, SLU, utförde elektrofores på sera. Genom serumproteinelektrofores (hydragel Beta1-Beta2 15/30) fastställdes mängden totalprotein samt fördelningen av respektive proteinfraktion; albumin, alfa 1 och 2, beta 1 och 2 samt gamma.

Vid Statens Veterinärmedicinska Anstalt, SVA, Enheten för djurhälsa och antibiotikastrategier undersöktes förekomsten av antikroppar mot bovint coronavirus (BCV), bovint respiratoriskt syncytialt virus (BRSV) och bovint virusdiarré virus (BVDV) i sera. Antikroppar mot dessa agens analyserades med respektive antikropps-ELISA (Svanova Biotech AB, Uppsala Science Park, 751 83 Uppsala). För detektion av eventuella antikroppar mot grupp A rotavirus användes ett neutralisationstest (rutinmetod, SVA).

Samlade träckprover analyserades fortlöpande vid SVA med avseende på grupp A rotavirus med antigen-ELISA (Oxoid, Box U200, 202 29 Malmö) samt *Escherichia coli* F5 genom odling på glukosagar i kombination med direkt agglutinationstest (rutinmetod, SVA).

RESULTAT

Träckprover

Rotavirus eller *E. coli* F5 påvisades inte i något av de totalt 20 analyserade träckproverna.

Passiv immunitet

Nivån totalprotein i serum skiljde sig mellan de kalvar som fått råmjölk och de som endast fått Locatim®. Kalvar som fått råmjölk uppnådde tillfredsställande passiv immunitet, medan kalvar som endast fått Locatim® inte passerade gränsvärdet 50 g/l. Se Tabell 1.

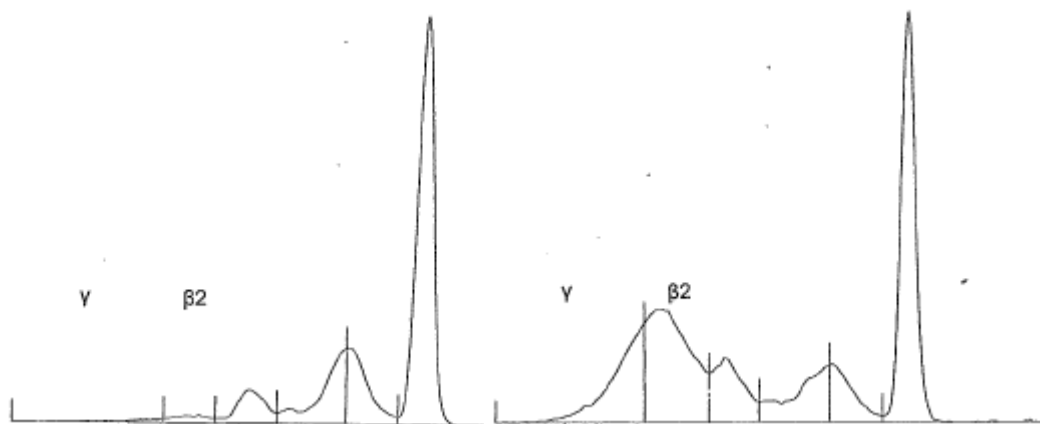
Tabell 1. Totalprotein g/l i serum med elektrofores hos kalvar som fått Locatim® respektive råmjölk. Inom parantes anges totalprotein g/l med refraktometer

Ålder	Locatim 1	Locatim 2	Kontroll 1 ^a	Kontroll 2 ^b
24 timmar	45 (47)	39 (44)	69 (70)	50 (57)
48 timmar	41 (45)	40 (41)	68 (70)	53 (59)
1 vecka	44 (47)	39 (41)	66 (67)	51 (55)
2 veckor	46 (46)	40 (45)	53 (53)	53 (52)
3 veckor	41 (48)	42 (48)	51 (56)	50 (55)

^a Första råmjölksgivan 90 g/l

^b Första råmjölksgivan 45 g/l

Överförda immunoglobuliner i serum representeras vid proteinelektrofores i fraktionerna beta 2 och gamma. Summan av dessa vid varje provtagningstillfälle återges i Tabell 2. Vid 24 timmars ålder uppvisade kontroldjur och kalvar som fått Locatim® olika elektroforesmönster. Kalvar som fått Locatim® saknade nästan helt de fraktioner som utgörs av immunoglobuliner. Exempel se Figur 1.



Figur 1. Elektroforesmönster för protein i serum vid 24 timmars ålder. Skillnader ses i fraktionerna beta 2 och gamma, där överförda immunoglobuliner återfinns. Till vänster ses Locatim 1. Mönstret till höger representerar Kontroll 1.

Tabell 2. Immunoglobulin g/l i serum

Ålder	Locatim 1	Locatim 2	Kontroll 1 ^a	Kontroll 2 ^b
24 timmar	1	1	28	7
48 timmar	2	1	25	9
1 vecka	2	2	21	7
2 veckor	2	3	13	8
3 veckor	3	3	12	6

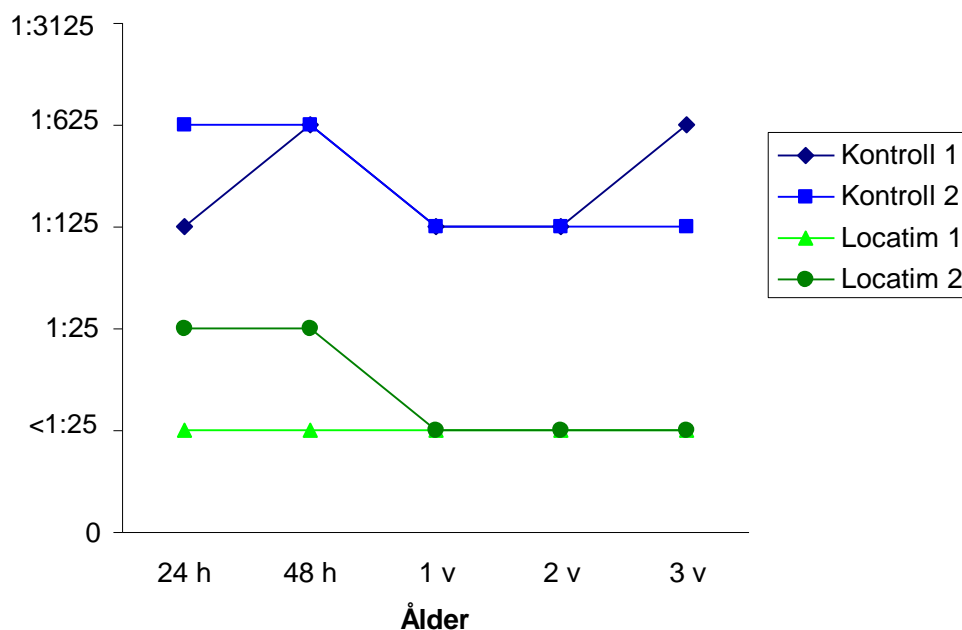
^a Första råmjölksgivan 90 g/l

^b Första råmjölksgivan 45 g/l

Specifika antikroppar

Antikroppar mot rotavirus i serum undersöktes med hjälp av ett neutralisationstest. Analysen utfördes med spädning i fem steg från 1:25 till 1:3125. Högre spädning motsvarar således ett högre innehåll av antikroppar. Hos en kalv detekterades inga antikroppar i lägsta spädningen. Se Figur 2.

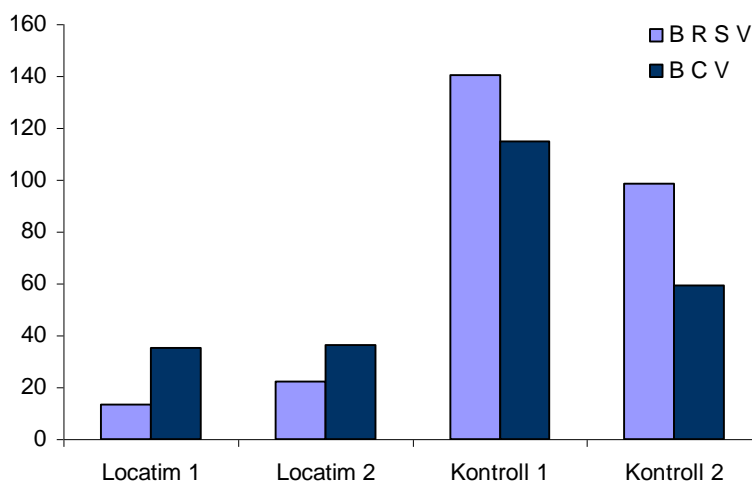
Spädning



Figur 2. Neutralisationstest för rotavirusantikroppar i serum

För BCV och BRSV anges $\geq 10\%$ gränsen för att antikroppar finns vid analys med respektive antikropps-ELISA. Ju högre procenttal som uppnås desto högre antikropps-nivåer i serum. Kalvar som fått Locatim® hade färre specifika BCV- och BRSV-antikroppar än de kalvar som fått råmjölk. För varje kalv anges i procent medeltalet av resultaten. Se Figur 3.

Procent



Figur 3. Resultat i medeltal för antikropps-ELISA för BRSV respektive BCV i serum.

Serum analyserat med så kallad blocking-ELISA för BVDV bedöms innehålla BVDV-antikroppar om resultatet är $\geq 30\%$. Tre av totalt 20 testade prover från de fyra kalvarna i försöket var positiva för BVDV-antikroppar. Samtliga positiva prover härrör från kalvar, vilka fått Locatim®. Inget positivt resultat noterades hos kalvar äldre än en vecka.

DISKUSSION

Trots att få kalvar ingick i försöket kan resultaten ge information om Locatim®. Användning av läkemedlet resulterade inte i tillfredsställande antikropps nivåer. Då produkten ges utan normal råmjölk uppnås inte acceptabel passiv immunitet. Det bör betonas att Locatim® är ett komplement till naturlig råmjölk och tillverkaren gör inga anspråk på att god passiv immunitet skall uppnås då produkten används ensam. De antikropps nivåer som överförs är dock så låga att några positiva effekter av preparatet inte kan urskiljas. Andra mer omfattande studier av råmjölksersättning och råmjölkskomplement stödjer dessa resultat. Gemensamt för dessa studier är att kommersiella immunoglobuliner med ursprung från råmjölk eller serum generellt ger sämre passiv immunitet än naturlig råmjölk. Produkterna har i de flesta fall ett lågt innehåll av immunoglobuliner och ett högt intag av antikroppar från dessa resulterar inte nödvändigtvis i ett högt upptag hos kalven (Hopkins & Quigley, 1997, Arthington et al., 2000, Swan et al., 2007).

De två kalvar i försöket som enbart fått Locatim® hade låga nivåer av antikroppar mot corona- och rotavirus. Detta trots att moderdjuren vaccinerats mot dessa agens. Betydligt högre nivåer noterades hos kontrollerna, där överförda antikroppar från råmjölken var ett resultat av naturlig immunisering av moderdjuren i besättningen.

Samma bild återges för antikroppar mot BRSV. Följaktligen fanns eller hade BRSV nyligen funnits i försöksbesättningen. Kalvar som fått Locatim® hade låga nivåer av antikroppar mot BRSV. Förklaringen till detta är antingen lågt innehåll i

produkten, vilket bedöms mycket troligt, eller lågt upptag från produkten. Alternativt förekommer infektion med BRSV i mindre utsträckning bland givarbesättningarna. Det sistnämnda bedöms vara mindre sannolikt.

Produkten anges kunna innehålla BVDV-antikroppar. Resultaten visar att dessa också överförts till de kalvar som fått Locatim®. Antikropparna i sig utgör inget hot, men kan komma att interagera vid serologisk diagnostik i besättningar där eventuell förekomst av BVDV-infektion utreds. Maternella antikroppar kan inte särskiljas från endogent bildade. I de fall råmjölken innehåller stora mängder antikroppar mot BVDV kan dessa ännu detekteras vid cirka sex månaders ålder (Alenius, 2009).

Antikroppar mot *E. coli* F5 i serum undersöktes inte då denna analys inte används rutinmässigt vid SVA. Nivån av dessa hade varit av intresse då läkemedlets indikation är mot just detta agens. Det är dock ett rimligt antagande att inte heller dessa specifika IgG-antikroppar finns i tillräcklig mängd. Immunoglobulinerna borde i sådant fall finnas representerade i elektroforesens gamma-fraktion, vilken redan bedömts vara undermålig.

Ingen kompensation med hänsyn till halveringstid och endogen bildning av antikroppar har gjorts, då dessa parametrar är av mindre betydelse för resultaten under de allra första dagarna.

Mätning av totalprotein i serum med refraktometer gav konsekvent för höga värden i jämförelse med totalprotein enligt elektrofores. Detta är en felkälla då graden passiv immunitet övervärderas. Avläsning av instrumentet utfördes kontinuerligt allt eftersom proverna togs, vilket också skulle kunna vara en missledande faktor. I litteraturen nämns refraktometern som en enkel och tillförlitlig fältmetod för att övervaka den passiva immuniteten hos friska kalvar. Tyler et al (1996) anger i sin studie gränsvärdet 55 g/l för maximal sensitivitet respektive 50 g/l för maximal specificitet. Sensitivitet anger andelen prov över gränsen sant identifierade medan specificitet anger andelen prov under gränsen sant identifierade. Över 80 % av kalvarna i samma studie klassificerades korrekt med dessa värden. Med gränsvärdet 50 g/l klassificerades samliga kalvar i försöket med Locatim® korrekt.

Kontroll 2 uppvisade relativt låg passiv immunitet. Dess upptag av immunoglobuliner bedöms inte vara optimalt. Av praktiska skäl inkluderades kalven i försöket som kontroll. Detta trots att den inte uppfyllde samtliga kriterier; kalven vägde betydligt mer vid födseln än övriga djur och det var ovisst om den diat. Den första råmjölksgivan uppnådde inte heller den kvalitet som eftersträvades vilket delvis kan förklara kalvens begränsade upptag av antikroppar.

Få djur ingick i försöket varför eventuella skillnader gällande kalvarnas kliniska status inte kan relateras till användandet av Locatim®. Angående träckproverna är det möjligt att utsöndring av rotavirus eller *E. coli* F5 skett mellan provtagningar, men inte fångats upp vid dessa tillfällen. Att så har skett bedöms som mindre troligt med ledning av kalvarnas kliniska status.

Det kan ifrågasättas hur relevant användning av Locatim® är under svenska förhållanden. Enligt svenska författare är förekomsten av neonatal diarré associerad med *E. coli* F5 låg (de Verdier Klingenberg & Svensson, 1998, Björkman et al., 2003). Övriga komponenter i råmjölk såsom leukocyter har visat sig ha effekt mot just *E. coli*-enteriter (Reidel-Caspari, 1993), dessa återfinns inte i Locatim®. Viring et al (1993) fann signifikant samband mellan diarré och samtidig förekomst av rotavirus och *E. coli* F5. Om dessa infektioner interagerar vid utveckling av sjukdom, borde också andelen rotavirusantikroppar ha betydelse i skyddet mot enterotoxiska *E. coli*. I besättningar där *E. coli* F5 anses vara ett problem för kalvhälsan förväntas nivåerna antikroppar i råmjölk därtill vara högre till följd av ökad naturlig immunisering.

En fördel med användning av råmjölksersättning och råmjölkskomplement är en ökad kontroll av patogener, vilka kan överföras från moderjuret. Under svenska förhållanden är detta inte ett godtagbart argument. Tvärtom kan en extern produkt utgöra en, om än liten, risk för introduktion av smitta som annars inte finns i landet.

Locatim® är registrerat som ett komplement till vanlig råmjölk. Med anledning av den formulering som nämns i inledningen finns det dock en uttalad risk att preparatet feltolkas för ett råmjölkssubstitut. Enligt angivna uppgifter i produktprofilen (EMEA, 2009) får läkemedlet maximalt innehålla 79 g IgG/l. I en dos Locatim®, det vill säga 60 ml, återfinns därmed som mest 4,74 g IgG. Detta motsvarar således inte den mängd antikroppar som sex liter råmjölk förväntas innehålla. Behållningen av produkten måste därmed ses som mycket begränsad.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Alenius, S. Professor, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska vetenskaper. Personligt meddelande. Uppsala 2009-12-02.
- Arthington, J.D. et al (2000). Effect of Dietary IgG Source (Colostrum, Serum or Milk-Derived Supplement) on the Efficiency of Ig Absorption in Newborn Holstein Calves. *J Dairy Sci* 83:1463-1467.
- Barrington, G.M. et al (2002). Biosecurity for neonatal gastrointestinal diseases. *Vet Clin Food Anim* 18:7-34.
- Barrington, G.M. et al (1997). Expression of Immunoglobulin G1 Receptors by Bovine Mammary Epithelial Cells and Mammary Leukocytes. *J Dairy Sci* 80:86-93.
- Berge, A.C.B. et al (2009). Evaluation of the effects of oral colostrum supplementation during the first fourteen days on the health and performance of preweaned calves. *J Dairy Sci* 92:286-295.
- Besser, T.E. et al (1991). Comparison of three methods of feeding colostrum to dairy calves. *J Am Vet Med Assoc* 198:419-422.
- Björkman, C. et al (2003). *Cryptosporidium parvum* and *Giardia intestinalis* in Calf Diarrhoea in Sweden. *Acta vet scand* 44:145-152.
- Brandon, M.R. and Lascelles, A.K. (1971). Relative efficiency of absorption of IgG1, IgG2, IgA and IgM in the newborn calf. *Aust J Exp Bio Med Sci* 49:629-633.
- Brandon, M.R. et al (1971). The mechanism of transfer of immunoglobulin into mammary secretion of cows. *Aust J Exp Biol Med Sci* 49:613-623.
- Brignole, T.J. and Stott, G.H. (1980). Effect of Suckling Followed by Bottle Feeding Colostrum on Immunoglobulin Absorption and Calf Survival. *J Dairy Sci* 63:451-456.
- Chigerwe, M. et al (2008). Comparison of four methods to assess colostral IgG concentrations in dairy cows. *J Am Vet Med Assoc* 233:761-766.
- Chigerwe, M. et al (2009). Evaluation of affecting serum IgG concentrations in bottle-fed calves. *J Am Vet Med Assoc* 234:785-789.
- de Verdier Klingenberg, K. and Svensson, L. (1998). Group A Rotavirus as a Cause of Neonatal Calf Enteritis in Sweden. *Acta vet scand* 39:195-199.
- EMA Europeiska läkemedelsmyndigheten <http://www.emea.europa.eu/>
- Fallon, R.J. (1978). The Effect of Immunoglobulin Levels on Calf Performance and Methods of Artificially Feeding Colostrum to the Newborn Calf. *Ann Rech Vét* 9:347-352.
- Fleenor, W.A. and Stott, G.H. (1980). Hydrometer Test for Estimation of Immunoglobulin Concentration in Bovine Colostrum. *J Dairy Sci* 63:973-977.
- Gulliksen, S.M. et al (2008). Risk Factors Associated with Colostrum Quality in Norwegian Dairy Cows. *J Dairy Sci* 91:704-712.
- Hagiwara, K. et al (2000). Detection of cytokines in bovine colostrum. *Vet Immunol Immunopathol* 76:183-190.
- Hansen, R.G. and Phillips, P.H. (1947). Studies on protein from bovine colostrum I. Electrophoretic studies on the blood serum proteins of colostrum-free calves and of calves fed colostrum at various ages. 223-227.

- Hopkins, B.A. and Quigley, J.D. (1997). Effect of Method of Colostral Feeding and Colostrum Supplementation on Concentrations of Immunoglobulin G in the Serum of Neonatal Calves. *J Dairy Sci* 80:979-983.
- Larson, B.L. et al (1980). Immunoglobulin Production and Transport by the Mammary Gland. *J Dairy Sci* 63:665-667.
- Liberg, P. (2000). Råmjölksutfodring – En god start förlänger livet. Veterinärmötet, Uppsala, nov 2000. s. 133-139.
- Matte, J.J. et al (1981). Absorption of Colostral Immunoglobulin G in the Newborn Dairy Calf. *J Dairy Sci* 65:1765-1770.
- Menge, Ch. et al (1998). Vet Compensation of preliminary blood phagocyte immunity in the newborn calf. *Vet Immunol Immunopathol* 62:309-321.
- Michanek, P. (1994). Transfer of colostral immunoglobulin to newborn calves - Effects of housing on suckling patterns and consequences for the intestinal transmission of macromolecules. SLU, Inst. för jordbrukets biosystem och teknologi. Rapport 90.
- Moore, M. et al (2005). Effect of delayed colostrum collection on colostrum IgG concentration in dairy cows. *J Am Vet Med Assoc* 8:1375-1377.
- Morin, D.E. et al (1997). Effects of Quality, Quantity and Timing of Colostrum Feeding and Addition of Dried Colostrum Supplement on Immunoglobulin G1 Absorption in Holstein Bull Calves. *J Dairy Sci* 80:747-753.
- Nocek, J.E. et al (1984). Influence of Neonatal Colostrum Administration, Immunoglobulin and continued Feeding of Colostrum on Calf Gain, Health and Serum Protein. *J Dairy Sci* 67:319-333.
- N-vet AB, Uppsala Science Park, 751 83 Uppsala. Folder: LOCATIM® - Hyperkoncentrerat skydd med omedelbar verkan till nyfödda kalvar. Tidtryck, Uppsala.
- Olsson, S.-O. et al (1993). Calf Diseases and Mortality in Swedish Dairy Herds. *Acta vet scand* 34:263-269.
- Pritchett, L.C. et al (1991). Management and Production Factors Influencing Immunoglobulin G1 Concentration in Colostrum from Holstein Cows. *J Dairy Sci* 74:2336-2341.
- Pritchett, L.C. et al (1994). Evaluation of the Hydrometer for Testing Immunoglobulin G1 Concentrations in Holstein Colostrum. *J Dairy Sci* 77:1761-1767.
- Reber, A.J. et al (2008). Transfer of maternal colostral leukocytes promotes development of the neonate immune system Part II. Effects on neonate lymphocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 123:305-313.
- Reiter, B. et al (1975). Inhibition of *Escherichia coli* by Bovine Colostrum and Post-colostral Milk - The Bacterostatic Effect of Lactoferrin on a Serum Susceptible and Serum Resistant strain of *E. coli*. *Immunology* 28:83-95.
- Riedel-Caspari, G. (1993). The influence of colostral leukocytes on the course of an experimental *Escherichia coli* infection and serum antibodies in neonatal calves. *Vet Immunol Immunopathol* 35:275-288.
- Sandholm, M. et al (1995). Physiology of the bovine udder. In: *The bovine udder and mastitis*. p. 14-23. Jyväskylä: Gummerus Kijapaino Oy .
- Sasaki, M. et al (1976). Immunoglobulin IgG1 Metabolism in New Born Calves. *J Dairy Sci* 60:623-626.

- Stott, G.H. et al (1979). Clostral Immunoglobulin Transfer in Calves. I. Period of Absorption. II. The Rate of Absorption. *J Dairy Sci* 62:1632-1638.
- Svensson, C. et al (2003). Morbidity in Swedish dairy calves from birth to 90 days of age and individual calf-level risk factors for infectious diseases. *Prev Vet Med* 58:179-197.
- Swan, H. et al (2007). Passive Transfer of Immunoglobulin G and Preweaning Health in Holstein Calves Fed a Commercial Colostrum Replacer. *J Dairy Sci* 90:3857-3866.
- Tizard, R. (2004). Immunity in the Fetus and Newborn. In: *Veterinary Immunology: An introduction*. p. 221-233. 7. ed. Philadelphia: Saunders.
- Tyler, J.W. et al (1996). Evaluation of 3 Assays for Failure of Passive Transfer in Calves. *J Vet Intern Med*. 10:304-307.
- Tyler, J.W. et al (1998). Use of Serum protein Concentration to Predict Mortality in a Mixed-Source Dairy Replacement Heifers. *J Vet Intern Med* 12:79-83.
- Tyler, J.W. et al (1999). Colostral immunoglobulin concentrations in Holstein and Guernsey cows. *Am J Vet Res* 60:1136-1139.
- Urday, K. et al (2008). Voluntary Colostrum Intake in Holstein Heifer Calves. *The Bovine Practitioner* 42:198-200.
- Viring, S. et al (1993). Studies of enteric Pathogens and γ -Globulin Levels of Neonatal Calves in Sweden. *Acta vet scand* 34:271-279.