



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper

Metoder för utvärdering av råmjölkskvalitet och passiv immunitet hos kalvar av mjölkras

Linnea Bernövall

*Uppsala
2015*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2015:50*

Metoder för utvärdering av råmjölkskvalitet och passiv immunitet hos kalvar av mjölkras

Methods for evaluating colostrum quality and passive immunity in calves of milk breed

Linnea Bernövall

Handledare: Madeleine Tråvén, institutionen för kliniska vetenskaper

Biträdande handledare: Nils Fall, institutionen för kliniska vetenskaper

Examinator: Camilla Björkman, institutionen för kliniska vetenskaper

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0736

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2015

Delnummer i serie: Examensarbete 2015:50

ISSN: 1652-8697

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

Nyckelord: Råmjölk, immunoglobuliner, passiv immunitet, Brixrefraktometer

Key words: Colostrum, immunoglobulines, passive immunity, Brix refractometer

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper

Sammanfattning

För att säkerställa en god start i livet hos kalvar är råmjölken en viktig del. Upptag av antikroppar från råmjölk påverkas av många olika faktorer. En viktig faktor är kvaliteten hos den råmjölk som kalven utfodras med. Det finns olika sätt att kontrollera halten av antikroppar innan råmjölksgiva. Ett vanligt verktyg i svenska besättningar är kolostrometer som mäter densiteten i mjölken och utifrån denna kan ge en uppskattning av antikroppsinnehållet.

I detta examensarbete har en digital Brix-refraktometer och kolostrometern jämförts med infraröd spektroskopi. Blodprover från kalvar som fått råmjölk av känd kvalitet har analyserats avseende gammaglobulinhalt samt innehåll av specifika antikroppar mot bovint adenovirus typ 3, bovint coronavirus och bovint respiratoriskt syncytialt virus. Syftet med dessa undersökningar var att se om det gick att utröna huruvida någon av de olika metoderna för kontroll av råmjölkskvalitet var bättre för att förutspå den passiva immuniteten hos kalvarna. Även födelseviktens påverkan på antikroppsuptaget har undersökts, samt eventuell skillnad i råmjölkskvalitet mellan två olika koraser.

Resultaten visade att de kalvar som fått råmjölk av god kvalitet enligt Brix-refraktometern i större utsträckning också hade högre gammaglobulinhalt i blodet än de kalvar som fått mjölk av sämre kvalitet. Kolostrometern gav ett mer osäkert resultat där kalvar som fått råmjölk av god kvalitet enligt kolostrometermätningen ändå låg lågt i gammaglobulinnivå. En signifikant skillnad har påvisats mellan de två olika mätmetoderna. Virusspecifika antikroppar sjunker snabbare i blodet hos kalvar som fått råmjölk av sämre kvalitet, än hos de som fått bättre råmjölk.

Kalvens födelsevikt hade signifikant, men svag, påverkan på upptaget av antikroppar. Korasens betydelse för råmjölkskvaliteten har inte kunnat styrkas i denna undersökning.

Summary

To ensure a good start in a calf's life the colostrum plays a big part. The absorption of antibodies from colostrum is dependent on many different factors. One of the main factors is the quality of colostrum given to the calf. There are various methods to make sure the colostrum is good enough before feeding it to a calf. A common method used in Swedish herds is a colostrometer that measures the colostrum density and gives an estimation of the contents of antibodies in colostrum.

In this study a digital Brix refractometer and the colostrometer were compared with infrared spectroscopy. Blood samples from calves fed colostrum of a known quality were analyzed for content of gamma globulines and antigen specific antibodies to bovine adeno virus type 3, bovine corona virus and bovine respiratory syncytial virus. The purpose was to investigate if any of the methods was better for determining colostrum quality and therefore ensure a better passive immunity in calves. Also the birthweight of the calves was compared with the level of gamma globulines in calf plasma to see if it had an impact on the uptake of antibodies. Differences in colostrum quality between breed of cow was also investigated.

Results show that calves fed colostrum of a higher quality, according to the Brix refractometer, also had a higher level of gamma globulines in the blood. The colostrometer showed a more varied result where some calves fed colostrum of good quality according to the colostrometer, had a very low level of gamma globulins. A significant difference between the two methods was shown. The level of antigen specific antibodies decreased faster in calves fed colostrum of low quality, compared to calves fed colostrum of better quality.

The birth weight of the calf had a small, but significant, impact on passive immunity. No difference between cow breeds was shown in this study.

INNEHÅLL

Inledning.....	1
Litteraturstudie.....	3
Råmjölk.....	3
Absorption och utfodring	3
Failure of passive transfer (FPT)	4
Riskfaktorer för FPT	5
Mätmetoder	7
Mätmetoder i råmjölk	7
Mätmetoder i blod	8
Material och metoder	10
Prover och tidigare utförda analyser.....	10
Analyser och jämförelser i denna studie	10
Analysmetoder	11
Resultat.....	14
Rasskillnader i råmjölkskvalitet	16
Plasmaanalyser.....	16
Födelseviktens betydelse	21
Diskussion.....	22
Slutsatser	25
Referenser	26

INLEDNING

Kalvhälsan är en viktig del i modern nötkreatursproduktion. Detta gäller både för mjölk- och köttproducerande besättningar. En dålig kalvhälsa orsakar både direkta och indirekta ekonomiska förluster och kan hälsan optimeras från start skapas förutsättningar för bättre vinst och bättre hälsa hos djuren.

Redan i början av 1900-talet studerades vikten av att kalvar fick den första mjölken från kon för att den skyddade mot sjukdomar. I en studie publicerad så tidigt som 1922, beskrivs ett försök där kalvar i två grupper antingen fått eller inte fått råmjölk. Skillnaden var slående avseende infektionssjukdomar och forskarna tyckte sig kunna se att smittorna fanns i kalvarna från början oavsett omgivande miljö, vilket ytterligare förstärkte råmjölkens betydelse (Smith & Little, 1922). Sedan denna tidiga studie utfördes har otaliga forskare djupdykt i de olika delar som ingår i den komplexa frågan om kalvars behov och upptag av råmjölk.

FPT eller failure of passive transfer, det vill säga ett för lågt upptag av antikroppar via råmjölken, är ett problem som förekommer på flera djurslag. En serumkoncentration av immunoglobuliner på mindre än tio gram per liter under första levnadsveckan räknas som FPT hos kalv (Vogels *et al.*, 2013). Då nötkreatur har en placenta som är utformad så att ingen passiv immunitet erhålles i moderlivet är det extra viktigt att den passiva överföringen av antikroppar post partum fungerar som den ska (Weaver *et al.*, 2000).

Det är många faktorer som spelar in för att upptaget skall bli så bra som möjligt. En viktig del är kvalitén på råmjölken. Med god kvalitet menas en hög halt immunoglobuliner, främst IgG, i råmjölken (Gulliksen *et al.*, 2008).

För att säkerställa att så goda förutsättningar som möjligt skapas redan vid födseln av en kalv krävs metoder för att ta reda på dels råmjölkens kvalitet, dels hur mycket antikroppar kalven faktiskt tar upp.

Syftet med detta examensarbete var att undersöka olika mätmetoder för att utvärdera råmjölkens antikroppshalt och upptaget av antikroppar hos kalvar som fått en uppmätt mängd råmjölk av känd kvalitet.

En Brix-refraktometer har jämförts med en kolostrometer för att se om den skulle kunna vara användbar för mätning av antikroppshalten i råmjölk i den dagliga verksamheten ute på gårdar, då den inte är temperaturberoende på samma sätt som en kolostrometer för att få ett bra resultat (Quigley *et al.* 2012). Om kons ras påverkar råmjölkskvaliteten undersöktes också.

Analys av antigenspecifika antikroppar mot bovint adenovirus typ 3, bovint respiratoriskt syncytialvirus och bovint coronavirus med ELISA-analys av plasma från kalvarna har utförts för att se om det går att dra slutsatser om råmjölksupptaget via dessa. Denna studie omfattar även en undersökning av om kalvens födelsevikt kan påverka förmågan att absorbera immunoglobuliner.

LITTERATURSTUDIE

Råmjölk

Till råmjölk räknas den första mjölken som produceras efter kalvning. Råmjölksperioden hos nötkreatur är mellan fem och sju dagar lång, men halten immunoglobuliner sjunker kraftigt relativt snabbt post partum. Syftet med råmjölk är att förse den nyfödda kalven med näring, men också att bidra till ett immunförsvar den första tiden i kalvens liv, då den föds helt utan cirkulerande antikroppar (Marnila & Korhonen, 2011). Kalvar föds med små energireserver och bör få i sig föda så snart som möjligt efter födseln. Kolhydrater och fett i mjölken står för upprätthållandet av kalvens kroppstemperatur, och därigenom för den omedelbara överlevnaden (Morrill *et al.*, 2012).

Råmjölken är i grova drag uppbyggd av proteiner, fett, laktos och vatten. Den största delen av proteinet utgörs av kasein. Enligt en studie utgör den totala torrsubstanshalten, inklusive fett, proteiner och spårämnen, 24 % i råmjölk. Av torrsubstansen utgörs 4,8 % av kasein, 6 % albumin och 6 % av immunoglobuliner. De viktiga immunoglobulinerna i råmjölken utgörs av framför allt IgG, hela 85-90 %, men även IgM 5 % och IgA 5-7 % (Godden, 2008; Vetter *et al.*, 2013; Stilwell & Carvalho, 2011).

Förutom immunoglobuliner innehåller råmjölken celler, exempelvis lymfocyter, samt en del bioaktiva komponenter som cytokiner. Dessa har också effekt på kalvens immunförsvar. Cellerna utgör ett direkt försvar i mag-tarmkanalen och cytokinerna hjälper till att utveckla det egna försvaret hos kalven (Sacerdote *et al.*, 2013). Cytokiner hjälper också till att inleda tarmutvecklingen hos kalven. Det tidiga intaget av råmjölk stimulerar celltillväxt i tarmslemhinnan och startar upp digestionskanalens funktioner (Hammon *et al.*, 2012).

Generellt har råmjölken en högre densitet, mer torrsubstans, än vanlig komjölk. Den innehåller högre halt av protein, mineral och ofta, men inte alltid, högre halt av fett. Laktoshalten däremot är något lägre i råmjölk jämfört med vanlig mjölk (Marnila & Korhonen, 2011). Torrsubstansen ligger på en halt av 21 till 27 % i råmjölk, att jämföra med 12 till 13 % i vanlig komjölk (Jaster, 2005).

Absorption och utfodring

Under kalvens första levnadsdygn, närmare bestämt de första 24-36 timmarna, är tarmen mottaglig för så kallade makromolekyler. Detta innebär att bland annat immunoglobuliner kan

passera in i kalvens tarmepitelceller med hjälp av pinocytos. Genom epitelcellerna går sedan antikropparna vidare till det lymfatiska systemet med hjälp av så kallad exocytos. Efter ett till två dygn upphör dock denna förmåga att absorbera antikroppar via råmjölken varför det är viktigt att kalven så snart som möjligt efter födseln får i sig råmjölk. Från lymfsystemet går immunoglobulinerna vidare till blodet via ductus thoracicus (Weaver *et al.*, 2000).

Många faktorer har betydelse för antikroppsuptaget hos kalven. Olika raser har olika bra upptag och en studie menar att kalvens kön kan spela viss roll där kvigor tenderar att ha en högre halt av antikroppar än tjurar. Det är dock enligt författarna inte helt klarlagt om detta snarare beror på den totala blodvolymen än ett faktiskt högre upptag hos kvigorna (Quigley & Drewry, 1998). Sambandet mellan kön och antikroppsuptag är inte fastställt då flera andra studier visar på motsatt resultat, där könet inte har någon betydelse för upptaget (Trotz-Williams *et al.*, 2008).

Hur mycket råmjölk som kalven får spelar roll. En studie visar ett linjärt samband mellan utfodrad mängd IgG och serumhalt av IgG. Försöket visar också att det är ett likvärdigt upptag av antikroppar mellan kalvar som får en utfodring under de första tolv levnadstimmarna och kalvar som får samma mängd råmjölk uppdelad i två givor. Det viktiga är koncentrationen av antikroppar i mjölken (Hopkins & Quigley, 1997).

Metoden som används vid utfodring av kalvarna har också betydelse för hur bra antikroppar absorberas. Upptaget av immunoglobuliner hos kalvar som matats med nappflaska har visats vara bättre än hos kalvar som givits råmjölk via sond, åtminstone då det gäller mindre volymer (Godden *et al.*, 2009). Även den abomasala tömningshastigheten hos kalven spelar in i upptaget av antikroppar där snabbare tömning av löpmagen ger ett högre upptag av IgG (Mokhber-Dezfooli *et al.*, 2012).

Failure of passive transfer (FPT)

FPT, det vill säga för lågt upptag av antikroppar från råmjölken, definieras som en för låg halt immunoglobuliner i blodet hos kalvar vid 24-48 timmars ålder. Ett gränsvärde för Ig-nivån i serum 24-48 timmar post partum är satt till 10 g/l, vilket motsvarar en totalproteinhalt på 52-55 g/l (Bielmann *et al.*, 2010, Tyler *et al.*, 1996). Totalproteinvärdet används ofta för att skilja mellan bra och dåligt upptag av antikroppar då mätning av totalprotein är enklare att utföra i fält än IgG-analys (Alley *et al.*, 2012). En viktig faktor för antikroppsuptaget är hygien på råmjölken vid utfodringen och rekommendationen är att bakterieinnehållet är lägre än 100000 cfu/ml där cfu står för colony forming units, vilket är ett mått på antal bakterier (Fidler *et al.*, 2011).

Enligt en amerikansk studie har prevalensen av FPT hos kvigkalvar minskat från över 40 % 1991-92, till 19,2 % då studien utfördes 2009. Den troliga orsaken till minskningen tros bero på förbättrade rutiner vid kalvning och råmjölksutfodring (Beam *et al.*, 2009).

En studie utförd i Florida, visade att kalvar som hade en låg halt totalprotein i blodet vid mätning vid två till åtta dagars ålder, löpte en tre till sex gånger förhöjd risk att dö innan sex månaders ålder, jämfört med kalvar som hade hög totalproteinhalt. En låg totalproteinhalt sattes i försöket till mindre än 50 g/l och gränsen för hög halt sattes till mer än 60 g/l (Donovan, *et al.*, 1998). Ytterligare en amerikansk studie gjord på två mjölkgårdar i Kalifornien visade att höga halter IgG, det vill säga halter över 20 g/l, gav kortare sjukdomsduration hos kalvar med diarré. Kalvarna hade insjuknat trots att överföringen av antikroppar var tillfredsställande, men de klarade av sin sjukdom bättre än de med för låg halt IgG, i försöket satt till 5 g/l (Paré *et al.*, 1993). I en undersökning utförd i Kanada på 78 sjuka kalvar kunde 86 % konstateras ha för lågt IgG-värde, det vill säga en antikroppshalt på mindre än 10 g/l. Även denna studie belyser risken för individer med FPT att insjukna i låg ålder (Fecteau *et al.*, 2013).

Riskfaktorer för FPT

Flera riskfaktorer för FPT har nämnts ovan, så som utfodringsmetod vid råmjölks-giva, mängd råmjölk som kalven får i sig samt kalvens hälsostatus vid födseln som kan kompliceras av exempelvis en svår förlossning och för tidig födsel.

En av de viktigaste faktorerna som påverkar kalvens upptag av antikroppar är naturligtvis kvaliteten på råmjölken. Det måste finnas tillräckligt med antikroppar i mjölken för att kalven ska kunna ta upp dem. Halten varierar kraftigt mellan olika kor, även inom samma ras, och många faktorer finns som påverkar detta. Gulliksen (2008) visar att halten antikroppar också är säsongsb beroende, med högre halt antikroppar under sommar och tidig höst än under resten av året. Samma studie visar också att det finns ett samband mellan vilket laktationsnummer kon har och halten immunoglobuliner, ju äldre ko desto mer antikroppar. Troligen beror detta på längre exponeringstid för smittoämnen och följaktligen längre tid att bilda antikroppar (Gulliksen *et al.*, 2008). I en svensk studie konstaterades att kons laktationsnummer spelar roll för råmjölakens immunoglobulinhalt. En signifikant skillnad i antikroppsnivå kunde uppmätas i serum från kalvar vars mödrar var första- och andrakalvare, där dessa kalvar hade lägre antikroppshalt jämfört med kalvarna till kor med laktationsnummer tre eller högre (de Verdier Klingenberg *et al.*, 1999).

Bristande rutiner för råmjölksutfodring nämns av flera författare som en stor riskfaktor för FPT. Ett exempel är då kalven lämnas med modern och ska dia själv, vilket visas ha ett signifikant samband med FPT. Trotz-Williams et al. (2008) visar att detta ökar risken att kalven får för liten mängd råmjölk och studien visar också ett samband mellan den tid som kalven lämnas med modern och FPT. Ju längre tid kalven var kvar hos kon desto större risk var det för FPT, medan kalvar som separerades från modern i samband med födseln i större utsträckning utfodrades med en känd mängd råmjölk inom de första sex levnadstimmarna. Denna utfodring minskade risken för FPT markant (Trotz-Williams *et al.*, 2008). En svensk studie visar också en signifikant högre risk för kalvar att drabbas av allvarlig diarré om de själva förväntats dia sin råmjölk, jämfört med de som matats av djurskötaren (Svensson *et al.*, 2003).

Tidpunkt för råmjölksgiva efter födelsen har också visats vara en viktig faktor i överföringen av antikroppar. Tarmens epitelceller förlorar förmågan att absorbera stora molekyler, exempelvis antikroppar, vid cirka 24 timmars ålder varför råmjölken måste ges inom det första dygnet för att absorberas tillfredsställande. Under dessa 24 timmar minskar effektiviteten i upptaget dessutom successivt och det är som bäst omedelbart efter kalvens födelse (Quigley & Drewry, 1998). Mjölakens innehåll förändras snabbt efter första mjölkningen och det går att se en kraftig minskning av immunoglobuliner mellan det första och tredje mjölkningstillfället post partum. Totalproteinhalten i procent går från 14 till 8,4 procent redan mellan första och andra mjölkningen och vid det tredje tillfället är totalproteinet nere på 5,1 procent. Detta ökar vikten ytterligare av att kalven utfodras med tillräcklig mängd råmjölk av god kvalitet så tidigt som möjligt (Marnila & Korhonen, 2011). Enligt samma studie är tarmen mottaglig för större molekyler i upp till 36 timmar efter födelsen. En svensk studie visar även den att kvaliteten på råmjölken minskar kraftigt mellan första och andra urmjölkningen. I det försöket minskade andelen antikroppar med 50 % mellan första och andra mjölkningstillfället. Hela 75 % av korna hade vid andra urmjölkningen en alltför låg halt, enligt försökets cut-off < 50 g/l (Liberg, 2000). Samma studie tar också upp problematiken med mjölkkläckage innan kalvning, där en hel del av antikropparna riskerar att gå till spillo. 25 kor i studien hade ett höggradigt läckage innan kalvning och samma kor hade sedan en låg antikroppshalt i råmjölken post partum.

Kalvens allmänna hälsostatus vid födseln avgör också hur mycket antikroppar som tas upp. Exempelvis kan en respiratorisk acidosis efter födseln bidra till ett sämre upptag av immunoglobuliner. Respiratorisk acidosis uppstår då kalven utsätts för hypoxi, vilket sker vid alla normala förlossningar. Vid dystoki och längre tids hypoxi kan acidosen kvarstå hos kalven och påverka upptaget av antikroppar negativt (Quigley & Drewry, 1998). I samband med detta kan också nämnas vikten av övervakade kalvningar för att undvika onödigt långa och utdragna födslar som ökar risken för hypoxi hos kalven. Genom övervakning och förlossningshjälp vid behov kan risken för ett allt för lågt råmjölksintag minskas (Lorenz *et al.*, 2011).

Mätmetoder

Det finns olika sätt att mäta totalproteinhalt eller antikroppshalt i ett provmaterial, både direkta och indirekta metoder. Till de direkta metoderna räknas bland annat ELISA (enzyme-linked immunosorbant assay) och radial immunodiffusion (RID) som båda mäter immunoglobulinhalten i provet. Att en mätmetod är indirekt innebär att den mäter totalprotein eller torrsubstanshalt i ett prov och ger en uppskattning av immunoglobulinvärdet. Till indirekta metoder räknas refraktometer och kolostrometer.

Mätmetoder i råmjölk

Kolostrometer

Det vanligaste sättet att mäta kvalitet på råmjölk i besättningar är att använda en så kallad kolostrometer (Bielmann *et al.* 2010). Det är ett instrument som mäter densiteten i råmjölken. Kolostrometern används för att bestämma totalproteinhalten i provmaterialet, vilket i sin tur leder till en uppskattning av antikroppsinnehållet i mjölken. Det finns en del problem med kolostrometern som mätinstrument. För det första är densiteten i mjölken inte helt korrelerad till halten antikroppar (Morin *et al.*, 2001). Till detta kommer att kolostrometern är temperaturberoende för att visa ett tillförlitligt resultat, vilket gör att den blir mer svårhanterlig i praktiken än till exempel en digital refraktometer (Quigley *et al.* 2012., Morin *et al.* 2001). Morin slår också fast att ras hos djuret och säsong på året kan påverka tillförlitligheten vid mätning med kolostrometer (Morin *et al.* 2001). I Libergs studie av råmjölk från 664 mjölkkor visade kolostrometern falskt positivt resultat för 8 % av proverna. Detta ansåg författaren vara en godtagbar felmarginal och kolostrometern bedömdes vara ett bra test att använda i fält (Liberg, 2000).

Refraktometer

En refraktometer bestämmer andelen torrsubstans i en vätska genom att mäta hur stor del av en ljusstråle som bryts av mot fasta partiklar i provmaterialet. Refraktometri kan användas på olika provmaterial och fungerar bra till både råmjölk och serum. Fördelen med exempelvis refraktometern jämfört med de direkta metoderna, är att den kan fungera som en cow-side test och användas i fält för att i möjligaste mån förhindra FPT hos kalvar då råmjölken kan kontrolleras på ett tillförlitligt sätt innan giva (Wallace *et al.*, 2006). En studie visar på en korrelation mellan refraktometri och immunoglobulinkoncentration i råmjölk mätt med elektrofores på 0,98 ($P < 0,001$) vilket är en hög korrelation och således gör refraktometern till ett användbart verktyg i fält (Molla, 1980).

Brix-refraktometern är en digital refraktometer som mäter torrsubstansen i råmjölk. Torrsubstanshalten visar bland annat hur mycket protein det finns i mjölken och ger därigenom en uppskattning av antikroppshalten. I en studie, (Bielmann *et al.*, 2008), visas att Brix-refraktometern inte är temperaturberoende på grund av att apparaten korrigerar för temperaturskillnader i provet. Mätningar utfördes på mjölk vid 5, 20 och 38 °C och inga signifikanta skillnader i resultat kunde påvisas. Den digitala refraktometern gör också mätningen mer objektiv då ett värde fastställs av apparaten, till skillnad från den traditionella analoga refraktometern, där avläsaren bedömer värdet. I en uppföljande studie av samma författare, gjord på råmjölksprover från 273 kor, slås fast att både digital och analog refraktometer fungerar bra för ungefärlig mätning av antikroppshalten. De sätter cut-off-värdet till 22 % då de olika refraktometrarna jämförs med en RID som gold standard (Bielmann *et al.*, 2010). I en studie på 183 mjölkprover visar också Quigley *et al.* (2013) att Brix-refraktometern ger en bra uppskattning av råmjölkskvaliteten jämfört med RID. Författarna rekommenderar en cut-off nivå på 21 % vilket skulle motsvara en IgG-halt på > 50 g/l. De konstaterar också att den digitala refraktometern är smidig och billig att använda i.

ELISA

ELISA är en laboriemetod för att mäta råmjölkskvaliteten och den är således inte så användbar i fält som de ovanstående metoderna. Det finns ett flertal ELISA-kit som kan användas för mätning av antikroppar i mjölk. En studie som jämförde ELISA och RID med varandra visade att ELISA-analysen inte fungerade lika bra vid analys av råmjölk som RID, men vid analys av plasma uppnåddes likvärdigt resultat mellan de båda testen. Studien visade att andra ämnen i mjölken, utöver immunoglobuliner kan påverka resultaten. Slutsatsen som drogs av detta var att RID ger ett tillförlitligare värde på antikroppshalt i mjölk (Li-Chan & Kummer, 1997). Molla (1980) visade på en korrelation mellan RID och elektrofores på 0,87 ($P < 0,001$).

Mätmetoder i blod

Flera analysmetoder finns för mätning av antikroppshalt i serum. I en studie utförd på köttraskalvar jämfördes refraktometer med tre olika mätmetoder; zinksulfatturbiditet, elektrofores och RID. Alla dessa tre är direkta mätmetoder för immunoglobuliner. De gav alla en rättvisande bild av hur mycket antikroppar som fanns i serum (Bradley & Niilo, 1985).

RID har validerats för användning på nötkreatur i ett försök utfört av Chelack (2003) där en standardkurva gjordes genom att spåda ett referensserum med känd mängd antikroppar. Standardkurvan användes för att sedan kunna beräkna antikroppsniivåerna i proverna. RID

fungerar i grova drag så att antiserum mot den antikropp som eftersöks adderas till en agarosgel. Då serum innehållande rätt antikroppar tillsätts diffunderar antigen-antikroppskomplex ut i gelen och bildar en ring. Diametern på ringen mäts sedan och ju större diameter desto mer antikroppar finns i provmaterialet (Chelack *et al.*, 1993).

Olika typer av antikropps-ELISA finns också att tillgå där det går att undersöka för antikroppar generellt alternativt antigenspecifika antikroppar. Redan på sjuttioalet var ELISA-analysen aktuell i försök. Bland annat gjordes ett försök i Sverige där ELISA användes för att finna antikroppar mot kolera i serum. Kortfattat fungerar en ELISA-analys på så sätt att specifika antigen fästs i mikrobrunnar i testplattan via inkubering. Antigen som inte fäst in till brunnarna sköljs av och därefter tillsätts provmaterialet (t.ex. plasma), varpå en andra inkubering sker. Antikroppar i provet binder då till antigenet i plattan. Antikroppar som inte bundits till antigen sköljs av och provet inkuberas återigen tillsammans med enzymmärkta sekundära antikroppar specifikt riktade mot de antikroppar man vill undersöka. Efter sköljning tillsätts en substratlösning till mikrobrunnarna. Enzymet omvandlar substratet till en färgad produkt under en sista inkubering och därefter tillsätts så kallad stoppvätska, som avbryter reaktionen. Resultatet avläses med hjälp av en spektrofotometer, vid en bestämd våglängd (Holmgren & Svennerholm, 1973).

MATERIAL OCH METODER

Prover och tidigare utförda analyser

För denna studie har blod- och råmjölksprover samlade i en tidigare studie använts. Den tidigare studien utfördes på 40 kalvar födda på Nationellt forskningscentrum för lantbrukets djur, Uppsala-Lövsta, från mars till juni 2012. Kalvarna var av två olika raser, 27 Svensk Låglandsboskap (SLB) och 13 Svensk Röd Boskap (SRB).

Blodproverna som användes togs dels i den första levnadsveckan, vid 4-6 dagars ålder, dels i den åttonde levnadsveckan. Blodet samlades i 10 ml evakuerade blodprovsrör, Vacutainer, med tillsats av 170 IU litiumheparin. Centrifugering utfördes i 3000 rpm i 20 minuter. Totalprotein analyserades med analog refraktometer och plasman pipetterades sedan över i 1,5 ml Eppendorfrör och frystes ned till -20 °C (Östlund, 2012).

Prov från råmjölken som kalvarna utfodrats med togs vid första mjölkningstillfället post partum. I försöket ingick 36 kor då två tvillingpar fötts in i kalvgruppen. Två råmjölksprover saknades. Råmjölkens densitet mättes med kolostrometer (KRUUSE Colostrum Densimeter) vid temperaturen 22 °C innan utfodring av kalven. Tidpunkt för utfodring, mängd given mjölk samt densitet registrerades. Prov på 40 ml råmjölk med tillsats av två droppar Bronopol frystes ned till -20 °C (Östlund, 2012).

HUV-laboratoriet utförde en ELISA-analys i kalvplasma på proverna tagna vid 4-6 dagars ålder (Immunotek Quantitative Bovine IgG ELISA, ZeptoMetrix Corporation). Testet mäter totalhalten IgG-antikroppar i olika kroppsvätskor från nötkreatur. (Östlund, 2012)

En analys av råmjölkens totalproteinhalt har utförts på Kungsängens försöksgårds laboratorium, Uppsala. Där användes Fourier Transform Infrared Instrument, Milkoscan FT 120, Foss, Danmark (Östlund, 2012).

Analyser och jämförelser i denna studie

I denna studie analyserades råmjölkens torrsbstanshalt med hjälp av en digital refraktometer, en så kallad Brix-refraktometer. Resultaten från den mätningen jämfördes med resultaten från

tidigare mätningar med kolostrometern som användes i besättningen. Syftet med denna jämförelse var att se om den digitala refraktometern är ett bättre verktyg att använda i fält än den vanligen använda kolostrometern för att uppskatta råmjölkens IgG-halt. Värdena från Brix-refraktometern jämfördes också med gammaglobulinhalten i plasma mätt med elektrofores för att se om det finns ett samband mellan råmjölkskvalitet uppmätt med Brix-refraktometern och kalvens antikroppshalt i plasma.

Analyser på blodet från kalvarna som utfördes i denna studie är en elektrofores avseende gammaglobulinhalt. Dessutom utfördes ELISA-analyser avseende antikroppar mot bovint adenovirus typ 3 (BAV-3), bovint coronavirus (BCV) samt bovint respiratoriskt syncytialt virus (BRSV). Syftet var att jämföra dessa mot gammaglobulinvärdet uppmätt med elektrofores som utgör en så kallad gold standard för immunoglobulinanalys i denna studie, för att se hur bra antikroppsupptaget speglas av de olika testmetoderna. Resultaten av proverna tagna vid en veckas ålder jämfördes också med proverna tagna vid åtta veckors ålder, för att utröna om det går att se vilka kalvar som haft ett sämre upptag av antikroppar från råmjölken utifrån hur länge de har antikroppar kvar i blodet.

Analysmetoder

Plasmaanalyser

Klinisk kemiska laboratoriet, Universitetsdjursjukhuset, SLU, Uppsala, utförde en elektrofores på plasma för att ta reda på hur stor gammafraktion som fanns i kalvplasma. Även totalprotein i plasma analyserades där med ett automatiskt kemiinstrument (Architect c4000, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL,US.), reagensen som användes var även den från Abbott Laboratories (Lilliehöök, I., Klinisk kemiska laboratoriet, SLU, pers. medd., 2014).

I denna studie testades totalprotein i plasma med en digital Brix-refraktometer (Pocket PAL-1, Cat. No. 3810, Atago). Refraktometern anger ett brytningsindex (Brix-värde) i procent. Detta värde användes för alla jämförelser i denna studie.

Antikroppar mot BAV-3 analyserades med en kommersiell ELISA (Adenovirus 3 ELISA kit, Bio-X Diagnostics). Testet är uppbyggt på en 96-brunns mikrotitreringsplatta där varannan kolumn fungerar som negativ kontroll. Proverna späds i buffert och pipetteras till plattan i par, där det ena provet utgör den negativa kontrollen. Inkubering sker i 1 timme och sedan tillsätts ett konjugat, innehållande monoklonala antikroppar riktade mot bovint IgG, till testplattan. Plattan inkuberas sedan en andra gång, tvättas och en chromogen i form av tetrametylbenzidin tillsätts för att färga in de brunnar som innehåller antikroppar mot adenovirus. Inkubering i tio

minuter sker och därefter tillsätts en stoppvätska som bromsar reaktionen. Färgen utvecklas i proportion till hur mycket antikroppar som finns i brunnen. Slutligen avläses plattan i en läsare med infrarött ljus och ett filter med 450 nm. Analysen utfördes på Statens Veterinärmedicinska Anstalt (SVA).

Antikroppar mot BRSV samt BCV analyserades på SVA med kommersiella ELISA-metoder (Svanova, Boeringer Ingelheim) på liknande sätt som beskrivits för adenovirus.

Råmjölksanalyser

En Brix-refraktometer (Pocket PAL-1, Cat. No 3810, Atago) användes för att mäta torrsubstanshalten (brytningsindex %) i råmjölksproverna. IgG-halten (g/l) kan utifrån detta räknas ut med hjälp av en formel: $-61,896 + 5,666 \times \text{Brix-procenten}$ (Quigley *et al.*, 2013).

Statistiska metoder

Jämförelse av olika analysmetoder har utförts med regressionsanalys som statistisk metod. Skillnaden i råmjölkskvalitet mellan de olika koraserna har mätts med t-test. Alla statistiska analyser har utförts i statistikprogrammet Minitab.

Gränsvärden

Vid analys av resultaten för testerna av råmjölk har gränsvärden satts för att resultaten skall bli jämförbara med liknande studier. För kolostrometer användes densiteten 1050 g/l som cut-off-värde, vilket motsvarar en IgG-halt på cirka 50 g/l (Godden, 2008). Brix-refraktometern gav ett procentvärde där cut-off för råmjölk sattes till 22,5 %, som använts i en tidigare studie (Nilsson, 2014). Det värdet är något högre än tidigare rekommenderat värde på 22 % motsvarande en IgG-halt på > 50 g/l (Bielmann *et al.*, 2010).

Vad gäller analysen av plasma från kalvarna har gränsvärdet för totalprotein justerats upp lite för att bli rättvisande, normalt används en cut-off på 55 g/l då serum analyseras (Bielmann *et al.*, 2010). I denna studie har plasma använts och cut-off-värdet justerats upp till 58 g/l för att kompensera för fibrinogen som finns med i plasma till skillnad från i serum. För den analoga refraktometer som använts sattes gränsvärdet till 58 g/l, samma gränsvärde användes för totalprotein mätt på Klinisk kemiska laboratoriet, Universitetsdjursjukhuset, SLU, Uppsala. För den IgG-ELISA som utförts på Kungsängens försöksgårds laboratorium sattes cut-off-värdet till 10 g/l.

För de olika ELISA-analyser som utförts för mätning av specifika antikroppar mot BAV-3, BRSV samt BCV har en cut-off på 10 PP (% av den positiva kontrollens värde på plattan) använts enligt tillverkarens rekommendation.

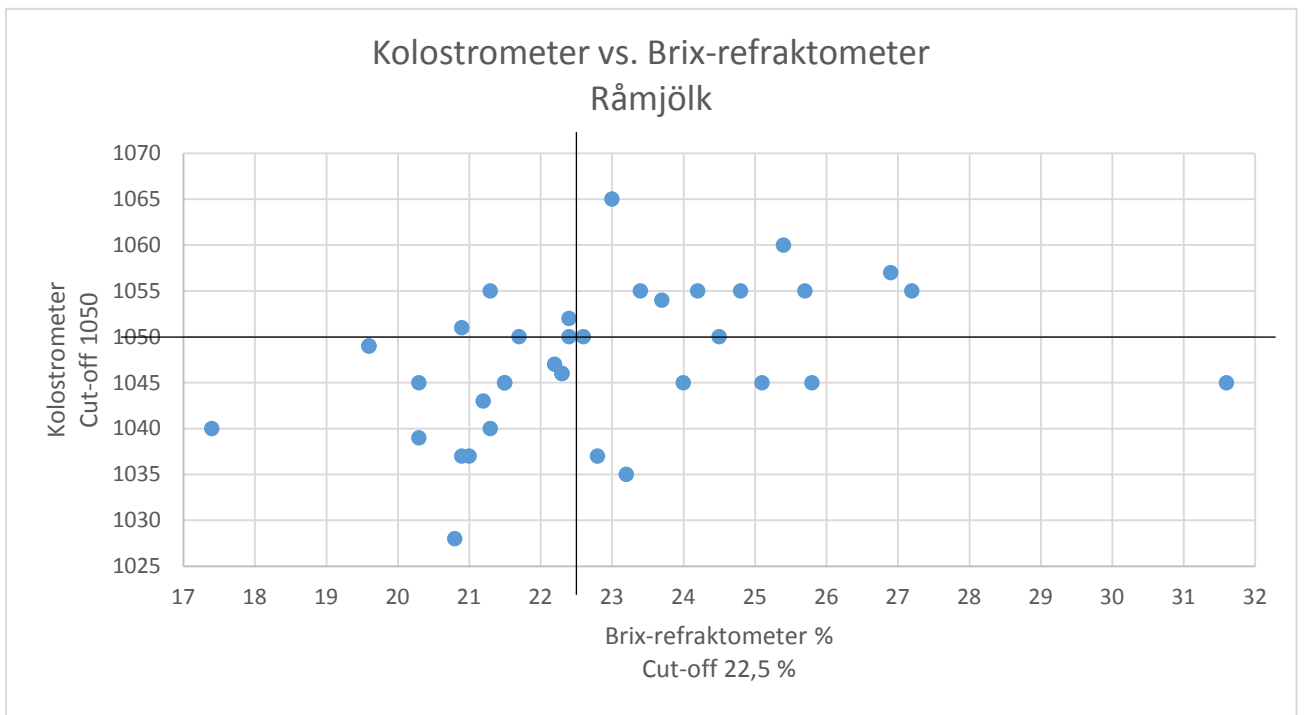
RESULTAT

Vid jämförelse av Brix-refraktometern mot totalproteinhalten i råmjölken uppmätt på laboratoriet på Kungsängens försöksgård uppnås vid regressionsanalys en förklaringsgrad på 91 % ($p < 0,01$). Kolostrometermätningarna i jämförelse med totalproteinhalten får däremot en låg förklaringsgrad, endast 26 % ($p < 0,01$), enligt en tidigare utförd studie på samma provmaterial (Östlund, 2012).

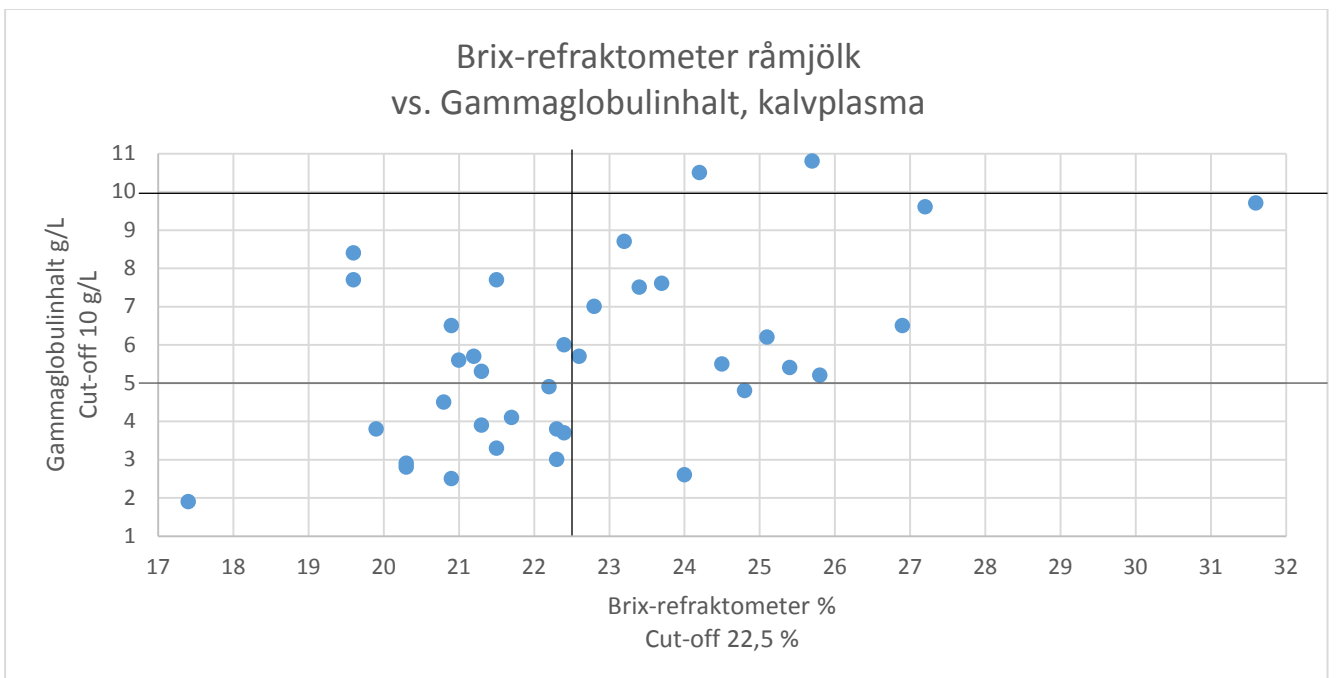
Vid jämförelse mellan mätning av råmjölkskvalitet med Brix-refraktometern och kolostrometer framkommer att 16 mjölkprover kommer över kolostrometers cut-offvärde på 1050 g/l. Vid en regressionsanalys av överensstämmelse mellan Brix-refraktometern och kolostrometern finns en förklaringsgrad mellan de två på 14 % ($p < 0,05$). Antalet positiva mjölkprover vid mätning med Brix-refraktometern är 17 stycken, men individerna skiljer sig åt i flera fall. Se Figur 1.

Endast två kalvar kommer över cut-offvärdet för gammaglobulin i plasma på 10 g/l. De flesta kalvar kommer dock upp över 5 g/l i gammaglobulinhalt. Tretton av 21 kalvar hamnar under 5 g/l.

Sex kalvar har fått råmjölk med ett Brix-värde över 22,5 %, där kolostrometern visar ett värde under 1050 g/l. Likaså har fem kalvar fått råmjölk som haft ett värde över eller lika med 1050 g/l vid mätning med kolostrometer, men vid Brix-mätningen visat sig ligga under 22,5 %. Dessa fem kalvar visar också vid mätning av gammaglobuliner att de har för låg halt och således lider av FPT. Även kalvar som fått råmjölk av godkänd kvalitet enligt Brix-mätningen hamnar under 10 g/l gammaglobulin. Det kan dock ses en skillnad i de kalvar som ligger under 10 men över 5 g/l där fem av sex kalvar, utfodrade med Brix-positiv/kolostrometernegativ råmjölk, hamnar över 5 g/l gammaglobulin. I motsatta fallet där kalvar utfodrats med Brix-negativ/kolostrometerpositiv råmjölk kommer endast två av fem kalvar upp i en gammaglobulinnivå över 5 g/l. Sambandet mellan mätning i råmjölk med Brix-refraktometern och gammaglobulinhalten i kalvplasma illustreras i Figur 2.



Figur 1. Torrsubstanshalt i råmjölk mätt med Brix-refraktometer jämfört med densitet mätt med kolostrometer.



Figur 2. Torrsubstanshalt i råmjölk mätt med Brix-refraktometer jämfört med kalvarnas gammaglobulinhalt i plasma.

Rasskillnader i råmjölkskvalitet

Vid mätning av råmjölkskvalitet med Brix-refraktometer så ses en liten numerisk skillnad mellan de två raserna SRB och SLB. SRB-gruppen består av 12 kor. Värdena i gruppen varierar mellan lägst 19,6 % och högst 25,1 %. Andel kor över cut-offvärdet på 22,5 % är fyra stycken, det vill säga 33 %. Medelvärdet för SRB-korna hamnar på 22,0 %. SLB-gruppen består av 24 kor. Värdena i gruppen varierar mellan lägst 17,4 % och högst 31,6 % och andel kor över cut-off-värdet är 13 stycken, det vill säga 54 % av korna har en tillfredsställande kvalitet på sin råmjölk. Medelvärdet i SLB-gruppen är 23,3%. Vid analys med t-test ses ingen signifikant skillnad mellan raserna. Värden för varje individ redovisas i Tabell 1.

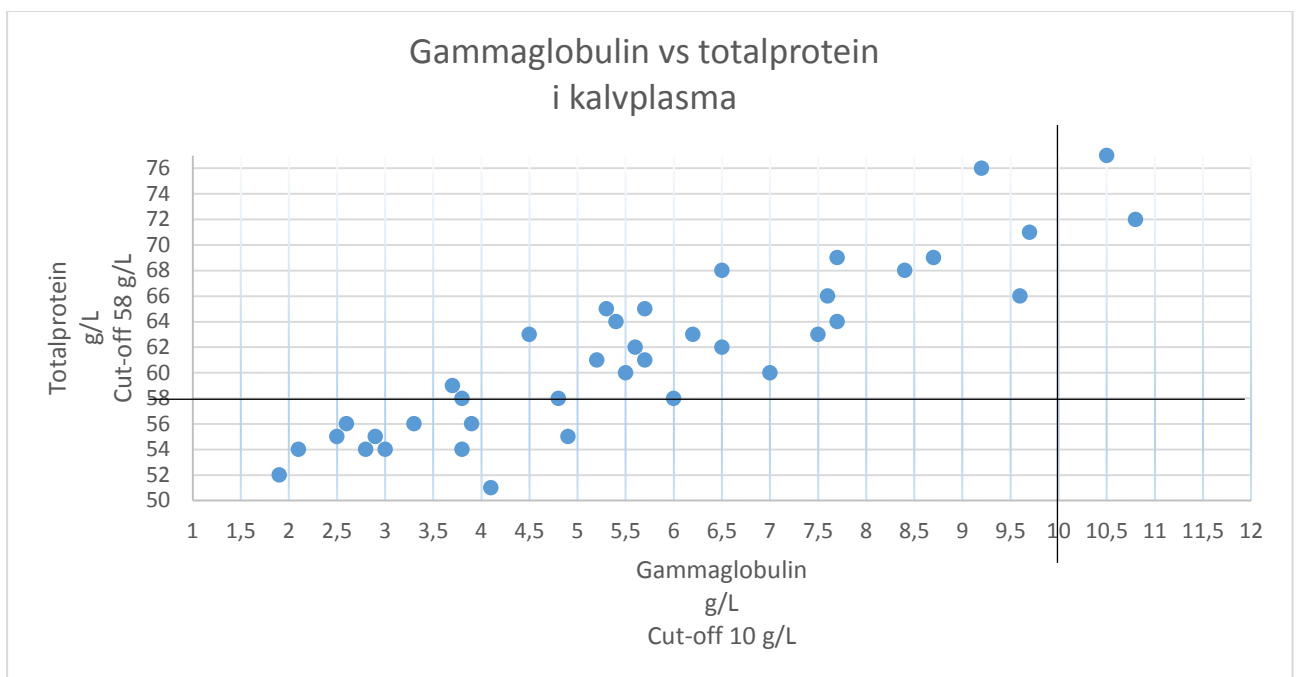
Tabell 1. Råmjölkskvalitet mätt med Brix-refraktometer hos de olika koraserna

Ko SRB	brixvärde	Ko SLB	brixvärde
1489	19,6	982	17,4
1506	19,9	6458	20,3
1584	20,3	6476	20,8
1464	21,3	5362	20,9
1451	21,3	976	20,9
1604	21,7	6377	21
1359	22,2	6506	21,2
1516	22,4	6432	21,5
1435	22,6	5367	21,5
1522	23,7	6438	22,3
1605	24	979	22,4
1591	25,1	6510	22,8
		6512	23
		6467	23,2
		6464	23,4
		6442	24,2
		6466	24,5
		6305	24,8
		5333	25,4
		6472	25,7
		6507	25,8
		5211	26,9
		973	27,2
		6473	31,6
N=12		N=24	
Medel: 22 %		Medel: 23,3 %	
SD: 1,7		SD:2,9	
Skillnad 1,271			

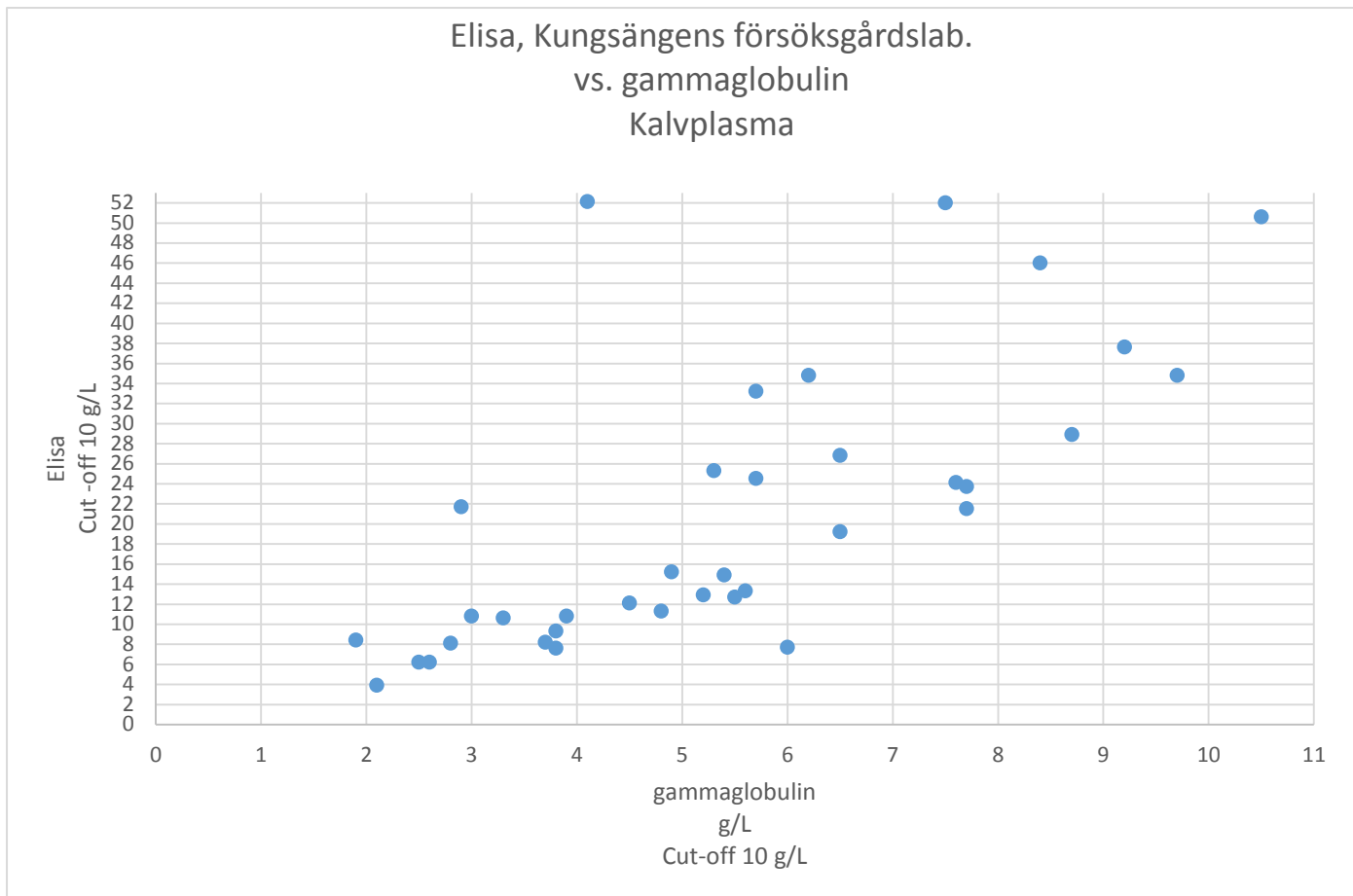
Plasmaanalyser

Då totalproteinhalten i plasma mäts med analog refraktometer hamnar 21 av 39 kalvar (värde för en kalv saknas) över gränsvärdet på 58 g/l. Mätning med Brix-refraktometer i plasma visar Brix-värden mellan 8,1 och 11,2 %. Jämförelse mellan de olika typerna av refraktometer vid användning för mätning i plasma får en hög förklaringsgrad, 96 % av totalproteinvärdena mätta med Brix-refraktometer kan förklaras av värdena uppmätta med den analoga refraktometern. Ett Brix-värde på 9 % motsvarar ett värde på 58 g/l mätt med analog refraktometer och samma 21 kalvar ligger över gränsvärdet för båda metoderna.

Gammaglobulin analyserat med elektrofores visar att endast två av kalvarna har ett gammaglobulinvärde över 10 g/l. Två av kalvarna har gammaglobulinvärden precis under cut-offvärdet (9,6 respektive 9,7 g/l) medan 23 kalvar har gammaglobulinvärden över 5 g/l. Vid regressionsanalys av sambandet mellan gammaglobulin och totalprotein mätt med analog refraktometer finns en hög förklaringsgrad, 70 % ($p < 0,001$) vilket gör att den analoga refraktometern utgör ett gott alternativ till elektrofores vid uppskattning av immunoglobulinhalt i plasma. Sambandet illustreras i Figur 3.



Figur 3. Gammaglobulinhalt i kalvplasma jämfört med totalprotein mätt med analog refraktometer.



Figur 4. Gammaglobulinhalt i kalvplasma jämfört med IgG-halt mätt med ELISA.

HUV-laboratoriet utförde en IgG-ELISA på kalvplasma vid fem dagars ålder. Resultaten visar en relativt låg överensstämmelse med gammaglobulinvärdena, vilket illustreras i Figur 4. Värden för tre av kalvarna saknas. Nio kalvar har värden under 10 g/l, i IgG-ELISAn. Gammaglobulinvärdena för dessa nio är under 4 g/l för alla utom en kalv som har 6 g/l. Åtta kalvar ligger över cut-offnivån i IgG-ELISAn, men har gammaglobulinvärden under 5 g/l. Av dessa utmärker sig särskilt en kalv som har en IgG-halt på 52 g/l, men en gammaglobulinhalt på strax över 4 g/l. Av de kalvar som kommer över 5 g/l i gammaglobulinhalt är alla utom en positiva i IgG-ELISAn. Enligt regressionsanalys finns en förklaringsgrad på 50 % ($p < 0,001$), vilket betyder en lägre överensstämmelse än den mellan totalprotein mätt med analog refraktometer och gammaglobulin.

Vid mätning av antigenspecifika antikroppar mot BAV-3 vid fyra till sex dagars ålder var 39 kalvar i kalvgruppen positiva, vid ett cut-offvärde på 10 PP. Värde saknas för en individ. Vid åtta veckors ålder har värdena sjunkit och 7 kalvar har blivit antikroppsnegativa, fyra kalvar har ökat i antikroppshalt vid den andra provtagningen. De antikroppsnegativa kalvarna hade alla fått råmjölk av kvalitet som var under cut-offvärdet på 22,5 % Brix. Jämförelse mellan halten adenovirusantikroppar vid 4-6 dagars ålder och gammaglobulinvärde visar en låg förklaringsgrad på 9 % ($p = 0,07$) vilket innebär att resultatet inte är signifikant. I Tabell 2, redovisas gammaglobulin- och totalproteinhalterna hos kalvarna, samt resultat av de

antigenspecifika ELISA-analyser som utförts. I Tabell 3 återfinns värden för de tio kalvar med högst respektive lägst gammaglobulinhalt i plasma.

Tabell 2. *Gammaglobulinhalt, totalproteinhalt samt värde för antigenspecifika ELISA-analyser i kalvplasma*

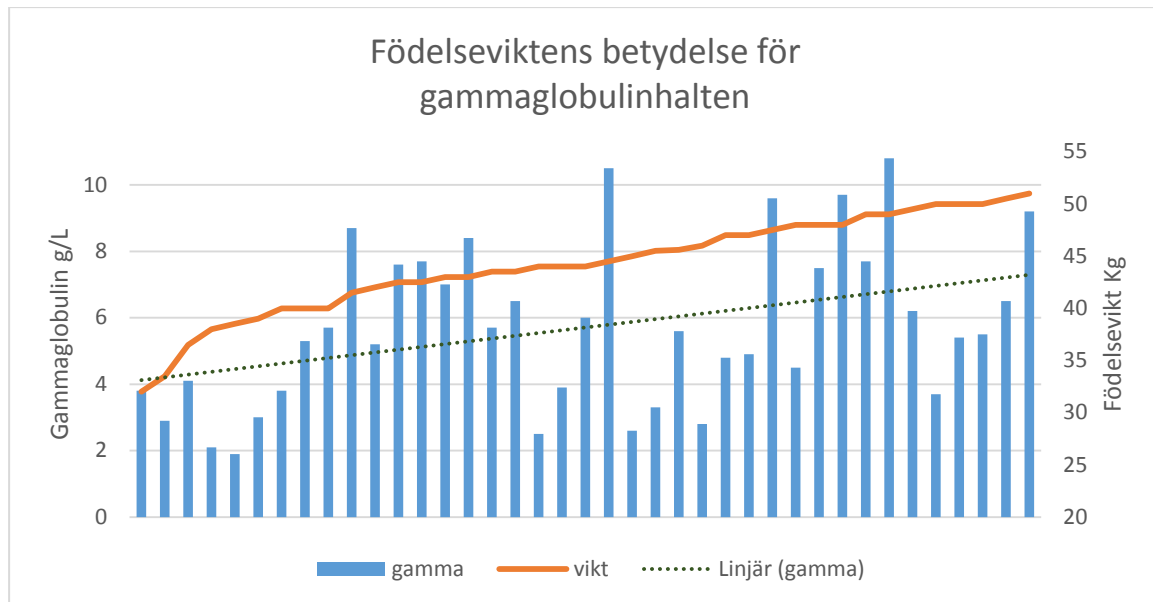
Kalvplasma, n=39	minimum	maximum	medel	
Gammaglobulin, g/l	1,9	10,8	5,7	23 kalvar > 5 g/l
Totalprotein, analog refraktometer g/l	48	72	57,9	21 kalvar > 58 g/l
BAV-3-antikroppar 4-6 dagar, %	20	132	94,7	39 kalvar > 10 % PP
BAV-3-antikroppar 8 veckor, %	2	110	51,8	33 kalvar > 10 % PP
BRSV-antikroppar 4-6 dagar, % (n=38)	0	155	70,2	29 kalvar > 10 % PP
BRSV-antikroppar 8 veckor, %	0	134	44,9	25 kalvar > 10 % PP
BCV-antikroppar 4-6 dagar, % (n=38)	10	121	81,8	38 kalvar > 10 % PP
BCV-antikroppar 8 veckor, %	0	88	45,4	32 kalvar > 10 % PP
Procentsats för antikroppsanalyser avser % av positiv kontroll för respektive ELISA. Prov vid 4-6 dagar saknas från en kalv				

Tabell 3. Värden för de tio kalvar som ligger högst i gammaglobulinhalt respektive de tio kalvar som ligger lägst. TP g/L avser totalprotein mätt med analog refraktometer. Specifika antikroppar anges i % av den positiva kontrollen på resp. ELISA-platta

Kalv	Födelsevikt (Kg)	Råmjölk (L)	Råmjölk (Brix %)	Gamma (g/L)	TP (g/L)	BAV 4-6 d	BAV 8 v	BRSV 4-6 d	BRSV 8 v	BCV 4-6 d	BCV 8 v
7111	49,0	2,0	25,7	10,8	67,0	117,0	79,0	155,0	133,0	71,0	35,0
131	44,5	2,5	24,2	10,5	72,0	95,0	108,0	151,0	134,0	99,0	88,0
7120	48,0	2,0	31,6	9,7	63,0	110,0	58,0	116,0	85,0	83,0	70,0
7126	47,5	2,5	27,2	9,6	61,0	95,0	21,0	116,0	56,0	89,0	42,0
134	41,5	saknas	23,2	8,7	65,0	118,0	46,0	97,0	52,0	110,0	71,0
141	43,0	2,5	19,6	8,4	62,0	105,0	30,0	1,0	0,0	88,0	46,0
7130	49,0	2,0	19,6	7,7	58,0	99,0	37,0	1,0	1,0	84,0	35,0
7116	42,5	saknas	21,5	7,7	66,0	132,0	82,0	98,0	60,0	106,0	69,0
7108	42,5	2,3	23,7	7,6	60,0	103,0	92,0	4,0	2,0	110,0	45,0
7118	48,0	2,5	23,4	7,5	59,0	109,0	57,0	142,0	11,0	91,0	59,0
Medel:	45,6	2,3	24,0	8,8	63,3	108,3	61,0	88,1	53,4	93,1	56,0
137	38,5	2,0	17,4	1,9	51,0	52,0	8,0	69,0	41,0	82,0	35,0
140	44,0	2,5	20,9	2,5	54,0	85,0	7,0	66,0	15,0	100,0	6,0
7110	45,0	1,5	24,0	2,6	55,0	65,0	74,0	68,0	32,0	26,0	3,0
138	46,0	2,0	20,3	2,8	51,0	102,0	10,0	100,0	49,0	107,0	65,0
128	33,5	1,5	20,3	2,9	53,0	78,0	49,0	2,0	1,0	47,0	9,0
7125	39,0	saknas	22,3	3,0	51,0	75,0	31,0	113,0	88,0	70,0	77,0
129	45,5	2,0	21,5	3,3	53,0	127,0	86,0	81,0	33,0	121,0	71,0
7128	40,0	saknas	19,9	3,7	48,0	73,0	2,0	0,0	2,0	81,0	32,0
7132	50,0	2,5	22,4	3,7	57,0	77,0	11,0	56,0	1,0	93,0	11,0
135	32,0	saknas	22,4	3,8	55,0	75,0	19,0	76,0	79,0	119,0	88,0
Medel:	41,4	2,1	21,1	3,0	52,8	80,9	29,7	63,1	34,1	84,6	39,7

Födelseviktens betydelse

Födelseviktens betydelse för gammaglobulinhalten är signifikant enligt regressionsanalys ($p < 0.001$), där de kalvar som väger mindre vid födseln också tenderar att ha en lägre nivå av gammaglobulin. Förklaringsgraden är dock låg, endast 18 %. Sambandet illustreras i Figur 5.



Figur 5. Kalvens födelsevikt jämfört med antikroppsupptag via råmjölken.

DISKUSSION

Resultaten för gammaglobulinhalt i kalvplasma visar att en övervägande del av kalvgruppen i detta försök har FPT vid en cut-off på 10 g/l. Många faktorer är involverade i upptaget av antikroppar från råmjölken utöver råmjölkskvalitet. Till exempel kan tidpunkten för råmjölksgivan ha betydelse, likaså mängden råmjölk (Quigley *et al.*, 2013; Mokhber-Dezfooli *et al.*, 2012). Detta är faktorer som inte tagits med i bedömningen i denna studie då data saknas för flera individer på dessa punkter.

Alla kalvar förefaller ha tagit upp antikroppar utifrån analys av antikroppar mot BAV-3 i plasma vid 4-6 dagars ålder, men sedan sjunker ett antal i antikroppshalt och vid åtta veckors ålder är flera kalvar under gränsen för ett positivt resultat. Alla kalvar som blivit antikroppsnegativa mellan de två provtagningstillfällena har fått en råmjölk med en totalproteinhalt under cut-offvärdet 22,5 % enligt mätning med Brix-refraktometern. Detta skulle kunna tyda på att de kalvar som fått råmjölk av bättre kvalitet också får ett mer varaktigt antikroppsskydd mot patogener som finns endemiskt i besättningen. Det förekommer också kalvar som fått råmjölk av sämre kvalitet, det vill säga under 22,5 % Brix, som ändå är starkt positiva för adenovirus vid åtta veckors ålder så resultatet är inte helt entydigt. Fyra individer har också ökat i antikroppar mot BAV-3 mellan första och andra mätningen varav en kalv fått råmjölk av sämre kvalitet (21,7 % Brix). Detta tyder på att dessa kalvar genomgått en infektion och bildat egna antikroppar. Enligt en studie utförd i Florida, USA, som undersökte faktorer som påverkar kalvhälsan från födelse till sex månaders ålder sågs ett starkt samband mellan låg totalproteinhalt och septikemi respektive pneumoni. De såg också att effekten av tillräckligt bra upptag av antikroppar från råmjölken kvarstod längre än man tidigare trott, åtminstone gällande mortalitet. I studien var risk ration för mortaliteten oförändrad upp till sex månaders ålder (Donovan *et al.*, 1998). Dessa resultat styrker teorin att varaktigheten i antikroppsskyddet stärks vid ett högre intag av antikroppar post partum.

Då Brix-refraktometern jämförs med totalproteinhalten i råmjölken uppmätt på laboratoriet på Kungsängens försöksgård, nås en betydligt högre överensstämmelse enligt regressionsanalysen, än då värdena från kolostrometermätningarna jämfördes med totalproteinhalten i en föregående studie av Östlund (2012). Brix-refraktometern har utvärderats i andra försök och resultaten visade att den har en god överensstämmelse med validerade metoder (Bielmann *et al.*, 2010; Quigley *et al.*, 2013). I Bielmans studie (2010), testades två Brix-refraktometrar, en digital och en analog, dels mot varandra och dels mot RID vilket utgjorde gold-standard i försöket. Resultatet blev att de båda refraktometertyperna hade mycket god korrelation till varandra och även god överensstämmelse med RID samt en specificitet och sensitivitet på 85 respektive 90 % vid en cut-off på 22 % för Brix-refraktometern (Bielmann *et al.*, 2010). Även Quigley *et al.* (2013) har rapporterat hög korrelation mellan Brix-refraktometer och RID; regressionsanalys visade en överensstämmelse på 75 %. Resultaten i denna studie, tillsammans med de fynd som gjorts i Bielmans (2010) och Quigleys (2013) studier visar att Brix-refraktometern ger en sannare

bild av IgG-halten i råmjölken än vad kolostrometern gör.

Jämförelsen mellan kolostrometer och Brix-refraktometer vid analys av råmjölk, visar på intressanta resultat där kolostrometern visar falskt låga värden i sex fall, framför allt då det gäller råmjölk av hög kvalitet. Fem falskt höga resultat finns också i mätningarna. Det innebär att elva, d.v.s. 30,6 %, av kolostrometermätningarna är felaktiga. Jämfört med en tidigare svensk undersökning där man fann att kolostrometern hade en felmarginal på 8 % (Liberg, 2000) är resultatet i denna studie slående. Resultatet överensstämmer dock relativt bra med en studie som undersökt kolostrometers specificitet och sensitivitet jämfört med RID för att bedöma råmjölkskvaliteten. Där fann man att kolostrometern visade fel i så mycket som en tredjedel av fallen, vid en cut-off på 1050 g/l (Weaver *et al.*, 2000). Detta utgör ett problem då det inte går att lita på att kolostrometern ger ett tillförlitligt resultat och risken finns att råmjölk av god kvalitet kasseras alternativt att kalvar riskerar att få en råmjölk av undermålig kvalitet. Det är viktigt att den metod som används i besättningar ger ett så tillförlitligt resultat som möjligt om det skall vara värt att lägga tid på att testa råmjölken som ges till kalvarna. I detta fall verkar Brix-refraktometern visa ett resultat som i de flesta fall överensstämmer med gammaglobulinvärdena.

Vid användning av Brix-refraktometern i plasmaproverna nås en förklaringsgrad på 96 % jämfört med analog refraktometer. Totalprotein i plasma mätt med analog refraktometer stämmer överens med gammaglobulinfraktionen till 70 % vilket får ses som en god förklaringsgrad och det gör att Brix-refraktometern kan anses fungera även vid mätning i plasma. Den IgG-ELISA som utförts på Kungsängens Försöksgårds laboratorium överensstämmer dåligt med elektroforesens gammaglobulinvärde enligt regressionsanalys. En låg förklaringsgrad indikerar att IgG-ELISAn är mindre tillförlitlig än mätning med refraktometer (analog eller digital).

Sambandet mellan födelsevikt och gammaglobulinhalt är statistiskt signifikant i denna studie där högre födelsevikt är gynnsamt för halten gammaglobulin i blodet, men förklaringsgraden är låg. Resultatet överensstämmer med en annan studie där kalvar med högre födelsevikt visades ha ett högre upptag av antikroppar, troligen på grund av att de kunde (äta) inta större mängd råmjölk (Vasseur *et al.*, 2009).

Någon rasskillnad i råmjölkskvalitet påvisades inte här, vilket överensstämmer med resultat från en tidigare svensk studie (Liberg, 2000). Inte heller Morrill *et al.* (2012) fann någon skillnad i IgG-halt mellan holsteinkor och jerseykor i en amerikansk studie. En norsk studie påvisar snarare en tendens till kraftig individskillnad i IgG-innehåll i råmjölken än en verklig skillnad mellan olika raser (Gulliksen *et al.*, 2008). Andra har visat att det råder skillnader

mellan raser och att kons ras påverkar råmjölkskvaliteten. I en studie jämfördes fem olika raser avseende IgG-halt i råmjölken där störst skillnad sågs mellan jerseykor, som låg högst i IgG-halt, och holsteinkor som låg lägst (Muller *et al.*, 1981). En kohortstudie som jämförde guernseykor med holsteinkor visar att guernseykorna hade högre halt IgG i råmjölken (Tyler *et al.*, 1999). Ytterligare en studie visar på att rasskillnad föreligger, men där har holsteinkorna högre halt IgG-antikroppar i råmjölken än både jersey- och brown swisskor (Shearer *et al.*, 1992).

SVA utförde en ELISA-analys för totalhalt IgG på råmjölk i detta försök. (Bovine IgG ELISA Kit 8010, Alpha Diagnostic International), men metoden fungerade inte. Varför det inte fungerade är oklart då testen utfördes enligt fabrikantens anvisningar samt kördes om efter att de första resultaten inte kunde användas. Inte heller det andra försöket fick användbara resultat.

SLUTSATSER

Den digitala Brix-refraktometern är ett bra alternativ för analys av råmjölkskvalitet i fält med en god överensstämmelse med totalprotein i råmjölk mätt med infraröd spektroskopi.

Kolostrometern klassificerade 31 % av råmjölksproverna på fel sida om cut-off vilket är för högt för att metoden ska anses tillförlitlig.

Upp till en tredjedel av de kalvar som fått råmjölk av sämre kvalitet enligt Brix-refraktometern har förlorat sina antigenspecifika antikroppar vid 8 veckors ålder.

Födelsevikten verkar ha en mindre betydelse för kalvens möjlighet att ta upp antikroppar på ett tillfredsställande sätt.

Några rasskillnader avseende råmjölkskvalitet kunde inte påvisas i den här studien.

En stor andel av kalvarna i denna studie har en alltför låg antikroppshalt i blodet enligt mätning av gammaglobulin med elektrofores.

REFERENSER

Alley, M.L., Haines, D.M. & Smith, G.W. (2012). Short communication: Evaluation of serum immunoglobulin G concentrations using an automated turbidimetric immunoassay in dairy calves. *Journal of Dairy Science*. 95:4596-4599.

Beam, A.L., Lombard, J.E., Koprak, C.A., Garber, L.P., Winter, A.L., Hicks, J.A. & Shtaler, J.L. (2009). Prevalence of failure of passive transfer of immunity in newborn heifer calves and associated management practices on US dairy operations. 2009. *Journal of Dairy Science*. 92:3973-3980.

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:-3713-3721.

Bradley, J.A. & Niilo, L. (1984). A reevaluation of routine force-feeding of dam's colostrum to normal newborn beef calves. *Canadian Veterinary Journal*. 25:121-125.

Bradley, J.A. & Niilo, L. (1985). Immunoglobulin transfer and weight gains in suckled beef calves force-fed stored colostrum. *Canadian Journal of Comparative Medicine*. 49:152-155.

Chelack, B.J., Morley, P.S. & Haines, D.M. (1993). Evaluation of methods for dehydration of bovine colostrum for total replacement of normal colostrum in calves. *Canadian Veterinary Journal*. 34:407-412.

Donovan, G.A., Dohoo, I.R., Montgomery, D.M. & Bennett, FL. (1998). Associations between passive immunity and morbidity and mortality in dairy heifers in Florida, USA. *Preventive Veterinary Medicine*. 34:31-46.

Fidler, A.P., Alley, M.L. & Smith, G.W. (2011). Short communication: Serum immunoglobulin G and total protein concentrations in dairy calves fed a colostrum-replacement product. *Journal of Dairy Science*. 94:3609-3612.

Fecteau, G., Arsenault, J., Paré, J., Van Metre, D.C., Holmberg, C.A. & Smith, B.P. (2013). Prediction of serum IgG concentration by indirect techniques with adjustment for age and clinical and laboratory covariates in critically ill newborn calves. *The Canadian Journal of Veterinary Research*. 77:89-94.

Godden, S.M., Haines, D.M., Konkol, K. & Peterson, J. (2009). Improving passive transfer of immunoglobulins in calves. II: Interaction between feeding method and volume of colostrum fed. *Journal of Dairy Science*. 92:1758-1764.

Gulliksen, S.M., Lie, K.I., Sölveröd, L. & Österås, O. (2008). Risk factors associated with colostrum quality in Norwegian dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 91:704-712.

Hammon, H.M., Steinhoff-Wagner, J., Flor, J., Schönhusen, U. & Metges C.C. (2012). Lactation biology symposium: Role of colostrum and colostrum components on glucose metabolism in neonatal calves. *Journal of Animal Science*. 91:685-695.

Holmgren, J. & Svennerholm, A-M. (1973). Enzyme-linked immunosorbent assays for cholera serology. *Infection and Immunity*. 5:759-763.

Hopkins, B.A. & Quigley, J.D. (1997). Effects of method of colostrum feeding and colostrum supplementation on concentrations of immunoglobulin G in the serum of neonatal calves. *Journal of Dairy Science*. 80:979-983.

Jaster, E.H. (2005). Evaluation of quality, quantity and timing of colostrum feeding on immunoglobulin G1 absorption in Jersey calves. *Journal of Dairy Science*. 88:296-302.

Liberg, P. (2000). Råmjölksutfodring – En god start förlänger livet. *Veterinärmötet*, s. 133-139.

Li-Chan, E.C.Y. & Kummer, A. (1997). Influence of standards and antibodies in immunochemical assays for quantitation of immunoglobulin G in bovine milk. *Journal of Dairy Science*. 80:1038-1046.

Lorenz, I., Mee, J.F., Earley, B. & More, S.J. (2011). Calf health from birth to weaning. I. General aspects of disease prevention. *Irish Veterinary Journal*. 64:10.

Marnila, P. & Korhonen, H. (2011). Colostrum. *Encyclopedia of Dairy Sciences (second edition)*. Elsevier. 591-597.

Molla, A. (1980). Estimation of bovine colostrum immunoglobulins by refractometry. *Veterinary Records*. 107(2):35-6.

Mokhber-Dezfooli, M.R., Nouri, M., Rasekh, M. & Constable, P.D. (2012). Effect of abomasal emptying rate on the apparent efficiency of colostrum immunoglobulin G absorption in neonatal Holstein-Friesian calves. *Journal of Dairy Science*. 95:6740-6740.

Morin, D.E., Constable, P.D., Maunsell, F.P. & McCoy, G.C. (2001). Factors associated with colostrum specific gravity in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 84:937-943.

Morrill, K.M., Conrad, E., Lago, A., Campbell, J., Quigley, J. & Tyler, H. (2012). Nationwide evaluation of quality and composition of colostrum on dairy farms in the United States. *Journal of Dairy Science*. 95:3997-4005.

Muller, L.D. & Ellinger, D.K. (1981). Colostrum immunoglobulin concentrations among breeds of dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 64:1727-30.

Nilsson, D. (2014). *Faktorer av betydelse för högt respektive lågt upptag av immunoglobuliner från råmjölk hos hinkuppfödda kalvar*. Examensarbete i veterinärmedicin vid Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap. Sveriges Lantbruksuniversitet, Uppsala.

Paré, J., Thurmond, M.C., Gardner, I.A. & Picanso, J.P. (1993). Effect of birthweight, total protein, serum IgG and packed cell volume on risk of neonatal diarrhea in calves on two California dairies. *The Canadian Journal of Veterinary Research*. 57:241-246.

Quigley, J.D., Drewry, J.J. (1998). Symposium: Practical considerations of transition cow and calf management. Nutrient and immunity transfer from cow to calf pre- and postcalving. *Journal of Dairy Science*, 81:2779-2790.

Quigley, J.D., Lago, A., Chapman, C., Erickson, P. & Polo, J. (2013). Evaluation of the Brix refractometer to estimate immunoglobulin G concentration in bovine colostrum. *Journal of Dairy Science*, 96:1148-1155.

Sacerdote, P., Mussano, F., Franchi, S., Panerai, A.E., Bussolati, G., Carossa, S., Bartonelli, A. & Bussolati, B. (2013). Biological components in a standardized derivative of bovine colostrum. *Journal of Dairy Science*. 96:1745-1754.

Shearer, J., Mohammed, H.O., Brenneman, J.S. & Tran, T.Q. (1992). Factors associated with concentrations of immunoglobulins in colostrum at the first milking post-calving. *Preventive Veterinary Medicine*. 14:143-154.

Smith, T. & Little, R. (1922). The significance of colostrum to the new-born calf. *Journal of Experimental Medicine*. 31:36(2):181-98.

Stilwell, G. & Carvalho, R. (2011). Clinical outcome of calves with failure of passive transfer as diagnosed by a commercially available IgG quick test kit. *Canadian Veterinary Journal*. 52:524-526.

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 disease. *Preventive Veterinary Medicine*. 58:179-197.

Trotz-Williams, L.A., Leslie, K.E. & Peregrine, A.S. (2008). Passive immunity in Ontario dairy calves and investigation of its association with calf management practices. *Journal of dairy science*. 91:3840-3849.

Tyler, J.W., Hancock, D.D., Parish, S.M., Rea, D.E., Besser, T.E., Sanders, S.G. & Wilson, L.K. (1996). Evaluation of 3 assays for failure of passive transfer in calves. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 10(5):304-7.

Tyler, J.W., Steevens, B.J., Hostetler, D.E., Holle, J.M. & Denbigh, J.L.Jr. (1999). Colostral

immunoglobulin concentrations in Holstein and Guernsey cows. *American Journal of Veterinary Research*. 60:1136-9.

Vasseur, E., Rushen, J. & de Passillé, A.M. (2009). Does a calf's motivation to ingest colostrum depend on time since birth, calf vigor, or provision of heat? *American Dairy Science Association*. 92:3915-3921.

Vetter, A., Argüello, A., Baumrucker, C. & Bruckmaier, R.M. (2013). Short communication: Fractional milking distribution of immunoglobulin G and other constituents in colostrum. *Journal of Dairy Science*. 96:5919-5922.

de Verdier Klingenberg, K., Vågsholm, I. & Alenius, S. (1999). Incidence of diarrhea among calves after strict closure and eradication of bovine viral diarrhea virus infection in a dairy herd. *Journal of American Veterinary Medical Association*. 214:1824-1828.

Vogels, Z., Chuck, G.M. & Morton, J.M. (2013). Failure of transfer of passive immunity and agammaglobulinaemia in calves in south-west Victorian dairy herds: prevalence and risk factors. *Australian Veterinary Journal*, 91:150-158.

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. *Canadian Veterinary Journal*. 47:573-575.

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*, 14:569-577.

Östlund, T. (2012). *IgG-koncentrationen i plasma hos spädkalvar i förhållande till kvaliteten hos den första råmjölken och kalvarnas hälsa och tillväxt*. Examensarbete i husdjursvetenskap vid Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap. Sveriges Lantbruksuniversitet, Uppsala.