



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2017 30 stp
Fakultet for biovitenskap

Evaluering av et Brix-refraktometer for å måle konsentrasjonen av immunglobulin G (IgG) i blodserum hos nyfødte kalver av rasen Norsk Rødt Fe (NRF)

Evaluation of a Brix refractometer to measure the concentration of immunoglobulin G (IgG) in blood serum in newborn calves of Norwegian Red (NR)

Marte Marie Taralrud
Husdyrvitenskap

Forord

Formålet med denne oppgaven var å undersøke om det digitale Brix-refraktometeret Milwaukee kunne benyttes til å måle konsentrasjonen av immunglobulin G (IgG) i blodserum hos kalv ved 1-3 og omkring ti dagers alder. I tillegg ble det undersøkt om IgG-konsentrasjonen i råmelk, tidspunktet og mengden råmelk ved første tildeling hadde effekt på IgG-konsentrasjon i kalvenes blodserum ved kjemisk analyse.

Masteroppgaven ble gjennomført ved fakultet for biovitenskap ved Norges miljø og biovitenskapelige universitet (NMBU). Jeg har alltid hatt stor interesse for dyr, og derfor ble det naturlig å velge naturbruk på videregående for å kunne kombinere denne interessen og studiekompetanse. Etter å ha skrevet bacheloroppgave om melkefôring av kalv, fikk jeg et stort ønske om å fortsette å skrive om kalv i masteroppgaven.

Jeg vil rette en stor takk til hovedveilederne professor Odd Magne Harstad og førsteamanuensis Erling Thuen for at dere utsatte pensjoneringen og økte arbeidsmengden, slik at jeg fikk veiledere til oppgaven. Videre vil jeg rette en stor takk til biveileder Åse Margrethe Sogstad i TINE SA, som ordnet alt ved gjennomføringen av oppgaven. Alt fra å lære meg opp i blodprøvetaking, til å veilede meg under skriveprosessen.

En takk går også til Liv Sølverød og Marie Vatne ved Mastittlaboratoriet i Molde, for analyseringen av serumprøvene. Videre vil jeg takke Julie Johnsen ved Veterinærinstituttet, for hjelp med blodprøvetakingen og for at jeg fikk resultatene på råmelkskvaliteten. Jeg vil også takke Olav Østerås i TINE SA for hjelp med de statistiske analysene i oppgaven.

Vil også takke TINE SA for at jeg fikk tildelt TINE-stipendet til min masteroppgave. Uten den økonomiske støtten gjennom stipendet hadde ikke masteroppgaven fått det samme omfanget.

Til slutt vil jeg takke Karoline Hol, Karoline Holte, Tonje Heggertveit og Elisabeth Vintermyr. Uten dere hadde det ikke blitt noe blodig alvor av blodprøvetakingen eller med skrivingen. Til slutt vil jeg rette en takk til familie og venner for hjelp, støtte og motivasjon.

Ås, 12.05.2017

Marte Marie Taralrud

Sammendrag

Hovedformålet med masteroppgaven var å evaluere om det digitale Brix-refraktometeret Milwaukee kunne benyttes til å måle konsentrasjonen av immunglobulin G (IgG) i blodserum hos kalver ved 1-3 og omkring ti dagers alder. Refraktometeret benyttes av mange bønder og andre til å måle IgG-konsentrasjonen i råmelken, og det ville være nyttig om det kunne benyttes til å undersøke om kalven har absorbert tilstrekkelige mengder IgG. Dette er viktig fordi kalver er født uten immunforsvar, og er avhengig av å få overført immunstoffer fra kyrnes råmelk etter fødsel for å være beskyttet mot sykdommer. Brix-refraktometeret sender lys gjennom væsken som analyseres og beregner prøvens tørrstoffinnhold, og dermed vil alle molekylene i væsken påvirke Brix-verdiene. Tørrstoffinnholdet blir angitt som prosent.

I forsøket ble det tatt en blodprøve av 67 kalver ved 1-3 dagers alder, og 39 kalver omkring ti dagers alder. Blodprøvene stod 1-2 timer til koagulering, før de ble sentrifugert. Deretter ble 3-4 dråper blodserum pipettert og målt på refraktometeret. Det resterende blodserumet ble fryst ved -20 °C og sendt til Mastittlaboratoriet i Molde for «Radial Immunodiffusion Test» (RID). Resultatene fra RID-analysen ble satt som standarden for IgG-konsentrasjonen i serumprøvene. Resultatene viste at det var signifikant korrelasjon mellom Brix-verdier (%) og IgG-konsentrasjon i blodserum (g/l) fra RID-analyse ved både 1-3 og omkring ti dagers alder. Resultatene viser at refraktometeret trolig kan benyttes til å måle IgG-konsentrasjonen i blodserum. Resultatene fra første blodprøveuttak viste at det bør anbefales å gjennomføre blodprøvetakingen ved to dagers alder sammenlignet med en og tre dagers alder. Resultatene viste at det var en signifikant sammenheng i IgG-konsentrasjon fra RID-analyse mellom blodprøvene tatt ved første (1-3 dagers alder) og andre (omkring ti dagers alder) prøveuttak.

Ved første blodprøveuttak ble også tatt en parallell blodprøve av 37 kalver som ble satt til bunnfelling i romtemperatur i ca. 24 timer, for å undersøke om det var mulig å gjennomføre slike målinger uten å ha tilgang til sentrifuge. Resultatene viste at refraktometeret gir de samme Brix-verdiene for bunnfelling og sentrifugering, og det er ikke nødvendig å sentrifugere. Videre ble det undersøkt om det var sammenheng i Brix-verdier (%) fra ferskt og fryst blodserum, og resultatene viste at serumprøvene ikke ble påvirket av frysing før analysering.

Det ble også undersøkt om det var noen sammenheng mellom råmelkskvalitet, tidspunktet og mengden ved første tildeling av råmelk og IgG-konsentrasjon blodserum ved RID-analyse. Råmelkskvaliteten forklarte 30 % av variasjonen i IgG-konsentrasjon i blodserum. Majoriteten av kalvene fikk tildelt det første måltidet i løpet av to timer etter fødsel, derfor var det vanskelig

å si noe om sammenhengen. Resultatene viste at kalver som drakk tre liter råmelk ved første tildeling hadde høyere IgG-konsentrasjonen i blodserum enn kalvene som drakk en, to, fire eller fem liter.

Abstract

The main purpose of this master thesis was to evaluate the digital Brix refractometer Milwaukee. Whether it could be used to measure the concentration of immunoglobulin G (IgG) in blood serum in calves at 1-3 and around ten days of age. If this is possible, the refractometer could be used to investigate whether calves have absorbed sufficient amounts of IgG. This is important because calves are born without a functioning immune system. They are therefore dependent on antibodies being transferred via the colostrum to be protected against diseases. The Brix refractometer sends light through the liquid and calculates the sample solids content (%), thus all the molecules in the fluid will affect the Brix values.

In the experiment, a blood sample of 67 calves was taken at 1-3 days of age and a blood sample of 39 calves about ten days of age. The blood samples had one to two hours to settle before centrifugation. 3-4 drops of blood serum were then tested on the refractometer. The remaining blood serum was frozen at -20 °C for 1-4 months and sent to Mastittlaboratoriet in Molde for “Radial Immunodiffusion Test” (RID). The results from the RID were used as a standard for the IgG concentration in the serum samples. There was significant correlation between Brix values and IgG concentration from RID at 1-3 days of age and around ten days of age. This indicate that the refractometer can be used to measure the IgG concentration in the blood serum. Furthermore, it should be recommended to perform blood sampling at two days of age compared to one and three days of age. The results showed that there was a significant correlation between IgG concentration in the first (1-3 days of age) and second (ten days of age) blood samples.

At the first sampling, a parallel sample was taken from 37 calves, to investigate whether it was possible to carry out such tests without a centrifuge. The results show that the refractometer gives the same Brix values for passive precipitation and centrifugation. That is, there is no need for centrifugation of the samples. Furthermore, it was investigated whether there was a relationship in Brix values from fresh and frozen blood serum. The results showed that serum samples were not affected by freezing.

It was also investigated whether there was any correlation between colostrum quality, the amount and timing of first allocation of colostrum and IgG concentration in the blood serum of the calf. The colostrum quality explained 30 % of the variation in IgG concentration in blood serum. It was difficult to tell if the timing had effect since most of the calves were fed the first meal within two hours of birth. Calves awarded three liters of colostrum at first allocation had

the highest IgG concentration in blood serum compared with calves that drank one, two, four or five liters.

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Sammendrag	II
Abstract	IV
1. Innledning	1
2. Spedkalvens immunsystem og råmelkens betydning, og metoder for å måle immunglobulinkonsentrasjon i råmelk og blodserum	3
2.1. Råmelk.....	4
2.1.1. Produksjon og kjemisk innhold i råmelk	4
2.1.2. Råmelkens betydning for kalvens immunforsvar.....	6
2.1.3. Opptak av IgG fra tarmen	8
2.1.4. Råmelkskvalitet	10
2.1.5. Effekt av tid fra fødsel til første melkemåltid.....	15
2.1.6. Råmelkstildeling	16
2.1.7. Årsaker til lav IgG-konsentrasjon i blodserum.....	19
2.2. Metoder for å måle IgG-konsentrasjon i råmelk og blodserum.....	21
2.2.1. Kjemiske analyser	21
2.2.2. Kolostrometer	24
2.2.3. Refraktometer	25
3. Material og metode	28
3.1. Gjennomføring av forsøket.....	28
3.2. Forsøksdyr	28
3.3. Refraktometeret Milwaukee	29
3.4. Blodprøvetaking	30
3.4.1. Praktisk gjennomføring	30
3.4.2. Metodestudier med refraktometeret Milwaukee	31
3.4.3. Alder og antall prøver ved første blodprøveuttak	32
3.4.4. Alder og antall prøver ved andre blodprøveuttak	32
3.5. Måling av IgG-konsentrasjon i blodserum med Milwaukee	32
3.6. Kjemisk analyse av blodserum ved «Radial Immunodiffusion Test».....	33
3.7. Beregninger	34
3.8. Statistikk	34
4. Resultater	35
4.1. Metodestudier med refraktometeret Milwaukee.....	35
4.1.1. Sammenligning av Brix-verdier fra bunnfelt og sentrifugert blodserum	35

4.1.2. Sammenligning av Brix-verdier fra ferskt og fryst blodserum.....	36
4.2. Sammenhengen mellom Brix-verdier fra refraktometeret Milwaukee og IgG-konsentrasjon i blodserum ved kjemisk analyse (RID)	37
4.2.1. Sammenhengen mellom Brix-verdier og IgG-konsentrasjon ved kjemisk analyse ved første blodprøveuttak	37
4.2.2. Sammenhengen mellom Brix-verdier og IgG-konsentrasjon ved kjemisk analyse ved andre blodprøveuttak	41
4.2.3. Sammenhengen mellom IgG-konsentrasjon i blodserum ved kjemisk analyse ved første og andre blodprøveuttak	43
4.3. Råmelkskvalitet	44
4.3.1. Effekt av laktasjonsnummer på råmelkskvaliteten	45
4.4. Overføring av IgG fra råmelk til kalvens blodserum	46
4.4.1. Effekt av IgG-konsentrasjon i råmelk på kalvens IgG-konsentrasjon i blodserum.....	46
4.4.2. Effekt av tiden fra fødsel til første råmelkstildeling på kalvenes IgG-konsentrasjon i blodserum	47
4.4.3. Effekt av mengde råmelk ved første tildeling på kalvens IgG-konsentrasjon i blodserum ..	48
5. Diskusjon.....	49
5.1. Material og metode	49
5.1.1. Datamaterialet	49
5.1.2. Refraktometeret Milwaukee	50
5.1.3. Metodestudier med refraktometeret Milwaukee	51
5.1.4. Usikkerhet ved «Radial Immunodiffusion Test»	52
5.2. Sammenhengen mellom Brix-verdier og IgG-konsentrasjon ved kjemisk analyse av blodserum ved første blodprøve	53
5.3. Sammenheng mellom Brix-verdier og IgG-konsentrasjon ved kjemisk analyse av blodserum ved andre blodprøve	55
5.4. Råmelkskvalitet, overføring av IgG fra råmelk til kalvenes blodserum og immunstatus ved 1-3 dagers alder.....	57
5.4.1. Råmelkens IgG-konsentrasjon	57
5.4.2. Overføring av IgG fra råmelk til kalvens blodserum.....	60
5.4.3. Effekt av råmelkskvalitet, tidspunktet og mengden råmelk ved første tildeling	61
6. Konklusjon.....	63
7. Litteraturliste.....	65

1. Innledning

I takt med en global befolkningsvekst, må matproduksjonen øke for å dekke behovet for mat (NATO, 2011). Food and Agriculture Organization of the United Nations (OECD/FAO, 2012) skrev i sin rapport om framtidsutsiktene i landbruket, at matproduksjonen i verden må øke med 60 % de neste 40 årene for å møte behovet for mat. For å nå dette målet er det essensielt med friske dyr med høy produksjon. Et høyt antibiotika-forbruk kan øke risikoen for at bakterier blir resistente mot behandlingene (Veterinærinstituttet, 2015). Bakterier som i dag blir sett på som ufarlige kan ved multiresistens gi fatale følger for dyr og mennesker. Det er derfor viktig at forbruket av antibiotika holdes på et absolutt minimum. Dette kan bare skje gjennom systematisk forebyggende helsearbeid og forsvarlig antibiotika-bruk (Veterinærinstituttet, u.å.).

Et av de viktigste forebyggende tiltakene i storfenæringen er å sørge for at råmelken har tilfredsstillende innhold av immunstoffer, og at kalven får i seg tilstrekkelige mengder råmelk. På grunn av morkakens oppbygging er kalver født uten immunforsvar, og det gjør at de nyfødte kalvene svært utsatt for bakterier og virus (Sjaastad et al., 2010). Råmelk inneholder immunstoffer som gir de nyfødte kalvene et passivt immunforsvar, som beskytter mot sykdommer de første kritiske ukene før det aktive immunsystemet etableres (Sjaastad et al., 2010). En god overføring av immunstoffer fra råmelk til avkom kan være med på å redusere forekomsten av de vanlige kalvesykdommene (Grøndahl et al., 2011).

Det er mange ulike immunstoffer i råmelken, men immunglobulin G (IgG) er den kvantitativt viktigste for kalvens passive immunsystem, og brukes derfor som et mål på råmelkskvaliteten (Sjaastad et al., 2010). Konsentrasjonen av IgG i råmelken varierer mye mellom og innad i besetningene. Noen faktorer som påvirker innholdet er rase, laktasjonsnummer, mengden råmelk produsert til første utmelking og utmelkingstidspunkt etter kalving (Gulliksen et al., 2008). Råmelk av god kvalitet skal ha en IgG-konsentrasjon på mer enn 50 g/l (Bartier et al., 2015). Generelt er det mange norske kyr som har en IgG-konsentrasjon lavere enn 50 g/l, og har dermed for dårlig råmelkskvalitet (Gulliksen et al., 2008). Det er ønskelig at IgG-konsentrasjonen kalvens i blodserum blir høyere enn 10 g/l for tilstrekkelig beskyttelse mot sykdom. For å lykkes med dette er det viktig å tildele kalven tilstrekkelig mengde råmelk av god kvalitet like etter fødsel (Morrill et al., 2013).

Kvaliteten på råmelken kan ikke anslås med det blotte øye, og det er derfor utviklet måleinstrumenter som kolostrometer og refraktometer for å måle råmelkskvaliteten (Dragset & Whist, 2015). Bonden kan benytte seg av disse instrumentene i fjøset, og får et hurtig svar på

kvaliteten. Ved å måle kvaliteten med et kolostrometer blir råmelk helt i en sylinder, og kvaliteten avgjøres etter hvor langt kolostrometeret synker ned i sylindere (Heinrichs & Jones, 2011). Refraktometer er et annet verktøy som måler råmelkskvaliteten og finnes i to varianter, optisk og digitalt. Begge variantene måler lysbrytning gjennom væsken som blir analysert, og kan benyttes til å måle protein-, sukker- eller mineralinnhold i en væske (Heinrichs & Jones, 2011).

Brix er en skala som benyttes av noen refraktometre, og det måler tørrstoffinnholdet i væsken som blir analysert. Flere forsøk viser at Brix-refraktometre kan benyttes til å måle IgG-konsentrasjonen i blodserum hos kalv (Morrill et al., 2013; Deelen et al., 2014; Thornhill et al., 2015). Dette betyr at veterinærer kan benytte et refraktometer som en hurtig test på innholdet av IgG i blodserum hos kalver i besetninger som sliter med kalvehelsen, istedenfor å sende prøvene til kjemisk analyse. De ulike typene refraktometer fungerer og estimerer innholdet på ulik måte, og derfor er det viktig å teste de ulike typene refraktometer opp mot kjemiske analyser av IgG i råmelk og i blodserum.

TINE SA selger et refraktometer med produktnavnet Milwaukee til bønder og andre som har behov for å måle IgG-konsentrasjonen i råmelk, som apparatet primært benyttes til. Milwaukee er et digitalt Brix-refraktometer som angir verdiene som prosentandelen tørrstoff (Milwaukee Instruments, u.å.). Det har tidligere blitt gjennomført en studie med refraktometeret for å undersøke sammenhengen mellom Brix-verdi (%) og IgG-konsentrasjon ved kjemisk analyse i råmelk (Dragset & Whist, 2015). Firmaet som selger Milwaukee til TINE SA, henviser til en studie hvor de målte IgG-konsentrasjonen i blodserum med et annet refraktometer som ikke angir resultatene som Brix (%) når dokumentasjon blir etterspurt (Hansen & Valbjørn, 2005).

Hovedformålet med denne oppgaven er å vurdere om Milwaukee er et Brix-refraktometer som kan benyttes til å måle konsentrasjonen av IgG i blodserum hos kalver ved 1-3 dagers alder og omkring ti dagers alder. Det ble tatt blodprøve av 67 kalver slik at blodserum fra de kunne testes på refraktometeret og sammenlignes med IgG-konsentrasjonen ved kjemisk analyse.

Hypoteser:

- Milwaukee kan benyttes til å måle IgG-konsentrasjon i blodserum hos kalver ved 1-3 dagers alder
- Milwaukee kan benyttes til å måle IgG-konsentrasjonen i blodserum hos kalver omkring ti dagers alder
- IgG-konsentrasjon i råmelk, tidspunktet og mengden råmelk ved første tildeling har stor påvirkning på kalvenes IgG-konsentrasjon ved kjemisk analyse ved 1-3 dagers alder

2. Spedkalvens immunsystem og råmelkens betydning, og metoder for å måle immunglobulinkonsentrasjon i råmelk og blodserum

Kalven er framtiden i fjøset, men de første leveukene er kritisk for kalven. Kalven er sårbar når den kommer ut til en ny verden, hvor den blir utsatt for endringer i næringstilførsel og miljø (Strudsholm & Sejrsen, 2003). Den kommer fra et bakteriefritt og varmt miljø, og blir ved fødselen utsatt for utallige bakterier og temperaturforandringer. Det er en stor påkjenning for kalven, og derfor er det viktig å gi den en så god start på livet som mulig. Selv om kalvene er avgjørende for fremtidens produksjon, får de ikke alltid en optimal føring og stell (Gulliksen, 2010).

Kalveperioden er definert som perioden fra kalven blir født og frem til seks måneders alder (Hansen et al., 2009). Melkefôringsperioden varer normalt fram til åtte ukers alder, mens råmelksperioden blir ved praktisk tilnærming definert som de fem første dagene etter fødsel (Hansen et al., 2009). Kalvene er født med veldig små næringslagre, og er avhengig av å få i seg næring så fort som mulig etter fødsel (Strudsholm & Sejrsen, 2003). Råmelken inneholder i tillegg til essensielle næringsstoffer, immunstoffer, som er livsnødvendig for kalvens utvikling av et passivt immunforsvar (Heinrichs & Jones, 2003). Storfe er et av flere pattedyr som ikke får overført immunstoffer i fosterlivet, noe som skyldes morkakens oppbygning. Derfor er kalven i praksis født uten immunforsvar, og overføring av immunstoffer fra råmelk over til kalven er ekstremt viktig for kalvens beskyttelse mot skadelige mikroorganismer.

Det finnes flere typer immunstoffer i råmelken, men det er to som er de kvantitativt viktigste for kalvens beskyttelse mot sykdom. Immunglobulin G (IgG) blir absorbert fra tynntarmen og overføres til blodserumet, mens immunglobulin A (IgA) virker hovedsakelig lokalt i tarmen (Sjaastad et al., 2010). Kalven absorberer IgG gjennom tarmveggene en kort periode etter fødsel, og det er flere faktorer som gjør at det er stor variasjon i IgG-konsentrasjonen i blodserum mellom kalver. Det er særlig tre faktorer som påvirker kalvens passive immunitet; kvalitet på råmelken, tiden fra fødsel til første tildeling av råmelk, og mengden råmelk kalven blir tildelt ved det første målet og døgnet (Nybø et al., 2003).

2.1. Råmelk

2.1.1. Produksjon og kjemisk innhold i råmelk

Råmelk blir ved praktisk tilnærming definert som den melken som kyrne produserer de første fem dagene etter fødsel, men i litteraturen regnes kun den første utmelkingen som råmelk (Hansen et al., 2009). Det kjemiske innholdet i råmelken skiller seg fra melk som blir produsert senere i laktasjonen (tabell 1). Råmelk inneholder en blanding av næringsstoffer som er produsert i juret og komponenter fra blodserum (Godden, 2008). Kyrne begynner å forberede melkeproduksjonen flere uker før kalving ved påvirkning av viktige hormoner, som for eksempel prolaktin.

Tabell 1: Innhold av ulike næringsstoffer, immunstoffer og hormoner i råmelk ved første utmelking, i overgangsmelk ved andre og tredje utmelking og i vanlig helmelk ved sjette utmelking (Blum & Hammon, 2000; Godden, 2008).

Utmelkingsnummer	Råmelk	Overgangsmelk (fra råmelk til helmelk)		Helmelk
	1	2	3	6
Tørrstoff (%)	23,9	17,9	14,1	12,9
Fett (%)	6,7	5,4	3,9	4,0
Total protein (%)	14,0	8,4	5,1	3,1
Kasein (%)	4,8	4,3	3,8	2,5
Albumin (%)	6,0	4,2	2,4	0,5
Immunglobuliner (%)	6,0	4,2	2,4	0,09
IgG (g/l)	81	58	17	0,6
Laktose (%)	2,7	3,9	4,4	5,0
IGF-I (µg/L)	341	242	144	15
Insulin (µg/L)	65,9	34,8	15,8	1,1
Aske (%)	1,11	0,95	0,87	0,74
Kalsium (%)	0,26	0,15	0,15	0,13
Magnesium (%)	0,04	0,01	0,01	0,01
Sink (mg/100 mL)	1,22	-	0,62	0,3
Mangan (mg/100 mL)	0,02	-	0,01	0,004
Jern (mg/100 mL)	0,2	-	-	0,05
Kobolt (µg/100 g)	0,5	-	-	0,1
Vitamin A (µg/100 mL)	295	190	113	34
Vitamin E (µg/g fett)	84	76	56	15
Riboflavin (µg/mL)	4,83	2,71	1,85	1,47
Vitamin B12 (µg/100 mL)	4,9	-	2,5	0,6
Folsyre (µg/100 mL)	0,8	-	0,2	0,2
Kolin (mg/mL)	0,7	0,34	0,23	0,13

Tabell 1 viser at den kjemiske sammensetningen i melken endres betydelig gjennom den første uken etter fødsel. Konsentrasjonen av mange av komponentene i råmelken er høyest ved første utmelking etter fødsel, for så å reduseres gradvis til de når innholdet i vanlig helmelk (Godden, 2008).

Råmelken har dobbelt så høyt tørrstoffinnhold som vanlig melk, og inneholder mye av viktige næringsstoffer som energi, proteiner, vitaminer og mineraler. Disse næringsstoffene er viktige for utvikling av muskelmasse, øke stoffskiftet og stimulere fordøyelsesaktiviteten til kalven (Heinrichs & Jones, 2003). Selv om innholdet av laktose er lavere i råmelken sammenlignet med helmelk, er energien fra laktose og fett essensielt for en velfungerende temperaturregulering hos kalven rett etter fødsel (Godden, 2008). Sammensetningen av næringsstoffene i råmelken er viktig for å dekke den nyfødte kalvens næringsbehov, spesielt for næringsstoffer som i liten grad har blitt overført i fosterlivet (Kehoe et al., 2007). Fettløselige vitaminer og mange mineraler blir i liten grad overført til kalven i fosterlivet, derfor har råmelken et høyt nivå av disse næringsstoffene (Heinrichs & Jones, 2003; Kehoe et al., 2007).

Kyrne akkumulerer immunstoffer i melkekjertlene i løpet av sinperioden, noe som fører til at innholdet er høyere i råmelk enn i vanlig helmelk (Godden, 2008). Transporten av immunstoffer fra blodserum over til melkekjertlene begynner flere uker før kalving ved stimulering av hormonet prolaktin. Overføringen øker ytterligere noen dager før fødselen setter i gang (McGuirk & Collins, 2004). Umiddelbart etter fødsel vil stimuleringen av prolaktin opphøre, og det vil ikke overføres immunstoffer til melkekjertlene. Prolaktin er et hormon som øker kraftig under drektighetsperioden, og som i tillegg til å påvirke overføring av immunstoffer, stimulerer til utvikling av juret og melkeproduksjon (Godden, 2008).

Andre viktige komponenter i råmelken er vekstfaktorer, andre hormoner og uspesifikke antimikrobielle faktorer som laktoferrin, lysozym og laktoperoksidase (Godden, 2008). Innholdet av oligosakkarider i råmelken kan beskytte kalven mot skadelige bakterier, ved å fungere som konkurrerende inhibitorer for bindestedene i epiteloverflaten i tarmen (Godden, 2008). I tillegg inneholder råmelken store mengder trypsin-inhibitorer, som skal beskytte immunstoffene og andre proteiner fra proteolytisk nedbrytning av fordøyelsesenzymene trypsin og chymotrypsin i tynntarmen (Strudsholm & Sejrsen, 2003).

2.1.2. Råmelkens betydning for kalvens immunforsvar

I fjøsmiljøet finnes det er stort antall potensielt sjukdomsframkallende mikroorganismer (Sjaastad et al., 2010). Patogene agens er definert som mikroorganismer som kan gi sykdom hvis de får etablere seg i kroppen (Sjaastad et al., 2010). Kroppens immunsystem angriper alt den ser på som fremmed, og bekjemper mange patogene agens lenge før de får mulighet til å etablere seg og utvikle sykdom. De mest vanlige infeksjonene som produksjonsdyr blir utsatt for er forårsaket av bakterier, virus eller protozoer.

På grunn av morkakens struktur og funksjon får ikke kalvene overført immunstoffer i løpet av fostertiden, og immunsystemet til kalven er derfor dårlig utviklet ved fødsel (Bourne et al., 1978; Sjaastad et al., 2010). På grunn av den lave immuniteten ved fødsel, vil det i praksis si at kalven er født uten immunforsvar. Passiv immunitet er en midlertidig immunitet, som kalvene oppnår ved å absorbere immunstoffer fra kyrnes råmelk. Denne formen for immunitet varer bare noen uker, og immunstoffene blir gradvis brutt ned i blodserum (Sjaastad et al., 2010).

Immunstoffer

Immunstoffer blir også kalt antistoffer eller immunglobuliner (Ig), og de utgjør ca. 20 % av proteinene i blodplasma (Hansen et al., 2009; Sjaastad et al., 2010; Abbas et al., 2014). B-lymfocytene kan lage flere typer antistoffer, som reagerer med spesifikke antigen som er festet utenpå cellemembran til virus. (Abbas et al., 2014). De ulike antistoffene fester seg kun til et spesifikt antigen, og derfor blir det produsert mange ulike typer. Når immunstoffene har bundet seg til et antigen, kan inntrengerne lettere oppdages av andre celler som fjerner de.

Immunstoffene er store proteiner, og er bygget opp av fire polypeptidkjeder. Det er to identiske tunge kjeder og to identiske lette kjeder (Abbas et al., 2014). De fire kjedene danner en Y-formet struktur, hvor antistoffet har to seter til antigenbinding og den siste enden er halen (Korhonen et al., 2000). Antistoffer som inneholder ulike tunge polypeptidkjeder tilhører ulike klasser eller isotyper, og de har sitt navn ut fra den tunge kjeden de består av. Det finnes fem ulike klasser og de kalles IgM, IgD, IgG, IgE og IgA. Hver klasse har ulike fysiologiske og biologiske egenskaper, og funksjoner (Abbas et al., 2014).

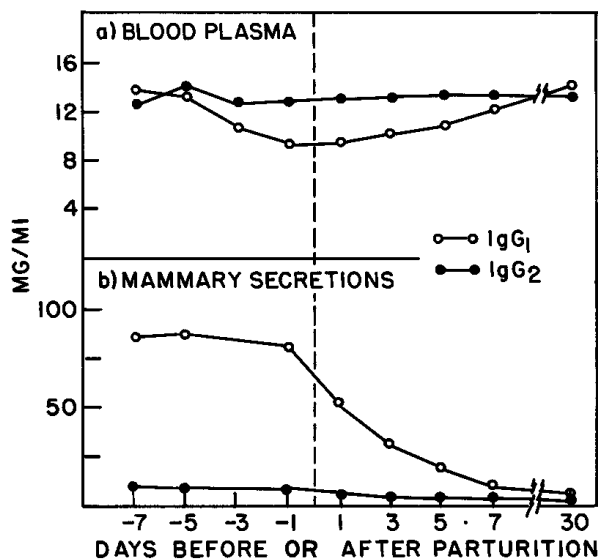
Råmelken inneholder klassene IgG, IgM og IgA, og innholdet er henholdsvis ca. 85-90 %, 7 % og 5 % av det totale immunstoffinnholdet (Godden, 2008). De små mengdene med IgM og IgA blir i hovedsak hentet fra lokal syntese av plasmaceller i melkekjertlene, mens IgG blir overført

fra kuas blodserum over til melkekjertlene (Strudsholm & Sejrsen, 2003). Kua produserer immunstoffer som er tilpasset det miljøet hun oppholder seg i, og dermed vil kalven få overført immunstoffer som gjør den tilpasset det smittepresset den vokser opp i (Hansen et al., 2009).

Halveringstiden til IgG i blodserumet hos kalvene er lengre enn for IgA og IgM (Hurley & Theil, 2011). IgG har en halveringstid på 1-3 uker, mens IgA og IgM har en halveringstid på 1-2 dager.

Immunglobulin G

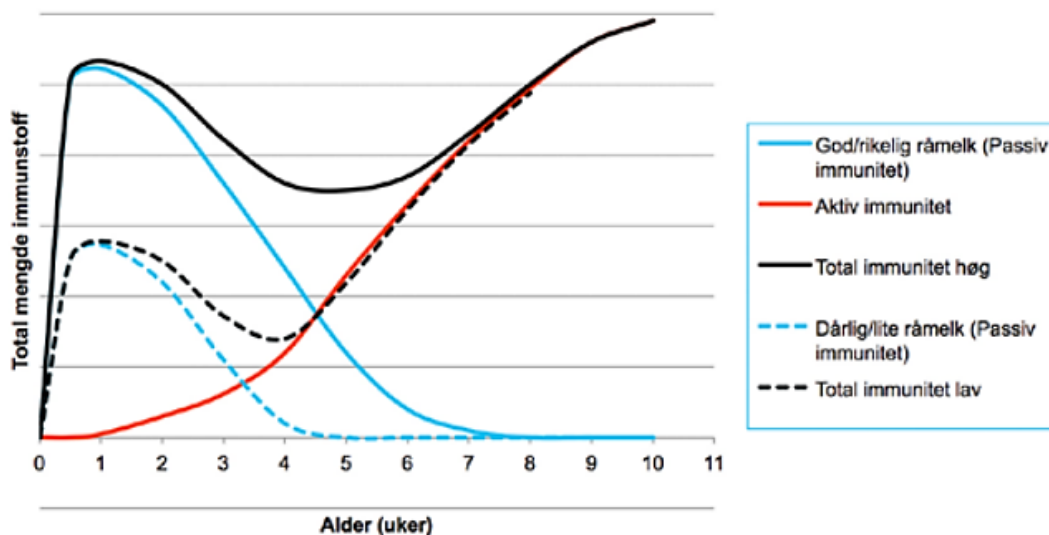
Immunglobulin G er en klasse som består av fire subklasser. Disse kalles IgG₁, IgG₂, IgG₃ og IgG₄, og navnet er avhengig av typen tung polypeptidkjede (Abbas et al., 2014). Hos storfe er



Figur 1: Innholdet av IgG₁ og IgG₂ i blodplasma hos kyrne og i råmelk (Sasaki et al., 1976).

subklassene IgG₁ og IgG₂ de som blir overført til råmelken (Sasaki et al., 1976; Korhonen et al., 2000). IgG₁ blir selektivt tatt opp fra blodserum og transportert inn i melkekjertlene, hvor det utgjør 80-90 % av det totale IgG-innholdet (Weaver et al., 2000; McGuirk & Collins, 2004). Forsøk har vist at IgG₁ og IgG₂ blir overført til råmelken med en ratio på 7:1, selv om innholdet i blodserumet hos kyrne er likt for de to subklassene (figur 1) (Sasaki et al., 1976).

Kalvens egenproduserte immunsystem, det aktive immunsystemet, begynner ikke å etablere seg før to til fire ukers alder (Chase et al., 2008). Det betyr at immuniteten får en liten knekk rundt 3-6 ukers alder, før egenproduksjonen av immunstoffer har kommet skikkelig i gang. Undersøkelser har vist at hos kalver med lav IgG-konsentrasjon i blodserum (<10 g/l) ved 24-48 timers alder, tar det lengre tid før det aktive immunsystemet utvikles enn hos kalver med høy IgG-konsentrasjon (>10 g/l) (Hansen et al., 2009). IgG har en nedbrytningstid på ca. 20 dager, og dermed vil kalvens passive immunitet være borte ved 4-7 ukers alder, avhengig av hvor mye den fikk overført rett etter fødsel (figur 2) (Overrein et al., 2015).



Figur 2: Kalvens utvikling av passiv, aktiv og total immunitet fra fødsel til ti ukers alder ved god/rikelig og dårlig/lite tildeling av IgG fra råmelk (Overrein et al., 2015).

2.1.3. Opptak av IgG fra tarmen

Tilstrekkelig overføring av immunstoffer fra råmelk til kalvens blodserum er viktig for å oppnå et sterkt passivt immunforsvar. Kalvene absorberer på det meste 25-30 % av immunstoffene som er i råmelken (Heinrichs & Jones, 2003). En lav konsentrasjon av IgG i kalvens blodserum kan gi økt risiko for sykdom hos kalven, fordi immunsystemet ikke greier å stå imot smittepresset. Man betrakter en blodserumkonsentrasjon høyere enn 10 g IgG/l som akseptabelt (Hansen, 2007). En blodserumkonsentrasjon lavere enn 10 g IgG/l betraktes som lavt, og blir betegnet som mislykket overføring av immunstoff («failure of passive transfer» (FPT)) (Quigley & Drewry, 1998; Hansen, 2007; Godden, 2008).

Det er flere faktorer som kan påvirke overføringen av immunstoffer fra morens råmelk til kalven. Faktorer som IgG-konsentrasjon i råmelken, tidspunktet og mengden råmelk ved første tildeling, samt bakterieinnhold i råmelken og stress hos kalven har stor betydning for kalvens passive immunstatus (Weaver et al., 2000; Godden, 2008).

Immunstoffene blir absorbert i tynntarmen som proteiner i sin opprinnelige form (Sjaastad et al., 2010). Kalvene har høyere pH i løypen og råmelken inneholder trypsin-inhibitorer som gjør at immunstoffene er beskyttet mot nedbrytning i fordøyelsessystemet det første døgnet (Havrevoll, 2002; Godden, 2008). Dette er viktige funksjoner, slik at mest mulig immunstoffer kan bli absorbert i tynntarmen (Stott et al., 1979b).

Immunstoffene i råmelken tas opp i tarmen ved hjelp av pinocytose. Pinocytose er en form for endocytose, hvor cellen tar opp væske eller løste substanser i ekstracellulærvæsken (Sjaastad et al., 2010). Cellen tar opp immunstoffene med små membranblærer, uten at stoffet kommer i direkte kontakt med det doble lipidlaget i membranen (Sand et al., 2001). Pinocytose blir også kalt celledriking, fordi det er lite selektivt på hva som blir absorbert (Sand et al., 2001). Immunstoffene blir absorbert fra tynntarmen med pinocytose av FcRn-reseptorer og sluppet ut i «lamina propria», og deretter tatt opp i lymfesystemet eller portalsirkulasjonen (Hurley & Theil, 2011). Et annet navn for denne reseptoren er «noenatal FC-reseptor», og den er også med på å frakte IgG fra blodserum over til melkekjertlene hos kyrne. Bindingen mellom IgG og reseptoren er pH-avhengig. Ved sur pH-verdi vil IgG binde seg bedre til reseptoren, mens ved basisk pH-verdi blir det dannet svake bindinger. Evnen til å absorbere immunstoffer som hele proteiner har tynntarmen omkring et døgn etter fødsel, før den nærmest opphører (Cortese, 2009; Hansen et al., 2009). Forsøk har vist at allerede fra seks timer etter fødsel, er absorpsjonen av IgG begrenset (Besser et al., 1985).

Forsøk har vist at alle typer myseproteiner i råmelken blir absorbert som hele proteiner i tynntarmen (Bush & Staley, 1980). Myseproteiner består av proteiner dannet i melkekjertlene som β -laktoglobulin og α -laktalbumin, samt proteiner som er overført fra blodserum som bovin serum albumin og immunstoffer (Strudsholm & Sejrsen, 2003). Kalvene har ikke ubegrenset absorpsjonskapasitet, og forsøk har vist at råmelk tilsatt bovint albumin ga redusert konsentrasjon av IgG₁ i blodserum (Besser et al., 1985; Besser & Osborn, 1993). I tynntarmen skjer det meste av absorpsjonen i jejunum, fordi der er tarmens mikrovilli mer utviklet enn i ileum. Bakterier som *E. coli*, blir absorbert på lik linje som myseproteinene og immunstoffene i tynntarmen (Bush & Staley, 1980). Derfor er det viktig med god hygiene og lavt bakterieinnhold i råmelken, slik at bakterier ikke reduserer absorpsjonskapasiteten av de viktige immunstoffene. Videre tildeling av råmelk etter at tarmen har sluttet å absorbere IgG, har vist seg å beskytte tarmene mot sykdomsfremkallende bakterier som *E. coli*. Dette kan de gjøre ved å hindre at bakteriene får fester seg til tarmveggen (Hansen et al., 2009).

Det er stor variasjon mellom kalvene på hvor høy IgG-konsentrasjon er i blodserum (Bush & Staley, 1980). Bush og Staley (1980) gjennomførte en litteraturstudie hvor de konkluderte at absorpsjonsgraden av IgM reduseres når inntaket øker, mens den totale absorpsjonen av IgG og IgA øker med økt konsentrasjon i råmelken. Dette fører til at konsentrasjonen av IgM i blodserum ikke blir høyere, selv om kalvene blir fôret med råmelk som har høy konsentrasjon.

I tillegg konkluderte de at effektiv absorpsjon av immunstoffer blir redusert ved forsinket tildeling av råmelk etter fødsel.

2.1.4. Råmelkskvalitet

Kvaliteten på råmelk er viktig for å lykkes med IgG-opptaket. Det er en positiv sammenheng mellom mengden immunstoffer i råmelken og mengden som er absorbert av kalven (Bush & Staley, 1980). Råmelk av god kvalitet blir definert som melk som har en IgG-konsentrasjon over 50 g/l (Godden, 2008; Gulliksen et al., 2008). En lavere konsentrasjon av IgG i råmelken kan gi økt risiko for mislykket overføring av IgG («failure of passive transfer» (FPT)) hos kalvene (Gulliksen et al., 2008). I tillegg til et høyt immunstoffinnhold, er det viktig å tenke på hygienen rundt utmelking for å redusere forurensing av skadelige bakterier, som kan bli absorbert på lik linje som immunstoffene (Bush & Staley, 1980). Siden kalvene absorberer omkring 1/4 av det totale immunstoffinnholdet like etter fødsel, er det viktig å sørge for at de får råmelk med et høyt immunstoffinnhold (Hansen et al., 2009).

Flere forsøk har vist at det er stor variasjon i IgG-konsentrasjon mellom kyr (Heinrichs & Jones, 2003; Gulliksen et al., 2008; Morin et al., 2010). Gulliksen et al. (2008) gjennomførte en studie hvor de fant at IgG-konsentrasjonen i råmelk blant Norsk Rødt Fe (NRF) varierte fra 4 til 235 g/l. Morin et al. (2010) gjennomførte et forsøk hvor IgG-konsentrasjon i råmelken varierte fra 9 til 121 g/l. En annen studie observerte en variasjon mellom 9 og 186 g IgG/l (Godden, 2008). Med en så stor variasjon i kvalitet er det ekstremt viktig å vite IgG-konsentrasjonen i råmelken som kalven får tildelt, slik at man er sikker på at kalven har mulighet til å oppnå et godt passivt immunforsvar.

Variasjon i IgG-konsentrasjon i råmelk mellom raser

Det har vært tidlig interesse for å studere om råmelkskvaliteten varierer mellom raser. Muller og Ellinger (1981) gjennomførte et forsøk med fem ulike raser for å undersøke om det var forskjell på immunstoffkonsentrasjonen i råmelken til de ulike rasene. Det ble tatt ut 3-4 kg råmelk umiddelbart etter kalving fra rasene Ayshire, Brown Swiss, Guernsey, Holstein og Jersey. Gjennomsnittlig immunstoffkonsentrasjon var henholdsvis 8,1, 6,6, 6,3, 5,6 og 9,0 % av totalprotein. Råmelk fra Jersey hadde høyest immunstoffkonsentrasjon, med høyt innhold av IgG, IgA og IgM. Råmelk fra Holstein hadde den laveste konsentrasjonen av IgG, og Guernseys hadde det laveste innholdet av IgA og IgM.

Forsøk med kyr i Norge viste at den gjennomsnittlige IgG-konsentrasjon i råmelken lå på 51,7 g/l, men 57,8 % av råmelksprøvene hadde en lavere konsentrasjon enn 50 g/l (Gulliksen et al., 2008). Morrill et al. (2012) gjennomførte et forsøk med 494 Holstein, 87 Jersey, 7 krysningsraser og 239 uidentifiserte melkeraser i USA. Resultatene viste at den gjennomsnittlige IgG-konsentrasjonen i råmelken var 68,8 g/l, og nesten 30 % av prøvene hadde en konsentrasjon lavere enn 50 g/l. Ut fra disse forsøkene kan det se ut som at kyr i USA har bedre råmelkskvalitet enn norske kyr. En grunn til dette kan være at forekomsten av sykdommer i Norge generelt er relativt lavt. I tillegg er det ikke forekomst av sykdommer som bovint virusdiarévirus (BVDV) i Norge, noe som er mer vanlig i flere andre europeiske land (Gulliksen et al., 2009a). Kyr som blir utsatt for høyt smittepress fra miljøet og sykdom, produserer mer antistoffer som blir overført til melken (Grøndahl et al., 2011).

I sammenligninger av Holstein og andre raser, har Holstein generelt hatt en lavere konsentrasjon av immunstoffer i råmelken (Pritchett et al., 1991). Strudsholm og Sejrsen (2003) hevdet at noe av forklaringen på dette kan være at Holstein produserer større mengder råmelk, noe som gir lavere konsentrasjon i melken. Jersey er kjent som rasen som har det høyeste tørrstoffinnholdet i melken sammenlignet med andre melkeraser, og har generelt høyere immunstoffkonsentrasjon i råmelken.

Effekt av sinperioden på IgG-konsentrasjon i råmelk

Det er mange faktorer som påvirker råmelkskvaliteten, og lengden og ernæringen i sinperioden er noen av faktorene som kan påvirke kvaliteten (Godden, 2008). I Norge anbefaler TINE Rådgiving en sinperiode på 60 dager for å forberede kyrne på neste laktasjon (Whist & Sølvørød, 2008). Rastani et al. (2005) konkluderte ut fra resultatene at en forkortet (< 21 dager) eller økt sinperiode (> 90 dager) ga dårligere råmelkskvalitet enn normal lengde på 57 dager. Watters et al. (2008) konkluderte fra sitt forsøk at en forkortet sintid på 34 dager ikke ga signifikant forskjell i IgG-konsentrasjon sammenlignet med en sintid på 57 dager.

Forsøk har vist at kalver som har fått råmelk fra kyr med restriktiv fôring av protein og energi gjennom sinperioden, har hatt 21,8 % lavere IgG-opptak enn kontrollgruppen (Quigley & Drewry, 1998). Andre forsøk har i motsetning konkludert at fôringen gjennom sintiden ikke har hatt effekt på IgG-konsentrasjonen i råmelken (Quigley & Drewry, 1998).

Holdutviklingen til kyrne gjennom sintiden kan også ha påvirkning på råmelkskvaliteten. Shearer et al. (1992) konkluderte at kyr som gikk opp i holdpoeng fra avsining til kalving hadde

signifikant høyere IgG-konsentrasjon i råmelken enn de som hadde stabilt eller fikk et dårligere hold gjennom sinperioden. Det er allikevel ikke anbefalt at kyrne får et høyt hold ved slutten av sinperioden, med tanke på melkeproduksjonen og fôropptaket i kommende laktasjon (Strudsholm & Sejrsen, 2003).

Effekt av laktasjonsnummer på IgG-konsentrasjon i råmelk

Laktasjonsnummer har vist seg å ha stor effekt på råmelkskvaliteten (Weaver et al., 2000; Gulliksen et al., 2008). Mange forsøk har konkludert at første- og andrekalvskyr har vesentlig dårligere råmelkskvalitet enn eldre kyr (Pritchett et al., 1991; Weaver et al., 2000; Gulliksen et al., 2008). Shearer et al. (1992) gjennomførte et forsøk med tre ulike raser for å studere årsaker til ulik råmelkskvalitet, og konkluderte at konsentrasjonen av IgG økte fram til tredje laktasjon. Kyrne i første laktasjon hadde signifikant lavere IgG-konsentrasjon enn kyr i andre laktasjon og eldre. Det ble ikke funnet signifikant forskjell i IgG-konsentrasjonen mellom kyr i tredje laktasjon og eldre kyr. Gulliksen et al. (2008) konkluderte også med at laktasjonsnummer hadde effekt, etter en undersøkelse av råmelkskvaliteten hos NRF. Kvaliteten økte mest fra kyr som var i første eller andre laktasjon til kyr som var i fjerde laktasjon eller eldre. Pritchett et al. (1991) konkluderte at kyr i andre laktasjon hadde signifikant lavere IgG-konsentrasjon enn kyr i første laktasjon.

Eldre kyr har vært utsatt for flere typer antigener lengre enn yngre, og produserer dermed mer antistoffer som blir overført til råmelken. Kyr produserer antistoffer mot antigener som de blir utsatt for fra miljøet. Dette gjør at innkjøpte kyr som har stått i et annet miljø, vil produsere andre antistoffer enn kyrne som har vært i besetningen over lengre tid (Hansen et al., 2009). Weaver et al. (2000) påpekte i en litteraturgjennomgang at det var en vanlig anbefaling å kaste råmelken fra førstekalvskyr, på grunn av lav IgG-konsentrasjon. Senere har forskere gått bort fra denne anbefalingen, siden store mengder råmelk ville bli kastet og at førstekalvskyr nødvendigvis ikke har dårligere kvalitet enn eldre kyr (Weaver et al., 2000; Gulliksen et al., 2008). I flere besetninger er det dessuten en utfordring at kyrne produserer for lite råmelk og alt må tas vare på (Sogstad, 2017, personlig meddelelse).

Effekt av tiden fra fødsel til første utmelking på IgG-konsentrasjon

Hvor lang tid det tar før kua blir melket første gang etter fødsel har betydning for IgG-konsentrasjonen i råmelken. IgG-konsentrasjonen er høyest umiddelbart etter fødsel, og blir gradvis redusert om første utmelking blir utsatt (Godden, 2008). Moore et al. (2005)

gjennomførte et forsøk med 13 melkekyr av rasen Holstein, for å se om tidspunktet for melking etter fødsel hadde betydning for IgG-konsentrasjon i råmelk. Kalvene ble tatt bort fra moren rett etter fødsel, og deretter ble kyrne delt inn i fire grupper som ble melket etter henholdsvis 2, 6, 10 og 14 timer etter fødsel. De fire gruppene hadde gjennomsnittlig 113, 92, 82 og 76 g IgG/l. Den gjennomsnittlige IgG-konsentrasjonen ved 10 og 14 timer var signifikant lavere enn i råmelken utmelket etter 2 og 6 timer. I tillegg var det signifikant lavere konsentrasjon av IgG ved 6 timer sammenlignet med 2 timer. Morin et al. (2010) konkluderte at IgG-konsentrasjonen i råmelken ble redusert med 3,7 % for hver time første utmelking ble utsatt etter fødsel, og at tiden fra fødsel til første utmelking forklarte 27 % av variasjonen i IgG-konsentrasjonen mellom kyr. Lekkasje under sinperioden eller etter fødsel før første utmelking, vil gi tap av immunstoffer (Heinrichs & Jones, 2003).

Effekt av mengden råmelk produsert til første utmelking på IgG-konsentrasjon

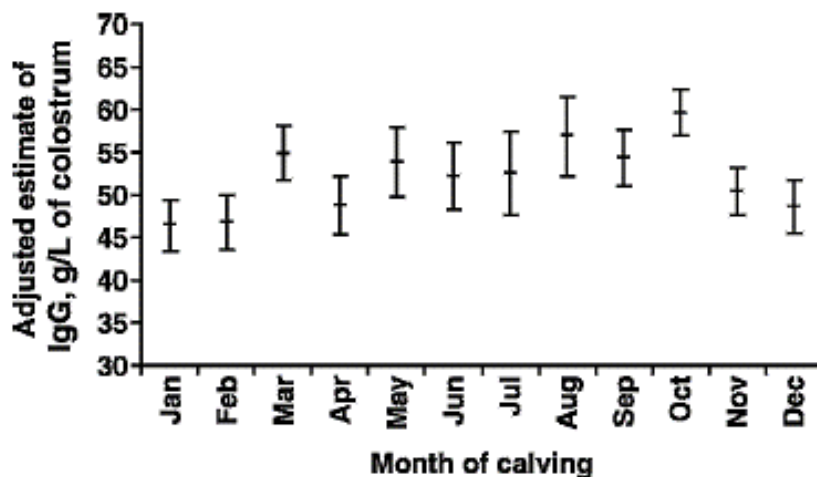
Det er stor variasjon i hvor mye råmelk kyrne produserer til første utmelking. McGuirk & Collins (2004) fant at melkemengden varierte mellom 2,8 til 26,5 liter hos melkekyr av rasen Holstein. Pritchett et al. (1991) konkluderte at melkemengden ved første utmelking hadde signifikant effekt på IgG-konsentrasjonen i råmelken. Forsøket viste at kyr som melket mindre enn 8,5 kg råmelk ved første utmelking, hadde signifikant høyere konsentrasjon av IgG₁ enn de som melket mer. Dette resultatet gjaldt alle kyr uansett laktasjonsnummer, men var tydeligst hos kyr i andre laktasjon. Innholdet av IgG₁ ble kraftig redusert når melkemengden økte. Den samme konklusjonen trakk Morin et al. (2010) fra resultatene hvor kvaliteten varierte mellom <10 og 120 g IgG/l, avhengig av mengden ved første utmelking. Med økt melkemengde blir innholdet av IgG fortynnet, og konsentrasjonen blir dermed lavere (Morin et al., 2010). Weaver et al. (2000) hevdet at mengden råmelk kunne brukes som et hjelpemiddel for å selektere hva som er god og dårlig råmelkskvalitet.

Variasjoner gjennom året på råmelkens IgG-konsentrasjon

Pritchett et al. (1991) gjennomførte en studie med 900 Holstein-kyr, og konkluderte at det ikke var signifikant effekt av årstiden på råmelkskvaliteten. Morin et al. (2010) dro samme konklusjon i et forsøk hvor kyrne ble delt inn i grupper som ble eksponert for kort-, lang- eller naturlig lyslengde. Andre forsøk har derimot konkludert med at det er variasjon i IgG-konsentrasjonen gjennom året. Resultatene fra et forsøk gjennomført av Shearer et al. (1992),

viste at det var en signifikant høyere IgG-konsentrasjon i råmelken i august og september sammenlignet med resten av året.

Gulliksen et al. (2008) konkluderte fra forsøk i Norge, at kyr som kalvet i løpet av vintermånedene hadde signifikant lavere IgG-konsentrasjon enn kyr som kalvet i de andre månedene (figur 3). Gulliksen et al. (2008) hevdet at sesongvariasjonen mulig var viktigere i Norge enn i andre land. Klimaforskjellene gjennom året er mye større i Norge enn i mange andre land, og dette gir stor variasjon på fôrrasjon, sykdom og miljøet hvor kyrne oppholder seg. I løpet av sommeren er det krav om at kyrne skal gå ute på beite i minst åtte uker, og det kan gjøre at kyrne blir utsatt for flere og andre typer agens enn om vinteren. Dette kan være mulige årsaker til at råmelken ser ut til å ha høyere IgG-konsentrasjon om sommeren sammenlignet med vinteren (Gulliksen et al., 2008).



Figur 3: Sesongvariasjon i IgG-konsentrasjon i råmelk (Gulliksen et al., 2008).

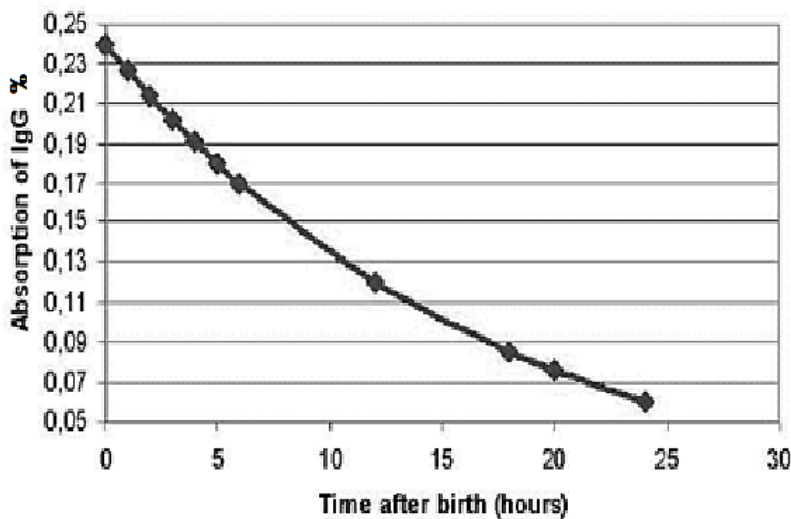
Effekt av mastitt på IgG-konsentrasjonen i råmelk

Effekten av å fôre kalvene med mastittmelk er uklar (Kesler, 1981). Maunsell et al. (1998) gjennomførte et forsøk for å se om mastitt i sinperioden har effekt på volum og sammensetningen av råmelk hos Holstein-kyr. Det ble tatt prøver fra juret ved 14 og 7 dager før fødsel, og innen tre timer etter fødsel. Prøvene ble analysert for unormaliteter og testet med California Mastitis Test (CMT), som er en metode for å teste om kyrne har høyt celledtall i melken. I tillegg ble IgG₁-konsentrasjonen i råmelken og melkemengden målt umiddelbart etter fødsel. Fra resultatene ble det konkludert at mastitt i sinperioden ga noe lavere melkemengde fra infiserte melkekjerteler sammenlignet med friske. Det forklarte at den totale mengden IgG₁ var lavere, selv om konsentrasjonen i råmelken var den samme fra de infiserte og friske

melkekjertlene. Selv om mastitt i melkekjertelen ikke påvirker råmelkens IgG₁-konsentrasjon, kan fôring med mastittmelk øke smittepresset ved melkesøl og spredning av bakteriene i fjøset (Overrein et al., 2015). Forsøk har vist at forekomsten av bakterien *S. agalactiae* var høyere hos kyr som ble fôret med mastittmelk som kalv (McDougall et al., 2009).

2.1.5. Effekt av tid fra fødsel til første melkematid

Hvor raskt kalvene får tildelt råmelk etter fødsel har avgjørende betydning for hvor mye IgG som blir absorbert i kalvenes tynntarm (figur 4) (Quigley & Drewry, 1998; Godden, 2008). Kalvens tynntarm mister sin permeabilitet til å absorbere store molekyler ved 24-30 timer etter fødsel (Stott et al., 1979a; Bush & Staley, 1980). Etter 12 timers alder er tarmens evne til å



Figur 4: Endring i opptak av IgG (prosent opptak av total IgG-konsentrasjon i råmelken) ved pinocytose i timene etter fødsel (Hansen et al., 2009).

absorbere immunstoffer halvert, noe som betyr at det er viktig å fôre kalvene med råmelk raskt etter fødsel (Bush & Staley, 1980; Hansen et al., 2009). Ved 12 timers alder har sekresjonen av fordøyelsesenzymer økt markant, og det fører til at immunstoffene blir brutt ned til aminosyrer (Quigley & Drewry, 1998).

Rajala og Castrén (1995) gjennomførte en studie hvor de så på sammenhengen mellom kalvenes konsentrasjon av IgG i blodserum og helse. De konkluderte at for hver halvtime den første råmelkstildelingen ble forsinket, ble konsentrasjonen av IgG redusert med 2 g/l. Et annet forsøk konkluderte at råmelkstildelt ved 0, 6 og 12 timer etter fødsel, ga høyere konsentrasjon av IgG i blodserum enn tildeling ved 0 og 12 timers etter fødsel (Morin et al., 1997). Forsøket viste også at en dobling av mengden råmelk fra 2 til 4 liter ved fødsel ga høyere konsentrasjonen av IgG i blodserum. Stott et al. (1979a) observerte at kalvene som fikk utsatt første tildeling til etter 12 timers alder hadde høy risiko for å dø.

2.1.6. Råmelkstildeling

I følge norske forskrifter skal kalven fôres med tilstrekkelig mengde råmelk så snart som mulig etter fødsel og senest innen seks timer (Lovdata, 2004). Det står også i forskriftene at kalvene skal fôres minst to ganger daglig. Hva som er tilstrekkelig mengde råmelk er dermed opp til den enkelte produsent å avgjøre, og dette kan forklare hvorfor det er store forskjeller på råmelkstildelingen mellom besetningene (Nybø et al., 2003). Kalver i økologisk produksjon skal ifølge forskriftene gå sammen med kua i minimum tre dager etter fødsel (Mattilsynet, 2005).

I dagens konvensjonelle melkeproduksjon er det vanlig å ta kalven bort fra kua rett etter fødsel og fôre kalvene med flaske, bøtte eller sonde, mens det i kjøttproduksjon er vanlig å la kalvene amme kua helt til avvenning (Grøndahl et al., 2011).

TINE SA (2015) anbefaler på sin hjemmeside å fokusere på tre faktorer for å gi kalven en god start på livet; nok råmelk, god kvalitet på tildelt råmelk og rask tildeling av råmelk etter fødsel. De anbefaler å gi alle kalvene minst fire liter råmelk av god kvalitet innen to timer etter fødsel. Det er anbefalt å ha råmelk av god kvalitet i fryseren, slik at man har noe i bakhånd om noen kyr har lav IgG-konsentrasjon eller det er problemer med utmelking etter fødsel. Fra et forsøk med ulik råmelksmengde av god kvalitet rett etter fødsel, konkluderte Morin et al. (1997) at kalver som fikk fire liter råmelk etter fødsel hadde høyere IgG-konsentrasjon i blodserum sammenlignet med de som fikk tildelt to liter, når IgG-konsentrasjonen i kalvenes blodserum ble undersøkt etter 48 timers alder.

I brosjyren «Godt kalveoppdrett» av TINE Rådgiving, er anbefalingen at alle kalvene skal ha råmelk med en IgG-konsentrasjon på minst 50 g/l (Overrein et al., 2015). Det blir også fremhevet at man ikke bør stole på at kalvene får i seg nok råmelk ved amming. Mengden råmelk som anbefales å tildele kalvene er 8,5 % av kroppsvekten, som betyr at en kalv på 40 kg må tildeles 3,5 liter råmelk så fort som mulig etter fødsel eller innenfor to timer. Videre anbefales det at kalvene som ikke får i seg mer enn en liter ved første tildeling burde sondefôres, og at kalvene må tildeles ytterligere 3-4 liter i løpet av det første døgnet.

Tidligere ble bøndene anbefalt å gi kalvene 1,0 dl/kg levendevekt ved første tildeling, fordi mer enn 1,5 liter kunne overfylle løypen og man mente at dette kunne forårsake diaré. Nybø et al. (2003) gjennomførte et forsøk hos 55 produsenter med i alt 764 kalver i Nord-Trøndelag, hvor de undersøkte sammenhengen mellom råmelksrutiner og kalvenes immunitet. Resultatene viste

at kalvene burde få i seg minst seks liter råmelk i løpet av det første levedøgnet for å oppnå en tilfredsstillende IgG-konsentrasjon (tabell 2). Videre ble det konkludert at kalvene burde få tildelt råmelk etter appetitt ved første måltid, og argumenterte med overfylling av løypen kun var relevant når fordøyelsen hadde stabilisert seg etter noen dagers alder. Derimot viste resultatene til Gulliksen et al. (2009a) at kalver som fikk mer enn to liter råmelk ved første tildeling hadde høyest forekomst av diaré. Videre konkluderte Nybø et al. (2003) at produsenter som ga kalvene råmelk innen to timer etter kalving, hadde den høyeste gjennomsnittlige IgG-konsentrasjonen.

Tabell 2: Effekt av ulike råmelksrutiner på immunstoffkonsentrasjonen i blodserum (Nybø et al., 2003).

Mengde i løpet av første døgnet		Mengde ved første tildeling		Tidspunkt ved første tildeling	
Mengde	Immunstoff i blodserum g/l	Mengde	Immunstoff i blodserum g/l	Tidspunkt	Immunstoff i blodserum g/l
1-3 liter	7,82	Maks 1 liter	6,22	Straks etter kalving	8,92
4-5 liter	9,40	Maks 2 liter	7,81	Straks etter kalving om dagen, ved neste fjøsstell om natta	7,6
6 liter eller mer	11,06	Etter appetitt	9,84	Ved neste fjøsstell	7,37

Godden (2008) påpekte at eksperter hadde beregnet at kalvene burde fôres med minst 100 g IgG ved første tildeling. Ut fra de resultatene betyr det at kvaliteten på råmelken avgjør hvor mye råmelk kalvene burde tildeles ved første mål. Er kvaliteten under 50 g IgG/l, må produsentene kompensere ved å gi kalvene mer råmelk for å oppnå en tilfredsstillende IgG-konsentrasjon i blodserum. Eksempelvis vil en tildeling på to liter råmelk med en IgG-konsentrasjon på 50 g/l, gi den samme mengden IgG som fire liter råmelk med en IgG-konsentrasjon på 25 g/l.

Faber et al. (2005) gjennomførte en studie hvor det ble undersøkt om det var sammenheng mellom to ulike råmelksmengder umiddelbart etter fødsel og senere melkeytelse. Det ble født 68 Brown Swiss kviger, som tilfeldig ble delt inn i to grupper hvor 37 kalver ble tildelt to liter råmelk ved første tildeling, mens 31 kalver ble tildelt fire liter. Kalvene ble tildelt råmelk med en IgG-konsentrasjon på 50-140 g/l. I de gjenværende fôringene i råmelksperioden ble begge gruppene fôret med den samme råmelken. Etter avvenning og fram til fødsel ble alle kvigene plassert i samme bing, hvor de ble tildelt den samme rasjonen.

Resultatene viste at et råmelksinntak på fire sammenlignet med to liter råmelk, ga 160 dollar mer i økte produksjonsinntekter og 15 dollar lavere veterinærkostnader i løpet av perioden. Kalvene som fikk tildelt fire liter råmelk hadde signifikant høyere daglig tilvekst (230 g) enn gruppen som fikk to liter (tabell 3). Faber et al. (2005) konkluderte at å føre kalver med fire liter istedenfor to liter, ga kyr som produserte vesentlig mer melk. Resultatene fra forsøket kan tyde på at det bør vurderes å gi kalvene minst fire liter råmelk umiddelbart etter fødsel, fordi det kan ha effekt på senere melkeytelse.

Tabell 3: Effekten av mengde råmelk på gjennomsnittlig daglig tilvekst i kvigeperioden, melkeavdrått i 1. laktasjon og 2. laktasjon (Faber et al., 2005).

Effekter av råmelkstildelingen	Mengde råmelk liter/dag	
	2	4
Gjennomsnittlig daglig tilvekst, kg/dag	0,8	1,03
Estimert 305-dagers EKM 1. laktasjon, kg	8 952	9 907
Estimert 305-dagers EKM 2. laktasjon, kg	9 642	11 294
Gjennomsnittlig melkemengde, kg/dag	26,9	27,8

I et annet forsøk så de på sammenhengen mellom immunstatus hos kalven ved 24-48 timers alder og melkeproduksjon i første laktasjon (DeNise et al., 1989). Fra forsøket ble det konkludert at det var en positiv sammenheng mellom immunstatus og melkemengde ved første laktasjon, men de kunne ikke si om konsentrasjonen av IgG hadde en direkte eller indirekte sammenheng med melkeproduksjonen. Allikevel ble det hevdet at tilstrekkelig mengde råmelk av god kvalitet til riktig tid kunne øke kvigenes fremtidige melkeproduksjon.

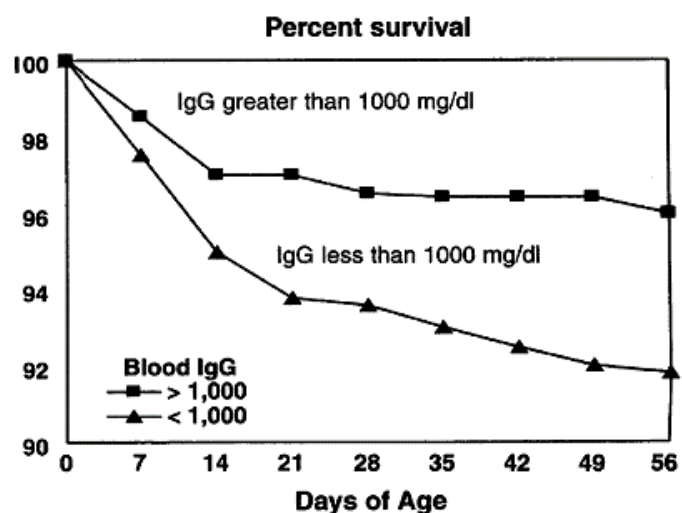
Kua kan overføre mange smittestoffer til kalven, derfor kan mange tiårs praksis med å ta bort kalven fra moren umiddelbart etter fødsel være noe av årsaken til at Norge sjeldent er rammet av utbrudd med paratuberkulose (Grøndahl et al., 2011). Økologiske produsenter må ifølge forskriftene la kalven gå med kua i tre døgn før de kan skilles (Mattilsynet, 2005). I litteraturen har det vært ulikt syn på om kalven burde gå med moren etter fødsel eller ikke. Det har blitt rapportert at en stor andel av kalvene i USA som diet moren hadde en IgG-konsentrasjon i blodserum lavere enn 10 g/l (FPT) (Godden, 2008). Det blir hevdet at mye av årsaken kan være at kalvene ikke får i seg nok råmelk innen det har gått seks timer etter fødsel. Studier viste at andelen kalver som overlevde kalveperioden økte, når andelen som lot kalven die moren ble redusert (Godden, 2008). Imidlertid skrev Grøndahl et al. (2011) i en litteraturstudie at oppstalling sammen med moren har vist seg å ha positiv effekt på kalven, og viste til en dansk undersøkelse hvor de hadde observert at kalvens immunstoffabsorpsjon økt ved morens tilstedeværelse selv om kalven ikke fikk die.

Selman et al. (1971b) utførte en studie hvor de så på effekten av absorpsjon av immunglobuliner når kalvene ble oppstallet sammen med kyrne eller separat fra kyrne. Alle kalvene fikk lov til å die moren til de oppnådde en metthetsfølelse ved 6-12 timer etter fødsel. Kalvene som fikk gå med moren, fikk påsatt en munnkurv slik at de ikke skulle ha mulighet til å drikke ytterligere. Fra forsøket ble det ikke funnet noen forskjell i mengden råmelk kalvene hadde konsumert. Det viktigste funnet i forsøket, var at kalvene som fikk gå med moren hadde en høyere IgG-konsentrasjon i blodserum ved 48 timers alder. Selman et al. (1971a) startet deretter et oppfølgingsforsøk hvor ti kalver fikk gå i gruppe med mødrene, mens ti kalver måtte gå uten mødrene. Alle kalvene ble tildelt den samme råmelken, og den eneste forskjellen mellom gruppene var om kalvene gikk sammen med kyrne eller ikke. Konklusjonene fra dette forsøket viste også at kalvene som fikk gå sammen med mødrene hadde signifikant høyere IgG-konsentrasjon i blodserum ved 9, 24 og 48 timer etter fødsel, sammenlignet med kalvene som ikke gikk sammen med mødrene.

2.1.7. Årsaker til lav IgG-konsentrasjon i blodserum

Lave IgG-konsentrasjoner i blodserum hos kalver er mye omtalt i internasjonal litteratur som omhandler immunitet og råmelk. I USA ble det rapportert at mellom 8-11 % av kalvene hadde FPT (Godden, 2008). I en studie hvor de tok blodprøver av 2177 kalver ved 24-48 timers alder, observerte de at 41 % hadde FPT (Godden, 2008). Videre er det noe uenighet om FPT har noen sammenheng med sykdom eller død opptil 180 dagers alder (Villarroel et al., 2013). Noen forskere mener at FPT kan gi 90 % økt risiko for sykdom og opptil 39 % økt risiko for død hos kalver opp til 180 dagers alder. Andre

mener at det ikke er sammenheng mellom IgG-konsentrasjon eller totalproteininnhold i blodserum og sykdom eller dødelighet (Villarroel et al., 2013). Allikevel har de fleste studier konkluderte at kalver med FPT har større sannsynlighet for sykdom eller død i melkeførringsperioden og etter avvenning (figur 5) (Weaver et al., 2000; Gulliksen et al., 2008). Godden (2008) påpekte at mange produsenter i



Figur 5: Kalvens sannsynlighet (%) for å overleve ved lav eller tilstrekkelig IgG-konsentrasjon etter fødsel (Godden, 2008).

USA hadde vesentlige tap av kalver assosiert med FPT, og dårlig råmelkskvalitet var en av de viktigste faktorene for de høye tapene. Det ble beregnet at omtrentlig 1/3 av dødeligheten i de tre første ukene av melkeførringsperioden skyldtes svikt i overføringen av IgG (Godden, 2008).

Variasjonen i IgG-konsentrasjon i blodserum mellom besetninger skyldes ulike råmelksrutiner. Det er stor variasjon på produsentenes fokus på kvaliteten på råmelken kalvene blir tildelt, hvor mye de blir tildelt og hvor raskt etter fødsel de får tildelt råmelken (Nybø et al., 2003). I tillegg til ulike råmelksrutiner mellom besetningene, kan stress hos kalven og bakterier i råmelken påvirke absorpsjonen av immunstoffer (Stott et al., 1976). Stresshormoner som kortikosteroider kan gjøre tarmen mindre permeabel for store molekyler, og absorpsjonen av IgG kan reduseres. Et alternativ for å redusere bakterieinnholdet i råmelken er pasteurisering. Forsøk har vist at kalver som ble føret med pasteurisert råmelk hadde signifikant høyere IgG-konsentrasjon i blodserum, sammenlignet med kalver som fikk tildelt ubehandlet råmelk (McMartin et al., 2006; Johnson et al., 2007). Pasteurisering har allikevel ikke blitt anbefalt i Norge, på grunn av liten utbredelse av svært alvorlige agens (Sogstad, 2017, personlig meddelelse).

For å ha kontroll på råmelkskvaliteten, blir produsentene anbefalt å måle råmelkskvaliteten (Dragset & Whist, 2015). Gjennom prosjektet «Kalve- og ungdyrhelse i Norge» konkluderte Gulliksen et al. (2009c) at en god start er meget viktig, og det starter allerede før kalven er født. Videre ble det også konkludert at for liten IgG-overføring fra råmelk til kalvens blodserum fortsatt er et stort og vanlig problem i norske besetninger.

FPT kan i tillegg til å gi økt risiko for sykdom og død i løpet av kalveperioden, senere påvirke dyrenes melkeproduksjon (DeNise et al., 1989). Resultatene fra et forsøk gjennomført av DeNise et al. (1989) viste at for hver IgG-enhet (g/l) som økte i kalvenes blodserum ved 24-48 timers alder, økte den totale melkeproduksjonen i førstelaktasjon med 8,5 kg energikorrigert melk (EKM). Det ble også erfart under forsøket at kalver med FPT hadde større risiko for å bli tidlig utrangert på grunn av lav produksjon eller sykdom.

De vanligste kalvesykdommene i dag er diaré, luftveissykdommer, og leddsykdommer (Malmo et al., 2005; Gulliksen et al., 2009a). Fra innsamling av data til prosjektet «Kalvehelse», utgjorde diaré og luftveissykdommer nesten 80 % av alle registreringene (Gulliksen et al., 2009a). I følge Helsetjenesten for storfe (2013) er infeksjoner i mage- og tarmkanalen veldig vanlig hos unge dyr, og det forekommer i hovedsak hos kalver i første levemåned. Infeksjonen kan føre til diaré, dehydrering og dårlig allmenntilstand. Luftveissykdommer rammer ofte litt eldre kalver, og spesielt kalver som allerede har blitt utsatt for en annen sykdom (Gulliksen et

al., 2009b). Leddbetennelse kan opptre sekundært til navlebetennelse eller oppstå som følge av infeksjon fra et sår (f.eks. framkne). Malmö et al. (2005) observerte at kalver med lav passiv immunitet, hadde mye høyere risiko for å få navlebetennelse. En tilstrekkelig immunstatus og god hygiene kan forebygge og redusere forekomsten av disse sykdommene (Hansen et al., 2009).

Kalver som rammes av sykdom koster både mye tid og penger. I en svensk rapport har de konkludert med at hvis en kvigekalv blir rammet av luftveisinfeksjon, vil det koste bonden totalt 2 150 svenske kroner i direkte og indirekte kostnader (Wallgren et al., 2011). Blir kvigekalven rammet av diaré vil det koste bonden 2 750 svenske kroner i direkte og indirekte kostnader, i tillegg til økt risiko for andre sykdommer senere. Store besetninger har vist seg å ha høyere kalvedødelighet, og dette kan skyldes at det er vanskeligere å følge opp hvert enkelt individ og opprettholde god hygiene (Gulliksen et al., 2009a).

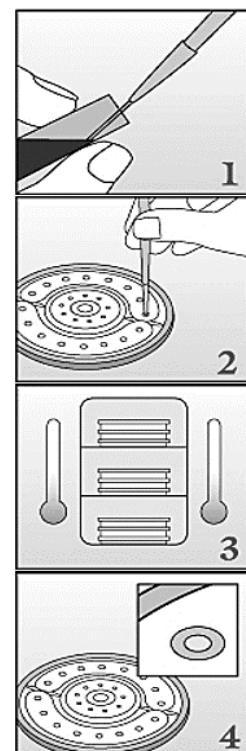
2.2. Metoder for å måle IgG-konsentrasjon i råmelk og blodserum

2.2.1. Kjemiske analyser

Det finnes mange ulike kjemiske metoder for å måle innholdet av IgG i blod og råmelk. De tre vanligste vil bli nærmere beskrevet, men det finnes utallige kjemiske analyser som kan analysere IgG-innhold i både råmelk og blodserum (Godden, 2008).

«Radial immunodiffusion test» (RID) eller også kalt «singel radial immunodiffusion test» er en av flere metoder som kan benyttes for å bestemme det kvantitative innholdet av IgG i blodserum eller råmelk (Deelen et al., 2014). Selv om det finnes flere metoder, blir RID sett på som gullstandarden og er den metoden som blir oftest benyttet (Morrill et al., 2013; Deelen et al., 2014). Den blir valgt fordi den er enkel å utføre, i tillegg til at det lave kostnader i forbindelse med analyseringen.

Analysen er en diffusjon av antistoffer fra en brønn med blodserum eller råmelk inn i en homogen gel med antigen (figur 6) (Morrill et al., 2013) Testen baserer seg på antigen-antistoff bindinger, og størrelsen på sirkelen som blir dannet ved diffusjonen sier noe om innholdet av IgG. Ulempen med RID er at det kreves en relativt lang inkuberingstid, opptil



Figur 6:
Fremgangsmetode ved RID-analysen (Kent laboratories, 2016).

24 timer, før innholdet kan bestemmes. Derfor kan ikke analysen brukes som en hurtig test for å måle IgG-konsentrasjonen (Deelen et al., 2014). En annen ulempe er at det er forskjell mellom RID-platene fra ulike produsenter, noe som fører til variasjon (Quigley, 2008). Det er viktig å benytte en RID-plate som er tilpasset IgG fra storfe for å få riktig analyse av IgG-konsentrasjon.

Testen blir kjørt på en plate med 8 x 3 brønner. De er plassert i tre serier, som er merket A, B og C. I de første tre brønnene på platen blir det fylt væske med kjent og ulik konsentrasjon av IgG. Dette er kontroller som blir brukt til å bestemme standardkurven til testen. I de gjenværende brønnene på platen blir det fylt blodserum eller råmelk fra prøver som skal analyseres. Rundt brønnene er det et spesifikt bovin-antiserum i en agarosegel, hvor det skjer en reaksjon mellom antigen og antistoff. Agar er et vekstmedium som er en gelatinlignende substans utvunnet fra tang (Quigley, 2008).

«Enzyme linked immunosorbent assay» (ELISA) er en annen kjemisk metode for å analysere kvantitativt innhold av IgG i en væske (Elsohaby et al., 2015). Metoden er ekstremt sensitiv, og beskrives å ha en variabel grad av nøyaktighet ved prediksjon av IgG-konsentrasjonen i blodserum hos kalv (Quigley, 2008; Elsohaby et al., 2015). ELISA har mange fordeler som hurtighet, nøyaktighet og målinger av veldig små mengder av IgG. Ulempen er at det er en kompleks analyse som krever trent personell og mer utstyr sammenlignet med de andre kjemiske analysene. Ulempene gjør også at analysen er lite benyttet til å måle IgG-konsentrasjonen i blodserum i studier med kalver.

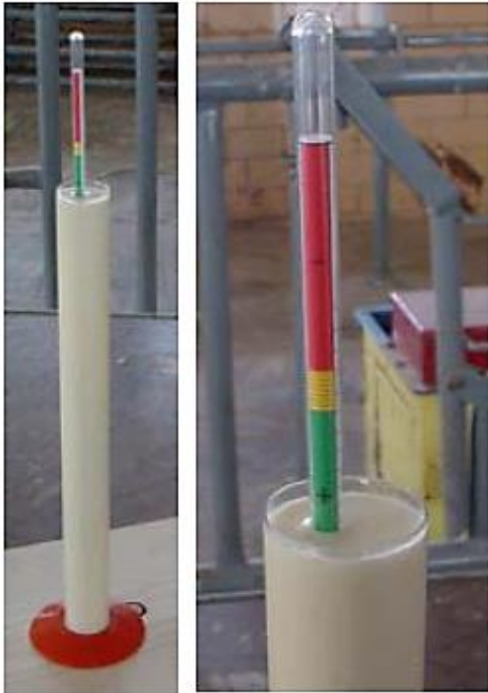
ELISA-analysen blir utført på et brett med mange brønner hvor det skjer en fargereaksjon. For å analysere IgG fra storfe, er det viktig å benytte seg av plater som produsentene har festet bovin antigen på overflaten i brønnene. Ved analysing av IgG blir en metode som kalles «sandwich ELISA» benyttet (Kummer et al., 1992). Prøve med serum eller råmelk blir pipettert over til en brønn og IgG-antistoffene fester seg til antigenene i brønnen. Brønnene blir deretter skylt, for å fjerne det som er igjen av andre immunstoffer og substanser. Videre blir det tilsatt et annet antistoff som binder seg til antistoffet fra prøven som blir analysert. Dette stoffet er bundet til et enzym, og kan bare binde seg til det aktuelle antistoffet som det blir analysert for. Deretter blir brønnen vasket på nytt for å fjerne antistoffer som ikke har festet seg. Tilslutt blir det tilsatt en løsning med substrater som fester seg til enzymene, og det skjer en fargereaksjon. Kjente mengder IgG blir benyttet i brønner for å lage en standardkurve. Mengden farge som blir produsert i prøvene blir målt av en elektronisk plateleser, og videre kalkulering gir et resultat på IgG-konsentrasjonen i prøven.

En tredje kjemisk metode kalles «Turbidimetric immunoassay» (TIA). Den blir sett på som en hurtigere test med lavere kostnader i forbindelse med analyseringen av IgG i blodplasma og blodserum sammenlignet med RID (Quigley et al., 2013). TIA bygger på samme prinsipp som RID ved at antistoff fra storfe skal reagere med antigen, men forskjellen er at reaksjonen foregår i en væske istedenfor en agarosegel. Fordelen med dette er at analysen kan bli gjennomført mye raskere enn RID, samtidig som at den kan bli automatisert. Reaksjonen mellom antigen og antistoff danner en uklarhet i løsningen, og størrelsen på denne blir avlest maskinelt. Dette gjør at menneskelige feil reduseres, og antall prøver som kan analyseres per dag øker (Quigley, 2008).

McCue (2007) utførte en studie hvor de så på muligheten til å benytte seg av TIA istedenfor RID til å analysere IgG-konsentrasjonen i blodserum hos hesteføll. Føll blir i likhet med kalv, født uten immunstoffer. Dette gjør at viktigheten av god råmelkskvalitet og overføring av IgG er like stor som hos storfe. Det ble konkludert at TIA var enkel å benytte, og kunne benyttes til blodplasma og blodserum, og analysesvarene var klare etter ca. 10 minutter. Analysen ga høyere grad av repeterbarhet om prøvene ble analysert flere ganger samme dag, enn om samme prøve ble testet flere ganger over flere dager. Videre ble det konkludert at resultatene fra TIA hadde høy korrelasjon med resultatene fra RID. En annen studie med analysing av blodserum fra føll, konkluderte at måling av IgG-konsentrasjon med TIA var sammenlignbar med andre kjemiske analyser, og presisjonen av TIA var høyere enn tidligere rapportert for RID (Davis et al., 2005).

2.2.2. Kolostrometer

Kolostrometer, også kalt hydrometer, er et måleinstrument som er utviklet til det formålet å



Bilde 1: Et kolostrometer i bruk. Fargeskalaen viser at dette er råmelk av god kvalitet (Heinrichs & Jones, 2011).

kunne gjennomføre en hurtig test av råmelkskvaliteten i fjøset (Heinrichs & Jones, 2011). Måleinstrumentet måler oppdriften til stangen som flyter fritt i væsken (bilde 1) (Godden, 2008). På stangen er det en fargekodet skala som forteller produsentene hvor høy den estimerte IgG-konsentrasjonen er i råmelken. Grønt på fargeskalaen indikerer god råmelkskvalitet, og melken inneholder mer enn 50 g IgG/l. Gult indikerer middels råmelkskvalitet, og inneholder 20 -50 g IgG/l. Rødt er den fargen man finner øverst på stangen og det indikerer råmelk av dårlig kvalitet, og inneholder mindre enn 20 g IgG/l.

Denne metoden gir variable resultater på grunn av at den måler råmelkens tetthet, som også inneholder andre stoffer som påvirker resultatet (Heinrichs &

Jones, 2011). I studier som har blitt gjennomført for å undersøke sammenhengen mellom IgG-innhold og råmelkens spesifikke vekt, har resultatene vist at korrelasjonen var 0,50-0,65 (Heinrichs & Jones, 2011). Andre forsøk har derimot funnet høyere korrelasjoner mellom IgG og spesifikk vekt. Bartier et al. (2015) fant ut at korrelasjonen mellom IgG-konsentrasjon og målingene med kolostrometer var 0,77. Resultatene fra en undersøkelse gjennomført av Morin et al. (2001), viste at sammenhengen mellom den spesifikke vekten til råmelken varierte mellom raser. Fra resultatene konkluderte forfatterne at råmelkens egenvekt var mer avhengig av proteinkonsentrasjonen enn konsentrasjonen av IgG₁, og at det var sterkt påvirket av hvilken måned kalvingen foregikk. De mente til slutt at disse resultatene gjorde at kolostrometer er et dårlig instrument til å måle IgG₁-konsentrasjonen. Det blir hevdet at kolostrometer bare egnet til å skille dårlig og god råmelk, og ikke nøyaktig måling av IgG-konsentrasjon (Heinrichs & Jones, 2011).

Kolostrometeret er avhengig av temperaturen på væsken for høyest mulig nøyaktighet på målingene (Heinrichs & Jones, 2011). TINE Rådgivning anbefaler at råmelken har romtemperatur (24 °C) når målingen gjennomføres (Gulliksen, 2008). Etter et forsøk hvor de

gjennomførte målinger av råmelksprøver med en økning på 5 °C fra 0 til 40 °C, ble det konkludert at kolostrometeret kunne benyttes til å måle immunstoffer, men det ga ikke nøyaktige prediksjoner (Mechor et al., 1992). Videre ble det gitt anbefalinger om å gjennomføre målingene når råmelken holdt 20 °C. Ved høy temperatur vil kolostrometeret ofte underestimere IgG-konsentrasjonen, mens ved lav temperatur vil instrumentet ofte overestimere konsentrasjonen (Heinrichs & Jones, 2011).

Fordelen og grunnen til at produsentene velger å benytte seg av måleinstrumentet er at det gir et hurtig svar på råmelkskvaliteten. Selv om det ikke gir en nøyaktig prediksjon av IgG-konsentrasjonen, kan det hjelpe produsentene til å avgjøre om kvaliteten er god eller dårlig (Heinrichs & Jones, 2011). I tillegg er kolostrometeret relativt billig i innkjøp, og det kan utføres mange analyser.

2.2.3. Refraktometer

Refraktometer finner man i to ulike varianter, optisk og digitalt. Refraktometer benyttes til mange ulike formål, og måling av IgG i blodserum eller råmelk er bare en liten del av hva de kan benyttes til. Det finnes mange ulike merker og varianter av både optiske og digitale refraktometer på markedet, og de har ulike skalaer og gir ulike måleverdier som resultat. Optisk refraktometer ser ut som en kikkert som må holdes opp mot en lyskilde for å lese av resultatene på en skala med øyet, mens digitale refraktometer sender selv ut lys og angir resultatene digitalt.

Det som er felles for alle refraktometer er at målingen skjer ved at lys sendes gjennom prøven, og måling av vinkelen på lysbrytningen gir et analyseresultat (George, 2001). På den måten er refraktometer et måleinstrument som er i stand til å gjennomføre en hurtig test både på et laboratorium og i et fjøs.

Bruken av refraktometer til å estimere konsentrasjonen av protein i blodserum ble introdusert allerede i 1902 (George, 2001). Det ble fort populært, nettopp av den enkle grunnen at man raskt fikk resultat på proteinkonsentrasjonen i prøvene som ble analysert. Ulempen med de første refraktometrene var at de var avhengige av konstant temperatur ved målingen. De ble mer populære igjen når optiske temperatuavhengige refraktometre ble introdusert på 1960-tallet (George, 2001).

På grunn av at det er stor sammenheng mellom tørrstoff og IgG-konsentrasjonen i både råmelk og blodserum, kan refraktometer benyttes til å evaluere IgG-konsentrasjonen (Elsohaby et al.,

2015). Refraktometer har tradisjonelt blitt brukt til å måle IgG-konsentrasjonen i råmelk av bonden selv i fjøset. Det har vært en hurtig test, som gir produsenten svar på kvaliteten på råmelken. I de senere årene har det blitt en større interesse for å undersøke om refraktometre kan måle IgG-konsentrasjonen i råmelk og blodserum (Heinrichs & Jones, 2011; Quigley et al., 2013; Thornhill et al., 2015). Refraktometeret brukes da som en hurtig test for å måle IgG-konsentrasjonen i blodserum hos kalver for å undersøke om opptaket har vært vellykket (Wallace et al., 2006). Siden blodserumet til kalver mellom dag en og syv inneholder immunstoffer overført fra råmelken, har forsøk vist at refraktometre kan benyttes til dette formålet (Calloway et al., 2002; Wallace et al., 2006; Deelen et al., 2014).

Brix er en skala som noen produsenter av både optiske og digital refraktometre har valgt å benytte seg av. Det har derfor blitt gjennomført en rekke forsøk de siste årene, for å se om det er mulighet for å benytte seg av Brix-refraktometer til å måle IgG-konsentrasjonen i råmelk og blodserum (Quigley et al., 2013; Dragset & Whist, 2015; Thornhill et al., 2015). Brix-skalaen ble utviklet på 1800-tallet, av den tyske forskeren Adolf F. Brix (Ball, 2006). Brix-skalaen måler i praksis prosent tørrstoff, men det blir ofte uttrykt som prosentandel sukrose fordi den er mye brukt til væsker med høyt sukroseinnhold. Siden det måler lysbrytning gjennom væsken, vil andre substanser i råmelks- eller serumprøvene som fett, mineraler, karbohydrater og vitaminer påvirke resultatet. Brix-refraktometre oppgir resultatene i grader eller prosent, hvor en grad betyr et tørrstoffinnhold på 1 gram per 100 g eller det angis som prosent tørrstoff (Ball, 2006; Quigley et al., 2013). Forsøk med det digitale refraktometeret Milwaukee viste at en Brix-verdi på 24 % korresponderer til 50 g IgG/l i råmelk, så alle verdier på 24 % eller høyere er råmelk av god kvalitet (Dragset & Whist, 2015).

Optiske refraktometer blir også kalt håndholdte refraktometer, og det fordi man er nødt til å holde refraktometeret opp mot en lyskilde for å lese av en skala (Heinrichs & Jones, 2011). Optiske refraktometer ble introdusert allerede på 1960-tallet, og det har vært utviklet mange ulike typer som har sine spesifikke formål.

Når råmelk- eller blodserumprøven skal leses av med et optisk refraktometer må prøven plasseres på prismet, for å deretter lese av Brix-verdien mellom det lyse og det mørke området som dannes på skalaen (bilde 2) (Heinrichs & Jones, 2011). Ved råmelksprøver med et høyt fettinnhold, kan overgangen mellom lyst og mørkt område bli vanskelig å lese på grunn av uskarp overgang.



Bilde 2: Et optisk refraktometer og avlesningsskalaen hvor man ser er klar overgang mellom mørkt og lyst område (Heinrichs & Jones, 2011).

Ved digitale refraktometre vil instrumentet selv sende ut lys som går gjennom væsken som blir analysert. Dette gjør at digitale refraktometre ikke trengs å holdes opp mot en lyskilde, og samtidig blir resultatene oppgitt digitalt (bilde 3). Fordelen med dette er at det ikke blir menneskelig variasjon mellom prøver som blir analysert (Heinrichs & Jones, 2011). I tillegg er digitale refraktometre i stand til å analysere prøver med høyt fettinnhold.



Bilde 3: Et digitalt refraktometer fra Milwaukee (Milwaukee Instruments, u.å.).

Det har blitt gjennomført forsøk med måling av IgG i blodserum hos kalver for å finne om et optisk og digitalt refraktometer ga de samme verdiene i IgG-konsentrasjon (Elsohaby et al., 2015). Resultatene viste at RID var positivt korrelert med både digital ($R=0,79$) og optisk Brix-verdi ($R=0,74$), og at begge refraktometrene ga om lag de samme resultatene. Fordelen med optiske og digitale refraktometre er at de gir et hurtig svar på den estimerte IgG-konsentrasjonen, og det kan utføres mange analyser med det samme apparatet.

3. Material og metode

3.1. Gjennomføring av forsøket

Forsøket ble gjennomført ved Senter for husdyrforsøk (SHF) på Ås gård ved NMBU i tilknytning til et stort automatisk melkesystemforsøk (AMS-forsøk), som ble gjennomført høsten 2016. Blodserum fra kalvene som kom til under dette forsøket ble brukt til å måle IgG-konsentrasjonen både ved hjelp av en kjemisk analyse kalt «Radial Immunodiffusion Test» (RID) og refraktometeret Milwaukee. Blodprøver ble tatt fra 67 kalver i tidsrommet 31. august til 23. november. Det ble tatt en blodprøve av alle kalvene ved 1-3 dagers alder og av 39 kalver omkring 10 dagers alder. Tre-fire dråper blodserum ble pipettert fra fullblodsglasset og testet på refraktometeret, før det resterende blodserumet ble fryst ved -20 °C i en til fire måneder, og videre sendt Mastittlaboratoriet i Molde for RID.

Fra første utmelking etter fødsel ble det tatt ut råmelksprøve fra 47 kyr, som ble fryst ved -20 °C til alle prøvene var utført (1-6 måneder) og videre kjemisk analysert med RID. Råmelksprøvene som ble tatt av kyrne, inngikk i prosjektet «Quality Calf» som ble gjennomført av Veterinærinstituttet. Det ble også undersøkt om kyrnes laktasjonsnummer hadde effekt på råmelkskvaliteten. Kyrne ble delt opp i fire grupper; en, to, tre og flere enn tre laktasjoner. Kyr som inngikk i gruppen som hadde flere enn tre laktasjoner var kyr som var i fjerde, femte eller sjette laktasjon. Den største gruppen var kyr i første laktasjon, mens den minste gruppen var de som var i tredje laktasjon.

3.2. Forsøksdyr

Alle kalvene som inngikk i forsøket var renrasert NRF. Etter fødsel ble kalvene tatt fra moren så fort som mulig, for deretter å veies og oppstalles i enkeltbinger i et eget kalverom i fjøset (bilde 4). I enkeltbingen hadde kalvene kun kontakt med to nabokalver. Bingene ble vasket og desinfisert mellom hver kalv, og de ble oppstallet på et tykt lag med halm. I løpet av det første levedøgnet fikk kalvene drikke så mye råmelk de ville ved fire tildelinger. Målsetningen var få i kalvene minst to liter råmelk fra egen mor innen to timer etter fødsel. Kalvene hadde allerede fra første levedag fri tilgang til fint høy, vann og kraftfôr. Etter det første døgnet ble kalvene tildelt to liter melk fire ganger om dagen, og ble stående i enkeltbinge fram til omkring ti dagers alder. Omkring ti dagers alder ble kalvene flyttet til en gruppebinge med 5-10 kalver, hvor de fikk melk fra en automatisk melkefôringautomat. I fellesbingene var det spaltegulv i halve bingen og det resterende arealet var et liggeareal med flis som strø.

Sterkt dehydrerte kalver eller kalver som ble evaluert til å ha dårlig almenntilstand ble ikke inkludert i blodprøvetakingen. Ørenummer til ku og kalv, vekt, dato og tidspunktet kalven ble født, kjønn, når og hvor mye råmelk de fikk i seg fra egen mor på første, andre og tredje tildeling ble notert. På skjemaet ble det også notert om kalven hadde klart å die moren før de ble skilt eller om det var vanskeligheter med å gi råmelk med flaske slik at kalven måtte sondeføres. Det var varierende hvor mye som ble notert ned på skjemaet, derfor ble det noe mangelfulle opplysninger om noen av kalvene.



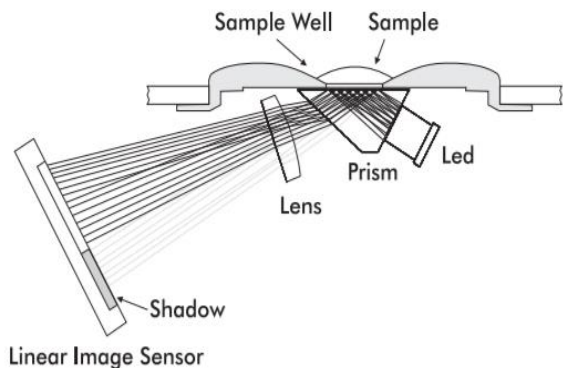
Bilde 4: Oppstalling av kalv i enkeltbenge ved SHF.

3.3. Refraktometeret Milwaukee

For å kunne gjennomføre en hurtig måling av IgG-innholdet i råmelk, kjøper TINE SA Milwaukee av ProVET Nordic. ProVET er et dansk firma som importerer Milwaukee fra Bione Calf i Frankrike (ProVET nordic, u.å.). Bonden kan kjøpe refraktometeret av TINE SA, slik at råmelksskvaliteten hurtig kan undersøkes i fjøset. Det har vært en økende interesse for å undersøke refraktometrene kan benyttes til å måle IgG-konsentrasjonen i blodserumet til kalver. På den måten kan veterinærer ta blodprøver av kalver i besetninger som sliter med kalvehelsen, for å undersøke hvordan opptaket av IgG har vært i besetningen. Når det har blitt etterspurt dokumentasjon om Milwaukee kan benyttes til å måle IgG-konsentrasjonen i blodserum, har ProVET henvist til en dansk undersøkelse som



Bilde 5: Refraktometeret av modellen MA882 som ble benyttet under forsøket.



Figur 7: Et digital refraktometers funksjon (Milwaukee Instruments, u.å.).

ble gjennomført med et optisk Atago-refraktometer som oppgir analyseverdiene som totalprotein (Hansen & Valbjørn, 2005).

Det finnes mange ulike modeller av Milwaukee på markedet, men modellen som ble benyttet i dette forsøket var MA882 (bilde 5) (Milwaukee Instruments, u.å.). Denne Leser av verdier som prosentandel Brix, som er et uttrykk for mengden tørrstoff i prøven beregnet ut fra lysbrytningen. Refraktometeret sender gult Light Emitting Diode-lys (LED-lys) gjennom et prisme som har kontakt med prøven. Brytningsindeksen er avhengig av materialet og antall oppløste partikler i prøven. Brix er et mål på brytningsgrad som er definert som væskens evne til å reflektere lys, og resultatet vil være at lyset brytes når det treffer prøven (Milwaukee Instruments, u.å.). Når lyset reflekteres tilbake fra prøven, vil en bildesensor bestemme den kritiske vinkelen på lyset og beregne innholdet av tørrstoff (figur 7). MA882 har et analyseområde på 0-50 % Brix ved en temperatur på 0-80 °C. Apparatet angir Brix-verdien med 0,1 % nøyaktighet, og har en variasjon på $\pm 0,2$ %. På grunn av høy korrelasjon mellom tørrstoff, totalprotein og IgG, kan refraktometre benyttes som metode å bestemme IgG-innholdet i råmelk og blodserum (Deelen et al., 2014).

3.4. Blodprøvetaking

3.4.1. Praktisk gjennomføring

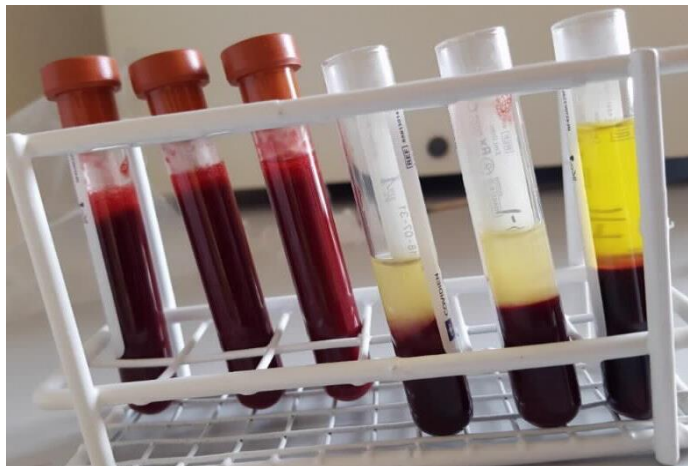
Kalvene fikk først barbert et område på halsen, slik at det skulle være lettere å oppdage blodåren. Deretter ble blodåren stemmet opp, slik at blodvenen kom til syne på halsen og prøven kunne tas. Utstyret som ble benyttet for å gjennomføre prøvetakningen var 5 ml fullblodsglass med rød kork uten antikoaguleringsmiddel og 0,9 mm kanyler med beskyttelse. Det ble tatt ut ett til to fullblodsglass av hver kalv ved prøveuttaket (tabell 4). Glassene med blod ble vendt opp og ned 5 ganger, før kalvens ørenummer ble notert på glassene og de ble satt i et stativ.

Tabell 4: Antall prøver tatt ut ved første og andre blodprøveuttak og videre behandling.

	Første prøveuttak (1-3 dagers alder)		Andre prøveuttak (ca. ti dagers alder)
	Bunnfelling	Sentrifugering	Sentrifugering
Totalt antall prøver tatt ut	37	67	39
Antall testet på refraktometret	37	67	39
Antall til kjemisk analyse	-	67	39

Ved uttak av to blodprøver fra kalvene som var 1-3 dager gamle, ble det ene fullblodsglasset satt til bunnfelling i ca. 24 timer i romtemperatur. Det andre fullblodsglasset stod 1-2 timer til

koagulering, før det ble sentrifugert i 15 minutter ved 3000 omdreininger per minutt (tabell 4). Koagulering gjør at fibrinogen blir borte fra blodplasma, og væsken som blir igjen kalles blodserum. Etter sentrifugering hadde blodet skilt seg i tre tydelige lag med blodserum øverst, og blodplater i midten og røde blodceller nederst (bilde 6).



Bilde 6: Tre prøver som var sentrifugert og tre som var satt til bunnfelling. To av de sentrifugerte prøvene var tømt for blodserum.

Fra de ferdig bunnfelte og sentrifugerte fullblodsglassene ble det tatt ut 3-4 dråper blodserum som ble analysert på refraktometeret. Fra de sentrifugerte blodprøvene ble det gjenværende blodserumet pipettert over til eppendorfrør. Rørene ble deretter fryst ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, for og senere bli analysert med RID og testet på et annet Milwaukee refraktometer.

Ved blodprøveuttaket omkring ti dagers alder ble det kun tatt ut ett fullblodsglass (tabell 4). Disse ble sentrifugert og behandlet på lik linje som de sentrifugerte blodprøvene tatt ut ved 1-3 dagers alder.

3.4.2. Metodestudier med refraktometeret Milwaukee

Sentrifugering blir sett på som standardmetoden for å skille blodserum fra de røde blodcellene og blodplatene, og er den metoden som er benyttet i mange lignende studier. Det ble gjennomført en metodeundersøkelse med refraktometeret der bunnfelling av blodprøvene ble sammenlignet med sentrifugering. Hos de 37 kalver ble det tatt to blodprøver ved første uttak, hvor den ene ble sentrifugert og den andre ble satt til bunnfelling på laboratoriet til Stoffskifteavdelingen i ca. 24 timer. Etter 24 timer ble disse serumprøvene lest av på Milwaukee på samme måte som de sentrifugerte prøvene, men de ble ikke kjemisk analysert (RID).

De sentrifugerte serumprøvene som ble kjemisk analyserte med RID, ble også målt med Milwaukee for å få en Brix-verdi på fryst blodserum i Molde. Dette ble gjennomført slik at man kunne undersøke om det var forskjell i Brix-verdien fra fryst eller ferskt blodserum. De fryste serumprøvene ble testet med et annet digitalt Milwaukee refraktometer av samme modell enn det som ble benyttet på ferskt blodserum i fjøset på Ås gård.

3.4.3. Alder og antall prøver ved første blodprøveuttak

Det ble tatt ut en til to fullblodsprøve ved 1-3 dager etter fødsel av alle de 67 kalvene som inngikk i forsøket, hvor den ene ble bunnfelt og den andre sentrifugert (tabell 4 og 5). Blodprøver ble tatt ved dag 1-3 etter anbefaling fra produsentene av Milwaukee, som hevder at refraktometeret gir det beste estimatet av IgG-konsentrasjonen i denne aldersperioden.

Tabell 5: Alder og antall kalver ved blodprøveuttak i forsøket (n første blodprøve=67, n ved andre blodprøve=39).

	Alder ved første uttak			Gjennomsnittsalder ved andre uttak
Dager	1	2	3	8 (6-12)
Antall kalver	31	21	15	39

3.4.4. Alder og antall prøver ved andre blodprøveuttak

Det var ønskelig å undersøke om refraktometeret også kunne benyttes til å estimere IgG-konsentrasjonen i blodserum når kalvene var eldre enn tre dager, siden det ikke nødvendigvis er tilstrekkelig antall kalver under tre dager i fjøset når veterinæren er der. Andre blodprøve ble tatt av 39 kalver, som hadde en gjennomsnittlig alder på åtte dager med en variasjon fra seks til 12 dager (tabell 4 og 5). Det ble avtalt med de ansatte i fjøset at kalvene skulle flyttes når de var ti dager gamle, men på grunn av stort press på ledige enkeltbinger ble 15 kalver flyttet til fellesbinger før det andre blodprøveuttaket ble gjennomført.

På grunn av at de fleste oksene ble solgt etter råmelksperioden, ble det i hovedsak tatt prøver av kviger ved andre prøvetaking. I oktober og november ble en liten gruppe okser beholdt, og det ble da tatt en blodprøve av disse ved ti dagers alder.

3.5. Måling av IgG-konsentrasjon i blodserum med Milwaukee

Før refraktometeret ble brukt til å analysere blodserum, måtte det nullstilles. Dette ble gjort ved å ta 3-4 dråper destillert vann i målekammeret, for og deretter tykke på «zero»-knappen på apparatet (bilde 5). Det var viktig å bruke like mengder destillert vann som en vanlig prøve med blodserum, slik at apparatet var riktig kalibrert i forhold til mengde serumprøve. Til slutt ble vannet tørket forsiktig bort fra målekammeret. Det var viktig å sjekke at glasset var helt tørt før analyseringen av serumprøvene.

Når refraktometeret var klart, ble 3-4 dråper blodserum pipettert ut og plassert i målekammeret. For å lese av verdien trykket man på «read», og Brix-verdien kommer opp uttrykt som prosent.

Refraktometeret var følsomt for lys, derfor ble lyset i taket slukket og en hånd plasser over målekammeret. Ved å gjøre dette antas det at analyseringen ble lik for alle serumprøvene. Ut fra tidligere erfaringer med refraktometeret, ble det bestemt at apparatet skulle skrues av og på igjen mellom hver serumprøve med blodserum for å minimere sannsynligheten for feilkilder. Brix-verdien ble notert ned, før kammeret ble rengjort til neste serumprøve.

3.6. Kjemisk analyse av blodserum ved «Radial Immunodiffusion Test»

Eppendorfrørene ble pakket inn med fryseelement, og sendt til Mastittlaboratoriet i Molde hvor de umiddelbart ble fryst ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Alle prøvene ble tatt opp og satt til tining i romtemperatur dagen før de skulle analyseres med RID. Prøvene ble vendt et par ganger for å være sikker på at prøvene var homogene, før $5\text{ }\mu\text{l}$ fra hver prøve ble fylt i en brønn på platen.

Den kjemiske analysen (RID) ble utført på plater hvor det var 8×3 brønner fra Triple J Farms (u.å.), som er en produsent av RID-plater. De var plassert i tre serier, som var merket A, B og C. I de første tre brønnene på platen ble det tilsatt ulike kjente konsentrasjoner av IgG. Dette var kontroller som videre ble brukt til å bestemme standardkurven til analysen. De gjenværende brønnene på platen ble fylt med blodserum som skulle analyseres. Rundt brønnene er det et spesifikt bovin-antiserum i en agarosegel med $0,1\text{ M}$ fosfatbuffer med $\text{pH } 7,0$, $0,1\text{ }\%$ natriumtsyre som bakteriostatisk middel, $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ amfotericin B som et soppdrepende middel og $0,002\text{ M}$ etylendiamintetraeddiksyre (Triple J Farms, u.å.).

RID-platene ble satt i romtemperatur i 24 timer, før diameteren av diffusjonen rundt hver brønn ble målt med et skyvelære med $0,1\text{ mm}$ nøyaktighet og notert ned. Når alle serumprøvene var målt med skyvelæret, ble standardene plottet inn i et Excel-ark for å lage en best tilpasset linje til de tre punktene. Deretter ble denne lineære linjen benyttet til å beregne IgG-konsentrasjonen (g/l) fra diameteren på sirkelen.

Når IgG-konsentrasjonen i blodserumsprøvene var høyere eller lavere enn standardkurven måtte serumprøvene fortynnes for å gi mer nøyaktige verdier. Mange av serumprøvene hadde en IgG-konsentrasjon høyere enn 27 g/l noe som var over standardkurven som ble beregnet. Derfor ble det bestemt at disse serumprøvene måtte fortynnes og testes på nytt. Prøvene ble fryst ned igjen og senere testet på nytt med samme metode.

3.7. Beregninger

Sensitivitet og spesifisitet ble benyttet av leverandørene for å beskrive refraktometerets evne til å oppdage kalver som har over eller under 10 g IgG/l (Milwaukee Instruments, u.å.). Sensitivitet beskriver refraktometerets evne til å oppdage kalver som har lavere IgG-konsentrasjon enn 10 g/l. Spesifisitet beskriver refraktometerets evne til å oppdage kalver som har høyere IgG-konsentrasjon enn 10 g/l. Sensitivitet og spesifisitet ble beregnet ut fra angitte Brix-grenseverdier, for å undersøke hvilken grenseverdi som ga de høyeste verdiene. Det er viktig for å unngå et stort antall observasjoner som er falske positive (lavere enn 10 g IgG/l, men høyere Brix-verdi (%) enn grenseverdi) eller falske negative (høyere enn 10 g IgG/l, men lavere Brix-verdi (%) enn grenseverdi).

$$\text{Sensitivitet} = \frac{\text{Antall kalver med Brix verdi (\%) under angitt grenseverdi}}{\text{Totalt antall kalver med IgG innhold lavere enn 10,0 g/l fra kjemisk analyse (RID)}}$$

$$\text{Spesifisitet} = \frac{\text{Antall kalver med Brix verdi (\%) over angitt grenseverdi}}{\text{Totalt antall kalver med IgG innhold høyere enn 10,0 g/l fra kjemisk analyse (RID)}}$$

3.8. Statistikk

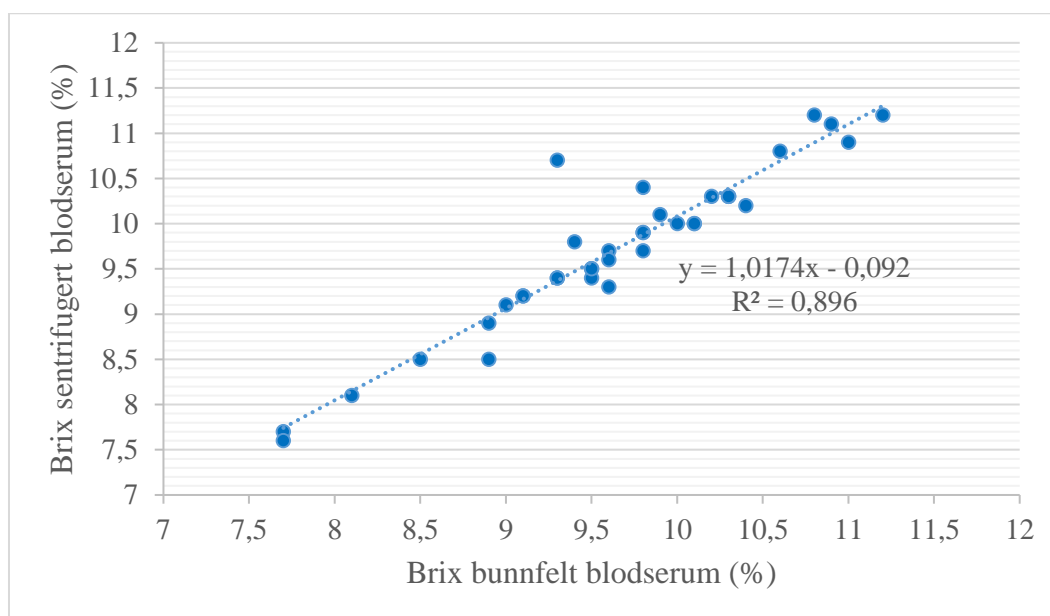
Statistikken ble gjennomført i statistikkprogrammet SAS (SAS Institute, 2013) ved bruk av «general linear model» (GLM-funksjon) og figurer ble laget i Excel (Microsoft, 2016). Sammenhengen mellom IgG-konsentrasjon fra RID-analyse og Brix-verdi (%) ble analysert med hjelp av korrelasjonsberegninger med angivelser av korrelasjon (r) og forklaringsgrad (R²). Resultatene ble vurdert som signifikante ved p-verdi lavere enn 0,05. P-verdier mellom 0,05 og 0,10 ble vurdert som en tendens.

4. Resultater

4.1. Metodestudier med refraktometeret Milwaukee

4.1.1. Sammenligning av Brix-verdier fra bunnfelt og sentrifugert blodserum

Den gjennomsnittlige Brix-verdien for bunnfelt og sentrifugert blodserum var henholdsvis 9,6 og 9,7 %, med en variasjon på henholdsvis 7,7-11,2 og 7,2-11,8 %. Resultatene viser en god korrelasjon ($r=0,94$) og forklaringsgrad ($R^2=0,90$) mellom Brix-verdiene (%) fra bunnfelling og sentrifugering (figur 8).



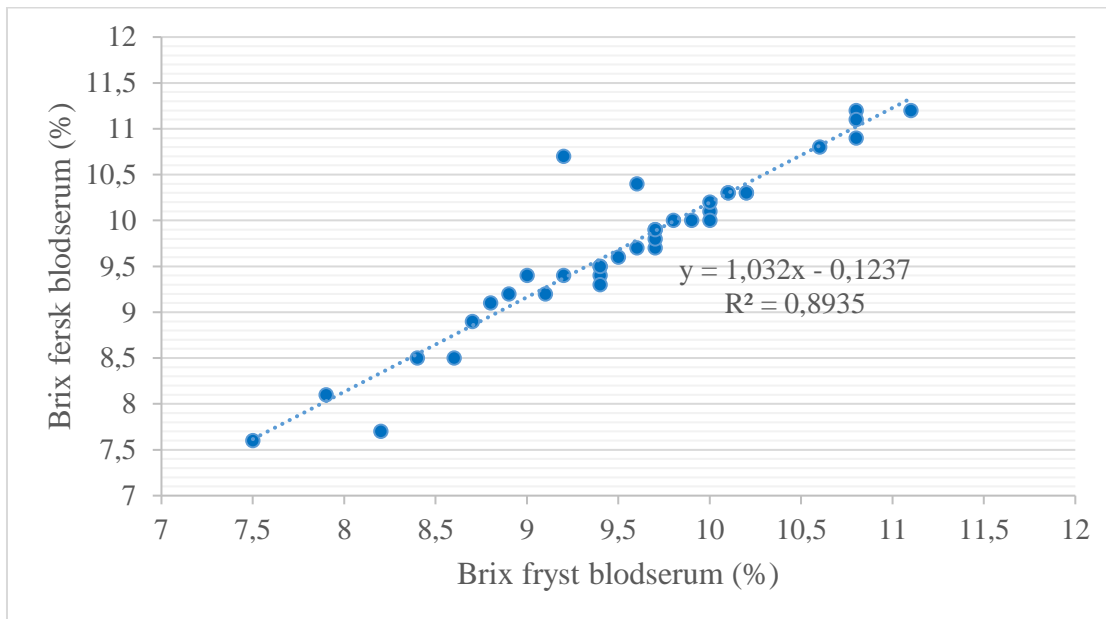
Figur 8: Sammenhengen mellom Brix-verdier (%) etter bunnfelling eller sentrifugering ($n=37$).

En observasjon skilte seg ut med stor forskjell på Brix-verdiene (%) målt etter bunnfelling og sentrifugering. Ved å ta ut denne observasjonen, økte sammenhengen mellom bunnfelling og sentrifugering ytterligere ($R^2=0,96$). Observasjonen var per definisjon ingen «outlier» (to ganger standardavvik), og er derfor inkludert i regresjonen (figur 8).

Selv om resultatene viser at det er godt samsvar mellom Brix-verdier (%) fra bunnfelt og sentrifugert blodserum, ble det valgt å bruke de målte Brix-verdiene (%) fra sentrifugerte serumprøver videre i resultatene, slik at resultatene kan sammenlignes med publiserte resultater.

4.1.2. Sammenligning av Brix-verdier fra ferskt og fryst blodserum

De fryste serumprøvene hadde en gjennomsnittlig Brix-verdi på 9,6 %, og en variasjon mellom 7,2 og 11,8 %. Resultatene viser at det var høy korrelasjon mellom Brix-verdiene målt på fryst og ferskt blodserum ($r=0,94$) (figur 9). Brix-verdiene fra fryst blodserum forklarte 89 % av variasjonen i Brix-verdiene for ferskt blodserum (R^2). De fryste prøvene ble testet på et annet Milwaukee refraktometer av samme modell som de ferske serumprøvene, noe som kan ha påvirket resultatene.



Figur 9: Sammenhengen mellom Brix-verdier (%) fra fryst og ferskt blodserum ($n=37$).

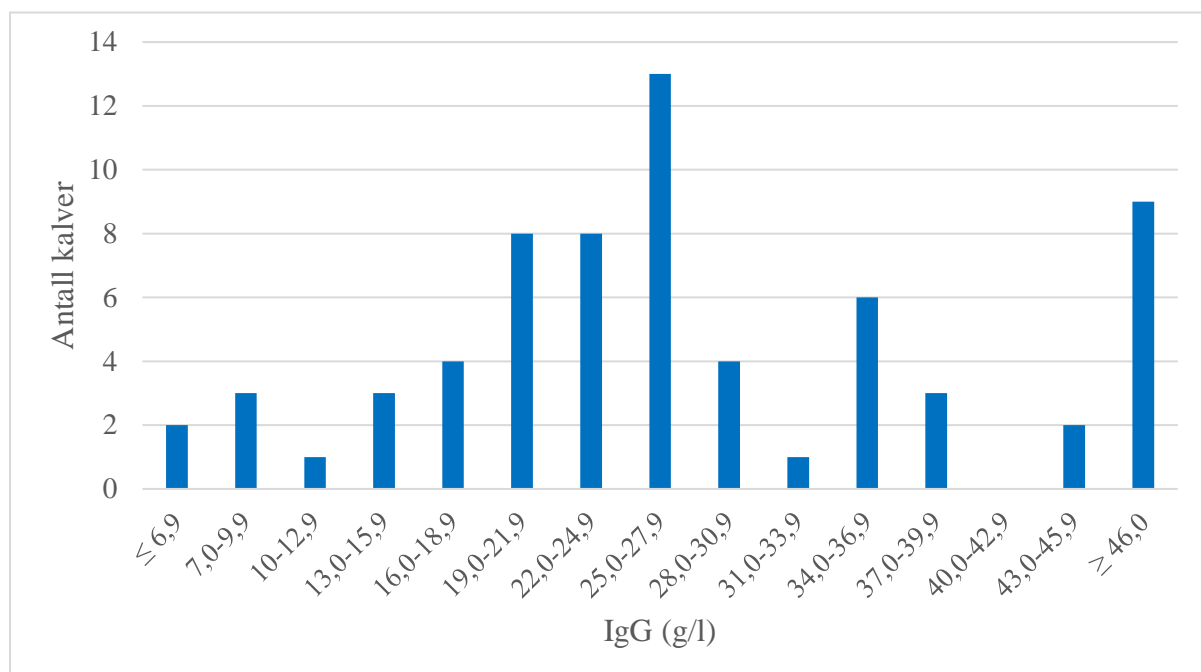
Det er to observasjoner som skiller seg tydelig ut fra de andre observasjonene. Ved å utelate disse to observasjonene, økte korrelasjonen mellom fryst og ferskt blodserum ytterligere ($R^2=0,97$). De to observasjonene var per definisjon ingen «outlier» (to ganger standardavvik), og er derfor inkludert i regresjonen (figur 9).

4.2. Sammenhengen mellom Brix-verdier fra refraktometeret Milwaukee og IgG-konsentrasjon i blodserum ved kjemisk analyse (RID)

4.2.1. Sammenhengen mellom Brix-verdier og IgG-konsentrasjon ved kjemisk analyse ved første blodprøveuttak

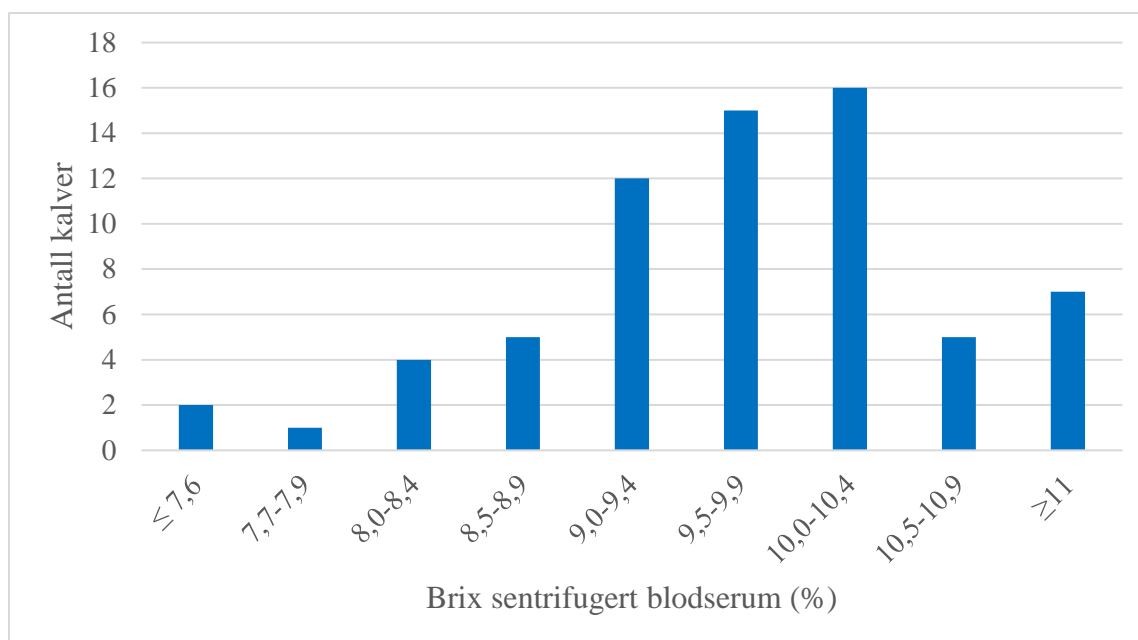
Fordelingen av de kjemiske analyseverdiene (RID) av IgG-konsentrasjonen i blodserum ved første blodprøve, viser at mange av kalvene hadde en høy konsentrasjon i blodserum. Gjennomsnittlig IgG-konsentrasjon hos kalvene var 28,1 g/l, med en variasjon fra 2 til >55 g/l. Ni kalver hadde en IgG-konsentrasjon som var høyere enn 46,0 g/l, hvor tre hadde IgG-konsentrasjon >55 g/l (figur 10).

Immunstatusen til kalvene ble vurdert ut fra resultatene fra RID-analyse. Ut fra fordelingen av IgG-konsentrasjon fra RID-analysen viser resultatene at det var 5 kalver som hadde en IgG-konsentrasjon i blodserum lavere enn 10 g/l (figur 10).



Figur 10: Fordelingen av IgG-konsentrasjonen i blodserum (g/l) for kalver ved 1-3 dagers alder, ved kjemisk analyse (RID) (n=67).

Fordelingen av Brix-verdiene på sentrifugerte serumprøver ved første blodprøve varierte fra 7,2 til 11,8 % (figur 11), og var gjennomsnittlig 9,7 %.



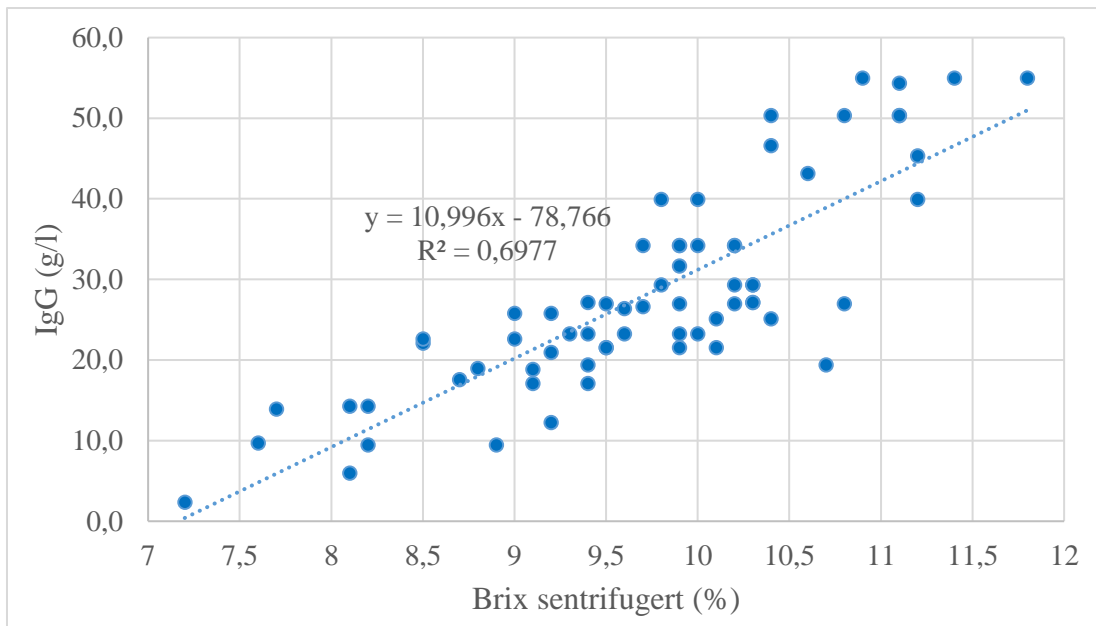
Figur 11: Fordelingen av Brix-verdiene (%) ved første blodprøve som ble tatt ved 1-3 dagers alder (n=67).

Produsentene av Milwaukee benytter seg av en grenseverdi («cut-off point») på 8,3 %, noe som betyr at kalver som har Brix-verdi (%) under dette har en IgG-konsentrasjon i blodserum lavere enn 10,0 g/l. Fra beregninger ser det ut til at en grenseverdi på 8,3 og 8,5 % Brix gir høyest sensitivitet og spesifisitet (tabell 6), noe som er de beste tilpassede grenseverdiene fra dette datamaterialet.

Tabell 6: Sensitivitet og spesifisitet ved ulike grenseverdier for refraktometeret.

Brix grenseverdi (%)	Sensitivitet		Spesifisitet	
	I forsøket	Fra produsenten	I forsøket	Fra produsenten
7,5	0,20	0,26	1,00	0,98
8,3	0,80	0,74	0,95	0,89
8,5	0,80	0,93	0,95	0,7
9,0	1,00	1,00	0,89	0,35
9,5	1,00	1,00	0,69	0,23

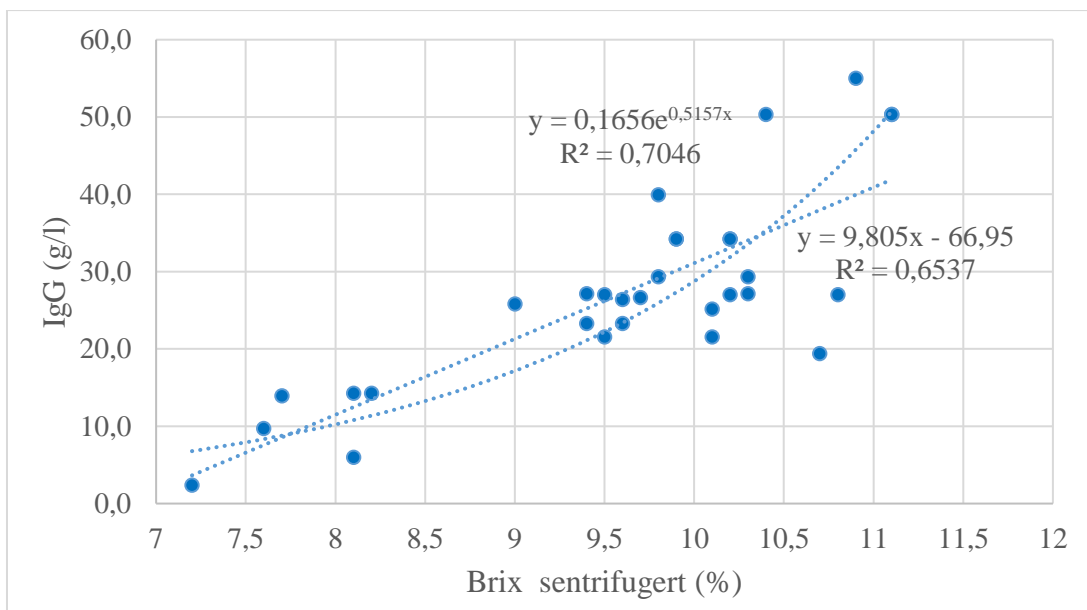
Resultatene fra regresjonsanalysen viser en korrelasjon (r) mellom Brix-verdiene (%) og IgG-konsentrasjonen (g/l) i blodserum fra den kjemiske analysen (RID) på 0,84 (p<0,0001), og 70 % (R²) av variasjonen i IgG-konsentrasjonen blir forklart av variasjonen i Brix-verdiene (figur 12).



Figur 12: Sammenhengen mellom Brix-verdi (%) og IgG-konsentrasjon (g/l) ved kjemisk analyse (RID) for sentrifugerte blodprøver (n=67).

Sammenhengen mellom Brix-verdier og IgG-konsentrasjon i blodserum ved kjemisk analyse ved en dags alder

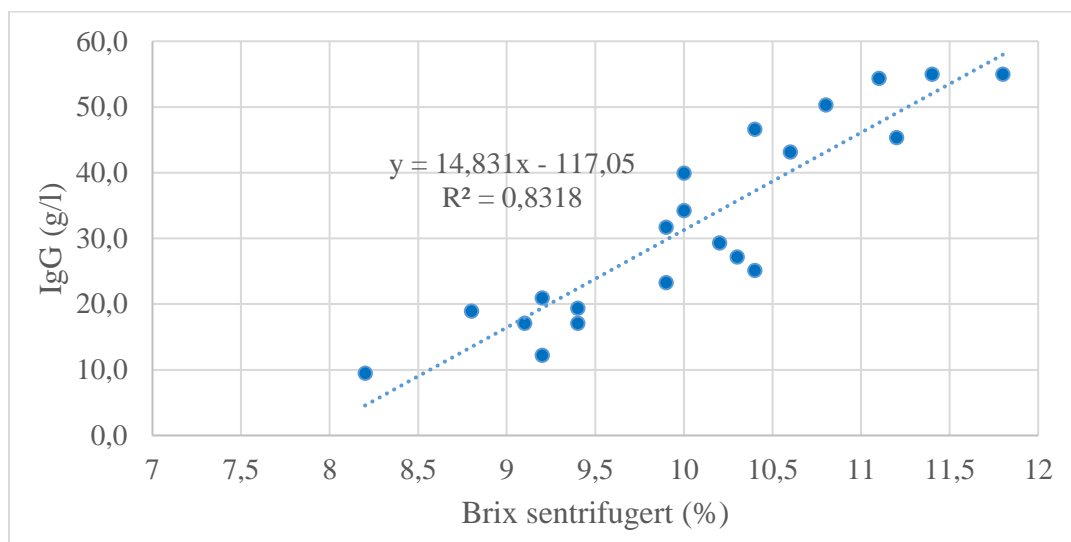
Det ble foretatt regresjonsanalyser mellom Brix-verdiene (%) og IgG-konsentrasjon (g/l) i blodserum (RID) når kalvene var en dag gamle. Den lineære og eksponentielle korrelasjonen (r) mellom Brix (%) og IgG-konsentrasjon i blodserum (g/l) fra den kjemiske analysen (RID) var henholdsvis 0,80 og 0,83 ($p < 0,0001$), og forklaringsgraden (R^2) var henholdsvis 65 % og 70 % (figur 13).



Figur 13: Sammenhengen mellom Brix-verdi (%) og IgG-konsentrasjon (g/l) fra kjemisk analyse (RID) for sentrifugerte blodprøver tatt ved en dags alder (n=31).

Sammenhengen mellom Brix-verdier og IgG-konsentrasjon i blodserum ved kjemisk analyse ved to dagers alder

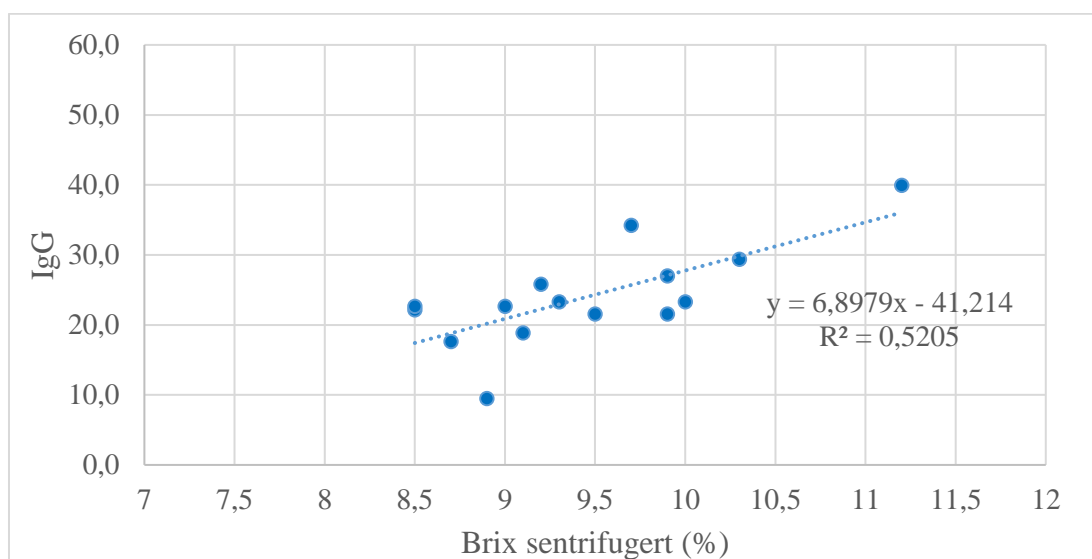
Resultatene viser at korrelasjonen (r) mellom Brix-verdiene (%) og IgG-konsentrasjon (g/l) fra kjemisk analyse (RID) ved to dagers alder var 0,91 ($p < 0,0001$). Variasjon i Brix-verdi (%) forklarte 83 % av variasjonen i IgG-konsentrasjon (g/l) (figur 14).



Figur 14: Sammenhengen mellom Brix-verdi (%) og IgG-konsentrasjon (g/l) fra kjemisk analyse (RID) for sentrifugerte blodprøver tatt ved to dagers alder (n=21).

Sammenhengen mellom Brix-verdier og IgG-konsentrasjon i blodserum ved kjemisk analyse ved tre dagers alder

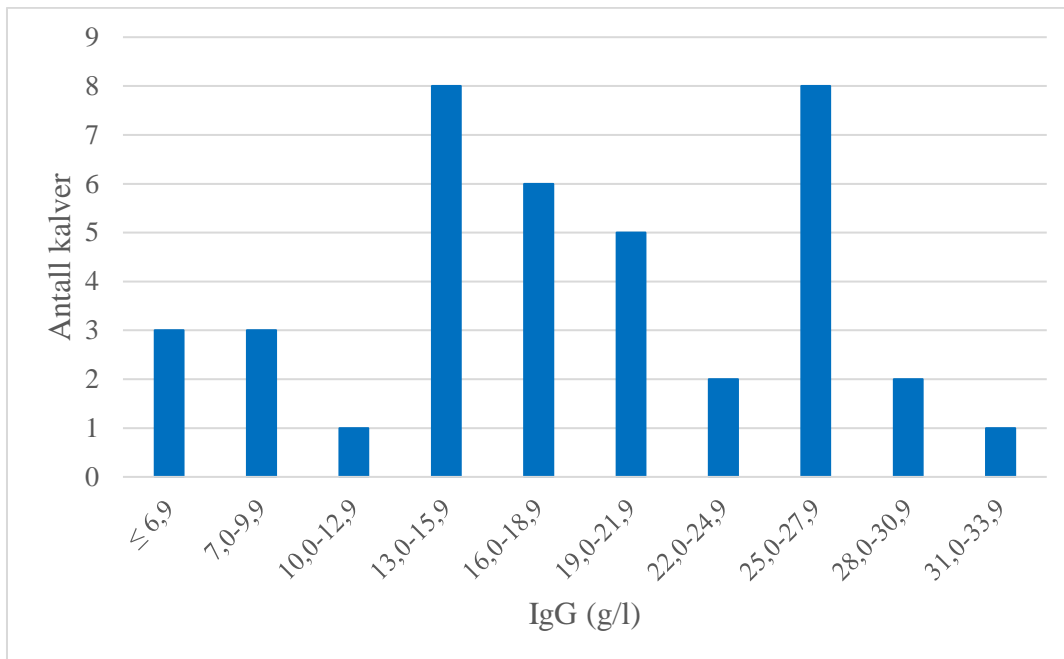
Resultatene viser at korrelasjonen (r) mellom Brix-verdi (%) og IgG-konsentrasjon (g/l) (RID) ved tre dagers alder var 0,72 ($p = 0,0024$) (figur 15). Variasjonen i Brix-verdi (%) forklarte 52 % av variasjonen i IgG-konsentrasjon (RID) i blodserum (g/l).



Figur 15: Sammenhengen mellom Brix-verdi (%) og IgG-konsentrasjon (g/l) fra kjemisk analyse (RID) for sentrifugerte blodprøver tatt ved tre dagers alder (n=15).

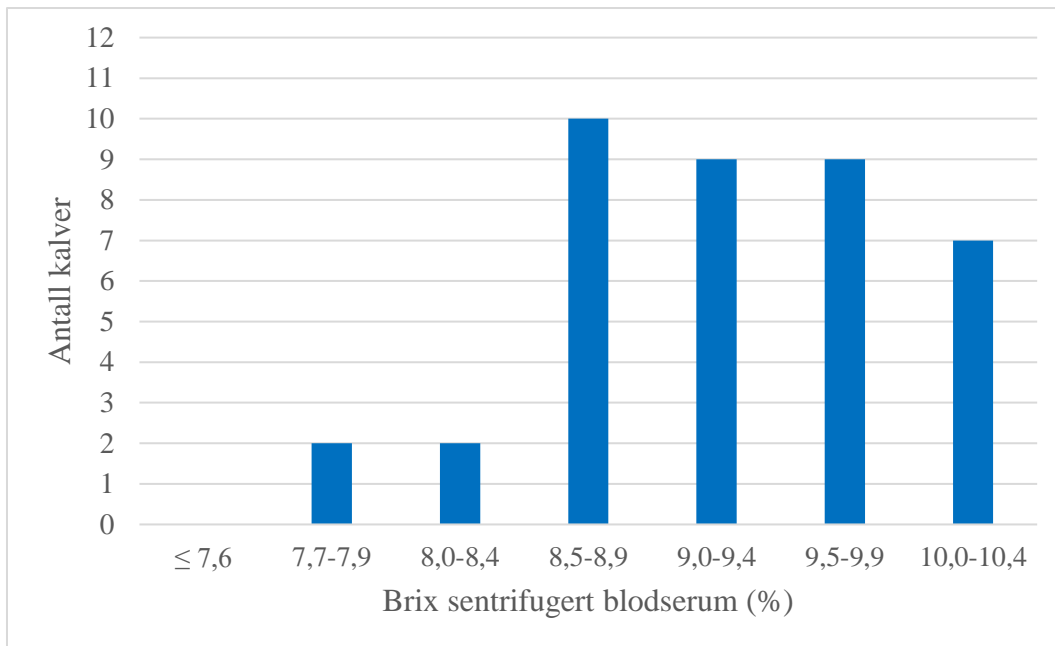
4.2.2. Sammenhengen mellom Brix-verdier og IgG-konsentrasjon ved kjemisk analyse ved andre blodprøveuttak

Gjennomsnittlig var kalvene åtte dager gamle, med en variasjon fra 6 til 12 dagers alder. Fordelingen av IgG-konsentrasjon (g/l) fra kjemisk analyse (RID) for kalvene viste at IgG-konsentrasjonen gjennomsnittlig var 18,8 g/l og varierte fra < 6,9 til 33,9 g IgG/l (figur 16). Det var ingen kalver som hadde en IgG-konsentrasjon i blodserum høyere enn 34,0 g/l.



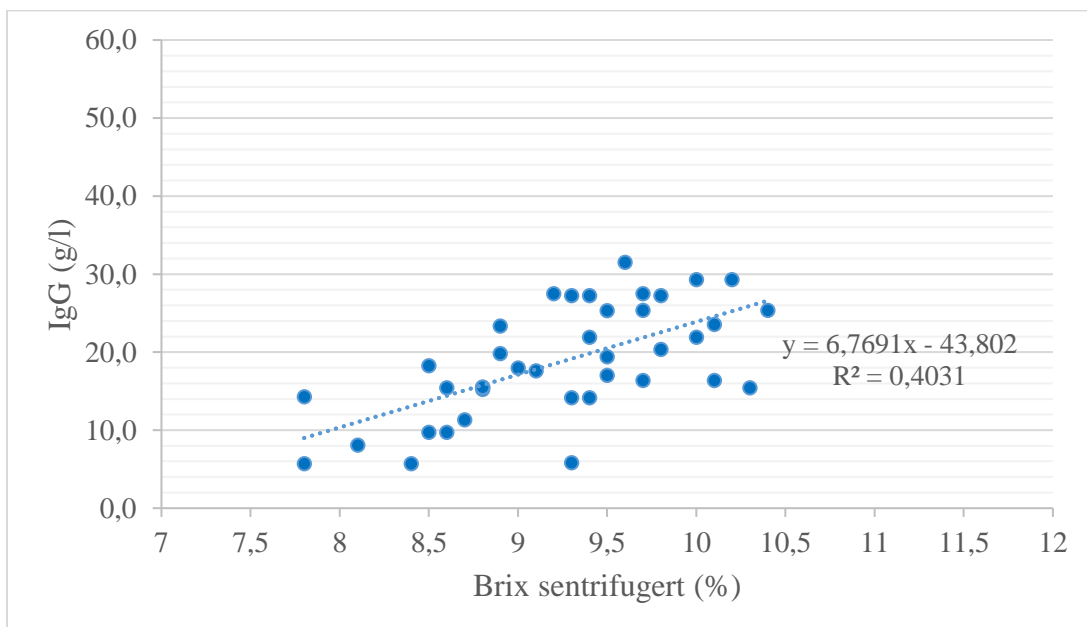
Figur 16: Fordelingen av IgG-konsentrasjonen i blodserum (g/l) ved kjemisk analyse (RID) for kalver ved omkring ti dagers alder (n=39).

Fordelingen av Brix-verdiene ved andre prøve er vist i figur 17. Alle serumprøvene hadde en Brix-verdi mellom 7,7 og 10,4 %, med en gjennomsnittlig Brix-verdi på 9,2 %.



Figur 17: Fordelingen av Brix-verdiene (%) ved andre blodprøve som ble tatt ved omkring ti dagers alder (n=39).

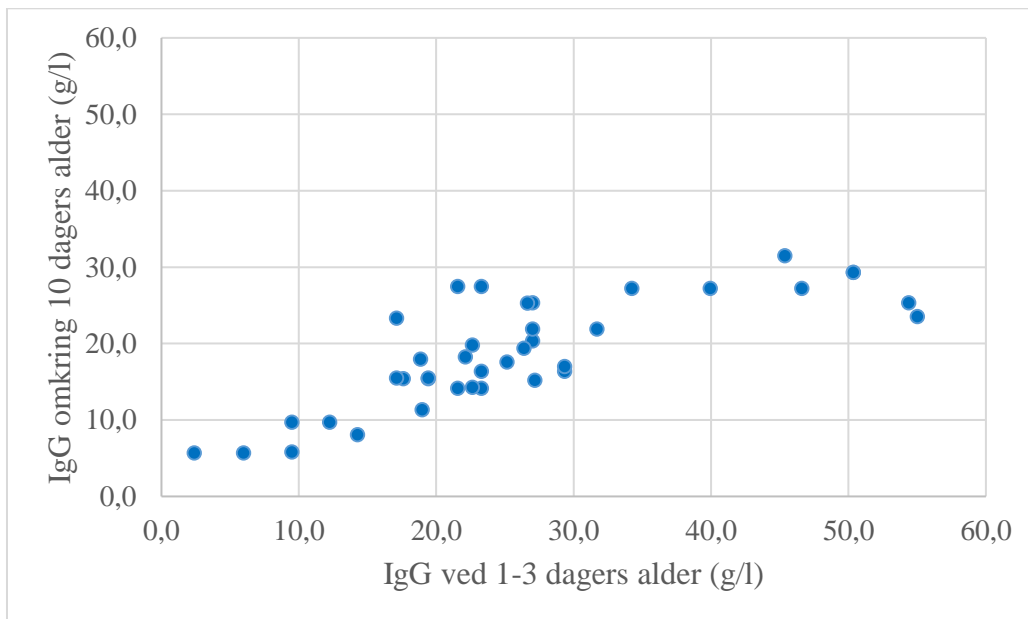
Sammenhengen mellom Brix-verdi (%) og IgG-konsentrasjon (g/l) ved kjemisk analyse (RID) er lavere ved andre blodprøveuttak sammenlignet med første (figur 18). Ved andre prøve var korrelasjonen (r) mellom Brix-verdiene (%) og IgG-konsentrasjonen (g/l) ved kjemisk analyse (RID) 0,64 ($p < 0,0001$), og forklaringsgraden (R^2) var 40 %.



Figur 18: Sammenhengen mellom Brix-verdi (%) og IgG-konsentrasjon (g/l) ved kjemisk analyse (RID) for sentrifugerte blodprøver ved omkring ti dagers alder (n=39).

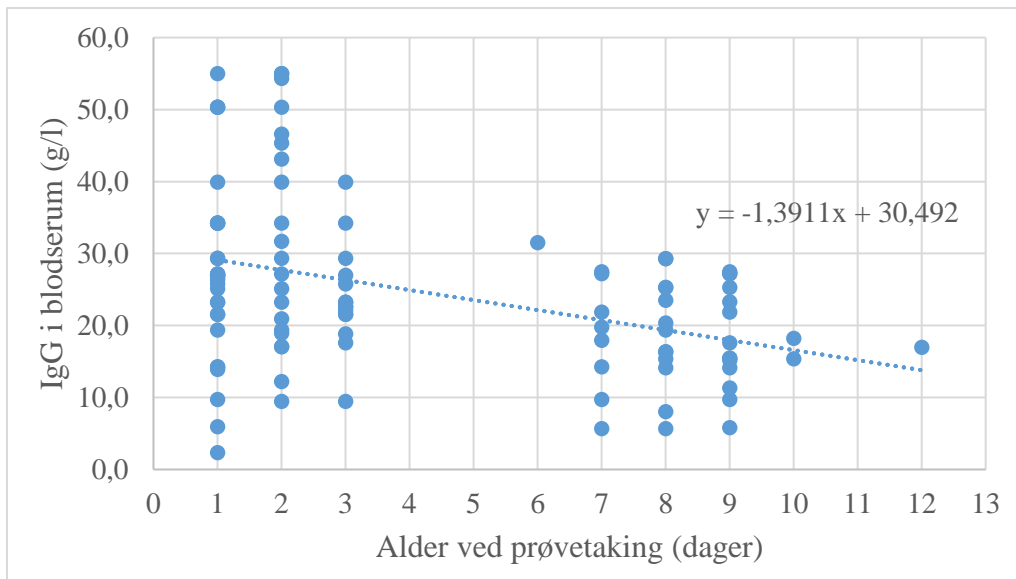
4.2.3. Sammenhengen mellom IgG-konsentrasjon i blodserum ved kjemisk analyse ved første og andre blodprøveuttak

Figur 19 viser sammenhengen i IgG-konsentrasjonen (g/l) fra kjemisk analyse (RID) for de samme 39 kalvene ved første og andre blodprøveuttak. Et punkt er IgG-konsentrasjonen ved første og andre blodprøveuttak for en enkelt kalv. Fem kalver økte IgG-konsentrasjon i blodserum fra første til andre blodprøve, mens 10 kalver reduserte IgG-konsentrasjon med over 10 g/l fra første til andre blodprøve. Ved andre blodprøve var det ingen av kalvene som hadde en IgG-konsentrasjon i blodserum høyere enn 34,0 g/l.



Figur 19: Sammenhengen i IgG-konsentrasjonen (g/l) fra første til andre blodprøve ved kjemisk analyse (RID)(n=39).

Resultatene viser at det er en sammenheng mellom IgG-konsentrasjonen ved første og andre prøve (figur 20). Sammenhengen mellom første og andre blodprøve er statistisk sikker ($p < 0,0001$).



Figur 20: Sammenhengen mellom IgG-konsentrasjonen i blodserum (g/l) mellom første og andre blodserumprøve ved kjemisk analyse (RID). Alle blodprøvene fra første og andre blodprøveuttak er inkludert.

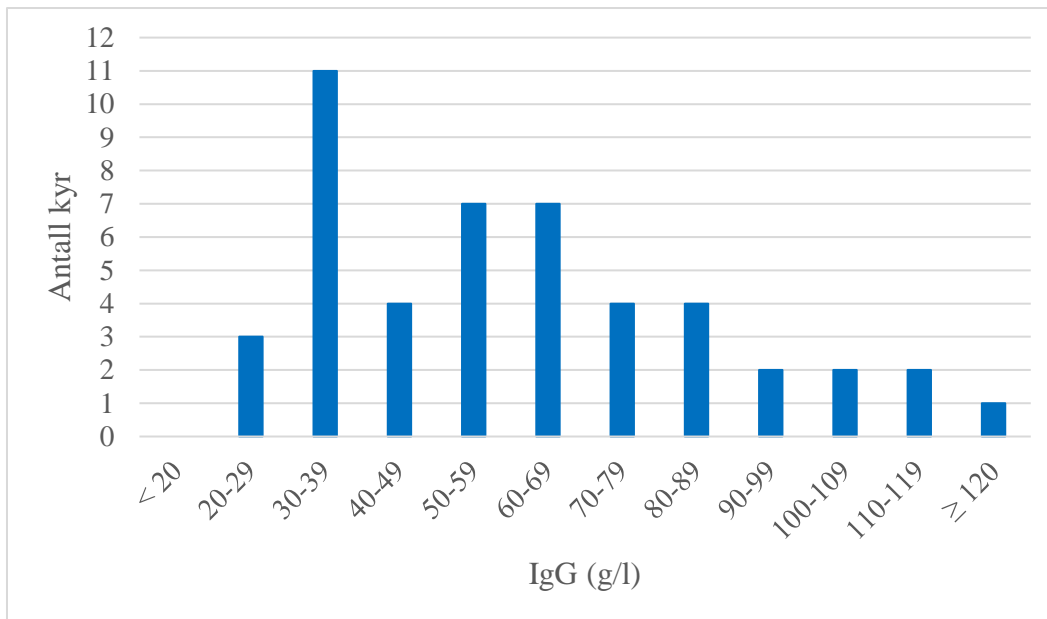
4.3. Råmelkskvalitet

Resultatene av RID-analysen viser at den gjennomsnittlige IgG-konsentrasjonen i råmelk var 61 g/l, med en variasjon fra 25 til 137 g/l (tabell 7).

Tabell 7: IgG-konsentrasjon i råmelken analysert med kjemisk analyse (RID) (n=47).

	Gjennomsnitt	Standardavvik	Minimum	Maksimum
IgG g/l	61	25,47	25	137

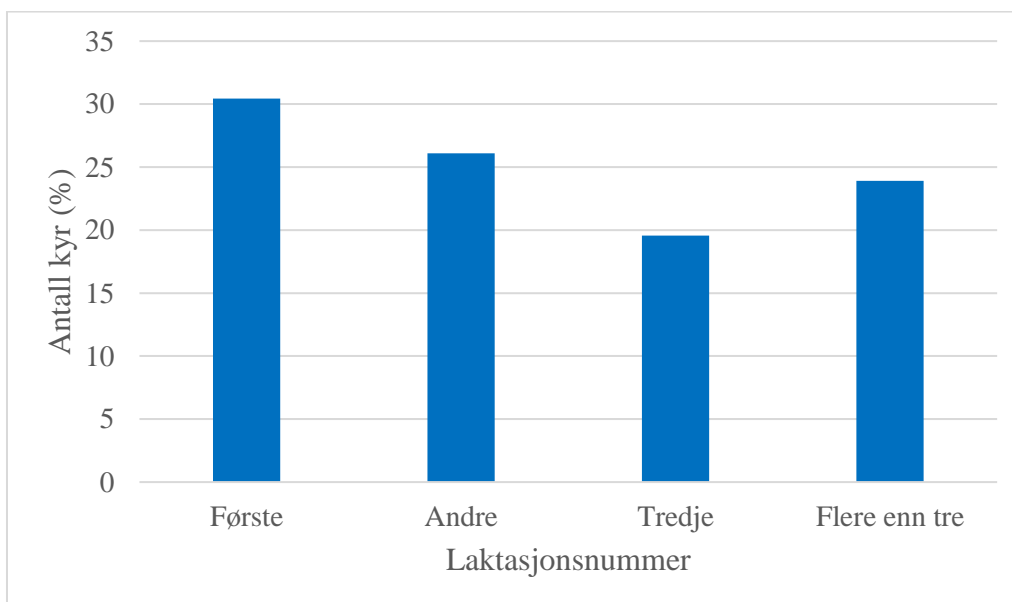
Fordelingen av IgG-konsentrasjonen i råmelken til de 47 kyrne viser stor spredning på konsentrasjonen, men den største gruppen lå mellom 30 og 39 g IgG/l (figur 21). Resultatene viser at 18 av de 47 kyrne hadde en IgG-konsentrasjon lavere enn 50 g/l i råmelken.



Figur 21: Fordelingen av IgG-konsentrasjonen i råmelk (g/l) fra første mål etter kalving for de 47 mødrene ved kjemisk analyse (RID) (n=47).

4.3.1. Effekt av laktasjonsnummer på råmelkskvaliteten

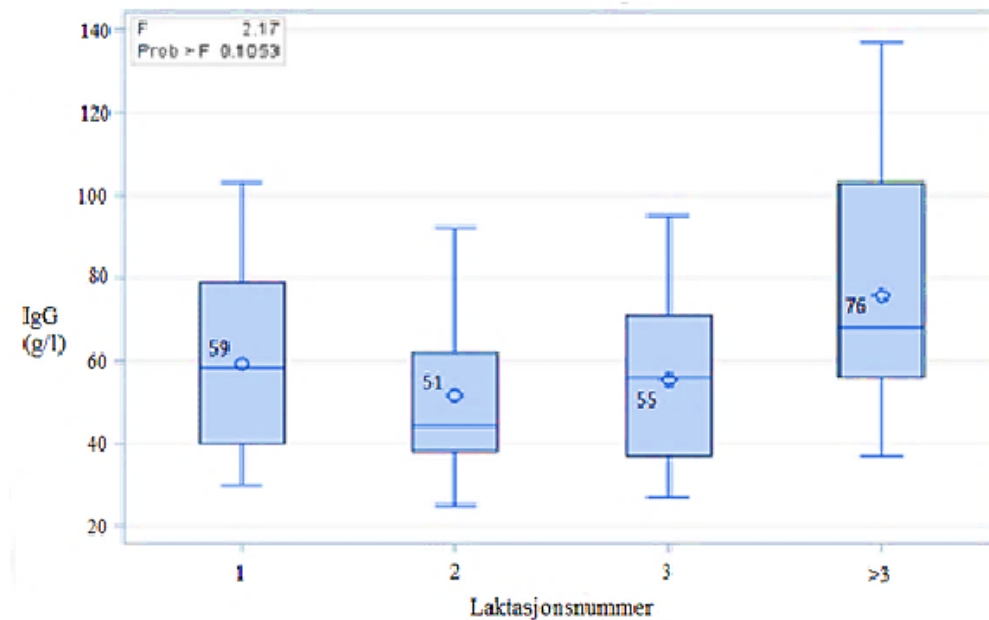
Fordelingen av kyrnes laktasjonsnummer er vist i figur 22.



Figur 22: Fordelingen (%) av laktasjonsnummer (n=46).

Kyr med flere enn tre laktasjoner hadde den høyeste gjennomsnittlige IgG-konsentrasjonen i råmelken, men det er også den gruppen med størst variasjon (figur 23). Kyr i andre laktasjon hadde den laveste gjennomsnittlige IgG-konsentrasjonen, men er også den gruppen som hadde lavest variasjon. Det var ingen signifikant forskjell på IgG-konsentrasjon mellom de fire

laktasjonsgruppene. Det var allikevel en tendens til at kyr i andre laktasjon hadde lavere gjennomsnittlig IgG-konsentrasjon i råmelken, sammenlignet med kyr som hadde hatt flere enn tre laktasjoner ($p=0,09$).



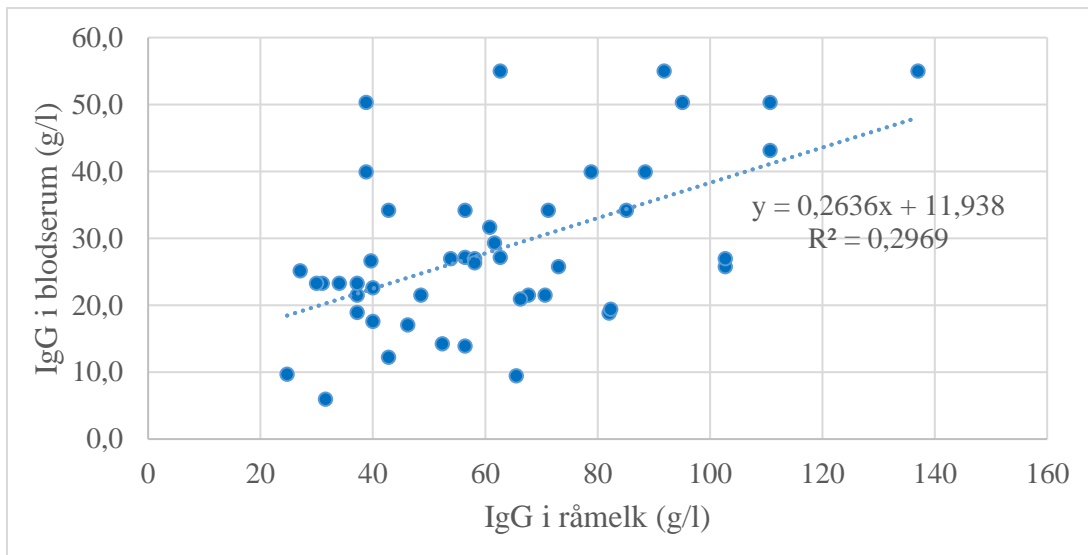
Figur 23: Gjennomsnittlig IgG-konsentrasjon i råmelk (g/l) og variasjonen for de fire ulike laktasjonsgruppene ved kjemisk analyse (RID) ($n=47$).

4.4. Overføring av IgG fra råmelk til kalvens blodserum

I de videre resultatene er det sett på tre ulike faktorer som er kjent for å påvirke kalvenes IgG-status; råmelkskvalitet, tiden fra fødsel til første tildeling, og mengden råmelk ved første tildeling.

4.4.1. Effekt av IgG-konsentrasjon i råmelk på kalvens IgG-konsentrasjon i blodserum

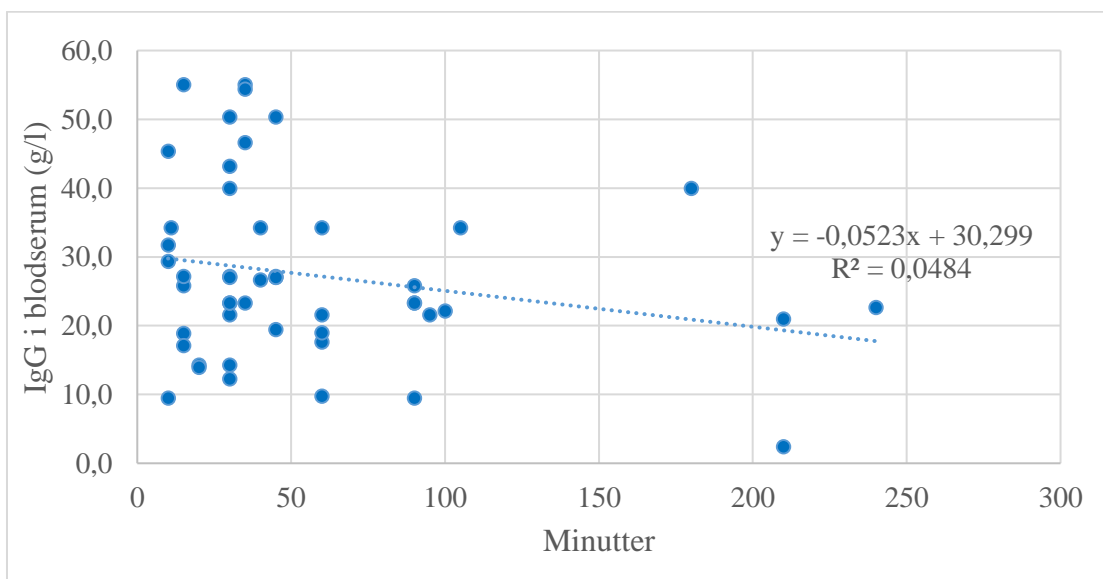
Resultatene over sammenheng (R^2) mellom IgG-konsentrasjon (g/l) ved RID-analyse i råmelk og i blodserum ved 1-3 dagers alder, viser at råmelkskvaliteten forklarte rundt 30 % av variasjonen i IgG-konsentrasjon i blodserum hos kalvene (figur 24). I regresjonen er alle de 47 kalvene tatt med, selv om noen verdier viste store avvik fra gjennomsnittet.



Figur 24: Sammenhengen mellom IgG-konsentrasjon i råmelk (g/l) og blodserum ved kjemisk analyse (RID) (n=47).

4.4.2. Effekt av tiden fra fødsel til første råmelkstildeling på kalvenes IgG-konsentrasjon i blodserum

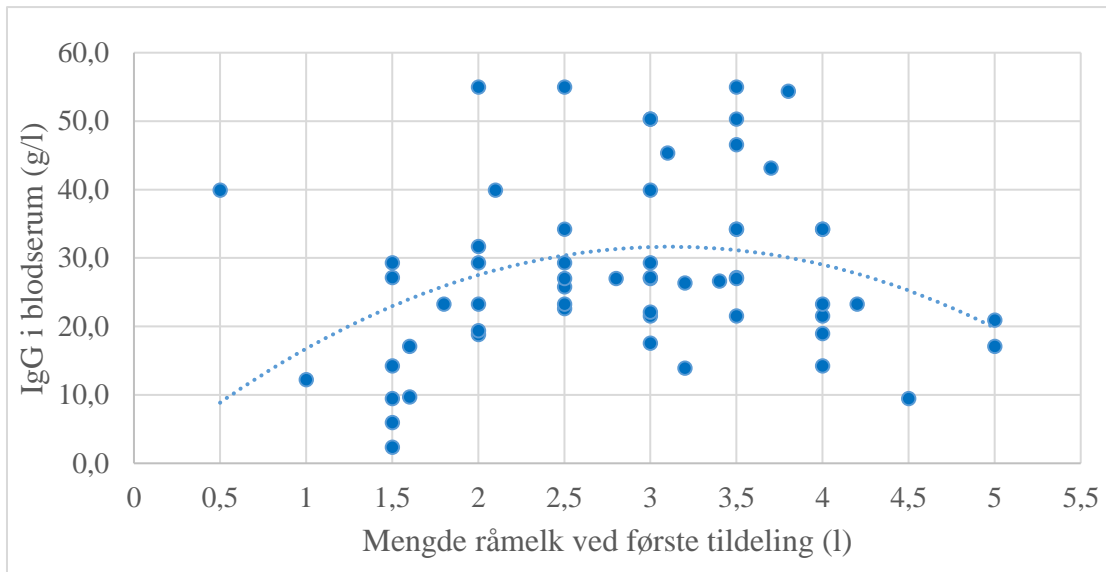
På grunn av mangler i noterings skjemaet til noen av kalvene, viser figur 25 resultatet for 49 kalver av totalt 67 kalver. Regresjonen mellom tid fra fødsel til første tildeling av råmelk og IgG-konsentrasjonen (g/l) i blodserum hos kalvene viser at den største andelen av kalvene fikk første tildeling av råmelk innen to timer etter fødsel, og at det var stor spredning i variasjon i IgG-konsentrasjon i blodserum mellom kalvene. Regresjonen viser liten sammenheng mellom tiden fra fødsel til første råmelkstildeling og IgG-konsentrasjonen i blodserum ved kjemisk analyse ($R^2=0,05$).



Figur 25: Sammenhengen mellom minutter fra fødsel til første tildeling av råmelk og IgG-konsentrasjonen i blodserum (g/l) hos kalvene ved 1-3 dagers alder ved kjemisk analyse (RID) (n=49).

4.4.3. Effekt av mengde råmelk ved første tildeling på kalvens IgG-konsentrasjon i blodserum

På grunn av noe manglende opplysninger på skjemaet og at enkelte kalver diet moren før de ble skilt, viser figur 26 bare 59 kalver av totalt 67 kalver. Kalvene med lavest råmelksinntak på 0,5 og 1,0 liter, hadde i tillegg diet moren før de ble skilt. Resultatene viser at det var stor variasjon på mengden råmelk kalvene drakk ved første tildeling, og det kan ut til at kalver som drakk ca. 3 liter råmelk hadde høyest IgG-konsentrasjon i blodserum (g/l).



Figur 26: Sammenhengen mellom liter råmelk ved første tildeling og IgG-konsentrasjonen (g/l) i blodserum ved 1-3 dagers alder ved kjemisk analyse (RID) (n=59).

5. Diskusjon

Hovedformålet med forsøket var å undersøke om det digitale Brix-refraktometeret Milwaukee kan benyttes til å estimere IgG-konsentrasjon i blodserum hos kalver ved 1-3 dagers alder og omkring 10 dagers alder. Det ble også undersøkt om det var sammenheng mellom IgG-konsentrasjonen i råmelk, tidspunktet, og mengden råmelk ved første tildeling og kalvenes IgG-konsentrasjon i blodserum målt ved RID-analyse.

5.1. Material og metode

5.1.1. Datamaterialet

Antall kalver i forsøket vil påvirke resultatene. Flere kalver i forsøket ville antakelig gitt en større spredning i IgG-konsentrasjon i blodserum, og flere kalver med utilstrekkelig opptak av IgG («failure of passive transfer» (FPT)). I tillegg ble forsøket gjennomført ved ett fjøs, som ut fra resultatene ser ut til å ha gode rutiner i forbindelse med kalving. Hadde forsøket omfattet flere kalver i ulike fjøs med ulike rutiner i forbindelse med kalving, vil det mest sannsynlig ha påvirket resultatene. Resultater fra flere besetninger ville gitt andre regresjonsligninger som mulig er bedre tilpasset en gjennomsnittlig besetning, fordi besetninger med høy og lav IgG-konsentrasjon i blodserum ville blitt inkludert.

På grunn av mange samtidige forsøk i fjøset på Ås gård, ble det stor variasjon i hvor mye tid røkterne kunne bruke på å notere ned informasjon om kalvene. En utfordring i datamaterialet var at det ikke ble notert ned informasjon om alle kalvene, og derfor viser noen resultater langt færre antall kalver enn det totale antallet ved 1-3 dagers alder (67 kalver). En annen utfordring var at kalvene ble flyttet til fellesbinge før det som ble avtalt før forsøket begynte, noe som kan ha påvirket IgG-konsentrasjonen ved andre blodprøveuttak.

Det ble tatt en råmelksprøve av alle kyrne som fikk kalv i løpet av forsøksperioden (antall 67), men det var bare 47 kyr som hadde et ørenummer som det var mulig å gjenkjenne som mødrene til kalvene i forsøket.

5.1.2. Refraktometeret Milwaukee

Refraktometeret var enkelt å benytte i forbindelse med målingene av IgG i blodserum. En fordel med refraktometeret sammenlignet med et kolostrometer, er at det er temperaturuavhengig. På den måten kan både råmelksprøver og blodserumsprøver kan bli testet uten tanke på å holde en spesifikk temperatur. Det gjør at temperatur kan utelukkes som en mulig feilkilde i resultatene.

Utfordringen ved praktisk bruk vil være å ha tilgang til destillert vann for å nullstille apparatet før målingen, og å holde målekammeret rent slik at ikke andre partikler påvirker resultatene. I tillegg er refraktometeret svært sensitivt for påvirkning av lys. Dette var grunnen til at lyset i rommet ble slukket og en hånd ble plassert over målekammeret ved analysering. En forbedring av refraktometeret med tanke på denne utfordringen, kan være å montere et tett lokk eller lignende over målekammeret.

En problemstilling er at refraktometeret beregner tørrstoffprosent, og ikke den faktiske IgG-konsentrasjon i blodserumet, slik at andre partikler i blodserumet kan påvirke resultatet. Dette kan også være noe av grunnen til at resultatene viser varierende korrelasjoner mellom en, to og tre dagers alder. I tillegg ble ikke hematokritt målt, noe som hadde vært en ekstra sikkerhet for å utelukke dehydrerte kalver. Selv om sterkt dehydrerte kalver ble utelukket, kan kalver som var lettere dehydrerte inngått i resultatene, noe som kan gi falsk høy Brix-verdi (%).

Det ble ikke undersøkt om apparatet ga repeterbare resultater, siden alle prøvene kun ble analysert en gang. Det kan da være en mulig svakhet om refraktometeret ikke gir repeterbare resultater og det gir en usikkerhet til resultatene i dette forsøket, selv om produsentene skriver at refraktometeret viser en variasjon på bare 0,2 % Brix (Milwaukee Instruments, u.å.).

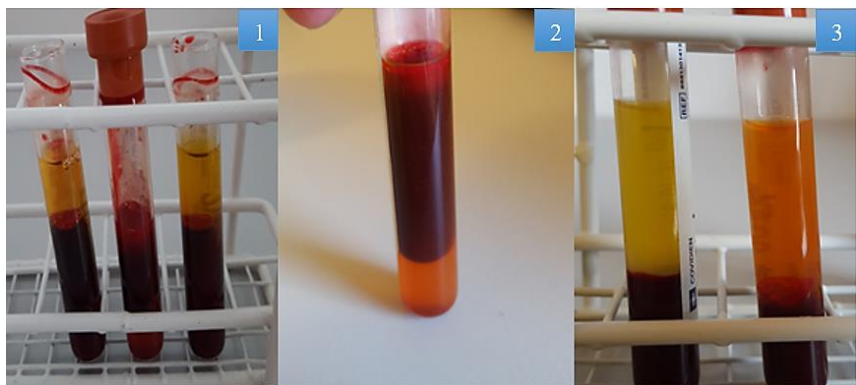
En gitt Brix-verdi blir benyttet som grenseverdien for å bestemme om en kalv har en IgG-konsentrasjon i blodserum høyere eller lavere enn det anbefalte nivået på 10,0 g/l. Ved å beregne en best tilpasset grenseverdi kan man raskere finne ut om kalven har for lavt eller tilstrekkelig IgG-konsentrasjon i blodserum ut fra Brix-verdien. Produsentene av Milwaukee skriver at de benytter en grenseverdi på 8,5 % (tabell 7). I forsøket viser resultatene at 8,3 og 8,5 % Brix ga høyest sensitiviteten og spesifisiteten sammenlignet med de andre Brix-grenseverdiene (%) som ble utprøvd. Dette betyr at kalver som har en Brix-verdi over 8,3-8,5 % har en IgG-konsentrasjon i blodserum høyere enn 10,0 g/l, i likhet med Brix-verdien som produsenten har satt som grenseverdi. Disse resultatene er også i samsvar resultatene til Deelen et al. (2014) og Elsohaby et al. (2015) som observerte best grenseverdi ved henholdsvis 8,4 og 8,3 % Brix, mens Morrill et al. (2013) observerte noe lavere grenseverdi (7,8 % Brix).

5.1.3. Metodestudier med refraktometeret Milwaukee

Resultatene viser at det var god korrelasjon i Brix-verdier (%) fra bunnfelte og sentrifugerte serumprøver (figur 8). Wallace et al. (2006) undersøkte om det var effekt av hvordan serumprøvene ble samlet inn og innholdet av totalprotein med ulike refraktometre. Fra forsøket ble det konkludert at ikke hadde noen effekt på resultatene av totalprotein om blodprøvene ble sentrifugert eller stod til bunnfelling, og det var høy forklaringsgrad mellom de to ulike metodene ($R^2=0,95$).

Fra resultatene på Ås var det en observasjon som skilte seg ut. Ved å kjøre en ny regresjon uten denne observasjonen, økte sammenhengen ytterligere ($R^2=0,96$). Observasjonen som skilte seg ut, hadde en mye høyere Brix-verdi (%) fra sentrifugering sammenlignet med bunnfelling. Det er usikkert hva som kan forklare forskjellen, men sannsynligvis har det skjedd noe ved målingen av den sentrifugerte serumprøven. Dette på grunn av at Brix-verdiene (%) fra fryst og bunnfelt blodserum var relativt like (resultater ikke vist).

Utfordringen med de bunnfelte blodprøvene var at det samlet seg røde blodceller i korken på glasset. Disse falt lett ned i blodserumet når glasset ble åpnet for å gjennomføre målingen på refraktometeret (bilde 7 (1)). Det ble i tillegg utelatt å analysere noen blodprøver som hadde stått til bunnfelling, fordi bunnfellingen hadde mislykkes. Grunnen til dette var at de røde blodcellene hadde festet seg til kanten øverst i glasset og koagulert der, og blodserumet endte da nederst i fullblodsglasset (bilde 7 (2)). Oransje blodserum kan skyldes at det har skjedd en hemolyse (nedbrytning av rødeblodceller) (bilde 7 (3)). Nyfødte kalver er født med hemoglobin som er tilpasset fosterlivet, og må i løpet av kort tid etter fødsel bytte det ut med hemoglobin som er tilpasset det nye miljøet (Sjaastad et al., 2010). En annen årsak til hemolyse kan være dårlig prøvebehandling eller uheldig blodprøvetaking. En siste årsak til oransje blodserum kan være at bunnfellingen ikke har stått lenge nok, slik at blodprøven ikke har skilt seg skikkelig. Hansen og Valbjørn (2005) konkluderte at hemolyserende prøver ikke kunne benyttes til å måle totalproteininnhold.



Bilde 7: Utfordringer med bunnfellingsprøvene. 1) Røde blodceller fra korker faller ned i serumet. 2) Blodcellene og platene har koagulert øverst i fullblodsglasset og serumet er nederst. 3) Oransje serum kan skyldes hemolyse eller for kort bunnfellingstid.

Resultatene fra Ås gård viser at det var god sammenheng mellom ferskt og fryst blodserum (figur 9), selv om det var to observasjoner som skilte seg ut. Ved å gjennomføre en ny regresjon uten disse to observasjonene økte sammenhengen ytterligere ($R^2=0,97$). For begge serumprøvene var det høyere Brix-verdi (%) fra sentrifugering sammenlignet med resultatene fra frysing og bunnfelling (figur 9). Dette kan tyde på at det kan ha skjedd noe når målingen av de to sentrifugerte serumprøvene ble gjennomført med refraktometeret. Selv om undersøkelsen ble gjennomført med to ulike Milwaukee refraktometre, ser ikke det ut til å ha påvirket resultatene i stor grad siden bunnfelte og fryste serumprøver viste tilnærmet lik Brix-verdi (%) (resultater ikke vist).

Bielmann et al. (2010) gjennomførte en lignende metodestudie med digitalt og optisk Brix-refraktometer, hvor det ble undersøkt om det var forskjell i Brix-verdi mellom ferskt og fryst råmelk. Deres resultater viste en høy korrelasjon ($r=0,97$) mellom fryste og ferske råmelksprøver med digitalt refraktometer, noe som er i samsvar med resultatene fra serumprøvene fra Ås gård. Hansen og Valbjørn (2005) konkluderte derimot at serumprøver som ble lagret på kjøll eller fryst utover to dager etter prøvetaking, ga en viss usikkerhet ved måling av totalprotein med Atago-refraktometeret.

5.1.4. Usikkerhet ved «Radial Immunodiffusion Test»

Selv om RID-analysen har blitt sett på som gullstandarden ved analysering av IgG i blodserum, er det en del usikkerheter i forbindelse med analyseringen. I forbindelse med analyseringen skal området hvor det har skjedd en reaksjon mellom antistoff og antigen måles med et skyvelære. Personen som måler må selv vurdere hvor stor diameteren er, noe som øker sannsynligheten for menneskelige feil. Noen få millimeter med skyvelæret fra eller til kan gi store utslag på IgG-konsentrasjonen når diameteren skal omberegnes til g IgG/l. Når disse prøvene ble analysert ble det gjennomført av samme person, for å redusere muligheten for menneskelige feil.

En del av prøvene som i første omgang ble analysert til å ha et større innhold enn 27 g IgG/l, fikk etter andre analyse et analyseresultat lavere enn 27 g IgG/l. Produsentene av RID-platene skrev at dette kommer av at RID-platene kan måle IgG-konsentrasjon mellom 2 til 30 g/l, og den største variasjonen var i det lavere og høyere området for testen. De mest nøyaktige og reproducerbare målingene var i området 10-15 g IgG/l. Noe som også kan ha påvirket resultatene er at serumprøvene ble tint til første analyse, for å deretter fryses igjen før en ny analyse av prøvene med høyere IgG-konsentrasjon enn 27 g/l kunne gjennomføres.

5.2. Sammenhengen mellom Brix-verdier og IgG-konsentrasjon ved kjemisk analyse av blodserum ved første blodprøve

Den gjennomsnittlige Brix-verdien (%) i serumprøvene fra dag 1-3 etter fødsel i dette forsøket var noe høyere enn hva Deelen et al. (2014) observerte, og vesentlig høyere enn hva som ble observert av Elsohaby et al. (2015) og Morrill et al. (2013), men lavere enn hva som ble observert i forsøket til Thornhill et al. (2015) (tabell 8).

Tabell 8: Gjennomsnittlig Brix-verdi (%), gjennomsnittlig IgG-konsentrasjon (g/l) ved kjemisk analyse (RID) og forklaringsgrad (R^2).

	Gjennomsnittlig Brix-verdi (%)	Gjennomsnittlig IgG-innhold g/l (RID)	R^2 mellom Brix (%) og IgG g/l (RID)
Ås gård	9,7	28,1	70 %
Morrill et al. (2013)	8,6	19,0	75 %
Deelen et al. (2014)	9,2	24,1	86 %
Elsohaby et al. (2015)	8,8	17,7	62 %
Thornhill et al. (2015)	10,2	22,5	73 %

Resultatene fra Ås gård viser at den gjennomsnittlige IgG-konsentrasjonen i blodserum analysert ved RID, lå relativt høyt sammenlignet med refererte studier i tabell 8. Ut fra disse resultatene kan det tyde på at kalvene på Ås gård har hatt høy absorpsjon av IgG fra tarmen. I alle studiene ble det i likhet med resultatene på Ås gård (figur 10), observert en stor variasjon i IgG-konsentrasjon i blodserum mellom kalvene. Deelen et al. (2014), observerte en variasjon på 2,1-59,1 g/l, Elsohaby et al. (2015) en variasjon på 1,3-60,0 g/l, Thornhill et al. (2015) en variasjon på 1,2-39,0 g/l og Morrill et al. (2013) en variasjon på 3,5-47,0 g/l.

Alle de refererte forsøkene benyttet seg av RID-analyse for å bestemme konsentrasjonen av IgG i serumprøvene. Faktorer som kan ha påvirket kalvenes IgG-konsentrasjon og gitt variasjoner mellom studiene er raseforskjeller, råmelkskvalitet, tiden fra fødsel til første tildeling, mengden råmelk kalvene fikk tildelt første døgn, stress og sykdom. En annen årsak kan være bruk av RID-plater fra ulike produsenter, samt kalvenes alder ved prøveuttak (Quigley, 2008).

Det kan være flere andre årsaker til at det blir observert så stor variasjon i IgG-konsentrasjon mellom studiene. I de tidligere refererte studiene (tabell 8) har det blitt samlet inn data fra flere produsenter, og dette gir stor variasjon i råmelkskvalitet, tid fra fødsel til første tildeling og mengden råmelk ved første tildeling. Deelen et al. (2014) samlet inn datamaterialet fra fem ulike besetninger, hvor kalvene ble tildelt tre liter råmelk, to liter råmelk eller fem liter råmelkerstatning. Elsohaby et al. (2015) samlet inn data fra seks besetninger, Thornhill et al.

(2015) fra fire besetninger og Morrill et al. (2013) fra en besetning. De studiene beskrev ikke råmelkskvaliteten, tiden fra fødsel til første tildeling eller mengden råmelk etter fødsel.

I de senere årene er det gjennomført en rekke studier for å undersøke sammenhengen mellom IgG-konsentrasjon (g/l) i blodserum målt ved RID og Brix-verdiene (%) fra ulike digitale refraktometre (Morrill et al., 2013; Deelen et al., 2014; Elsohaby et al., 2015; Thornhill et al., 2015). Resultatene fra Ås gård viser en signifikant positiv korrelasjon ($r=0,84$), og Brix-verdiene forklarer 70 % av variasjonen i IgG-konsentrasjonen i blodserum ved RID-analyse (figur 12). Disse resultatene er i samsvar med resultatene til Thornhill et al. (2015) som observerte at variasjonen i Brix-verdiene forklarte 73 % av variasjonen i IgG-konsentrasjon i blodserum (tabell 8). Andre forsøk som har blitt gjennomført med Brix-refraktometre har funnet noe varierende resultater. Morrill et al. (2013) observerte en forklaringsgrad på 75 %, Elsohaby et al. (2015) observerte noe lavere forklaringsgrad på 62 %, mens Deelen et al. (2014) observerte den høyeste forklaringsgraden på 86 % (tabell 8).

I de refererte forsøkene (tabell 8) er blodprøven tatt ut ved ulik alder hos kalven. Dette kan være en årsak til variasjoner i forklaringsgrad mellom de ulike studiene. Elsohaby et al. (2015) observerte den laveste forklaringsgraden av de nevnte studiene, og grunnen til dette kan være at blodprøvene ble samlet inn mellom en og elleve dagers alder, noe som gir en veldig stor variasjon i alder hos kalvene. Dette kan, i likhet med resultatene fra andre blodprøve fra Ås gård, skyldes at blodserumet til eldre kalver inneholder andre komponenter som påvirker målingene. Samtidig vil eldre kalver utsettes for stadig mer smittestoff, noe som kan stimulere det aktive immunsystemet. Deelen et al. (2014) observerte en overraskende høy forklaringsgrad, spesielt med tanke på at serumprøvene ble samlet inn mellom tre og seks dagers alder. Thornhill et al. (2015) og Morrill et al. (2013) gjennomførte begge blodprøvetakingene ved 24-48 timers alder, og observerte høy korrelasjon mellom Brix-verdi og IgG-konsentrasjon fra RID-analyse. En annen årsak til ulike forklaringsgrader kan være bruk av forskjellige digitale Brix-refraktometre, men det ikke er beskrevet hvilke refraktometre som er benyttet i de refererte studiene (tabell 8).

En årsak til at det ble funnet noe lavere forklaringsgrad i forsøket på Ås gård enn noen av de refererte studiene (tabell 8), kan være at blodprøvene ble tatt i samme fjøs av relativ få kalver. Forsøkene i tabell 8 omfatter 200-400 kalver, unntatt studien gjennomført av Thornhill et al. (2015) hvor det inngikk 48 kalver. I tillegg inngikk alle 67 kalvene i regresjonsanalysen, mens det i forsøket til Morrill et al. (2013) ble tatt ut 15 prøver som hadde en IgG-konsentrasjon i blodserum lavere enn 3,4 g/l ved RID-analyse.

Regresjonsanalysen sannsynliggjør at refraktometeret Milwaukee kan benyttes til å beregne IgG-konsentrasjon i blodserum hos kalver ved 1-3 dagers alder ut fra målte Brix-verdier (%) (figur 12). Regresjonslikningen i figur 12 er basert på observasjonene fra Ås gård, som synes å være en besetning med høy IgG-konsentrasjon i råmelken hos majoriteten av kyrne og i blodserumet til kalvene. Det kan derfor diskuteres om resultatene er representative og kan benyttes i andre besetninger, spesielt i besetninger med lavere IgG-konsentrasjon i blodserum. For å etablere en sikrere sammenheng burde det gjennomføres et større forsøk hvor det blir tatt blodprøve av langt flere kalver i ulike besetninger, slik at regresjonslikningen er bedre tilpasset en større spredning i IgG-konsentrasjon i blodserum.

Sammenhengen mellom IgG-konsentrasjonen (g/l) fra RID-analyse og Brix-målingene (%) ble delt opp i tre grupper avhengig av kalvens alder ved prøvetaking (figurer 13-15). Resultatene viser at det å gjennomføre blodprøvetakingen ved to dagers alder ga den høyeste korrelasjonen ($r=0,91$) mellom RID-analyse av IgG (g/l) og Brix-verdier (%) ($p<0,0001$). Hos helt nyfødte kalver (< 24 timer) ved første planlagte prøvetaking, ble prøvetakingen flyttet til neste fjøsbesøk for å unngå for kort periode fra fødsel til første blodprøve. Årsaken til at korrelasjonen er høyere ved to dagers alder sammenlignet med en dags alder, kan være fordi kalvene fortsatt absorberer IgG (Parish et al., 1997). Den laveste korrelasjonen var i gruppen som det ble tatt blodprøve av ved tre dager alder. Dette kan skyldes kroppens katabolisme og utskillelse av immunstoffer, noe som fører til en nedgang i sirkulerende immunstoffer i blodserum (Parish et al., 1997). Heinrichs og Jones (2003) anbefalte å undersøke IgG-konsentrasjon ved 24-48 timers alder og Parish et al. (1997) ved 36-48 timer for mest nøyaktighet, noe som er i samsvar med resultatene fra Ås gård. Derfor vil det ut fra disse resultatene anbefales å gjennomføre et blodprøveuttak ved to dagers alder for å undersøke kalvenes immunstatus.

5.3. Sammenheng mellom Brix-verdier og IgG-konsentrasjon ved kjemisk analyse av blodserum ved andre blodprøve

På grunn av at kalvene ble flyttet før ti dagers alder, ble den gjennomsnittlige alderen ved andre blodprøvetaking åtte dager. Den gjennomsnittlige IgG-konsentrasjon i blodserum og Brix-verdien (%) hadde gått ned fra første til andre blodprøve (figur 16, 17 og 19). Ingen av kalvene hadde en IgG-konsentrasjon høyere enn 34,0 g/l ved andre prøvetaking. En årsak til at kalvenes IgG-konsentrasjon i blodserum er lavere ved andre blodprøve kan være at immunproteinene

brytes ned, samtidig som kalvens aktive immunsystem først begynner å utvikle ved en ukes alder og produserer svært lite IgG (Overrein et al., 2015).

Korrelasjonen mellom IgG-konsentrasjon i blodserum (g/l) fra RID og Brix-verdiene (%) var dårligere ved andre sammenlignet med første blodprøve (figur 18). En forklaring på dette kan være at blodserumet inneholder flere komponenter som påvirker lysbrytningen ved målingen med refraktometeret. I studien til Elsohaby et al. (2015) ble det tatt blodprøve av kalvene mellom en og elleve dagers alder, og denne store spredningen ved uttak av blodprøvene kan være årsaken til det der ble observert den laveste korrelasjonen mellom IgG-konsentrasjon og Brix-verdi.

Hansen og Valbjørn (2005) gjennomførte en eksamensoppgave ved dyrlegeutdanningen i Danmark, hvor de undersøkte sammenhengen mellom IgG-konsentrasjon ved kjemisk analyse og totalproteininnhold ved et Atago-refraktometer. De konkluderte at blodprøvetakingen burde gjennomføres hos kalver yngre enn ni dager på grunn av lavere sammenheng mellom totalprotein og IgG-konsentrasjon ved høyere alder. De observerte at kalver med høy totalproteinverdi ved to dagers alder falt kraftigere enn kalver med lavere innhold. Samt observerte de at noen kalver med utilstrekkelig opptak av IgG ved to dagers alder, hadde høyere totalproteininnhold ved blodprøver tatt etter ti dagers alder. Denne observasjonen er i samsvar med resultatene på Ås gård (figur 19). Der viser resultatene at kalvene som hadde den kraftigste reduksjonen i IgG-konsentrasjon i blodserum fra første til andre blodprøveuttak, hadde en IgG-konsentrasjon høyere enn 27 g/l ved første blodprøve. Resultatene viste også at fem kalver økte IgG-konsentrasjonen i blodserum fra første til andre blodprøveuttak, og to av disse hadde en IgG-konsentrasjon lavere enn 10 g/l ved første prøve.

Selv om sammenhengen var lavere omkring ti dagers alder sammenlignet med 1-3 dagers alder, var det en signifikant korrelasjon ($p < 0,0001$) mellom Brix-verdier (%) og IgG-konsentrasjon i blodserum (g/l). Det vil videre bety at Milwaukee trolig kan benyttes til å estimere IgG-konsentrasjonen i blodserum hos kalver omkring ti dagers alder. Regresjonsligning i figur 18 kan benyttes til å beregne IgG-konsentrasjon (g/l) i blodserum hos kalver omkring ti dagers alder ut fra Brix-verdiene (%).

Svakheten ved resultatene til det andre blodprøveuttaket var at en stor andel av kalvene ble flyttet til fellesbinger langt tidligere enn det som var planlagt. Dette kan ha påvirket immunsystemet til kalvene, fordi de blir utsatt for et nytt miljø og mange andre kalver.

Resultatene fra RID-analysen viser at IgG-konsentrasjonen ble redusert med 1,4 g/l per dag fra første til andre blodprøveuttak (figur 20). Regresjonsanalysen av resultatene fra kjemisk analyse viser at den er en høy sammenheng mellom IgG-konsentrasjonen (g/l) ved første og andre blodprøveuttak ($p < 0,0001$).

For videre forskning bør det utvikles en korreksjonsformell for å kunne estimere hva kalvens IgG-konsentrasjon trolig var ved to dagers alder ut fra resultater fra blodprøver tatt omkring ti dagers alder. Veterinæren kan da vurdere om besetningen sliter med IgG-opptaket eller om majoriteten av kalvene har hatt et tilstrekkelig opptak av IgG etter fødsel. Som tidligere beskrevet, bør kalvenes IgG-konsentrasjon i blodserum vurderes ut fra innholdet ved 24-48 timers alder.

Hansen og Valbjørn (2005) utviklet i sin oppgave en korreksjonsformell som beregner totalproteininnholdet (mg/ml) i kalvenes blodserum ved to dagers alder, ut fra resultatene fra blodprøve tatt mellom 3 og 38 dagers alder. Denne formelen er tilpasser resultatene fra Atago-refraktometeret, og kan ikke benyttes ved bruk av Milwaukee-refraktometeret da dette oppgir resultatene i Brix (%). Videre konkluderte de at korreksjonsformelen er utviklet på datagrunnlaget for 30 kalver, så en utvidelse av datamaterialet vil kunne styrke valideten til formelen. Formelen hadde også en tendens til å underestimere kalver som hadde et høyt totalproteininnhold i blodserum. Videre konkluderer de at formelen er best egnet til å undersøke om besetninger sliter med FPT eller ikke.

5.4. Råmelkskvalitet, overføring av IgG fra råmelk til kalvenes blodserum og immunstatus ved 1-3 dagers alder

5.4.1. Råmelkens IgG-konsentrasjon

Råmelk av god kvalitet skal ifølge litteraturen ha en IgG-konsentrasjon høyere enn 50 g/l, og det har blitt gjennomført en rekke forsøk hvor råmelkskvaliteten har blitt undersøkt (Pritchett et al., 1991; Gulliksen et al., 2008; Morin et al., 2010). I et forsøk hvor man så på råmelkskvaliteten til 1250 NRF-kyr fra 119 besetninger spredt over hele Norge, viste resultatene en gjennomsnittlig IgG-konsentrasjon på 51,7 g/l med en variasjon fra 4 til 235 g/l (Gulliksen et al., 2008). Ut fra disse resultatene, kan det se ut til at råmelkskvaliteten på Ås gård ligger vesentlig høyere enn hva det kan antas å være på landsbasis (tabell 7). Godden (2008) viste til en studie i sin litteraturgjennomgang gjennomført med Holstein, hvor den gjennomsnittlige IgG-konsentrasjonen i råmelken var 76 g/l med variasjon fra 9 til 186 g/l.

Dette resultatet var høyere enn hva som ble observert blant de 47 kyrne på Ås. Pritchett et al. (1991) utførte også en studie med Holstein hvor resultatene ga en gjennomsnittlig IgG₁-konsentrasjon i råmelk på 48,2 g/l, noe som er langt lavere enn i forsøket Godden (2008) refererer til. IgG består av fire subgrupper, hvor det i hovedsak bare er IgG₁ som blir overført fra blodserumet til kyrne over til råmelken (Sasaki et al., 1976). Derfor er IgG₁ et godt bilde på råmelkskvaliteten. Et annet forsøk som ble gjennomført med 81 Holstein fra samme besetning viste en gjennomsnittlig IgG-konsentrasjon på 41 g/l, noe som er langt lavere verdiene fra Ås gård (Morin et al., 2010).

Det kan være flere årsaker til at det har blitt observert stor variasjon i IgG-konsentrasjon i råmelken i ulike studier. Faktorer som kan påvirke innholdet er raseforskjeller, laktasjonsnummeret til kyrne, utmelkingstidspunkt og melkemengden ved første utmelking, og ikke minst smittepresset som kyrne utsettes for i besetningen. En grunn til at det ble observert høyere konsentrasjon av IgG i råmelken på Ås gård sammenlignet med forsøket til Gulliksen et al. (2008), kan være at det er et stort fjøs med mange dyr. I tillegg ble det observert noe sykdom (akutt mastitt, i tillegg til noen andre sykdommer) i løpet av forsøksperioden på Ås gård. Dette kan ha resultert i at de hadde et høyt immunstoffinnhold i blodserum, som videre ble overført til råmelken. I forsøk hvor det ble observert lav IgG-konsentrasjon, kan en mulighet være at smittepresset var så lavt slik at kyrne fikk et lavere innhold av immunstoffer i blodserum sammenlignet med kyr i besetninger med høyere smittepress. Flere av studiene var gjennomført med Holstein, og den melkerasen er kjent for høy melkeproduksjon (Muller & Ellinger, 1981; Morin et al., 2010). Det fører til IgG-innholdet blir fortynnet og konsentrasjonen blir lavere ved utmelking.

Fra den kjemiske analysen av råmelken fra kyrne på Ås gård, viser resultatene at 38 % hadde en IgG-konsentrasjon lavere enn 50 g/l (figur 21). Fra studien med NRF gjennomført av Gulliksen et al. (2008), kunne de konkludere at majoriteten av kyrne hadde for dårlig råmelkskvalitet. De observerte at hele 57,8 % av prøvene hadde en IgG-konsentrasjon lavere enn 50 g/l, noe som er langt flere enn resultatene fra Ås gård. Quigley et al. (2013) observerte i et forsøk med 183 kyr i USA, at kun 16 % av kyrne hadde en IgG-konsentrasjon lavere enn 50 g/l. Morrill et al. (2012) gjennomførte en større studie med 827 kyr i USA, og konkluderte at 30 % av prøvene hadde en IgG-konsentrasjon lavere enn 50 g/l, noe som er i samsvar med det som er observert på Ås gård, men mye lavere enn resultatene til Gulliksen et al. (2008).

Laktasjonsnummer har ifølge litteraturen betydning for konsentrasjon av IgG i råmelken (Pritchett et al., 1991; Gulliksen et al., 2008). Ut fra resultatene fra Ås gård, er det en tendens til at kyr i andre laktasjon har lavere IgG-konsentrasjon i råmelken enn kyr som har hatt flere enn tre laktasjoner (figur 23). Dette er i samsvar med resultatene til Pritchett et al. (1991), Quigley et al. (1994) og Gulliksen et al. (2008). Gulliksen et al. (2008) begrunnet funnet med at eldre kyr har blitt utsatt for antigener mye lengre enn yngre kyr, og derfor produserer de råmelk som inneholder mer immunstoffer. De observerte også at kyr i andre laktasjon produserte råmelk av dårligere kvalitet enn kyr i første laktasjon. En grunn til ikke er tydeligere forskjeller mellom laktasjonsnumrene på Ås gård, kan være det begrensede datamaterialet. En studie som Weaver et al. (2000) refererer til, fant ingen forskjell mellom kyr i første og tredje laktasjon, men kyr i tredje laktasjon hadde signifikant høyere IgG-konsentrasjon enn kyr i andre laktasjon. Shearer et al. (1992) konkluderte derimot fra sin studie at kyr i andre laktasjoner og eldre, hadde høyere sannsynlighet for å ha god råmelkskvalitet sammenlignet med kyr i første laktasjon.

Det er andre faktorer som også kan ha påvirket IgG-konsentrasjonen i råmelken til kyrne på Ås gård, blant annet lengden og ernæring i sintiden og forekomst av mastitt. Dette er det ikke informasjon om, og det er ikke mulig å si i hvor stor grad dette har påvirket IgG-konsentrasjonen i råmelken. Siden alle kalvene ble født mellom august og november antas det at sesongvariasjoner i liten grad påvirket IgG-konsentrasjonen. Gulliksen et al. (2008) observerte at kyrne som fikk kalv i løpet av vintermånedene hadde signifikant lavere IgG-konsentrasjon enn kyrne som kalvet i løpet av de andre sesongene.

Forsøksopplegget ga ikke mulighet til å måle IgG-konsentrasjon i råmelk ved hjelp av refraktometeret, noe som hadde vært ønskelig. Milwaukee blir primært solgt til bønder eller andre som har behov til å måle råmelkskvaliteten. Dragset og Whist (2015) skrev i en artikkel i fagbladet Buskap om et forsøk gjennomført med refraktometeret. Forsøket ble gjennomført i løpet av våren 2015, hvor totalt 260 råmelksprøver ble testet på refraktometeret og analyser med RID ved Mastittlaboratoriet i Molde. Resultatene viste at det var høy korrelasjon mellom Brix-verdiene (%) fra refraktometeret og IgG-konsentrasjonen ved RID-analyse. Dette gjør at bonden med stor trygghet kan investere i et Milwaukee refraktometer for å måle råmelkskvaliteten til kyrne. Selv om den primære bruken av Milwaukee vil være å måle IgG-konsentrasjon i råmelk, ble denne masteroppgaven gjennomført for å undersøke om veterinærer kan benytte det samme apparatet til å vurdere kalvens IgG-konsentrasjon i blodserum i besetninger som sliter med kalvehelsen. På den måten kan man finne ut om råmelkstildelingen

har vært tilstrekkelig eller om det burde settes i gang tiltak for å forbedre råmelksrutinene i fjøset.

5.4.2. Overføring av IgG fra råmelk til kalvens blodserum

I dette forsøket hadde kun 7,5 % av kalvene lavere IgG-konsentrasjon enn det litteraturen anbefaler i blodserum (figur 10) (Godden, 2008). Det ble gjennomført en studie i Nord-Trøndelag med 88 melkekubesetninger og 17 ammekubesetninger med totalt 746 kalver (Nybø et al., 2005). Resultatene viste at 65,4 % av serumprøvene hadde en IgG-konsentrasjon lavere enn 10 g/l, og 21,2 % hadde en konsentrasjon lavere enn 5 g/l. Resultater fra «Kalvehelseprosjektet» som ble gjennomført fra 2004 til 2008, viste at 31 % av totalt 584 kalver under 14 dagers alder hadde en IgG-konsentrasjon lavere enn 10 g/l (Gulliksen et al., 2011). Resultatene fra disse to undersøkelsene tyder på at det er et stort antall kalver i norske besetninger som har en IgG-konsentrasjon i blodserum som er langt under det anbefalte nivået. Resultatene fra Ås gård kan tyde på at de har lyktes med å gi kalvene tilstrekkelige mengder råmelk av god kvalitet raskt etter fødsel.

Det har blitt gjennomført en rekke amerikanske studier hvor kalvenes IgG-konsentrasjon i blodserum har blitt undersøkt ved kjemisk analyse. Deelen et al. (2014) observerte i en studie med 400 kalver, at kun 4,8 % av kalvene hadde en IgG-konsentrasjon lavere enn 10,0 g/l. Elsohaby et al. (2015) skrev at det i 2007 ble observert FPT hos 19-40 % av populasjonen. I en annen studie ble det rapportert at 41 % av kalvene i studien hadde en IgG-konsentrasjon i blodserum lavere enn 10 g/l ved 24-48 timers alder (Quigley, 2004; Godden, 2008). I en litteraturstudie gjennomført av Weaver et al. (2000) ble det referert til en undersøkelse hvor de antok at 35 % av kalvene fra melkekyr hadde FPT.

Lav absorpsjon av IgG er i seg selv er ingen sykdom, men kalver med lav immunitet utvikler ofte sykdommer fordi immunsystemet ikke greier å bekjempe de patogene agens som angriper kroppen (Weaver et al., 2000). Hva som er lav immunstatus vil i stor grad bestemmes av smittepresset i fjøset (Tyler et al., 1999). En kalv med IgG-konsentrasjon i blodserum lavere enn 10 g/l, kan ha tilstrekkelig immunitet hvis smittepresset er lavt. I Norge har kalvedødeligheten vært omkring 3-5 %, mens det i Europa, USA og Canada har blitt rapportert en kalvedødelighet på 10-20 % (Lie et al., 2005; Gulliksen et al., 2009c). Høyere forekomst av FPT i Norge kan skyldes lavere forekomst av kalvesykdom sammenlignet med resultatene fra flere amerikanske og europeiske studier (Nybø et al., 2005; Gulliksen et al., 2008; Gulliksen et

al., 2009c). En årsak til det lavere smittepresset kan være relativt små besetninger som er spredt over hele landet, samt gode rutiner for sykdomsbehandling og -forebygging (Østerås, 2009).

I USA ble det rapportert en høyere overlevelse blant de nyfødte kalvene når flere produsenter gikk over fra å la kalven die kua til å føre med flaske eller sonde (Godden, 2008). Fra resultatene på Ås gård var det ingen av kalvene som diet moren før de ble skilt, som hadde FPT (resultater ikke vist).

Resultatene fra Ås gård viser at det var tre kviger og to oksekalver som hadde utilstrekkelig IgG-konsentrasjon i blodserum (resultater ikke vist). Quigley (2004) skrev at FPT ble observert oftere hos okser, noe resultatene fra et forsøk i USA viste. Resultatene fra forsøket viste at hos 1110 oksekalver mellom tre til åtte dagers alder, hadde over 57 % av kalvene en IgG-konsentrasjon lavere enn 10 g/l. Ut fra resultatene på Ås gård er det ikke grunnlag for å kunne vurdere kjønnsforskjeller.

5.4.3. Effekt av råmelkskvalitet, tidspunktet og mengden råmelk ved første tildeling

Resultatene fra forsøket viser at variasjonen i IgG-konsentrasjonen (g/l) i råmelken forklarte 30 % av variasjonen i kalvenes IgG-konsentrasjon (g/l) i blodserum (figur 24). Morin et al. (1997) konkluderte at kalvene som fikk tildelt råmelk med høy IgG-konsentrasjon (60,1 g/l) hadde høyere IgG-konsentrasjon i blodserum enn kalvene som fikk tildelt råmelk med lav IgG-konsentrasjon (32,9 g/l). Siden det ikke var mulig å få resultatene fra RID-analysen av råmelken fra alle mødrene, er det vanskelig å se om kyr med lav IgG-konsentrasjonen i råmelken har gitt kalver med lav IgG-konsentrasjon i blodserum (FPT). Kun to av kalvene med FPT har mødre hvor det ble registrert en råmelksprøve (resultater ikke vist).

Tynntarmens evne til å absorbere immunstoffer reduseres raskt og opphører tilslutt ved ca. 24 timers alder, og i tillegg øker utskillelsen av fordøyelsesenzymer slik at de store immunproteinene blir brutt ned (Stott et al., 1979a). Tiden fra fødsel til første tildeling av råmelk er derfor avgjørende for kalvenes IgG-konsentrasjon i blodserum. Majoriteten av kalvene i forsøket fikk tildelt råmelk i løpet av to timer etter fødsel, og dermed er det vanskelig å si noe om tiden fra fødsel til første tildeling hadde effekt på IgG-konsentrasjonen i blodserum (figur 25). I tillegg var det stor variasjon i IgG-konsentrasjon i blodserum hos kalvene som fikk tildelt råmelken innen to timer.

Det har gjennom årene kommet mange anbefalinger om hvor mye råmelk kalvene burde tildeles ved første råmelksmåltid (Nybø et al., 2003; Godden, 2008; Overrein et al., 2015). Det er anbefalt alt fra 1,0 dl/kg levendevekt til at kalven skal få drikke så mye den selv ønsker (Nybø et al., 2003) I tillegg har ikke de norske forskriftene for hold av storfe gitt konkrete anbefalinger på hvor mye råmelk kalvene bør tildeles. I dette forsøket ser det ut til at kalvene som fikk tildelt ca. tre liter råmelk ved første tildeling hadde den høyeste IgG-konsentrasjonen i blodserum (figur 26). Det er usikkert hvor mye kalvene totalt drakk i løpet av det første døgnet på grunn av manglende opplysninger på skjemaet, noe som også vil påvirke resultatet. Resultatene i forsøket til Nybø et al. (2003) viste at kalvene som fikk tildelt råmelk etter appetitt ved første tildeling, hadde høyere IgG-konsentrasjon i blodserum enn kalvene som ble tildelt maks en eller to liter råmelk. Hvor mye kalvene drakk ved fri tilgang er ikke beskrevet.

Morin et al. (1997) observerte i et stort forsøk med råmelkstildeling og helseeffekter hos kalver, at kalver som fikk tildelt fire liter innen en time etter fødsel hadde høyere IgG-konsentrasjon enn kalvene som fikk tildelt to liter. I forsøket fikk alle kalvene tildelt råmelk av like kvalitet, slik at det skulle være mulig å sammenligne gruppene. Det ble heller ikke observert ubehag eller diaré hos kalvene som fikk tildelt fire liter råmelk. Faber et al. (2005) konkluderte fra sin studie at kalver som fikk tildelt fire liter råmelk ved første tildeling umiddelbart etter fødsel, hadde høyere melkeproduksjon i første og andre laktasjon sammenlignet med kalvene som fikk tildelt to liter. Ut fra disse resultatene kan det tyde på at kalvene bør få tildelt fire liter råmelk umiddelbart etter fødsel, men ut fra resultatene på Ås gård så det ut til at kalvene som drakk tre liter råmelk hadde den høyeste IgG-konsentrasjonen.

Selv om forsøk har vist at det kan være lønnsomt å tildele kalvene store mengder råmelk umiddelbart etter fødsel, har praktiske erfaringer fra bønder vist at kalver som drikker relativt mye ved første måltid kan være vanskeligere å få til å drikke ved neste måltid. For å kartlegge hvor mye råmelk som gir den høyeste IgG-konsentrasjonen i blodserum, hadde det vært interessant å dele inn kalver i grupper som får tildelt to, tre, fire eller fem liter råmelk av samme kvalitet umiddelbart etter fødsel. Deretter måtte det tas blodprøve av kalvene omkring 24-48 timers alder for høyest nøyaktighet av IgG-konsentrasjonen i blodserum.

6. Konklusjon

Metodestudiet som ble gjennomført med sentrifugert og bunnfelt blodserum viser at det er høy korrelasjon ($r=0,94$) mellom Brix-verdiene fra de to metodene. Derfor kan veterinærer eller andre benytte seg av bunnfelling istedenfor å måtte ha tilgang til en sentrifuge, og kunne forvente å få det samme resultatet. Det var i tillegg god korrelasjon mellom Brix-verdiene fra ferskt og fryst serum ($r=0,94$), og det kan dermed konkluderes at blodserumprøvene tåler å fryses ved -20 °C før analyse.

Resultatene viser at Milwaukee trolig kan benyttes til å måle kalvens IgG-konsentrasjonen i blodserum ved en til tre dagers alder bekrefte. Det var høy korrelasjon mellom IgG-konsentrasjon fra kjemisk analyse (RID) og Brix-verdiene (%) ved blodprøver som ble tatt mellom en og tre dagers alder ($r=0,84$). Det vil likevel anbefales å gjennomføre blodprøvetakingen ved to dagers alder, da resultatene viser en høyere korrelasjon ($r=0,91$) sammenlignet med en ($r=0,80$) eller tre dagers alder ($r=0,72$). Med regresjonsligningen som ble utarbeidet kan man beregne IgG-konsentrasjonen i blodserum ut fra Brix-verdien. En grenseverdi på 8,3-8,5 % kan benyttes for å bestemme om kalven har for lavt eller tilstrekkelig IgG-konsentrasjon i blodserum.

Resultatene viser at Milwaukee kan benyttes til å estimere IgG-konsentrasjon i blodserum hos kalvene ved ca. 10 dagers alder, da det var signifikant korrelasjon mellom IgG-verdien fra RID-analysen og Brix-verdiene ($r=0,64$). Den kjemiske analysen (RID) ga en signifikant korrelasjon mellom den første og andre blodprøven ($r=0,40$).

Resultatene viser at råmelkskvaliteten alene forklarte 30 % av variasjonen i IgG-konsentrasjon i blodserum hos kalvene. Majoriteten av kalvene fikk tildelt råmelk innen det hadde gått to timer etter fødsel, derfor er det vanskelig å bekrefte om tid fra fødsel til første tildeling hadde effekt på IgG-konsentrasjonen i blodserum. Resultatene viser at kalvene som fikk tildelt 3 liter ved første tildeling, hadde det høyeste IgG-konsentrasjon i blodserum sammenlignet med de andre kalvene som drakk 1-4 liter råmelk. Ut fra disse resultatene er det ikke mulig å bekrefte hypotesen om at IgG-konsentrasjon i råmelk, tidspunkt fra fødsel til første tildeling og mengde ved første tildeling har effekt på IgG-konsentrasjonen i blodserum. Grunnen til dette er at faktorene er meget sammensatte og bør studeres nærmere i egne forsøk.

En forbedring av refraktometeret Milwaukee kan være å montere et lokk over målekammeret, slik at lys ikke påvirker målingene. For videre forskning med refraktometeret hadde det vært interessant å undersøke om apparatet gir høy repeterbarhet på samme prøve. Dette for å ha en større trygghet i at målingene ikke gir for stor variasjon i måleverdiene. Det vil også være interessant å gjennomføre forsøk hvor flere besetninger blir inkludert, slik at det kan utvikles en regresjonsmodell for å beregne IgG-konsentrasjon fra Brix-verdi ved første og andre blodprøveuttak. Dette gjør at regresjonsmodellen kunne vært tilpasset besetninger med både høy og lav IgG-konsentrasjon i blodserum. Videre bør det utvikles en korreksjonsformell som veterinærene kan benytte for å enkelt kunne estimere hva kalvenes IgG-konsentrasjon mest trolig har vært ved to dagers alder, ut fra blodprøver tatt ved et senere tidspunkt.

For videre forskning hadde det vært interessant å gjennomføre en studie for å se på hvilken råmelksmengde umiddelbart etter fødsel som gir høyest IgG-konsentrasjon i blodserum ved 24-48 timers alder. Kalvene bør da deles inn i flere grupper som får tildelt en, to, tre, fire eller fem liter råmelk umiddelbart etter fødsel, og en blodprøve blør gjennomføres ved 2-48 timers alder for høyest nøyaktighet av konsentrasjonen.

7. Litteraturliste

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai, S. (2014). *Basic immunology: functions and disorders of the immune system*: Elsevier Health Sciences.
- Ball, D. W. (2006). Concentration scales for sugar solutions. *J. Chem. Educ*, 83 (10): 1489.
- Bartier, A., Windeyer, M. & Doepel, L. (2015). Evaluation of on-farm tools for colostrum quality measurement. *Journal of dairy science*, 98 (3): 1878-1884.
- Besser, T., Garmedia, A., McGuire, T. & Gay, C. (1985). Effect of colostrum immunoglobulin G1 and immunoglobulin M concentrations on immunoglobulin absorption in calves. *Journal of Dairy Science*, 68 (8): 2033-2037.
- Besser, T. E. & Osborn, D. (1993). Effect of bovine serum albumin on passive transfer of immunoglobulin G1 to newborn calves. *Veterinary immunology and immunopathology*, 37 (3-4): 321-327.
- Bielmann, V., Gillan, J., Perkins, N., Skidmore, A., Godden, S. & Leslie, K. (2010). An evaluation of Brix refractometry instruments for measurement of colostrum quality in dairy cattle. *Journal of dairy science*, 93 (8): 3713-3721.
- Blum, J. W. & Hammon, H. (2000). Colostrum effects on the gastrointestinal tract, and on nutritional, endocrine and metabolic parameters in neonatal calves. *Livestock Production Science*, 66 (2): 151-159.
- Bourne, F., Newby, T., Evans, P. & Morgan, K. (1978). The immune requirements of the newborn pig and calf. *Ann Res Vet*, 9: 239-244.
- Bush, L. J. & Staley, T. (1980). Absorption of colostrum immunoglobulins in newborn calves. *Journal of Dairy Science*, 63 (4): 672-680.
- Calloway, C. D., Tyler, J. W., Tessman, R. K., Hostetler, D. & Holle, J. (2002). Comparison of refractometers and test endpoints in the measurement of serum protein concentration to assess passive transfer status in calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 221 (11): 1605-1608.
- Chase, C. C., Hurley, D. J. & Reber, A. J. (2008). Neonatal immune development in the calf and its impact on vaccine response. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 24 (1): 87-104.
- Cortese, V. S. (2009). Neonatal immunology. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 25 (1): 221-227.
- Davis, D. G., Schaefer, D. M., Hinchcliff, K. W., Wellman, M. L., Willet, V. E. & Fletcher, J. M. (2005). Measurement of serum IgG in foals by radial immunodiffusion and automated turbidimetric immunoassay. *Journal of veterinary internal medicine*, 19 (1): 93-96.
- Deelen, S., Ollivett, T., Haines, D. & Leslie, K. (2014). Evaluation of a Brix refractometer to estimate serum immunoglobulin G concentration in neonatal dairy calves. *Journal of dairy science*, 97 (6): 3838-3844.
- DeNise, S., Robison, J., Stott, G. & Armstrong, D. (1989). Effects of Passive Immunity on Subsequent Production in Dairy Heifers I. *Journal of Dairy Science*, 72 (2): 552-554.
- Dragset, K. I. & Whist, A. C. (2015). Nok råmelk av god kvalitet gir robuste friske kalver *Buskap*, 6/2015 (6): 24-28.
- Elsohaby, I., McClure, J. & Keefe, G. (2015). Evaluation of digital and optical refractometers for assessing failure of transfer of passive immunity in dairy calves. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 29 (2): 721-726.
- Faber, S., Faber, N., McCauley, T. & Ax, R. (2005). Case study: effects of colostrum ingestion on lactational performance. *The Professional Animal Scientist*, 21 (5): 420-425.

- George, J. W. (2001). The usefulness and limitations of hand-held refractometers in veterinary laboratory medicine: An historical and technical review. *Veterinary Clinical Pathology*, 30 (4): 201-210.
- Godden, S. (2008). Colostrum management for dairy calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 24 (1): 19-39.
- Grøndahl, A. M., Johnsen, J. F. & Mejdell, C. M. (2011). Overføring av smittestoffer fra ku til kalv i melkefôringsperioden - en litteraturstudie. *Norsk veterinærtidsskrift*, Nr. 4/2011 (4): 9.
- Gulliksen, S., Lie, K., Sølverød, L. & Østerås, O. (2008). Risk factors associated with colostrum quality in Norwegian dairy cows. *Journal of dairy science*, 91 (2): 704-712.
- Gulliksen, S. M. (2008). Riktig bruk av KRUISE Colostrum densimeter. Tilgjengelig fra: <http://storfehelse.tine.no/kalv/kalvehelse/r%C3%A5melk-og-immunitet/det-er-viktig-at-r%C3%A5mj%C3%B8lka-har-nok-immunstoffer> (lest 10.03.2017).
- Gulliksen, S. M., Jor, E., Lie, K. I., Hammes, I. S., Loken, T., Akerstedt, J. & Osteras, O. (2009a). Enteropathogens and risk factors for diarrhea in Norwegian dairy calves. *J Dairy Sci*, 92 (10): 5057-66.
- Gulliksen, S. M., Jor, E., Lie, K. I., Løken, T., Åkerstedt, J. & Østerås, O. (2009b). Respiratory infections in Norwegian dairy calves. *Journal of dairy science*, 92 (10): 5139-5146.
- Gulliksen, S. M., Lie, K. I., Loken, T. & Osteras, O. (2009c). Calf mortality in Norwegian dairy herds. *J Dairy Sci*, 92 (6): 2782-95.
- Gulliksen, S. M. (2010). Hvordan har kalven det i norske besetninger? Tilgjengelig fra: <http://storfehelse.tine.no/kalv/kalvehelseprosjektet/kalvehelseprosjektet/hvordan-har-kalven-det-i-norske-melkebesetninger> (lest 11.01.2017).
- Gulliksen, S. M., Hansen, H. S. & Østerås, O. (2011). God start for kalven - framtidens ku. *Husdyrforsøksmøte 2005*. Tilgjengelig fra: <http://www.umb.no/statisk/husdyrforsoksmoter/2011/13.pdf> (lest 08.05.2017).
- Hansen, G. P. & Valbjørn, E. (2005). *Brug af refraktometer til vurdering af Ig-status hos kalve*. Eksamensoppgave. Kvægfagdyrlægenes årsmøde 2006.
- Hansen, H. S. (2007). Calf management, Steinkjer, Norway, 20-22 June 2007: proceedings from the conference.
- Hansen, H. S., Sakshaug, A. & Fløttum, J. (2009). Optimal produksjon av kalv. 2. utg. Havrevoll, Ø. (2002). *Fôring av kalven til god helse*. Kurs i Helsetjenesten for storfe. Upublisert manuskript,. Gardermoen.
- Heinrichs, A. J. & Jones, C. M. (2003). *Feeding the Newborn Dairy Calf*. Pennsylvania: Pennsylvania State University.
- Heinrichs, J. & Jones, C. (2011). Colostrum Management Tools: Hydrometers and Refractometers. *Penn State Extension*.
- Helsetjenesten for storfe. (2013). *Kalvesjukdom*. storfehelse.tine.no: Helsetjenesten for storfe. Tilgjengelig fra: <http://storfehelse.tine.no/kalv/kalvehelse/kalvesjukdom/kalvesjukdom> (lest 11.01.2017).
- Hurley, W. L. & Theil, P. K. (2011). Perspectives on immunoglobulins in colostrum and milk. *Nutrients*, 3 (4): 442-474.
- Johnson, J., Godden, S., Molitor, T., Ames, T. & Hagman, D. (2007). Effects of feeding heat-treated colostrum on passive transfer of immune and nutritional parameters in neonatal dairy calves. *Journal of dairy science*, 90 (11): 5189-5198.
- Kehoe, S., Jayarao, B. & Heinrichs, A. (2007). A survey of bovine colostrum composition and colostrum management practices on Pennsylvania dairy farms. *Journal of dairy science*, 90 (9): 4108-4116.

- Kent laboratories. (2016). *Radial Immunodiffusion Plates*. kentlabs.com: Kent laboratories.
Tilgjengelig fra:
http://www.kentlabs.com/content/Kent_Products/rid_plate_procedure.asp (lest 26.01.2017).
- Kesler, E. (1981). Feeding Mastitic Milk to Calves: Review 1, 2. *Journal of dairy science*, 64 (5): 719-723.
- Korhonen, H., Marnila, P. & Gill, H. (2000). Milk immunoglobulins and complement factors. *British Journal of Nutrition*, 84: S75-S80.
- Kummer, A., Kitts, D., Li-Chan, E., Losso, J., Skura, B. & Nakai, S. (1992). Quantification of bovine IgG in milk using enzyme-linked immunosorbent assay. *Food and Agricultural Immunology*, 4 (2): 93-102.
- Lie, K. I., Gulliksen, S. M., Jor, E., Nafstad, O., Sivland, S., Løken, T., Simensen, E. & Østerås, O. (2005). Kalve- og ungdyrhelse i Norge. *Husdyrforsøksmøte 2005*.
Tilgjengelig fra: <http://www.umb.no/statisk/husdyrforsoksmoter/2005/123.pdf> (lest 08.05.2017).
- Lovdata. (2004). Forskrift om hold av storfe. Tilgjengelig fra:
<https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2004-04-22-665> (lest 13.02.2017).
- Malmo, T., Simensen, E., Nybø, K. & Østerås, O. (2005). Navlebetennelse hos kalver i 105 storfebesetninger i Beitstad, Nord-Trøndelag. *Husdyrforsøksmøte 2005*. Tilgjengelig fra: <http://www.umb.no/statisk/husdyrforsoksmoter/2005/116.pdf> (lest 11.01.2017).
- Mattilsynet. (2005). *Veileder til forskrift om økologisk produksjon og merking av økologiske landbruksprodukter og næringsmidler, av 4. oktober 2005 nr. 1103*: Mattilsynet. 56 s.
- Maunsell, F., Morin, D., Constable, P., Hurley, W., McCoy, G., Kakoma, I. & Isaacson, R. (1998). Effects of mastitis on the volume and composition of colostrum produced by Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 81 (5): 1291-1299.
- McCue, P. M. (2007). Evaluation of a turbidimetric immunoassay for measurement of plasma IgG concentration in foals. *American journal of veterinary research*, 68 (9): 1005-1009.
- McDougall, S., Parker, K., Heuer, C. & Compton, C. (2009). A review of prevention and control of heifer mastitis via non-antibiotic strategies. *Veterinary microbiology*, 134 (1): 177-185.
- McGuirk, S. M. & Collins, M. (2004). Managing the production, storage, and delivery of colostrum. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 20 (3): 593-603.
- McMartin, S., Godden, S., Metzger, L., Feirtag, J., Bey, R., Stabel, J., Goyal, S., Fetrow, J., Wells, S. & Chester-Jones, H. (2006). Heat treatment of bovine colostrum. I: Effects of temperature on viscosity and immunoglobulin G level. *Journal of dairy science*, 89 (6): 2110-2118.
- Mechor, G., Gröhn, Y., McDowell, L. & Van Saun, R. (1992). Specific gravity of bovine colostrum immunoglobulins as affected by temperature and colostrum components. *Journal of dairy science*, 75 (11): 3131-3135.
- Microsoft. (2016). *Excel*: Microsoft Office
- Milwaukee Instruments. (u.å.). *INSTRUCTION MANUAL Milwaukee Refractometer MA882, MA883, MA884, MA885*: Milwaukee Instruments. Tilgjengelig fra:
http://www.milwaukeeinstruments.com/site/db/doc/manma882_08_09.pdf (lest 02.02.2017).
- Moore, M., Tyler, J. W., Chigerwe, M., Dawes, M. E. & Middleton, J. R. (2005). Effect of delayed colostrum collection on colostrum IgG concentration in dairy cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 226 (8): 1375-1377.

- Morin, D., McCoy, G. & Hurley, W. (1997). Effects of quality, quantity, and timing of colostrum feeding and addition of a dried colostrum supplement on immunoglobulin G 1 absorption in Holstein bull calves. *Journal of Dairy Science*, 80 (4): 747-753.
- Morin, D., Constable, P., Maunsell, F. & McCoy, G. (2001). Factors associated with colostrum specific gravity in dairy cows. *Journal of dairy science*, 84 (4): 937-943.
- Morin, D. E., Nelson, S. V., Reid, E. D., Nagy, D. W., Dahl, G. E. & Constable, P. D. (2010). Effect of colostrum volume, interval between calving and first milking, and photoperiod on colostrum IgG concentrations in dairy cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 237 (4): 420-428.
- Morrill, K., 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 (7): 3997-4005.
- Morrill, K., Polo, J., Lago, A., Campbell, J., Quigley, J. & Tyler, H. (2013). Estimate of serum immunoglobulin G concentration using refractometry with or without caprylic acid fractionation. *Journal of dairy science*, 96 (7): 4535-4541.
- Muller, L. & Ellinger, D. (1981). Colostrum Immunoglobulin Concentrations Among Breeds of Dairy Cattle1. *Journal of Dairy Science*, 64 (8): 1727-1730.
- NATO. (2011). *Befolkningsvekst: den viktigste utfordringen i det 21. århundre*: NATO. Tilgjengelig fra: http://www.nato.int/docu/review/2011/Climate-Action/Population_growth_challenge/NO/index.htm (lest 09.01.2017).
- Nybø, K., Malmo, T. & Simensen, E. (2003). Råmelk og immunitet. *Buskap*, 7 (7/2003): 34-36.
- Nybø, K., Malmo, T. & Østerås, O. (2005). Passiv immunitet hos kalver i 105 storfebesetninger i Beitstad, Nord-Trøndelag. *Husdyrforsøksmøte 2005*. Tilgjengelig fra: <http://www.umb.no/statisk/husdyrforsoksmoter/2005/016.pdf> (lest 08.05.2017).
- OECD/FAO. (2012). *OECD-FAO Agricultural Outlook 2012*: OECD Publishing.
- Overrein, H., Whist, A. C., Sølvsberg, K. M. & Nyhus, L. T. (2015). *Godt kalveoppdrett: TINE Rådgivning*.
- Parish, S. M., Tyler, J. W., Besser, T. E., Gay, C. C. & Krytenberg, D. (1997). Prediction of serum IgG1 concentration in Holstein calves using serum gamma glutamyltransferase activity. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 11 (6): 344-347.
- Pritchett, L. C., Gay, C. C., Besser, T. E. & Hancock, D. D. (1991). Management and production factors influencing immunoglobulin G1 concentration in colostrum from holstein cows1. *Journal of Dairy Science*, 74 (7): 2336-2341.
- ProVET nordic. (u.å.). *Velkommen*. Tilgjengelig fra: <https://provet.dk/> (lest 01.02.2017).
- Quigley, J., Martin, K., Dowlen, H., Wallis, L. & Lamar, K. (1994). Immunoglobulin Concentration, Specific Gravity, and Nitrogen Fractions of Colostrum from Jersey Cattle1. *Journal of Dairy Science*, 77 (1): 264-269.
- Quigley, J. & Drewry, J. (1998). Nutrient and immunity transfer from cow to calf pre-and postcalving. *Journal of Dairy Science*, 81 (10): 2779-2790.
- Quigley, J. (2004). The role of oral immunoglobulins in systemic and intestinal immunity of neonatal calves. *Diamond V Mills, Cedar Rapid, Iowa, USA*.
- Quigley, J. (2008). Calf Note #135 - On methods of IgG analysis. Tilgjengelig fra: <http://www.calfnotes.com/pdf/CN135.pdf> (lest 11.01.2017).
- Quigley, J., 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 (2): 1148-1155.
- Rajala, P. & Castrén, H. (1995). Serum immunoglobulin concentrations and health of dairy calves in two management systems from birth to 12 weeks of age. *Journal of dairy science*, 78 (12): 2737-2744.

- Rastani, R., Grummer, R., Bertics, S., Gümen, A., Wiltbank, M., Mashek, D. & Schwab, M. (2005). Reducing dry period length to simplify feeding transition cows: Milk production, energy balance, and metabolic profiles. *Journal of dairy science*, 88 (3): 1004-1014.
- Sand, O., Sjaastad, Ø. V. & Haug, E. (2001). *Menneskets fysiologi*. Oslo: Gyldendal akademisk. 600 s.
- SAS Institute. (2013). *SAS 9.4 companion for Windows*: SAS Institute.
- Sasaki, M., Davis, C. & Larson, B. (1976). Production and Turnover of IgG1 and IgG2 Immunoglobulins in the Bovine around Parturition1. *Journal of Dairy Science*, 59 (12): 2046-2055.
- Selman, I., McEwan, A. & Fisher, E. (1971a). Absorption of immune lactoglobulin by newborn dairy calves. Attempts to produce consistent immune lactoglobulin absorptions in newborn dairy calves using standardised methods of colostrum feeding and management. *Research in veterinary science*, 12 (3): 205-210.
- Selman, I., McEwan, A. & Fisher, E. (1971b). Studies on dairy calves allowed to suckle their dams at fixed times. Post partum. *Research in veterinary science*, 12: 1-6.
- Shearer, J., Mohammed, H., Brenneman, J. & Tran, T. (1992). Factors associated with concentrations of immunoglobulins in colostrum at the first milking post-calving. *Preventive Veterinary Medicine*, 14 (1-2): 143-154.
- Sjaastad, Ø. V., Sand, O. & Hove, K. (2010). *Physiology of Domestic Animals*, b. 2nd edition. Oslo: Scandinavian Veterinary Press. 804 s.
- Stott, G., Wiersma, F., Menefee, B. & Radwanski, F. (1976). Influence of environment on passive immunity in calves. *Journal of dairy Science*, 59 (7): 1306-1311.
- Stott, G., Marx, D., Menefee, B. & Nightengale, G. (1979a). Colostral Immunoglobulin Transfer in Calves I. Period of Absorption1. *Journal of Dairy Science*, 62 (10): 1632-1638.
- Stott, G., Marx, D., Menefee, B. & Nightengale, G. (1979b). Colostral Immunoglobulin Transfer in Calves II. The Rate of Absorption1. *Journal of dairy science*, 62 (11): 1766-1773.
- Strudsholm, F. & Sejrsen, K. (2003). Kvægets ernæring og fysiologi Bind 2-Fodring og produktion. *DJF rapport Husdyrbrug* (54).
- Thornhill, J., Krebs, G. & Petzel, C. (2015). Evaluation of the Brix refractometer as an on-farm tool for the detection of passive transfer of immunity in dairy calves. *Australian veterinary journal*, 93 (1-2): 26-30.
- TINE SA. (2015). *Den livsviktige starten*. Medlem.tine.no: TINE Rådgivning. Tilgjengelig fra: <https://medlem.tine.no/fagprat/oppdrett/den-livsviktige-starten> (lest 14.02.2017).
- Triple J Farms. (u.å.). *Radial Immunodiffusion Test For Quantitation of Bovine IgG In Serum Or Plasma*. Tilgjengelig fra: http://www.kentlabs.com/content/Kent_Products/rid_plate_procedure.asp (lest 17.04.2017).
- Tyler, J. W., Hancock, D. D., Thorne, J. G., Gay, C. C. & Gay, J. M. (1999). Partitioning the mortality risk associated with inadequate passive transfer of colostral immunoglobulins in dairy calves. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 13 (4): 335-337.
- Veterinærinstituttet. (2015). Utdrag: Hovedfunn fra NORM-VET 2015. *NORM-VET*.
- Veterinærinstituttet. (u.å.). *Antibiotikaresistens*. Vetinst.no. Tilgjengelig fra: <http://www.vetinst.no/fagomr%C3%A5der/antibiotikaresistens>.
- Villarroel, A., Miller, T. B., Johnson, E. D., Noyes, K. R. & Ward, J. K. (2013). Factors affecting serum total protein and immunoglobulin G concentration in replacement dairy calves. *Advances in Dairy Research*, 2013.

- Wallace, M. M., Jarvie, B. D., Perkins, N. R. & Leslie, K. E. (2006). A comparison of serum harvesting methods and type of refractometer for determining total solids to estimate failure of passive transfer in calves. *The Canadian Veterinary Journal*, 47 (6): 573.
- Wallgren, P., de Verdier, K., Sjölund, M., Zoric, M., Hultén, C., Ernholm, L. & Waller, K. (2011). Hur mycket kostar sjukdomar för lantbrukets djur. *Uppsala: Statens veterinärmedicinska anstalt. Rapport: Anslagspost, 2.*
- Watters, R., Guenther, J., Brickner, A., Rastani, R., Crump, P., Clark, P. & Grummer, R. (2008). Effects of dry period length on milk production and health of dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 91 (7): 2595-2603.
- Weaver, D. M., Tyler, J. W., VanMetre, D. C., Hostetler, D. E. & Barrington, G. M. (2000). Passive transfer of colostral immunoglobulins in calves. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 14 (6): 569-577.
- Whist, A. C. & Sølverød, L. (2008). Er 60 dager optimal sintid? *Buskap*, 07/08 (7).
- Østerås, O. (2009). Strukturforandringer i storfenæringen og konsekvenser for helsearbeidet. *Husdyrforsøksmøte 2009*. Tilgjengelig fra:
<http://www.umb.no/statisk/husdyrforsoksmoter/2009/8.pdf> (lest 12.01.2017).



Norges miljø- og biovitenskapelig universitet
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway