



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

**Masteroppgave 2019 60 stp**  
Fakultet for Biovitenskap

# **Karakterisering av leukocytter i råmelk hos melkekyr og i blodet hos deres nyfødte kalver**

Characterization of leukocytes in colostrum of dairy  
cows and in the blood of their neonatal calfs

**Margrete Letnes**

Husdyrvitenskap  
Institutt for husdyr- og akvakulturvitenskap

## Forord

Denne masteroppgaven er skrevet ved Institutt for husdyr- og akvakulturvitenskap ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet, våren 2019. Oppgaven er skrevet på bakgrunn av et eget forsøk gjennomført fra oktober 2018 til februar 2019.

Med en oppvekst på gård med melkeproduksjon har interessen for storfe alltid vært tilstede. Oppgaven ble valgt med bakgrunn i min interesse for godt kalvestell og -helse.

Gjennomføringen av forsøket har vært avhengig av hjelp fra mange. Først og fremst vil jeg takke Geno SA, TINE SA og Nortura SA som har bidratt med økonomisk støtte, noe som var avgjørende for gjennomføringen av forsøket. Deretter vil jeg rette en stor takk til de ansatte ved Senter for Husdyrforsøk for hjelp til det praktiske i fjøset og biveileder Dag-Kristoffer Forberg for hjelp til planlegging og gjennomføring av forsøket. Det gode samarbeidet og bidraget til Nina Kristin Prestrud har vært uvurderlig for gjennomføringen av all prøvetaking. I tillegg har biveileder Kari Lybeck, ved Veterinærinstituttet, bidratt med uvurderlig veiledning med resultater og i skriveprosessen, samt hjelp til laboratoriearbeid og opplæring. Jeg vil også takke hovedveileder Stine Gregersen Vhile for all positivitet, hjelp og gode innspill i skriveprosessen, men også under planlegginga og gjennomføring av forsøket.

Arbeidet med masteroppgaven har vært svært lærerikt, både innen faget og alle de praktiske delene av forsøket, og en fin avslutning på fem år som husdyrvitenskapsstudent.

Avslutningsvis rettes en stor takk til alle medstudenter for både faglige og artige diskusjoner i lunsjen, mine kollektivsamboere, og spesielt venninne Mathilde Vilhelmsen for alle gode minner de siste årene. Helt til slutt vil jeg takke familien for bidrag med korrekturlesing og all støtte i denne prosessen.

Ås, 15. mai 2019

.....

Margrete Letnes

## Sammendrag

Hensikten med denne oppgaven var å undersøke populasjonen av hvite blodceller i råmelk fra ku og i blod fra deres respektive kalver. I tillegg ble en eventuell sammenheng mellom hvite blodceller i råmelk og i blod hos kalv undersøkt. Forsøket ble gjennomført ved Senter for Husdyrforsøk (SHF, NMBU, Ås) og studien er basert på råmelksprøver fra ni kyr av rasen Norsk rødt fe (NRF) og blodprøver fra deres ti kalver (ett sett tvillinger). Prøvene ble tatt like etter fødsel før tildeling av råmelk, og deretter 48 timer etter fødsel. Prøvene ble analysert ved bruk av flow-cytometri.

Det er godt etablert at råmelk (kolostrum) inneholder store mengder antistoffer og at disse er avgjørende for den nyfødte kalvens motstandskraft mot sykdom. Årsaken til at kalven har behov for en overføring av maternale antistoffer er at morkaka (placenta) hindrer overføring av antistoffer under drettigheten. Det har i senere tid blitt undersøkt om moryrets hvite blodceller (maternale leukocytter) blir overført til kalvens sirkulasjonssystem via kolostrum, og om disse har en betydning for kalvens immunforsvar.

For å undersøke endringene i leukocytter i råmelk og i blod hos kalv ble en Wilcoxon signed-rank-test gjennomført. For å undersøke en eventuell sammenheng mellom leukocytter i råmelk og i blod hos kalv ble Spearman-korrelasjon brukt. I råmelk ble det observert signifikant økning i andelen  $\gamma\delta$  T-celler ( $P=0,039$ ) og monocytter ( $P=0,023$ ), samt en tendens til økning i CD3-celler ( $P=0,098$ ) og CD8-celler ( $P=0,055$ ). I kalvenes blod var det signifikante økning i andel  $\gamma\delta$  T-celler ( $P=0,039$ ) og WC1-celler ( $P=0,027$ ), samt en signifikant reduksjon for granulocytter ( $P=0,012$ ). I tillegg ble det observert en tendens til reduksjon andel i NK-celler ( $P=0,051$ ).

Det er også vist en korrelasjon mellom CD8-celler og WC1-celler i råmelk på dag 1 og i kalveblod på dag 2, henholdsvis  $P=0,001$  og  $P=0,078$ . Disse funnene indikerer en sammenheng mellom type og andel leukocytter i råmelk fra mor og innholdet i kalvens blod. Dette støtter teorien om en overføring av maternale leukocytter via råmelk til kalvens blod, som vist gjennom tidligere studier. I fremtidig forskning bør en slik overføring undersøkes ytterligere, og i hvilken grad dette er av positiv betydning for kalvens immunforsvar og motstandskraft tidlig i livet.

## Abstract

The aim of this study was to investigate the population of leukocytes in colostrum of the mothers and also in the blood of their neonatal calves. In addition, a possible relationship between leukocytes in colostrum and in neonatal calf blood was examined. The research was conducted at the Center for livestock production (SHF, NMBU, Ås, Norway), and was based on colostrum samples from nine Norwegian Red cows and blood samples of their ten calves (one set of twins). The first sampling was performed just after birth before colostrum feeding, and the second sampling at approximately 48 hours after birth. The analysis of the samples was performed by flow cytometry.

Colostrum contains a large amount of maternal antibodies that are essential for the neonatal calf and its resistance against illness. The reason for the need of maternal antibodies transferred from colostrum is the impermeability of the bovine placenta during gestation. In recent research it has been studied that the substantial number of maternal leukocytes in colostrum may transfer to the calf's circulation and contribute to the calf's immune system.

To investigate the changes of leukocyte distribution in colostrum and calf blood, a Wilcoxon signed-rank-test was performed. A possible relationship between leukocytes in colostrum and in calf blood was examined, and the Spearman correlation was used. Presented results show changes in leukocyte population in both colostrum and calf's blood from parturition until two days postpartum. In colostrum it was observed significant increase in portion of  $\gamma\delta$  T-cells ( $P=0,039$ ) and monocytes ( $P=0,023$ ), and a tendency for increase of CD3 ( $P=0,098$ ) and CD8 cells ( $P=0,055$ ). In calf blood there was found significant increase in the proportion of  $\gamma\delta$  T-cells ( $P=0,039$ ) and WC1 cells ( $P=0,027$ ), a significant decrease of granulocytes ( $P=0,012$ ) as well as a tendency for reduction of NK-cells ( $P=0,051$ ).

Further, we found correlation between proportion of CD8 cells and WC1 cells in colostrum at day 0 and in calf blood at day 2,  $P=0,001$  and  $P=0,078$  respectively. These findings indicate that there might be a relation between type and portion on leukocytes in colostrum and in the blood of the neonatal calf's blood. These findings support the theory whether maternal leukocytes transfer to the neonatal calf by colostrum as shown by earlier studies. In future reaserch this should investigated further, especially to elucidate the impact these leukocytes have on the calf's immunity system.

## Innholdsfortegnelse

<b>1</b>	<b>Innledning</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Teori</b> .....	<b>3</b>
2.1	Immunforsvaret.....	3
2.1.1	Blodets betydning i immunforsvaret.....	4
2.1.2	Det medfødte immunforsvaret.....	7
2.1.3	Det ervervede forsvaret.....	9
2.2	Utviklingen av immunforsvaret hos kalv.....	10
2.2.1	I fosterlivet.....	10
2.2.2	Etter fødsel.....	11
2.3	Råmelk og dens betydning for kalvens immunforsvar.....	13
2.3.1	Kalvens fordøyelse av råmelk.....	15
2.3.2	Anbefalinger ved tildeling av råmelk.....	17
2.4	Celler i råmelk.....	18
2.5	Flow-cytometri.....	20
<b>3</b>	<b>Forsøksplanlegging</b> .....	<b>24</b>
3.1	Budsjett og finansiering av forsøket.....	25
3.2	Opplæring.....	27
3.3	Bacheloroppgave tilknyttet forsøket.....	27
<b>4</b>	<b>Materiale og metode</b> .....	<b>28</b>
4.1	Forsøksdyr.....	28
4.2	Rutiner rundt kalving.....	29
4.3	Melkefôring av kalver i forsøket.....	29
4.4	Klinisk undersøkelse av ku.....	30
4.5	Prøvetaking.....	31
4.5.1	Blodprøver.....	31
4.5.2	Melkeprøver.....	32
4.6	Flow-cytometri.....	33
4.6.1	Farging av celler i råmelk og blod: Prosedyre.....	33

4.6.1	Oversikt over antistoffer benyttet i forsøket .....	35
4.6.2	Oppsett for fortykning og tilsetting av antistoffer.....	37
4.6.1	Bearbeiding av resultater fra flow-cytometri .....	38
4.7	Statistisk analyse .....	41
<b>5</b>	<b>Resultater.....</b>	<b>42</b>
5.1	Klinisk helsestatus til dyr i forsøket.....	42
5.2	Analyseresultater av melkeprøver.....	43
5.3	Registrert opptak av melk .....	44
5.4	Resultater av analyse for cellepopulasjoner.....	44
5.4.1	Cellepopulasjon i blod hos kalv .....	45
5.4.2	Cellepopulasjon i råmelk.....	50
5.4.3	Korrelasjon mellom cellepopulasjoner: Råmelk ved dag 0 og blod hos kalv på dag 254	
<b>6</b>	<b>Diskusjon .....</b>	<b>56</b>
6.1	Kjemiske analyser av råmelk .....	56
6.2	Opptak av råmelk og immunglobuliner .....	56
6.3	Cellepopulasjon.....	56
6.3.1	Cellepopulasjon i blod hos kalv .....	56
6.3.2	Cellepopulasjon i melk.....	61
6.3.3	Korrelasjon mellom cellepopulasjoner: Råmelk ved dag 0 og blod hos kalv på dag 263	
6.4	Metode .....	64
6.5	Betydning og fremtidig bruk av funnene i forsøket.....	66
<b>7</b>	<b>Konklusjon .....</b>	<b>67</b>
<b>8</b>	<b>Referanseliste .....</b>	<b>68</b>

# 1 Innledning

Kalven er grunnlaget for den fremtidige produksjonen på melkebruket. Forsøk har vist at tilgangen på råmelk med et høyt innhold av antistoffer (immunglobuliner) er avgjørende for både lav sykdomsfrekvens og dødelighet hos kalv (Gulliksen, Jor, et al., 2009; Robison, Stott & DeNise, 1988). Andre undersøkelser har vist negative effekter av liten tilgang på immunglobuliner på både tilvekst og melkeproduksjon (Svensson & Hultgren, 2008; Virtala, Mechor, Gröhn & Erb, 1996).

Årsaken til at overføringen av immunglobuliner til kalven via råmelk har så stor betydning er fordi morkaka (placenta) hos drøvtyggere hindrer at makromolekyler overføres fra mor til foster i drectigheten (Godden, 2008; Peter, 2013). Det er derfor ingen overføring av antistoffer i fosterlivet hos drøvtyggere (Tizard, 2018). Nyere studier indikerer at kunnskap om overføringen av antistoffer til kalven ikke er tilstrekkelig for å belyse det totale bidraget av passiv immunitet fra råmelk (Donovan et al., 2007; Gonzalez & Dus Santos, 2017). Andre bestanddeler i råmelka, som for eksempel hvite blodceller (leukocytter), kan muligens også ha betydning på immunitet og immunrespons hos nyfødte kalver (Costa et al., 2017; Langel et al., 2015). Det å studere flere aspekter ved kalveoppdrettet som kan bedre dyrehelsen vil bidra til økt produksjonseffektivitet i tillegg til bedret dyrevelferd i melkeproduksjonen. Det er derfor viktig å innhente mer kunnskap om flere faktorer ved råmelka som kan være av betydning for kalvens robusthet mot sykdom.

Hensikten med denne oppgaven var å undersøke de ulike cellepopulasjonene av hvite blodceller i råmelk hos morder og i blodet hos deres tilhørende kalver. I tillegg ble det undersøkt om nivåene av leukocytter i råmelk kunne relateres til nivåene som ble funnet i blodet hos kalven.

Oppgaven består i hovedsak av to ulike deler, en teoridel og en forsøksdel. Teorikapitlet beskriver immunforsvaret og dets komponenter, med fokus på storfe. Videre presenteres forsøket, som er gjennomført ved Senter for Husdyrforskning (SHF, NMBU, Ås). I forsøket ble det tatt blodprøver fra 10 kalver (ett sett tvillinger) like etter fødsel og før tildeling av råmelk, og 48 timer etter kalving. I tillegg ble det tatt råmelksprøver fra deres respektive mødre (n=9).

Følgende hypoteser blir testet:

- Sammensetningen av leukocytter i blodet hos kalv endrer seg fra dag 0, før tildeling av råmelk, til dag 2 etter fødsel.
- Sammensetningen av leukocytter i råmelk endrer seg fra første utmelking og til to dager etter kalving.
- Det er en sammenheng mellom andel og type hvite blodceller i råmelk fra morder og i blodet hos deres respektive kalv.



## 2 Teori

So nevnt er en frisk kalv er en suksessfaktor for både økonomi og dyrevelferd i en melkeproduksjonsbesetning og i denne oppgaven bli leukocytterne i råmelk studert og undersøkt som et bidrag til bedret immunforsvaret hos kalven (Gulliksen, Lie & Østerås, 2009). På bakgrunn av dette er fokuset i teorien å belyse de ulike komponentene i immunforsvaret generelt, etterfulgt av en beskrivelse av hvordan kalvens immunforsvar utvikler seg. Videre blir forskning knyttet til råmelk omtalt, før en teoretisk gjennomgang av flow-cytometri som er metoden som ble benyttet i forsøket.

### 2.1 Immunforsvaret

Immunforsvaret er et fleksibelt forsvar, med en fantastisk evne til å tilpasse seg nye utfordringer (Lea, 2006). Et suksessfullt forsvar mot inntrengende mikrober som virus, bakterier, sopp, protozoer og parasitter er avgjørende for dyrets overlevelse (Sjaastad, Sand & Hove, 2010). Disse mikroorganismer som fører til sykdom kalles patogene mikroorganismer (Sjaastad et al., 2010). Immunforsvaret sine hovedfunksjoner er (Sjaastad et al., 2010):

- Å beskytte kroppen mot potensielt sykdomsfremkallende inntrengere
- Fjerne skadde og døde celler og vev
- Angripe og fjerne kreftceller

Immunforsvaret deles ofte opp i mange ulike grupper for å lettere forklare dets komponenter og egenskaper. I denne oppgaven tar vi utgangspunkt i grupperingene det medfødte forsvar og det ervervede (tillærte) forsvar. Komponentene i de to gruppene er vist i tabell 1.

*Tabell 1 De ulike komponentene i det medfødte og det ervervede forsvar. Modifisert etter Day og Schultz (2014).*

Det medfødte forsvar	Det ervervede forsvar
Hud og slimhinner	Lymfocytterne; deres kloner og produkter
Granulocytter	→ Hukommelsesceller
Monocytter → Makrofager	→ Plasmaceller
NK-celler	→ Antistoffer
Mastceller	→ Cytokiner
Komplement og antimikrobielle peptider	
Dendritiske celler	

### 2.1.1 Blodets betydning i immunforsvaret

Blodet består av ekstracellulær væske (plasma) og celler. Cellene i blodet deles i tre hovedtyper: røde blodceller (erytrocytter), hvite blodceller (leukocytter) og blodplater (trombocytter) (Sjaastad et al., 2010). Leukocytterne er cellene som bidrar i immunforsvaret og av cellene i blodet utgjør de en svært liten andel, omtrent 1 til 2 %. I beinmargen er omtrent 75 % av cellene leukocytter og deres forløpere (Sjaastad et al., 2010). Årsaken til denne forskjellen er at leukocytterne produseres og lagres i beinmargen, for deretter å benytte blodet som transportmedium og går relativt raskt over i kroppens vev (Sjaastad et al., 2010). Når det oppstår en infeksjon vil et stort antall leukocytter frigjøres fra beinmargen og overføres til blodet for transport til infeksjonsstedet (Sjaastad et al., 2010).

Det er tre hovedgrupper av hvite blodceller: granulocytter, monocytter og lymfocytter. Disse dannes i beinmargen med utgangspunkt i en felles stamcelle som deretter differensieres i to ulike linjer. Den ene linjen tar utgangspunkt i en lymfoid stamcelle, som er grunnlaget for danning av lymfocytterne. Den andre er den myeloide stamcelle, som er grunnlaget for produksjon av granulocytter og monocytter (Sjaastad et al., 2010).

Granulocytterne har tre ulike undergrupper og felles for disse er at de har mange vesikler som gjør at cytoplasma fremstår kornet og granulert når cellene farges (Sjaastad et al., 2010). Undergruppene er nøytrofile, basofile og eosinofile granulocytter. De eosinofile granulocytterne er viktige ved bekjempelse av inntrengende parasitter, men er også tilstede ved allergiske reaksjoner (Sjaastad et al., 2010). De basofile granulocytterne er også viktig ved allergiske reaksjoner og betennelsesreaksjoner (Lea, 2006). De nøytrofile granulocytterne er en del av det medfødte forsvaret og utøver primært fagocytose, som innebærer at cellen omslutter mikroorganismen før den dreper og fordøyer den (Sjaastad et al., 2010). I blodet utgjør de nøytrofile vanligvis 47-48 % av leukocytterne i blodet, sammenlignet med de basofile og eosinofile som er henholdsvis 0,4 og 1,4 % (Jain, 1993). Ved en bakteriell infeksjon øker antallet nøytrofile granulocytter i blodet raskt, men ved en virusinfeksjon vil antallet reduseres. Ved å telle nøytrofile granulocytter i blodet kan man derfor konstatere om en infeksjon skyldes bakterier eller virus (Sjaastad et al., 2010).

Monocytterne sirkulerer i blodet som umodne celler og blir omdannet til makrofager når de går over i vev (Jain, 1993). Omdanningen fører til en økt størrelse og endrede egenskaper (Sjaastad et al., 2010). Makrofagene er fagocytterende, slik som de nøytrofile granulocytterne,

i tillegg til å utøve en funksjon som en antigenpresenterende celle (APC) av antigener til T-lymfocytter (Abbas, Lichtman & Pillai, 2016; Sjaastad et al., 2010).

Felles for granulocytene og monocytene er at de er en del av det medfødte cellulære forsvaret. Det betyr at reaksjonene fra disse cellene er rask, men ikke spesifikk da de gjenkjenner strukturer som er felles for mange ulike mikroorganismer (Abbas et al., 2016; Sjaastad et al., 2010).

Lymfocytene blir dannet i beinmargen og deretter transportert med blodet til ulike steder i kroppen for videre differensiering (Barrington & Parish, 2001). Lymfocytene deles i to ulike grupper etter hvor de videreutvikles; B-lymfocytene modnes i den røde beinmargen og Peyerplettene, mens T-lymfocytene modnes i thymus (brisselen) (Barrington & Parish, 2001; Lea, 2006). Beinmargen og thymus er de primære lymfoide organene, de sekundære er blant annet lymfeknuter og -årer, peyerplettene og milten (Lea, 2006). Det er i de sekundære lymfoide organene at lymfocytene fortsetter å multiplisere seg (Sjaastad et al., 2010).

Når T- og B-lymfocytene er modne blir de kalt immunkompetente og er i det perifere vev, som for eksempel blod- og lymfeårer, lymfeknuter og andre sekundære lymfoide organ (Lea, 2006). Det er kun lymfocytene som er utstyrt med distinkte og unike reseptormolekyler som gjenkjenner fremmed materiale og skille dette fra kroppens eget (Lea, 2006). Lymfocytene blir stimulert når de binder seg til en fremmed struktur, dermed oppstår det en immunreaksjon. Lymfocytene er en del av det ervervede immunforsvaret og spesielt for de er deres evne til å huske et antigen og dermed utvikle sin respons mot det spesifikke antigenet. Ved et nytt møte med samme antigen vil reaksjonen være mer spesifikk og effektiv. Det er denne evnen til læring som gjør at lymfocytene skiller seg fra de andre leukocytene i immunforsvaret.

B-lymfocytene (B-celler) er mest knyttet til det ekstracellulære forsvaret ved produksjon av antistoffer, men har også en funksjon som antigenpresenterende celler (Abbas et al., 2016). Når B-lymfocytene kommer i kontakt med et antigen danner de to ulike typer datterceller. Disse er plasmaceller og huskeceller (Sjaastad et al., 2010). Første gang en B-celle kloner seg og produserer plasmaceller vil det ta tid før produksjonen av antistoffer kommer i gang, dette kalles en primær respons. Begrepene primær og sekundær respons blir ytterligere forklart i kapittel 2.1.3 Det ervervede forsvaret.

Plasmacellene er effektorceller som produserer antistoffer, også kalt immunglobuliner (Ig), og er de eneste cellene i kroppen som kan syntetisere Ig (Lea, 2006). Antistoffer er glykoproteiner som består av en eller flere grunnenheter. Hver grunnenhet kan binde seg til to antigener samtidig, så lenge de har samme antigenepitop (Sjaastad et al., 2010). En antigenepitop er den delen av antigenet som antistoffet gjenkjenner og binder seg til. Det finnes fem ulike grupper av Ig: IgA, IgD, IgE, IgG og IgM. Storfe har tre undergrupper for IgG, som er IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> og IgG<sub>3</sub> (Day & Schultz, 2014). Kjentegnet på plasmacellene er at de har membranbundet Ig (mIg), som har til funksjon å gjenkjenne antigener for deretter å initiere en respons, som innebærer sekresjon av Ig (Abbas et al., 2016; Lea, 2006). I tillegg til mIg blir Ig utskilt og er i både blod og på ulike slimhinner i kroppen (Abbas et al., 2016). Antistoffene kan ikke ødelegge mikroorganismene, men utøver sin virkning på to måter (Sjaastad et al., 2010):

1. Fysisk hindre antigen fra å utøve sitt skadepotensial
2. Forsterke det uspesifikke forsvaret, ved å øke fagocytose

Huskecellene har antigenreseptorer i cellemembranen som er lik de hos den originale klonen. Disse cellene deltar ikke i den umiddelbare immunreaksjonen som oppstår, men vil derimot fortsette å eksistere i en hvilende tilstand. Når huskecellene møter samme antigen igjen vil de produsere nye plasmaceller og huskeceller ved denne reaksjonen (Sjaastad et al., 2010).

Som nevnt er Ig knyttet til det ekstracellulære forsvaret og gjenkjenner antigen. Om et smittestoff kommer seg inn i en celle vil ikke antistoffene oppdage det. Derfor er T-lymfocytene (T-cellene) viktige for bekjempelse av smittestoff inne i cellene. En annen forskjell mellom funksjonene hos de to typene lymfocytter er at T-cellene må være i direkte kontakt med antigenet, hvor B-cellene kan bekjempe de på avstand gjennom utskilte antistoffer (Sjaastad et al., 2010). T-lymfocytene er også avhengig av andre cellyper for å reagere og utvikle sine effektoregenskaper (Lea, 2006). De vanligste T-cellene er celler med en T-cellereseptor (TCR) som kalles  $\alpha\beta$ -TCR (Day & Schultz, 2014). Disse består av undergruppene av T-celler som kalles hjelpeceller og cytotoksiske celler. Det er også andre T-celler, som bærer en  $\gamma\delta$  T-celle-reseptor.  $\gamma\delta$  T-cellene er ikke like spesifikke i sin virkning sammenlignet med  $\alpha\beta$  T-cellene (Day & Schultz, 2014).

De cytotoksiske T-cellene (angrepsceller) går til direkte angrep på målet, som ofte er virusinfiserte celler eller kreftceller (Sjaastad et al., 2010). Disse cellene får de infiserte

cellene til å gjennomføre såkalt programmert celledød, noe som er viktig ved mange virusinfeksjoner (Lea, 2006).

T-hjelpecellene er en type regulatorcelle som produserer cytokiner etter de er blitt stimulert. Cytokiner er ulike peptider og proteiner som er viktig for kommunikasjonen mellom leukocytter, men også mellom leukocytter og andre celler (Sjaastad et al., 2010). I tillegg er de viktig for reguleringen av immunresponsen, som for eksempel å gi feber, stimulerer levra til frigjøring av akutfase-proteiner eller rekruttere nøytrofile granulocytter og monocytter til stedet for inntrengning (Lea, 2006). Avhengig av type mikroorganisme og under hvilke betingelser immunsystemet har blitt aktivert, vil ulike CD4-hjelpeceller (Th) aktiveres, slik som Th1, Th2 og Treg som igjen har ulike funksjoner (Lea, 2006). Th1-cytokiner virker stort sett på celler som deltar i betennelsesprosesser og cellulær immunrespons, og Th2-cytokiner påvirker modningen av B-lymfocytene og er med å regulere antistoffsvaret (Lea, 2006).

For å skille de ulike cellene i immunforsvaret blir monoklonale antistoffer (mAb) benyttet og hvert monoklonale antistoff binder seg til ett spesifikt membranmolekyl (Abbas et al., 2016). Membranmolekylene er satt inn i et system som en CD (cluster of differentiation) og ett tall, for eksempel CD4 eller CD8, hvor T-hjelpecellene uttrykker CD4 og de cytotoksiske T-cellene uttrykker CD8 (Lea, 2006). De monoklonale antistoffene som er benyttet i denne oppgaven presenteres ytterligere i kapittel 4.6.1 Oversikt over antistoffer benyttet i forsøket.

### **2.1.2 Det medfødte immunforsvaret**

Det medfødte forsvaret er den delen av immunforsvaret som utvikler seg først og alltid er til stedet i individet (Abbas et al., 2016). Denne delen av immunforsvaret sørger for umiddelbar beskyttelse, men det er et relativt svakt og lite spesifikt forsvar som vil holde patogene mikroorganismer unna kun i en kort periode (Day & Schultz, 2014). I motsetning til det ervervede immunforsvaret vil ikke det medfødte forsvaret lære av tidligere møter med et antigen, og er derfor ikke spesifikt og vil reager likt hver gang (Day & Schultz, 2014). Det medfødte immunforsvaret er særlig aktivt på de stedene i kroppen hvor sjansen er størst for kontakt med potensielle patogener. Slike steder er øynene, huden, luftveiene, fordøyelsessystemet, reproduksjonsorganene og jurvet (Day & Schultz, 2014). Huden og slimhinnenes egenskaper er viktig i denne sammenhengen og kalles ofte det ytre uspesifikke forsvaret (Sjaastad et al., 2010). Videre vil det være fokus på det indre uspesifikke forsvaret.

Det indre uspesifikke forsvaret består i hovedsak av nøytrofile granulocytter og makrofager, men NK-cellene, mastcellene og de dendrittiske cellene er også viktig (Sjaastad et al., 2010). Som nevnt tidligere utøver de nøytrofile granulocytene og makrofagene fagocytose. NK-cellene dannes i den lymfoide cellerekken og har enkelte like egenskaper med T-lymfocytene (Lea, 2006). NK-cellene er en del av det medfødte forsvaret og er viktig ved bekjempelse av blant annet virus og kreftceller (Lea, 2006). NK-cellene angriper målcellen sine membraner og dreper den (Sjaastad et al., 2010). Mastcellene er en slektning av de basofile granulocytene og er i kroppens vev, hvor de spiller en sentral rolle ved både betennelsesreaksjoner og allergiske reaksjoner (Lea, 2006). De dendrittiske cellene forekommer mest i vev og er i blod som umodne celler, de har en viktig funksjon i utviklingen av immunresponser og er profesjonelle antigenpresenterende celler (Abbas et al., 2016; Lea, 2006). De fanger protein-antigener fra mikrober som entrer kroppen gjennom epitelvev, for deretter å transportere de til lymfeknutene (Abbas et al., 2016). I lymfeknutene presenteres de dendrittiske cellene antigenene for T-lymfocytter som deretter initierer en respons. Av denne grunn spiller de en viktig rolle i utviklingen av det ervervede immunforsvaret, men vil også inngå i det medfødte forsvaret (Lea, 2006).

I tillegg til den cellulære delen av det indre uspesifikke forsvaret er det også ikke-cellulærefaktorer som er viktig for immunforsvaret og dets respons. Disse faktorene er transferrin, interferoner, akutfaseproteiner og stoffer i komplementsystemet. Transferrin binder jern og gir dårlige vekstvilkår for bakterier, siden de trenger jern for egen vekst (Sjaastad et al., 2010). Interferoner er en gruppe proteiner som produseres og frigis fra virusinfiserte celler. Interferon binder seg til celler uten virus, slik at cellene produserer enzymer som hindrer virus i å ødelegge dem (Sjaastad et al., 2010). Akutfaseproteiner er en gruppe plasmaproteiner som hemmer virkningen av de vevsødeleggende stoffene som frigjøres av fagocytene (Sjaastad et al., 2010). Komplementsystemet består av ca. 30 plasmaproteiner, som aktiveres etter tur ved for eksempel en infeksjon og deres funksjon er enten å direkte angripe inntrengende mikroorganismer eller ved å stimulere aktiviteten til fagocytter (Sjaastad et al., 2010).

### 2.1.3 Det ervervede forsvaret

Det ervervede immunforsvaret kalles også det spesifikke immunforsvaret på grunn av dets evne til å lære av et møte med et antigen og dermed forbedre reaksjonen til neste møte. Det ervervede forsvaret består av lymfocytter og deres produkter, som for eksempel antistoffer (Abbas et al., 2016). I alle individer er det et stort antall kloner, eller undergrupper, av lymfocytene som i en modningsprosess lærer hvilke strukturer som skal og ikke skal angripes (Sjaastad et al., 2010). Noen lymfocytter utvikler et immunologisk minne og vil derfor reagere med større effekt og kraft (Sjaastad et al., 2010).

Begrepene primær og sekundær respons er viktig ved forklaring av det ervervede immunforsvaret. Den primære responsen viser til den responsen en lymfocytt har ved det første møtet med et antigen (Abbas et al., 2016). Før et første møte med et antigen kalles lymfocytene naiv som viser til at de er immunologisk uerfaren (Abbas et al., 2016). Når lymfocytene aktiveres av et antigen vil de gjennomgå en celledeling som fører til produksjon av mange kloner, som reagerer på samme antigen (Abbas et al., 2016). Et møte nummer to med samme antigen vil føre til en sekundær respons, som på grunn av lymfocyttens erfaring fra tidligere gjør denne responsen raskere, større og sterkere (Abbas et al., 2016). Denne sekundære responsen er en aktivering av hvilende B-huskeceller eller T-celler som ble produsert ved det første møtet med et antigen (Abbas et al., 2016). Denne læringen gjør at det ervervede forsvaret utvikler et stort repertoar mot ulike antigener i løpet av individets liv.

Det er det ervervede forsvarets evne til å lære og huske som er grunnlaget for vaksiner. Prinsippet med vaksiner er å tilføre kroppen et antigen som ikke fremkaller sykdom, men har sine antigene egenskaper i behold (Sjaastad et al., 2010). T- og B-lymfocytter som gjenkjenner antigenet vil deretter gjennomføre en kloning som øker antallet lymfocytter spesifikke for det antigenet (Sjaastad et al., 2010). Dette første møtet er den primære responsen og ved en senere eksponering av samme antigen vil responsen være raskere og sterkere, en sekundær respons. Vaksiner er derfor en form for aktiv immunisering (Lea, 2006).

## 2.2 Utviklingen av immunforsvaret hos kalv

Som nevnt blir immunforsvaret ofte delt opp i det medfødte og det ervervede forsvaret. I den følgende gjennomgangen vil derfor immunforsvaret hos kalv bli delt etter hva som blir utviklet i fosterlivet og etter fødsel.

### 2.2.1 I fosterlivet

For fosterets overlevelse er det viktig at det utvikler et immunforsvar også i fosterlivet. Kyr av rasen Norsk Rødt Fe (NRF) er drektig i ca. 280 dager og kalvens immunforsvar starter sin utvikling tidlig i fosterlivet (Geno, 2017; Tizard, 2018). De primære lymfoide organene thymus og beinmarg kan gjenkjennes ved henholdsvis dag 40 og 55 etter unnfangelse (Tizard, 2018). De lymfoide organene milten og lymfeknutene kan gjenkjennes ved henholdsvis dag 55 og 60, men ikke før omtrent 175 dager for peyerplettene (Tizard, 2018). I tillegg kan lymfocytter, IgM- og IgG-bærende celler observeres i perifert blod ved henholdsvis dag 45, 59 og 135 i drektigheten (Tizard, 2018). I løpet av uke 0-11 vil T- og B-lymfocytter gå fra å være i de primære lymfoide organ til å befinne seg i lymfeknuter, milt og slimhinner i lymfoid vev (Barrington & Parish, 2001). Sent i drektigheten er føtale nøytrofile granulocytter i stand til å utøve fagocytose (Barrington & Parish, 2001).

For kalvens utvikling av immunforsvaret i fosterlivet er utformingen av morkaka (placenta) av avgjørende betydning, hvor morkaka er koblingen mellom mor og foster i drektigheten. Kontakten sikrer transport av oksygen og næringsstoffer fra mor til foster, i tillegg til overføring av avfallsprodukter og varme fra foster til mor (Sjaastad et al., 2010). Utformingen av placenta er ulik mellom dyrearter, og dette har stor betydning for overføring av makromolekyler fra mor til foster. For eksempel hos mennesker er fosterets ytterste fosterhinne (chorion) i direkte kontakt med mors blod, en slik placenta-barriere betegnes hemochoreal (Sjaastad et al., 2010). En hemochoreal placenta muliggjør en overføring av makromolekyler, slik som Ig, fra mor til foster. Nyfødte menneskebarn har derfor likt nivå av sirkulerende IgG i blodet som mor (Tizard, 2018). For storfe kalles placenta-barrieren for "cotyledonary synepitheliocoreal" på grunn av sin morfologi ved dag 40-50 i drektigheten (Peter, 2013). "Cotyledonary" viser til at placenta hos storfe består av mange mindre placentomer, som små morkaker, og det er disse som er kontaktpunktene mellom mor og foster. Antall placentomer på kalvens fosterhinne kan variere fra 15 til 120, men gjennomsnittet er mellom 80 og 90 stk. (Peter, 2013). "Synepitheliocoreal" er en betegnelse ut ifra antall hinner mellom mor og foster, samt deres form (Peter, 2013). Hos drøvtyggere er



disse hinnene utformet slik at mor og fosters blod er separert, noe som hindrer overføring av Ig i fosterlivet (Gonzalez & Dus Santos, 2017). Dette er årsaken til at kalven er født med svært lave nivåer av Ig i blodet, noe som gjør at den nyfødte kalven har stor risiko for sykdom like etter fødsel (Gonzalez & Dus Santos, 2017).

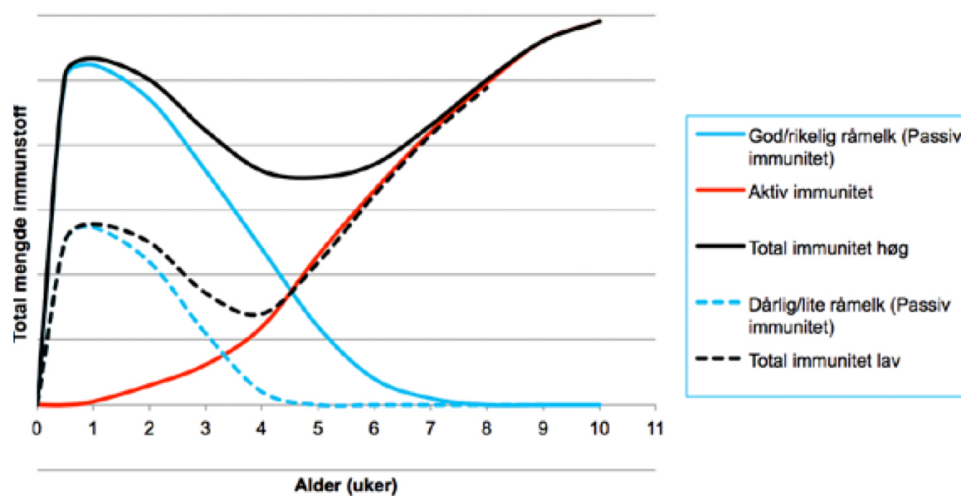
### 2.2.2 Etter fødsel

I fosterlivet har kalven utviklet seg i et sterilt miljø i livmora, og etter fødsel vil det nyfødte dyret komme til et miljø rikt på mikroorganismer (Tizard, 2018). Den nyfødte kalven har alle de nødvendige immunkomponentene ved fødsel, men disse er umodne og lite effektive, derfor vil en immunrespons tidlig i livet være krevende for dyret (Barrington & Parish, 2001; Cortese, 2009). Passiv immunisering vil sammen med et hygienisk miljø ha betydning for immunitet og overlevelse hos kalven de første ukene etter fødsel. Immunforsvaret til et ungt dyr vil være modent ved 5 til 8 måneders alder (Gonzalez & Dus Santos, 2017).

Passiv immunisering er overføring av Ig fra mor til kalv gjennom tilførsel av mors råmelk til kalven (Tizard, 2018). Råmelk er melka som skilles ut fra kuas jur de første 24 timene etter kalving og denne har et økt innhold av tørrstoff og Ig sammenlignet med vanlig melk (Blum & Hammon, 2000; Jaster, 2005). Ig i råmelka bidrar til immunologisk beskyttelse av kalven frem til dens egne immunmekanismer er av bedre funksjon. For å sikre størst mulig overføring av antistoffer fra råmelk og over i kalven, er faktorer som mengde råmelk og innholdet av Ig i denne, samt tidspunktet for tildeling svært viktig. Dette er aspekter som blir belyst i dette og det påfølgende kapittelet.

Figur 1 viser en skjematisk fremstilling av utviklingen i immunforsvaret hos en nyfødt kalv og frem til ca. 10 ukers alder. Figuren viser at i de første ukene er kalven avhengig av passiv immunisering via råmelka og kvaliteten på råmelka, målt som konsentrasjonen av Ig, er av stor betydning for effekten av immuniseringen. Figuren viser at kalvens immunitet er lavest fra uke 3 til 5, avhengig av tilførselen av Ig fra råmelk, og i denne perioden har bidraget av antistoffer fra mor sunket til et nivå hvor de ikke lenger gir tilstrekkelig beskyttelse, samtidig som kalvens egen produksjon av antistoffer fremdeles er lav. Dette betyr at kalven er ekstra utsatt for infeksjoner i denne perioden og det er viktig å unngå store endringer i oppstallingsmiljø og fôring (Overrein, Whist, Sølvberg & Nyhus, 2016). Den aktive immuniseringen (rød strek) er i grafen satt til å være lik uavhengig av råmelkskvaliteten, men ulike faktorer som for eksempel tilførsel av råmelk og Ig kan påvirke dette. Kalver som har mottatt passiv immunisering ved tilførsel av råmelk med tilfredsstillende innhold av Ig vil

starte syntese av egne Ig ved ca. 4. leveuke. Derimot vil kalver som ikke har fått tilstrekkelig passiv immunisering syntetisere disse allerede etter første leveuke (Tizard, 2018).



Figur 1 Utviklingen av kalvens totale motstandskraft, bestående av passiv og aktiv immunitet (Overrein et al., 2016). De blå og svarte, heltrukne og stiplede, linjene viser forskjellen mellom råmelk av god og dårlig kvalitet på kalvens immunitet.

Betydningen av Ig og andre komponenter i råmelk blir ytterligere beskrevet i kapittel 2.3 Råmelk og dens betydning for kalvens immunforsvar.

På grunn av viktigheten av passiv immunitet ved overføring av Ig har konsentrasjonen av Ig i serum blitt et mål på immunitet hos spedkalv. Begrepet failure of passiv transfer (FPT), svikt i passiv overføring av antistoffer, forklarer en tilstand hvor kalven ikke har fått tilstrekkelig tilførsel av passiv immunitet (Weaver, Tyler, VanMetre, Hostetler & Barrington, 2000). Undersøkelser har vist at kalver med FPT har økt fare for sykdom og død, samt redusert produksjon senere i livet (DeNise, Robison, Stott & Armstrong, 1989; Robison et al., 1988; Weaver et al., 2000). Selv om kalver med FPT har økt risiko for sykdom betyr ikke det at kalven med sikkerhet blir syk. I et miljø med lav forekomst av patogene mikroorganismer vil det være lettere å unngå sykdom, også for kalver med lav serum-Ig (Weaver et al., 2000). Weaver et al. (2000) presiserer at det samme gjelder kalver med tilsynelatende tilstrekkelig passiv immunisering i et miljø med store mengder patogene mikroorganismer, de kan også oppleve sykdom. Derfor vil grensen for FPT, som konsentrasjon av Ig i serum, i stor grad avhenge av smittepresset rundt kalven (Sehested, Pedersen, Strundsholm & Foldager, 2003). Roy (1990) har vurdert grensenivået for FPT til å være 30 g Ig/liter serum for å oppnå tilfredsstillende beskyttelse under ugunstige miljøforhold, og likedan 10 g Ig/liter serum ved

gode miljøforhold. Gunstige eller ugunstige miljøforhold er ikke definert av Roy (1990). Det er anbefalt å måle serum-Ig mellom de første 24 til 72 timer etter fødsel (Sehested et al., 2003). For å oppnå en serumkonsentrasjon på ca. 20 g Ig/liter serum har Sehested et al. (2003) gjort følgende beregning som viser behovet for Ig og råmelk: En kalv på ca. 40 kg må ta opp mellom 150 og 250 gram Ig. Noe som setter krav til et råmelksopptak fra tre til fem liter, med en Ig-konsentrasjon på 50 g/liter.

### **2.3 Råmelk og dens betydning for kalvens immunforsvar**

Råmelk er melk som skilles ut fra kuas jur de første 24 timene etter kalving (Jaster, 2005). I praktisk melkeproduksjon benevnes perioden med råmelk som den perioden hvor melka ikke kan leveres til meieriet i tida etter kalving. I Norge er denne perioden de første 5 dagene etter kalving, 10 melkinger (TINE, 2016). Videre i denne oppgaven brukes begrepet råmelk slik som Jaster (2005) har definert og vanlig melk brukes om melk som kan leveres til meieri slik som reglementet hos TINE (2016) sier.

Råmelk har en høy tetthet av næringsstoffer, sammenlignet med vanlig melk, noe som resulterer i høyere tørrstoffinnhold og bruttoenergi, tabell 2. En av årsakene til den store forskjellen i nettopp tørrstoffinnhold og bruttoenergi er knyttet til økt innhold av protein og fett. Det høye proteininnholdet er direkte knyttet til konsentrasjonen av Ig i råmelka. Resultatene i tabell 2 er ikke fra NRF og det kan forventes forskjeller mellom raser.

Tabell 2 Sammenligning av kjemisk innhold i råmelk og vanlig melk hos storfe, rase er ukjent. Utdrag fra Blum & Hammon (2000).

	Enhet	Råmelk, melking nr.		Vanlig melk <sup>1</sup>
		1	2	
Bruttoenergi	MJ/liter	6,0	4,8	2,8
Tørrstoff	g/liter	245	190	122
NFE <sup>2</sup>	g/liter	25	40	4,9
Råfett	g/liter	64	56	39
Råprotein	g/liter	133	85	32
IgG	g/liter	81	58	< 2
Råaske	g/liter	18	10	7
Laktoferrin	g/liter	1,84	0,86	
Transferrin	g/liter	0,55	0,44	
Insulin	µg/liter	65	35	1
Glukagon	µg/liter	0,16	0,08	0,01
Veksthormon	µg/liter	1,4	0,5	< 1

<sup>1</sup> Målt på melk melket over 14 dager etter kalving (Blum & Hammon, 2000).

<sup>2</sup> NFE = Nitrogenfrie ekstraktstoffer. Beregnet restfraksjon etter subtrahering av resultater for de øvrige komponentene. I hovedsak lettfordøyelige karbohydrater, slik som laktose.

Immunglobulinene i råmelk hos storfe er IgG, IgA og IgM (Day & Schultz, 2014; Korhonen, Marnila & Gill, 2000). Av disse er det mest IgG, som i følge Godden (2008) kan være fra 85 til 90 % av total Ig. Innholdet av IgA og IgM er henholdsvis 5 og 7 % av totalt innhold av Ig. Forholdet mellom de ulike immunglobulinene i melka endrer seg ut i laktasjonen og er noe annerledes i vanlig melk enn i råmelk (Tabell 3) (Tizard, 2018). Av de ulike underklassene av IgG er det IgG<sub>1</sub> det er mest av i råmelk, som er mellom 80 og 90 % av totalt IgG i råmelk (Godden, 2008; Korhonen et al., 2000). IgA og IgM dannes i hovedsak i juret, men IgG kommer fra blodserum i tillegg til noe produksjon i juret (Day & Schultz, 2014; Korhonen et al., 2000).

Tabell 3 Innhold av de ulike klassene immunglobuliner i råmelk og vanlig melk hos storfe, rase er ukjent (Tizard, 2018).

	Immunglobulin mg/dl		
	IgA	IgM	IgG
Råmelk	100-700	300-1300	2400-8000
Melk	10-50	10-20	50-750

Kvaliteten på råmelk måles etter nettopp innholdet av IgG, hvor de internasjonale anbefalingene er at råmelk av god kvalitet bør inneholde over 50 g IgG/liter råmelk (Gulliksen, Lie, Sølverød & Østerås, 2008). Gulliksen et al. (2008) gjennomførte en studie hvor råmelkskvaliteten hos norske melkekyr ble undersøkt. Resultatene viste at 57,8 % av råmelksprøvene (n = 1250) inneholdt under 50 g IgG/liter råmelk. Undersøkelsen viser store forskjeller mellom dyr, med ytterpunkter i undersøkelsen fra 4 til 235 g IgG/liter råmelk. Det er vanlig å observere store forskjeller i IgG-innhold i råmelk, selv for dyr i samme område og besetning, noe som gjør det vanskelig å trekke konklusjoner rundt årsaker til varierende innhold (Gulliksen et al., 2008). Videre peker de på at å korrigere for lavt innhold av IgG ved å øke mengden tildelt råmelk vil være viktig for å sikre god tilgang på Ig.

I tillegg til høyt næringsinnhold i råmelk er også innholdet av hormoner, vekstfaktorer, cytokiner og enzymer av biologisk effekt for kalven, og har tilsynelatende effekt på spedkalvens immunitet og utvikling av immunforsvaret (Blum & Hammon, 2000; Donovan et al., 2007; Le Jan, 1996). Innholdet av cytokiner er vist å være signifikant høyere i råmelk, sammenlignet med vanlig melk og kan påvirke kalvens utvikling, da spesielt for mage-tarmkanalen (Blum & Hammon, 2000; Hagiwara, Kataoka, Yamanaka, Kirisawa & Iwai, 2000).

### **2.3.1 Kalvens fordøyelse av råmelk**

Den største forskjellen mellom voksne storfe og kalv er at kalven ikke har en utviklet vom. Når kalven drikker melk like etter fødsel vil den derfor passere vomma og gå direkte til løpen (Sjaastad et al., 2010). Vommas utvikling starter ca. 2 til 3 uker etter fødsel, når kalven begynner å ta opp grovfôr, som stimulerer til denne utviklingen (Sjaastad et al., 2010). På grunn av det forhøyde proteininnholdet i råmelk og betydningen av overført Ig fra råmelk er det lagt vekt på fordøyelsen av disse komponentene i dette kapitlet.

Hos nyfødte kalver er den proteolytiske aktiviteten i magesekk og tarm lav, sammen med trypsinhemmere i råmelka gjør det at fordøyeligheten av proteiner er lav hos disse dyrene (Tizard, 2018). I tillegg vil melkas bufferegenskaper i løpen føre til høyere pH og dermed redusert enzymatisk aktivitet, noe som også reduserer fordøyeligheten (Tizard, 2018). På grunn av disse faktorene vil proteiner fra råmelk i stor grad nå tynntarmen i intakt form, som makromolekyler (Tizard, 2018). For å ha immunologisk effekt av immunglobulinene i råmelk er det avgjørende at tarmen har evnen til å absorbere disse, uten å bryte de ned. Om tarmen ikke tar opp hverken intakte eller nedbrutte immunglobulinene fra råmelka vil de passert

gjennom dyret og gå ut i avføringen. Opptaket av Ig fra tynntarmen skjer ved reseptormediert endocytose, hvor neonatale Fc-reseptorer (FcRn) binder til seg Ig og transporterer de gjennom tarmvevet (Tizard, 2018). Deretter overføres Ig til lymfekar i tynntarmen, og muligens kapillærene i tarmen før de går over i blodsirkulasjonen hos kalven (Tizard, 2018). Storfe har, til forskjell fra hest og gris, ingen seleksjon når det kommer til absorpsjon av de ulike immunglobulinene fra tarmen (Tizard, 2018). Det er imidlertid vist at IgM absorberes saktere fra tarmen enn IgG og IgA (Stott, Marx, Menefee & Nightengale, 1979b).

For å sikre så god tilførsel som mulig av Ig til den nyfødte kalven har det vært stort fokus på perioden for absorpsjon av Ig. Kalvens evne til å absorbere Ig fra tarmen reduseres ved økende alder og skyldes flere faktorer. Hvor Jochims, Kaup, Drommer og Pickel (1994) pekte på erstatning av tynntarmens epitelceller med mer modne celler, opphør av transporten over cellemembranen i epitelcellene og en økning av lysosomers proteolytiske aktivitet som viktige faktorer. I tillegg vil en økt produksjon av saltsyre (HCl) i løpen og økt enzymatisk nedbrytning av makromolekyler, slik som Ig, føre til redusert absorpsjon av intakt Ig. Etter opphør av absorpsjonene av immunglobuliner vil likevel intakt Ig ha en lokal effekt i tynntarmen som antistoff (Stott et al., 1979b).

Opphøret av absorpsjon av Ig benevnes som en lukking av tarmen. Stott, Marx, Menefee og Nightengale (1979a) undersøkte tidspunkt for lukking av kalvens tynntarm etter fødsel, hvor lukkingen av tarmen ble definert ut ifra når det ikke lenger ble overført Ig til blodet. Resultatene viste en variasjon i lukking fra 12 til 36 timer, med et gjennomsnitt på 24 timer etter fødsel. I tillegg ble det funnet en effekt av tidspunkt for tildeling av råmelk hvor tidligere tildeling etter fødsel resulterte i en raskere lukking av tynntarmen (Stott et al., 1979a). Deres resultater viste at kalver tildelt råmelk like etter fødsel hadde lukket tarmen etter gjennomsnittlig 21 timer, og utsatt tildeling av råmelk til 24 timer etter fødsel førte til lukking ved gjennomsnittlig 31 timer etter fødsel. Vinduet for absorpsjon var imidlertid redusert fra 21 timer til 8 timer (Stott et al., 1979a).

Mengden Ig absorbert fra tarmen hos kalven avhenger av mengde fordøyd råmelk, Ig-konsentrasjonen av råmelka, samt absorpsjonsevne og -effektivitet i tarmen (Holloway, Tyler, Lakritz, Carlson & Holle, 2001; Svensson, Lundborg, Emanuelson & Olsson, 2003). Faktorer som påvirker disse parameterne er blant annet alder (timer) ved første råmelkstildeling, metode for råmelkstildeling og laktasjonsnummer på kua råmelka er fra (Besser, Gay & Pritchett, 1991; Devery-Pocius & Larson, 1983; Stott, Marx, Menefee & Nightengale, 1979c).

### 2.3.2 Anbefalinger ved tildeling av råmelk

Det er godt dokumentert at mengde råmelk tildelt og alder (timer etter fødsel) ved første tildeling av råmelk har effekt på absorpsjonen av Ig (Stott et al., 1979b). Dette ligger til grunn for anbefalingene gjeldende råmelkstildeling. TINE Rådgivning anbefaler i sin brosjyre om kalveoppdrett at første føring av råmelk bør være innen to timer etter kalving og mengden bør være 8,5 % av kalvens kroppsvekt (Overrein et al., 2016). Videre anbefales det at kalven i løpet av første levedøgn bør drikke ytterligere tre til fire liter råmelk fra mor, gjerne fra første melking.

Anbefalingene legger i tillegg vekt på å gi råmelk av god kvalitet, med et krav til innhold av IgG på over 50 g IgG/liter råmelk. Råmelk med et lavere innhold enn dette blir anbefalt å bytte ut med råmelk med høyere innhold (Overrein et al., 2016). I praksis gjennomføres dette ved å fryse råmelk med et høyere innhold av IgG, da det er vist at frysing ikke påvirker IgG-innholdet i råmelka (Tizard, 2018). Ikke alle har mulighet til å måle IgG-

konsentrasjonen i råmelk og fryser derfor råmelk uten å

kjenne kvaliteten på den. Overrein et al. (2016) anbefaler å måle råmelkskvaliteten ved å bruke enten et kolostrometer eller et refraktometer. I dette forsøket er det benyttet et Milwaukee Brix-refraktometer (Figur 2), som er et digitalt refraktometer som oppgir en Brix-verdi som er tørrstoffprosenten i råmelka (Quigley, Lago, Chapman, Erickson & Polo, 2013). Brix-verdien fra målingen må regnes om til gram IgG/liter råmelk for å kunne vurdere råmelkskvaliteten, korrelerende verdier for Brix-verdier og gram IgG/liter er vist i tabell 4.



Figur 2 Digitalt Brix refraktometer fra Milwaukee Instruments (Milwaukee Instruments., u.å.)

Tabell 4 Sammenheng mellom Brix-verdi og innhold av IgG i råmelk (Dragset & Whist, 2015).

Brix-verdi (%)	IgG	Bedømmelse
>24	>50 g/L	Meget god kvalitet.
20-24	30-50 g/L	Middels god kvalitet. Kompenser med økt mengde råmelk eller hent bedre råmelk fra fryseren.
<20	<30 g/L	Dårlig kvalitet, hent god råmelk i fryseren.

Innholdet av Ig i råmelka reduseres raskt etter første melking, derfor vil det være av betydning å kunne gi av den første råmelka flere ganger før en går over på melk fra senere melkinger (Blum & Hammon, 2000). Selv etter at opptaket av Ig har opphørt kan immunglobulinene ha en lokal effekt i tarmen, i tillegg til den gunstige næringsmessige sammensetningen av denne melka (Sehested et al., 2003).

## 2.4 Celler i råmelk

Melk karakteriseres av fire typer celler; makrofager, nøytrofile granulocytter, lymfocytter og epitelceller (Le Jan, 1996). Begrepet somatiske celler brukes ofte om disse cellene ved måling av celletall i råmelk. Mengde og type av de ulike cellene variere med art, laktasjonsstadiet, fysiologiske og individuelle forhold (Jensen & Eberhart, 1981; Le Jan, 1996). For eksempel vil et friskt jurvev ha et lavt celletall som i hovedsak består av lymfocytter og makrofager, med et innhold av epitelceller fra to til 15 % (Malik et al., 2018; Ten Napel et al., 2009). Ved en infeksjon i jurvet vil konsentrasjonen av leukocytter øke og nøytrofile granulocytter dominere (Concha, 1986; Ten Napel et al., 2009). Jensen og Eberhart (1981) registrerte et celletall hos melkekyr på 360.000 pr. ml melk (geometriske gjennomsnitt) ved siste dag i laktasjonen, og en økning til 18.000.000 celler pr. ml melk en uke ut i sinperioden. Etter kalving fant de en reduksjon i celletallet til 280.000 celler pr. ml på dag seks etter kalving (Jensen & Eberhart, 1981). McDonald og Anderson (1981) har vist lignende verdier, med et celletall på 100.000 celler pr. ml ti dager etter kalving. Jensen og Eberhart (1981) dokumenterte i tillegg en endret sammensetning av leukocytter i juret i løpet av sinperioden og i tiden frem til kalving, hvor makrofager dominerte i sinperioden selve sinperioden. Mengden nøytrofile granulocytter var høy i starten og avtok ut i perioden, men økte når kalvingen nærmet seg. For lymfocyttene var endringene motsatt som for de nøytrofile granulocyttene, mengden økte i starten og avtok i tiden før kalving (Jensen & Eberhart, 1981).

Råmelk fra storfe inneholder mellom  $1,0 \times 10^6$  og  $2,5 \times 10^6$  somatiske celler pr. ml melk (Costa et al., 2017). Gomes et al. (2011) har rapportert en fordeling av de ulike leukocyttene som 13 % nøytrofile granulocytter, 0,3 % eosinofile granulocytter, 16 % lymfocytter og 70 % store celler (monocytter/makrofager og epitelceller). Reber, Lockwood, Hippen og Hurley (2006) og Liebler-Tenorio, Riedel-Caspari og Pohlenz (2002) har vist en overføring av markerte leukocytter i råmelk og over til den nyfødte kalvens blodsirkulasjon, dette diskuteres ytterligere i kapittel 6.3.3 Korrelasjon mellom cellepopulasjoner: Råmelk ved dag 0 og blod hos kalv på dag 2.



Tidligere studier har undersøkt betydningen av maternale leukocytter for avkommet. Pitt, Barlow og Heird (1977) gjennomførte et forsøk med rotter hvor melkeerstatning tilsatt levende celler fra rottemelk og fryst rottemelk ble sammenlignet. De nyfødte rottene tildelt melkeerstatningen ble beskyttet mot eksponering for bakterien *Klebsiella pneumoniae*, i motsetning til rottene tildelt fryst og tint rottemelk. *Klebsiella* er en slekt av tarmbakterier og kan gi ulike infeksjonssykdommer som for eksempel lungebetennelse (Tønjum, 2018). Senere har er også lignende studier blitt gjennomført på storfe og kalv. Riedel-Caspari (1993) undersøkte kalver tildelt fersk råmelk og kalver tildelt fryst og deretter tint råmelk, og deres respons på infeksjon av *Escherichia coli* (E. coli). Samtlige kalver i forsøket utviklet en mild form for diaré, men inntrykket var at kalver tildelt fersk råmelk med levende celler var mer livskraftig (vital). Kalver tildelt fryst råmelk hadde noe høyere rektal temperatur i hele forsøksperioden, som tyder på at infeksjonen var mer krevende for disse dyrene. I tillegg skilte de ut et høyere antall bakterier i avføringa i løpet dag to til syv etter fødsel. Disse funnene tyder på at også leukocytter fra råmelk bidrar til å forbedre kalvens motstandskraft mot sykdom. Costa et al. (2017) observerte en raskere og mer effektiv medfødt respons ved naturlig eksponering for patogener hos kalver tildelt intakt råmelk, sammenlignet med kalver tildelt råmelk uten levende celler. Årsaken til at forsøkene benytter seg av fryst melk er at frysing dreper de levende cellene i melk, i tillegg til at frysing er vanlig praksis for lagre råmelk (Langel et al., 2015).

En overføring av levende maternale leukocytter via råmelk kan ut ifra teorien bidra med immunitet til kalven på grunn av deres mer utviklede funksjoner. Spesielt lymfocytene med sine antigen-spesifikke egenskaper kan gjøre kalven mer motstandsdyktig i det miljøet den fødes inn i, da mor har utviklet sitt ervervede forsvar der (Donovan et al., 2007). For å maksimere immuniteten hos kalven skisserte Donovan et al. (2007) muligheten til å maksimere den passive immuniteten hos kalven ved å vaksinere mor. De overførte lymfocytter fra mor til kalv vil derfor være spesifikk mot det antigenet vaksinen inneholder.

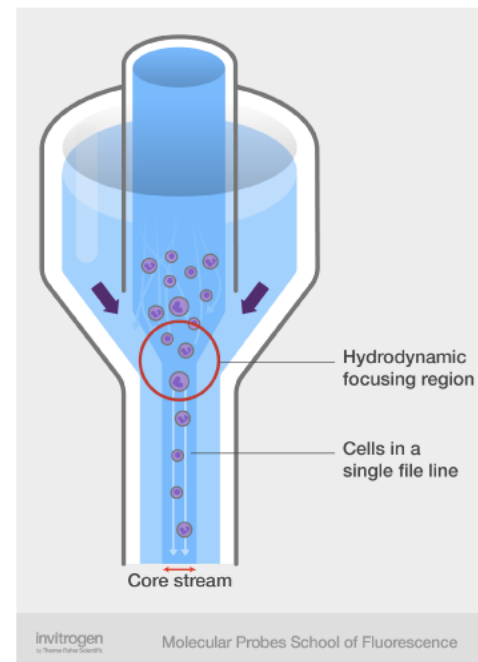
Det er som nevnt vanlig praksis å fryse råmelk med høyt innhold av IgG for å ha et lager i tilfelle kyr som kalver ikke har egen råmelk eller at råmelka har lavt innhold av IgG, noe som også anbefales av TINE (Overrein et al., 2016). Frysing har vist seg å ikke påvirke innholdet av Ig i råmelk, men vil føre til at cellene dør (Langel et al., 2015; Tizard, 2018).

## 2.5 Flow-cytometri

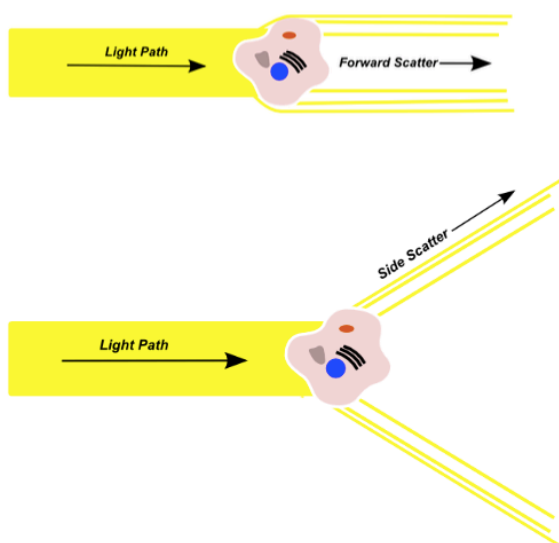
I forsøket er flow-cytometri benyttet for å analysere overflatemarkører hos leukocytter i blod og råmelk for å differensiere de ulike cellepopulasjonene.

Flow cytometri, eller væskestrømscytometri på norsk, er en metode som gjør det mulig å foreta kvantitative målinger av enkeltceller eller enkeltcellers innhold (Lea, 2006). I tillegg til eukaryote celler kan man også studere mikroorganismer. Fordelene ved å bruke flow-cytometri er at det er en automatisert og rask metode som gir objektiv informasjon om prøven som analyseres (Veal, Deere, Ferrari, Piper & Attfield, 2000).

Ved analyse blir cellene tatt opp i instrumentet og blir tilsatt en føringsvæske før de styres med stor hastighet i en tynn væskestrøm, forbi en lyskilde (Figur 3), lyskilden er ofte en laser (Lea, 2006). Deretter måles lysspredning (scatter) og fluorescens (Lea, 2006; Veal et al., 2000). Lysspredning deles i to målinger; forward scatter og side scatter (Figur 4). Forward scatter benyttes til å bestemme størrelsen på cellene og side scatter til å bestemme cellens indre kompleksitet, også kalt granularitet (Figur 4) (Thermo Fisher Scientific., 2014).

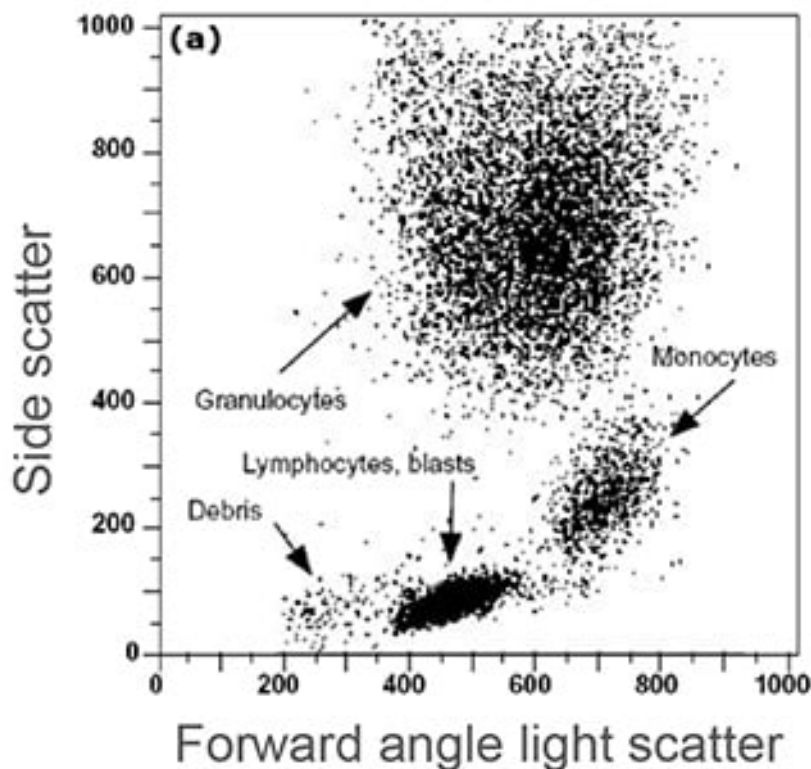


Figur 3 Væskestrøm ved analyse i flow cytometer (Thermo Fisher Scientific., u.å.-b). Cellene, i føringsvæsken, legger seg enkeltvis før de belyses med en laser.



Figur 4 Forskjellen på forward og side scatter ved flow-cytometri (Robinson & Pellenz, 2013).

Granularitet sier noe om innholdet i cellen, hvor spesielt granulocytter har en uregelmessig form på kjernen (Lea, 2006). Dette er vist ved lysspredning for ulike leukocytterne i figur 5. Figuren viser at granulocytterne er de største cellene, ut ifra forward scatter, og har et mer kompleks indre, ut ifra side scatter. Sammenlignet med lymfocytterne viser figuren at disse er mindre og har færre vesikler inne i cellen, et mindre granulert indre. Figur 5 illustrerer ulike cellers registrerte lysspredning.

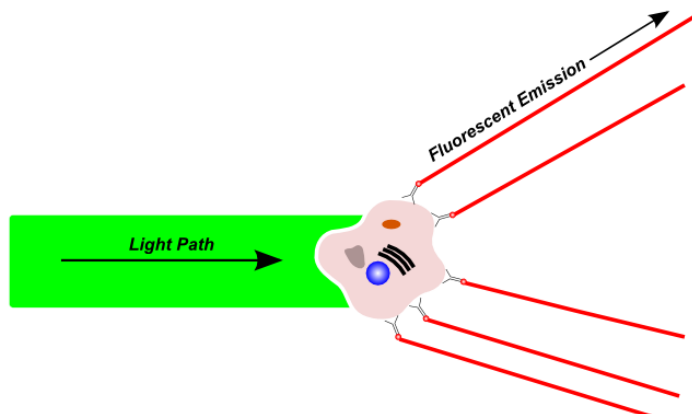


Figur 5 Et 2D scatter-plott, hvor informasjonen fra forward scatter og side scatter er satt i sammenheng og dermed gjør differensiering av cellepopulasjonene mulig (Abcam, u.å.).

For å kunne differensiere cellene ytterligere i ulike undergrupper, krever det en mer komplisert metode, hvor man ofte benytter fluorokromer (Veal et al., 2000). Fluorokromer er fluorescerende, som betyr at de frigir fotoner når en lyskilde belyser de. Ulike fluorokromer blir aktivert av lys med ulik bølgelengde og vil avgi fotoner med forskjellige bølgelengder. Disse fotonene med ulik bølgelengde vil oppfattes som lys av ulike farger, som er årsaken til at metoden også kalles farging av celler.

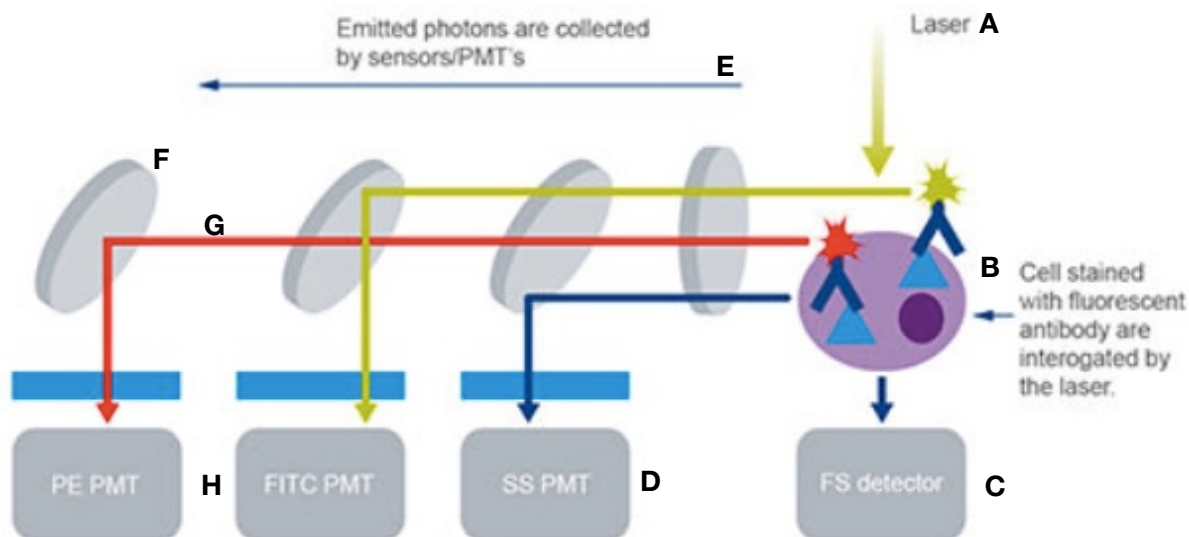
Fluorokromene kan være bundet til antistoffer som igjen kan binde seg til ulike molekyler i celleoverflaten eller inne i cellen (Lea, 2006). Noen fluorokromer kan i tillegg binde direkte til spesielle komponenter av cellen, slik som DNA, uten antistoffer. Ved bruk av flere

fluorokromer kan man dermed identifisere ulike cellemarkører eller celleprodukter. Figur 6 viser hvordan fluorokromer bundet til overflatereseptorer hos cellene aktiveres ved stimulering med en lysstråle.



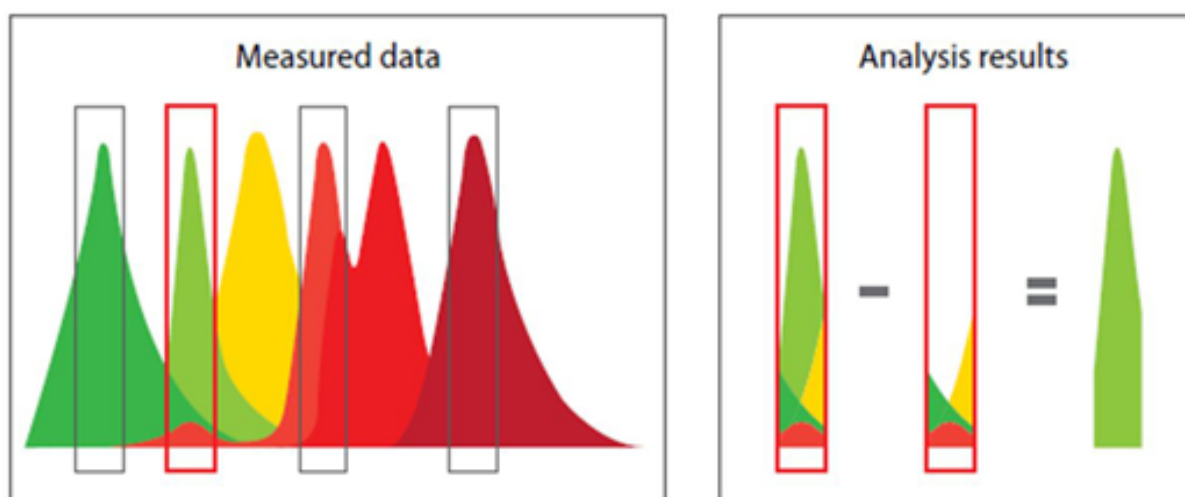
Figur 6 Aktivering av et fluorokrom bundet til et antistoff, som er bundet til en markør i cellens membran (Robinson & Pellenz, 2013).

Figur 7 viser en skjematisk fremstilling av et flow-cytometer og hvordan lysspredning samt fluorescensen fra cellene fanges opp av ulike sensorer.



Figur 7 Skjematisk fremstilling av flow-cytometri (Abcam, u.å.). **A:** Lyskilden, ofte en laser, som gir forward og side scatter, samt aktiverer fluorokromene. **B:** Celler i føringsvæsken som styres forbi laseren, her farget med fluorescerende antistoffer. **C:** Detektor til å fange opp forward scatter. **D:** Detektor for å fange opp side scatter. **E:** Illustrerer at de frigjorte fotonene, eller lyset, fra cellene samles opp av sensorer. **F:** De ulike filtrene dirigerer fotoner med korrekt bølgelengde til riktig sensor (PMT). PMT = photomultipliyng tubes, en type sensorer som omgjør energi fra fotoner til et elektrisk signal. **G:** Viser fotoner med en viss bølgelengde. **H:** PE og FITC er eksempler på ulike fluorokromer som detekteres ved ulike bølgelengder, og dermed registreres i ulike sensorer (PMT).

Ved valg av fluorokromer er det viktig at man har en laser med den bølgelengden som aktiverer fluorokromet. I tillegg må de ulike fluorokromene som skal benyttes avgi lys med ulike bølgelengde. Om fluorokromene avgir lys med lik bølgelengde vil det bli "overlapp" i analysene, noe om for eksempel kan gjøre det vanskelig å skille ulike celletyper fra hverandre. "Overlapp" betyr her at frigitt lys fra et fluorokrom blir fanget opp av en detektor som er ment å detektere et annet fluorokrom. Hvor stort dette problemet er avhenger av fluorokromene og hvilken bølgelengde det er på fotnene de avgir. Det er vanskelig å unngå overlapp helt, men ved å gjennomføre en "kompensering" kan problemet korrigeres. Dette sikrer at registreringer med samme bølgelengde kun viser resultater av det ene fluorokromet, og dermed for eksempel kun den ene typen celler. Figur 8 viser en skjematisk fremstilling av kompensering ved flow-cytometri.



Figur 8 Skjematisk forklaring av kompensering etter gjennomført flow-cytometri (Thermo Fisher Scientific., u.å.-a).

Metoden i dette forsøket blir videre forklart under kapittel 4.6 Flow-cytometri.

### 3 Forsøksplanlegging

I dette kapitlet blir planleggingen av forsøket gjennomgått. Årsaken til at forsøksplanleggingen og forsøket er blitt en stor del av denne masteroppgaven skyldes at det ikke var noe pågående forsøk ved NMBU som omhandlet det temaet jeg ønsket å skrive om. Emnet for oppgaven, som senere ble til dette forsøket og denne masteroppgaven, var min idé og mitt ønske å jobbe med. Jeg har selvsagt vært avhengig av god hjelp og veiledning av mine veiledere for å komme frem til den konkrete problemstillinga og metodene, men selve arbeidet og gjennomføring av forsøket har i stor grad blitt gjennomført av meg.

Arbeidet med oppgaven startet i januar 2018 med et møte med Anne Cathrine Whist og Kari Lybeck. Anne Cathrine er spesialrådgiver innen helse og fruktbarhet hos Tine Rådgivning og Medlem, og inkluderte Kari tidlig i prosessen grunnet hennes fagkompetanse innen immunologi som ansatt ved Veterinærinstituttet. Etter dette møtet tok jeg kontakt med Stine Gregersen While, førsteamanuensis ved Institutt for husdyr- og akvakulturvitenskap (IHA) ved NMBU, som da ble min hovedveileder for masteroppgaven.

Ut over våren ble det holdt møter jevnlig med hovedfokus på å opprettholde fremdriften i prosjektet og konkretisere problemstillingen. Ved oppstarten av forsøksplanlegginga var det naturlig å inkludere Dag-Kristoffer Forberg, overingeniør ved Stoffskifteavdelingen på SHF, da han har kjennskap til arbeidet ved forsøksfjøset og har bidratt konstruktivt til både planlegging og gjennomføring av forsøket.

En viktig del av forarbeidet var å søke om godkjenning av forsøket hos Mattilsynet, gjennom Forsøksdyrforvaltningens tilsyns- og søknadssystem (FOTS). Denne søknaden var det hovedveileder Stine G. While som sendte inn, og hun står som forsøksansvarlig sammen med Dag-Kristoffer Forberg. Forsøket er definert som et pilotforsøk med lett belastning for forsøksdyrene. Søknaden om gjennomføring av forsøk ble godkjent 23.08.2018 og vedtaket er fattet med hjemmel i forskrift 18. juni 2015 nr. 781 om forsøk med dyr (Forskrift om bruk av dyr i forsøk) § 6.

Under hele prosessen har egen drivkraft vært avgjørende for å opprettholde fremdriften i planleggingen og gjennomføringen av forsøket. Mine arbeidsoppgaver har vært:

- Innkalling og gjennomføring av møter, skriving og utsending av referater.
- Ansvar for å sikre finansieringen av forsøket.
- Skrive forsøksplan og lage registreringsskjema.
- Opplæring i prøvetaking og metode på laboratoriet ved Veterinærinstituttet.
- Oppfølging av kalvinger og ansvar for å få tatt prøver rett etter fødsel, før tildeling av råmelk.
- Prøvetaking i fjøset.
- Transport av prøver fra fjøset ved SHF til Veterinærinstituttet, Oslo.
- Gjennomføring av analyser på laboratoriet ved Veterinærinstituttet.

Én av utfordringene i forsøket var å få tatt blodprøve av kalven før første tildeling av råmelk. Blodprøven skulle være tatt innen to timer etter kalving og gode rutiner for varsling var derfor viktig. De ansatte ved SHF og andre engasjerte i forsøket brukte en felles chattefunksjon slik at alle ansvarlige for prøvetaking raskt fikk beskjed ved relevante hendelser. I tillegg ble kameraopptak fra fødebingene undersøkt ved uovervåkede kalvinger på natt og tidlig morgen.

Det oppsto også tilfeller hvor prøvetaking ikke kunne gjennomføres, heriblant en kalv som ble syk etter første analyse og ble derfor tatt ut av forsøket, samt en kalv som var dødfødt når vi ankom fjøset for å ta prøver.

### **3.1 Budsjett og finansiering av forsøket**

Et avgjørende aspekt ved forsøksplanleggingen var å søke om økonomiske bidrag fra ulike næringsaktører, da det ikke var noe pågående prosjekt innenfor dette temaet i denne tidsperioden. Det tok en del tid og i noen tilfeller ingen gevinst. Det totale budsjettet ble skissert til 56 200,-, tabell 5. Enkelte av postene har vi greid oss uten, noen analyser ble endret og egen arbeidsinnsats gjorde at utgiftene gikk opp med tilgjengelige midler.

Tabell 5 Budsjett for forsøket.

	Antall	Utgifter, kr.
Søknad Mattilsynet		4 000
Transport av prøver		5 000
Reisekostnader		2 500
Analysér ved Veterinærinstituttet	30 timer	30 000
Blodprøve analyser, stor profil	10 stk., á 470,- pr. stk.	4 700
Senter for husdyrforsøk		
Materiale		1 500
Blodprøvetaking	30 stk., á 250,- pr. stk.	7 500
Melkeprøver, TINE		
Trykking av oppgave		1 000
Sum		56 200

Støtte fra ulike bedrifter har vært avgjørende for gjennomføringen av forsøket, bidragsyttere og beløp er vist i tabell 6. I tillegg til disse aktørene har Institutt for husdyr- og akvakulturvitenskap ved NMBU bidratt med å dekke kostnadene til Senter for husdyrforsøk og til behandlingen av søknaden hos Mattilsynet.

Tabell 6 Bedrifter og deres økonomiske bidrag til forsøket..

Bedrift	Sum støtte
Geno	25 000,-
Tine	15 000,-
Nortura	Dekke reisekostnader

På det tidspunkt Geno valgte å støtte forsøket var det skissert et forsøk med ca. dobbelt antall forsøksdyr, prøveuttak og dermed budsjett. På grunn av utfordringen med å få dekt kostnadene og i tillegg prosjektets tidsramme ble forsøket halvert til det som beskrives i oppgaven. Geno valgte allikevel å bidra med samme sum slik at forsøket kunne gjennomføres. Dette har vært helt avgjørende for forsøket.



### 3.2 Opplæring

I tillegg til forsøksplanlegging har opplæring i blodprøvetaking og laboratoriemetode vært viktig. I mai og juni 2018 deltok jeg på opplæring i blodprøvetaking, med fokus på både dyrevelferd og HMS. I september samme år ble det gitt opplæring i metoden på laboratoriet ved Veterinærinstituttet, samtidig som testkjøringen av prosedyren for å undersøke om metoden egnet seg på råmelk fra ku. Laboratorieprosedyren er en omfattende prosess med mange ledd, derfor har Kari Lybeck bistått mye på lab for å sikre at arbeidet er blitt gjort riktig.

### 3.3 Bacheloroppgave tilknyttet forsøket

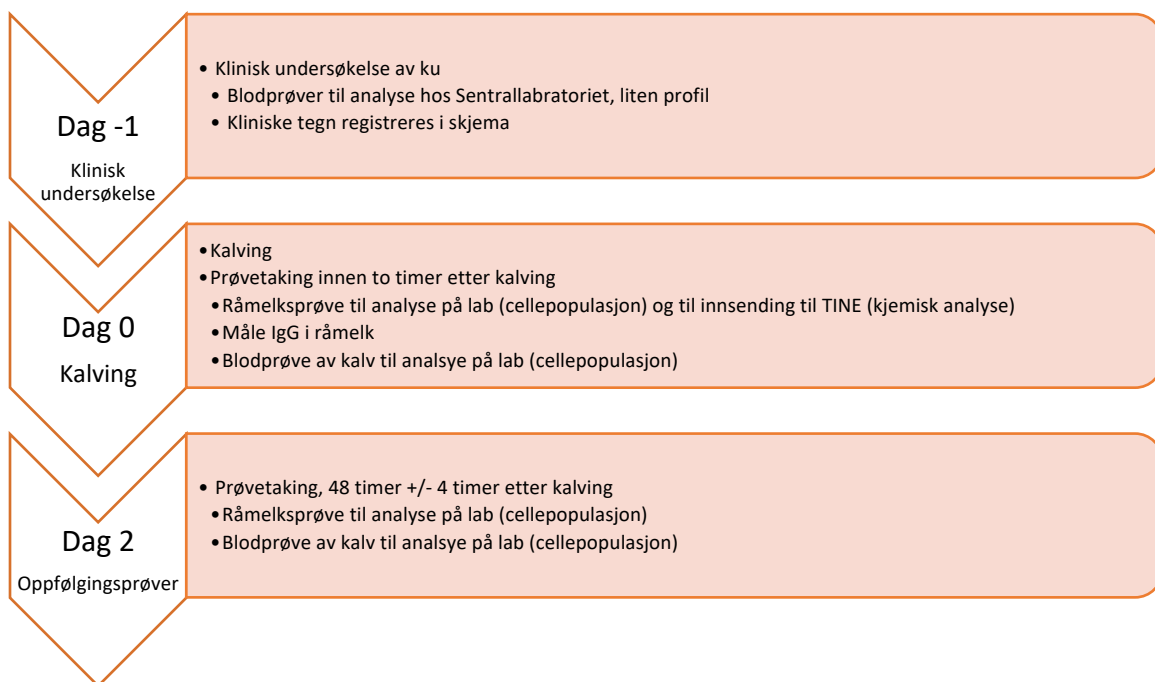
Under planleggingen av forsøket ble det klart at det kunne være behov for enda en student for å bidra ved prøvetaking i fjøset, både med tanke på arbeidsmengden og på sikkerheten ved prøvetaking. Det ble derfor opprettet en bacheloroppgave knyttet til forsøket som hadde til hensikt å undersøke innhold av IgG i spytt og serum hos kalv, før tildeling av råmelk og to dager etter. Dette er gjort med grunnlag i blod- og råmelksprøver, samt spyttprøver tatt på samme tidspunkt som blod- og melkeprøver i dette forsøket. Det ble benyttet et Milwaukee Brix refraktometer for å måle IgG i råmelk, samt spytt og serumprøver fra kalv. I tillegg ble prøvene analysert for IgG ved Mastittlaboratoriet i Molde.

Bacheloroppgaven og tilhørende arbeid er det Nina Kristin Prestrud som har gjennomført. Av resultatene til Nina er Brix-målingene av råmelk og analysene av IgG i serum hos kalv benyttet i denne oppgaven. Målinger knyttet til immunglobuliner i råmelk og blod er derfor i hovedsak studert i bacheloroppgaven. Fokuset i denne masteroppgaven er cellepopulasjonene av hvite blodceller i råmelk og blod.

## 4 Materiale og metode

Forsøket omhandlet blodprøvetaking av kalv like etter fødsel og før tildeling av råmelk, samt 48 timer +/- 4 timer etter fødsel. Det ble tatt prøver av mordyret sin melk ved samme tidspunkt. Prøveuttakene ble gjennomført ved SHF og analysene på Veterinærinstituttet. Den praktiske delen av forsøket ble gjennomført i perioden september 2018 til mars 2019.

Figur 9 viser en skjematisk fremstilling av forsøket. Hvert enkelt ledd blir forklart ytterligere i dette kapitlet.



Figur 9 Skjematisk fremstilling av gjennomføringen av forsøket.

### 4.1 Forsøksdyr

Dyrene i forsøket ble tilfeldig utvalgt, ut ifra kalvingstidspunkt som gjorde prøvetaking og analyser mulig. Kalvingstidspunkt var en avgjørende faktor for om ku og kalv ble med i forsøket da analysene på laboratoriet var tidkrevende og uttak av prøver ikke ble utført på kveld/natt. En annen forutsetning for å beholde kalvene i forsøket var at en hadde kontroll på tildeling av melk like etter fødsel. Alle forsøksdyrene var renrasede NRF og ytterligere informasjon om dyrene i forsøket er vist i tabell 7.

Tabell 7 Oversikt over dyr i forsøket.

Ku-ID	Fødselsdato	Laktasjonsnr.	Genetisk linje <sup>1</sup>	Kalvingsdato	Kalve-ID
6302	25.11.2014	3	FL	10.10.2018	6796
6305	26.11.2014	3	HL	24.10.2018	6805 <sup>2</sup>
					6806 <sup>2</sup>
6284	12.10.2014	3	FL	30.10.2018	6812
5843	18.09.2011	6	FL	06.11.2018	6816
6540	11.11.2016	1	HL	09.01.2019	6849
6576	27.01.2017	1	HL	11.01.2019	6850
6577	28.01.2017	1	FL	16.01.2019	6854
6274	19.09.2014	3	HL	26.01.2019	6858
6565	09.01.2017	1	HL	12.02.2019	6864

<sup>1</sup> FL = linje avlet for lav mastittfrekvens, frisk linje. HL = linje avlet for høy ytelse.

<sup>2</sup> Tvillinger.

## 4.2 Rutiner rundt kalving

Etter kalving ble kalven tatt ut fra kalvingsbingen, veid og satt i individuell boks med strøhalm. Deretter ble spytt- og blodprøver tatt. Etter prøveuttak ble kalvene tilbudt råmelk. Ut over dette var tidspunkt for melketildeling kl. 06:00, 12:00 og 17:00.

På bakgrunn av rutinen ved SHF, fikk kalvene i tillegg sprayet jod på navlestrengen like etter fødsel.

## 4.3 Melkeføring av kalver i forsøket

Ved føring av kalvene i forsøket ble det tatt utgangspunkt i TINE sine anbefalinger om kalveføring (Overrein et al., 2016) frem til andre blodprøve på dag 2. Anbefalt råmelksmengde ved første melketildeling er 8,5 % av kalvens kroppsvekt (Overrein et al., 2016). Med utgangspunkt i 40 kg fødselsvekt vil dette gi en anbefalt råmelksmengde på ca. 3,5 liter. De nyfødte kalvene ble tilbudt 4,0 liter ved første tildeling for å sikre god tilgang på råmelk. I løpet av første levedøgn bør kalvene ha et opptak av råmelk på ca. 8 liter (Overrein et al., 2016), noe som også var et mål i forsøket. Kalver med lavere inntak ble likevel inkludert i forsøket. Ved alle føringer i forsøksperioden ble følgende registrert: antall liter melk tilbudt og inntatt, tidspunkt for føring, temperatur på melka (i området 38-40°C) og om det ble brukt sonde. Det presiseres at kalvene fikk kun melk fra egen mor.

#### 4.4 Klinisk undersøkelse av kua

En enkel klinisk undersøkelse av kua ble gjennomført én til to dager før eller dagen etter kalving for å vurdere helsestatusen hos kua. Undersøkelse innebar en klinisk gjennomgang av kua og en blodprøve. Ved undersøkelsen av kua ble følgende parametere ble vurdert:

- Generell allmenntilstand
- Rektal temperatur
- Respirasjonsfrekvens
- Hjerterefrekvens
- Evt. betennelsessymptomer i jur/spener
- Klauvstatus og beinstilling

Blodprøven ble analysert hos Sentrallaboratoriet ved NMBU Adamstuen for analyse etter analysebestillingen "Liten profil, storfe" (Tabell 8).

Tabell 8 Blodprøver analysert etter analysebestillingen "Liten profil, storfe" hos Sentrallaboratoriet. Analysen inkluderer følgende parametere.

Enzymer	Metabolitter	SPE <sup>1</sup>	Mineraler	Hematologi
Aspartat aminotransferase	Total-protein	Albumin	Kalsium	Hematologi med differensialtelling
C-reaktivt protein	Urea	Globuliner $\alpha_1, \alpha_2, \beta_1, \beta_2, \gamma$	Magnesium	
Glutamat-dehydrogenase	$\beta$ -hydroksybutarat	Albumin:Globuliner, forholdstall	Fosfor	

<sup>1</sup> SPE = Serum proteinelektroforese

## 4.5 Prøvetaking

For prøvene tatt i forsøket er tidspunkt og sammenheng mellom disse vist i tabell 9.

Tabell 9 Prøvetaking i forsøket.

Dag -2/+1	Dag 0	Dag 2
	Fødsel	+ 48 t (+/- 4 t) etter fødsel
Klinisk undersøkelse av ku	Spyttprøve fra kalv <sup>1</sup>	Spyttprøve fra kalv
	Blodprøver av kalv og prøver av råmelk <sup>1</sup>	Blodprøver av kalv og melkeprøve
	Råmelkstildeling	Melketildeling <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Disse prøvene er tatt før første råmelkstildeling

<sup>2</sup> De dagene prøven ble tatt ved føringstidspunkt.

### 4.5.1 Blodprøver

Det ble tatt blodprøver i halsvenen (*vena jugularis externa*) på både ku og kalv. Under prøvetakinga ble dyret fiksert og pelsen på stedet for stikk ble barbert, før desinfisering med 70 % etanol. Det ble tatt to prøverør av både ku og kalv ved hver prøvetaking: 10 ml-rør fra ku og 6 ml-rør fra kalv. De to rørene var enten tilsatt etylendiamintetraacetat (EDTA) for å få prøve av fullblod (lilla kork) eller silicapartikler for å få serum (rød kork). Det ble benyttet kanyler med 0,9 mm diameter og 25 mm lengde. Blodprøvene ble like etter uttak vendt 180° 8-10 ganger, for å sikre jevn fordeling av tilsetningene i glassene. Dette var spesielt viktig for prøveglasset tilsatt EDTA for å hindre koagulasjon av blodet.

Analysen ved Sentrallaboratoriet krever fullblod (rør tilsatt EDTA) og serum. Etter blodprøvetaking ble blodprøven for uttak av serum satt loddrett i et stativ i minimum 30 minutter, før sentrifugering ved 3.000 RPM i 15 minutter. Deretter ble serum pipettert ut og satt i kjøleskap sammen med fullblod, frem til transport til Sentrallaboratoriet. Alle prøver ble analysert innen ett døgn etter prøveuttak. Sentrallaboratoriet anbefaler analyse innen to døgn etter uttak for slike analyser som her (Sentrallaboratoriet, personlig kommunikasjon, 29.04.2019)

Blodprøvene av kalven ble benyttet til analyse av cellepopulasjoner ved Veterinærinstituttet. Prøver til uttak av serum ble brukt til analyser i bacheloroppgaven tilknyttet forsøket.

### 4.5.2 Melkeprøver

Det ble tatt to prøver av første utmelking av råmelk (dag 0). Én ble benyttet til analyse av cellepopulasjoner på laboratoriet ved Veterinærinstituttet og den andre ble sendt til TINE for standard analyse av kjemisk innhold. På dag 2 ble det tatt en oppfølgingsprøve av melka for analyse av cellepopulasjoner. Alle melkeprøvene er samleprøver fra alle fire spener, tatt ut fra melkespann etter utmelking. Den analyserte melka blir derfor så lik som mulig den melka kalven tildeles. Melka ble rørt godt før prøveuttak for å sikre homogen og representativ prøve. Prøvemengdene var på 5,0 dl for analyse ved Veterinærinstituttet og 0,5 dl for kjemisk analyse hos TINE. Prøven til TINE var tilsatt bronopol (konserveringstablett) og ble oppbevart i kjøleskap (4 °C) frem til henting av tankbil.

Den kjemiske analysen besto av:

- Innhold av fett, %
- Innhold av protein, %
- Innhold av laktose, %
- Frie fettsyrer (FFS), mmol/L
- Urea, mmol/L
- Bakterieinnhold, antall
- Celletall, antall celler pr. ml melk
- Frysepunkt, °C

Celletall er det somatiske celletallet i melka, som inkluderer hvite blodceller og epitelceller. Analysen på laboratoriet benytter Somacount FCM (Bentley Instruments, Maroeuli, Frankrike).

I tillegg til disse prøvene er det tatt ut råmelk for måling av IgG-innhold på dag 0. Til dette ble et Milwaukee Brix refraktometer (Milwaukee Electronics, Szeged, Ungarn) benyttet for måling av Brix-prosent.

## 4.6 Flow-cytometri

Flow-cytometri er benyttet for å differensiere mellom ulike typer leukocytter og deres undergrupper i blod og råmelk. Prosedyren er utarbeidet av Veterinærinstituttet ved Kari Lybeck og er basert på tidligere forsøk med farging av blod og melk ved bruk av NovoCyte® Flow Cytometer (ACEA Biosciences, San Diego, USA). Samme flow-cytometer ble brukt i dette forsøket.

Til analyse av de ulike cellepopulasjonene ble både primære og sekundære antistoffer benyttet. De primære antistoffene binder seg til reseptormolekyler i celleoverflaten først, deretter tilsettes de sekundære antistoffene som binder seg til de primære antistoffene. De sekundære antistoffene er bundet til et fluorokrom. Et sekundærantistoff må kun binde seg til ett primærantistoff i samme prøve (brønn), ellers kan man ikke skille de ulike cellemarkørene fra hverandre. Dette lar seg gjøre ved å benytte antistoffer av ulike klasser og subklasser. Sekundærantistoffet detekteres ved flow-analysen basert på fluorokromet det har bundet til seg.

### 4.6.1 Farging av celler i råmelk og blod: Prosedyre

Melk ble først fortynnet 1:1 i fosfatbufret saltvann (PBS) og sentrifugert ved 400xg i 10 min. Deretter ble kremlag fjernet ved bruk av sug, før kanten på sentrifugerørene ble tørket. Resten av supernatanten ble helt av og cellepelleten ristet opp. Sentrifugerørene ble igjen tilsatt PBS og sentrifugert på nytt. Samme prosess for sentrifugering ble gjentatt før alle cellene ble overført i nytt rør via en 70 µM cell strainer (en sil) før ny sentrifugering etter samme prosedyre som over. Supernatanten ble igjen helt av og cellene ristet opp før ca. 2 ml PBS ble tilsatt. Cellene ble deretter fortynnet 1:20 med PBS og 0,4 % trypanblått (Trypan Blue, Bio-Rad Laboratories, Oslo, Norge) fortynnet 1:5 før cellene ble telt i et Bürkerkammer. Celletellingen er nødvendig for å vite omtrent konsentrasjon av celler i melk og dermed fortynne prøven slik at mengde celler i prøven er tilpasset mengde antistoffer tilsatt ved cellefarging.

Før farging av celler ble 100 µL celler fra melk (ca.  $1 \times 10^6$  celler) og 30 µL blod tilsatt til ett 96-brønners brett etter mal (tabell 13) før vask. Brønner med blod ble tilsatt 150 µL PBS før videre arbeid. All vask under fargeprosedyren ble gjort ved 500xg i 3 min ved 4 °C, tre ganger. Mellom hver vask ble supernatanten kastet av, cellene ristet opp og tilsatt 190 µL PBS. Etter siste vask ble 25 µL av LIVE/DEAD™ (Molecular probes LIVE/DEAD™ Fixable

Aqua Dead Cell Stain, Fisher Scientific, Oslo, Norge), fortynnet 1:500 med PBS, tilsatt i hver brønn før inkubering. Alle inkuberinger i prosedyren varte i 30 min på is uten lys, med unntak av blokkering med geitenserum. Etter inkubering med LIVE/DEAD™ ble cellene vasket tre ganger, ved første vask ble PBS brukt og ved de to neste ble PBS m/BSA (bovint serum albumin) brukt.

Etter siste vask ble 25 µL primærantistoff fortynnet i PBS m/BSA tilsatt i brønnene etter oppsettet i tabell 12 og 13. Deretter ble prøvene inkubert og vasket med PBS m/BSA. Videre ble 10 µL geitenserum, fortynnet 3:10 i PBS m/BSA, tilsatt alle brønner. Geitenserum blokkerer Fc-reseptorer for å hindre uspesifikk binding. Inkuberingen varte i 5 min på is, uten lys.

Videre ble 35 µL sekundærantistoffer fortynnet i PBS m/BSA, tilsatt etter oppsettet i tabell 13 før ny inkubering. Prøvene ble igjen vasket med PBS m/BSA. Etter siste vask ble supernatanten kastet av og cellene ristet opp. Til slutt ble 150 µL en lyserende løsning (FACS Lysing Solution, BD, Høvik, Norge) tilsatt alle brønner. FACS Lysing Solution fortynnet 1:10 i RO-vann. Løsningen lyserer de røde blodcellene før flow-cytometri-analysen, slik at disse elimineres og dermed ikke forstyrrer analysen.

Brettet settes inn i NovoCyte® Flow Cytometer for innlesning av minst 50.000 celler per brønn med en terskelverdi for størrelse ut ifra forward scatter.



#### 4.6.1 Oversikt over antistoffer benyttet i forsøket

Oversikt over primærantistoffer og hvilke cellepopulasjoner de markerer er vist i tabell 10.

Tabell 10 Oversikt over primærantistoffene benyttet i forsøket og hvilke cellepopulasjoner de binder seg til og dermed påviser ved analyse.

Overflatemarkør	Cellepopulasjon
CD3 <sup>1</sup>	På alle T-lymfocytter
CD4 <sup>2</sup>	T-lymfocytter; hjelpeceller
CD8 <sup>2</sup>	T-lymfocytter; cytotoksiske og $\gamma\delta$ T-celler NK-celler Enkelte dendritiske celler
$\gamma\delta$ TcR <sup>2</sup>	T-lymfocytter; $\gamma\delta$ T-celler
WC1 <sup>2</sup>	Subpopulasjon av $\gamma\delta$ T-celler
CD25 <sup>2</sup>	T-lymfocytter B-lymfocytter NK-celler Granulocytter
B-lymfocytter <sup>2</sup>	B-lymfocytter
CD335 <sup>1</sup> (NKp46)	NK-celler
Granulocytter <sup>2</sup>	Granulocytter
CD14 <sup>1</sup>	Monocytter og makrofager
CD11b <sup>1</sup>	Granulocytter Monocytter/makrofager Dendritiske celler (B-lymfocytter, T- lymfocytter, NK-celler) <sup>3</sup>
CD18 <sup>2</sup>	Granulocytter Monocytter

<sup>1</sup>Bio-Rad, Hercules, CA, USA.

<sup>2</sup> Monoclonal antibody center, Washington State University, USA.

<sup>3</sup> Kun enkelte undergrupper av disse cellene uttrykker denne markøren.

Konsentrasjonene for primærantistoffene ved farging av celler er vist i tabell 11. For de sekundære antistoffene er konsentrasjonene ved farging slik:

Alle sekundærantistoffer bundet til allophycocyanin (APC) eller phycoerythrin (PE) hadde en sluttkonsentrasjon på 2,5  $\mu\text{g/ml}$ , og sluttkonsentrasjonen til sekundærantistoffer bundet til

fluorescein isothocyanate (FITC) er 10 µg/ml. Samtlige sekundærantistoffer er fra Southern Biotech (Birmingham, AL, USA).

*Tabell 11 Primærantistoffer og deres fortykning ved farging av celler.*

<b>Overflatemarkør</b>	<b>Klone</b>	<b>Isotype</b>	<b>Fortynning</b>	<b>Konsentrasjon i brønn ved farging<sup>1</sup></b>
CD4	IL-A11	IgG <sub>2a</sub>	1:50	10 µg/ml
CD8α	7C2B	IgG <sub>2a</sub>	1:100	5 µg/ml
γδTcR	GB21A	IgG <sub>2b</sub>	1:100	5 µg/ml
CD3	MM1A	IgG <sub>1</sub>	1:100	5 µg/ml
CD25	LCTB2A	IgG <sub>3</sub>	1:100	5 µg/ml
WC1	BAQ4A	IgG <sub>1</sub>	1:50	10 µg/ml
B-lymfocytter	LCT30A	IgG <sub>1</sub>	1:50	10 µg/ml
CD21 <sup>2</sup>	BAQ15A	IgM	1:100	5 µg/ml
CD335	AKS1	IgG <sub>1</sub>	1:500	1 µg/ml
CD18	BAQ30A	IgG <sub>1</sub>	1:50	10 µg/ml
CD14	TÜK4	IgG <sub>2a</sub>	1:40	12,5 µg/ml
CD11b	CC126	IgG <sub>2b</sub>	1:50	10 µg/ml
Granulocytt	CH138A	IgM	1:10	50 µg/ml

<sup>1</sup> *Konsentrasjonen av antistoffene etter tilsetning i brønnene for farging av celler fra melk og blod.*

<sup>2</sup> *Resultatene er ikke med på grunn av dårlig farging med denne markøren.*

#### 4.6.2 Oppsett for fortyning og tilsetning av antistoffer

De benyttede antistoffene i forsøket er monoklonale antistoffer (mAb) som binder til cellemarkøren, samt sekundære antistoffene er bundet til ett av fluorokromene APC, FITC og PE. Hvert sekundærantistoff i oppsettet binder spesifikt til ett primærantistoff, dette gjør det mulig å skille ulike typer celler fra hverandre ut ifra påviste reseptormolekyler. Tabell 12 viser blandingen av primære og sekundære antistoffer for farging av celler, og dermed hvilke markører det analyseres for i samme brønn. Konsentrasjon av de ulike antistoffene angis i tabell 11.

Tabell 12 Blandinger av antistoffer til farging av celler. Hvert tall refererer til ulike blandinger av primære antistoffer. Hver bokstav viser til ulike blandinger av sekundære antistoffer. Brønner med primærantistoffer tilsettes sekundærantistoffer oppført i kolonnen under, markert med tilsvarende farge og stjerne. Tabell 13 viser hvilke primære (1-6) og sekundære antistoff (A-E) som tilsettes i hvilke brønner.

		1	2	3	4	5	6
Primær- antistoffer	*	CD3	CD335	$\gamma\delta$ TcR	B-celler	CD11b	CD18
	**	CD4	CD8	CD8	CD21 <sup>2</sup>	CD14	CD14
	***	CD25	CD25	WC1 <sup>1</sup>		Gr. <sup>3</sup>	
		A	B	C	D	E	
Sekundær- antistoffer	*	IgG <sub>1</sub> APC	IgG <sub>2b</sub> APC	IgG <sub>1b</sub> APC	IgG <sub>2</sub> APC	IgG <sub>1</sub> APC	
	**	IgG <sub>2a</sub> PE	IgG <sub>2a</sub> PE	IgM PE	IgG <sub>2a</sub> FITC	IgG <sub>2a</sub> FITC	
	***	IgG <sub>3</sub> FITC	IgG <sub>1</sub> FITC		IgM PE		

<sup>1</sup> WC = workshop cluster.

<sup>2</sup> Resultatene er ikke med på grunn av dårlig farging med denne markøren.

<sup>3</sup> Gr. = Granulocytter

Tabell 13 viser oppsett for tilsetning av antistoffer i brønnene, ut ifra blandinger med antistoffer oppgitt i tabell 12. Alle brønner, med unntak av C7 og G7, ble tilsatt levende/dødfarging slik som beskrevet i prosedyre. Brønn C1-C7 og G1-G7 ble tilsatt kun PBS m/BSA ved tilsetning av primære antistoffer da disse er kontroller for uspesifikk binding til sekundære antistoffer. Sekundære antistoffer tilsettes i alle brønner etter oppsettet, med unntak av brønn C1, C7, G1 og G7 som kun tilsettes PBS m/BSA.

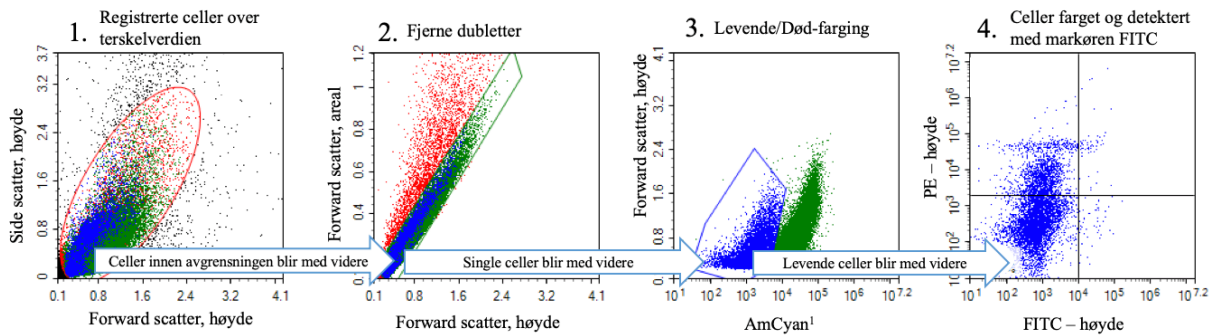
Tabell 13 Oppsett for tilsetting av primære og sekundære antistoffer. Rutenettet viser et 96-brønners brett. Rad B og C er tilsatt blod, rad F og G er tilsatt celler fra melk. Brønnene 1-6 og 7-12 i rad B og F er paralleller, tilsatt henholdsvis blod og celler fra melk. Brønn 1-7 i rad C og G er kontrollfarginger kun tilsatt sekundære antistoffer. Tall og bokstaver referer til blandinger av henholdsvis primære og sekundære antistoffer, vist i tabell 12.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	1/A	2/A	3/B	4/C	5/D	6/E	1/A	2/A	3/B	4/C	5/D	6/E
C	Kun Live/Dead <sup>TM</sup>	A	B	C	D	E	Ufarget					
D												
E												
F	1/A	2/A	3/B	4/C	5/D	6/E	1/A	2/A	3/B	4/C	5/D	6/E
G	Kun Live/Dead <sup>TM</sup>	A	B	C	D	E	Ufarget					
H												

#### 4.6.1 Bearbeiding av resultater fra flow-cytometri

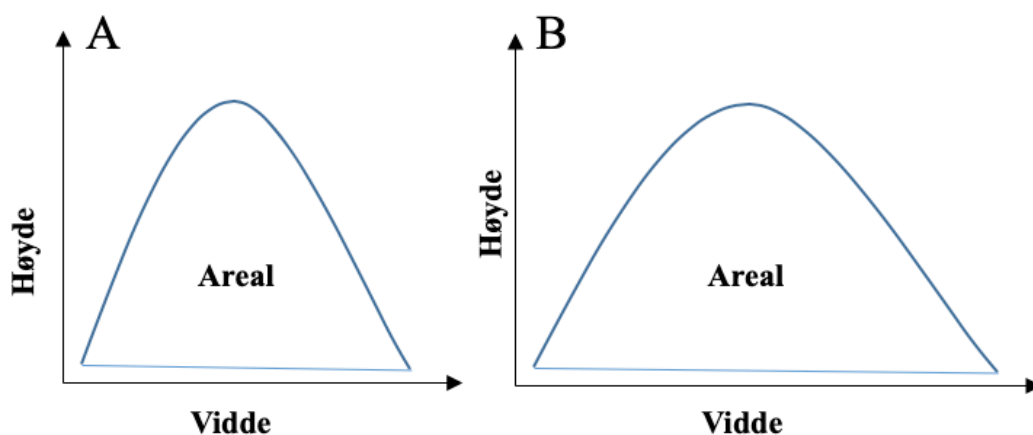
Etter endt analyse i flow-cytometeret ble resultatene bearbeidet manuelt. Det er flere steg som er viktig i denne prosessen, som blant annet omfatter *gating*. Gating innebærer å avgrense hvilke registrerte celler som blir med i resultatene fra analysen. I dette tilfellet vil det først si å definere den cellepopulasjonen som anses å omfatte celler man ønsker å analysere i et forward scatter mot side scatter plott. Videre omfatter det en ekskludering av dubletter og døde celler. Epitelceller i melkeprøvene har ikke blitt ekskludert og er derfor med i summen av antall celler som er registrert ved analysen.

Figur 10 viser de ulike trinnene ved bearbeiding av analyseresultater etter flow-analyse. Plottet i punkt 1 (Figur 10) viser alle cellene registrert i f.eks. blod som er over terskelverdien. Terskelverdien ble satt til å registrere celler over en viss størrelse etter forward scatter. Før videre bearbeiding av data ble cellene med riktig størrelse og granularitet tatt med videre. I figuren er cellene som inkluderes videre definert av den røde ovale streken.



Figur 10 Viser fremgangsmåten for bearbeiding av resultatene etter gjennomført flow-cytometri.  
<sup>1</sup> Kanalen som registreres ved Live/Dead farging.

Neste ledd i prosessen var å fjerne dubletter, punkt 2. Å identifisere dubletter ble gjort ved å se på cellenes lysspredning. Figur 11 viser forskjellen i lysspredning mellom dubletter og single celler, som er grunnlaget for å skille de fra hverandre. For å forklare hvordan lysspredning er bakgrunnen for å skille enkle og doble celler fra hverandre kan en graf, som vist i figur 11 benyttes. Ved bruk av lysspredning, forward og side scatter, blir vidden (V) på grafen bestemt ut ifra tiden det tar cellen å passere laseren og høyden (H) er den høyeste toppen av signalet (innsamlet lys). Arealet av grafen er  $H \times V$ , som er større hos dubletter fordi to celler bruker lenger tid på å passere laseren. Imidlertid er høyden omtrent lik og dermed kan dublettene ekskludert ved å se på arealet i kurven mot høyden. Disse cellene er i figur 10 de som er markert med rødt. Punktene innenfor det grønne rektangelet, de blå og grønne, er cellene som antas å ligge enkeltvis ved analysen. Slik ble kun single celler i analysen valgt ut til datagrunnlaget.



Figur 11 Grafer som viser lysspredning for enkeltceller (A) og dubletter (B) ved flow-cytometri.

Ved punkt 3 ble celler registrert som positiv for levende/død-farging ekskludert. Blå strek og prikker viser hvilke celler som er identifisert som levende, de ble med videre i datagrunnlaget.

Videre ble en grense definert for hvilke resultater som var positiv ved farging av cellene. Fargede brønner tilsatt ulike markører, bundet til fluorokromer, ble sammenlignet med brønner kun tilsatt samme sekundærantistoff og ikke primærantistoff. Siden det er primærantistoffet som skal binde til markøren, blir disse brønnene en kontroll for fargingen. På denne måten blir det tatt hensyn til eventuell uspesifikk binding av sekundærantistoffer.

I tillegg til denne bearbeidingen av resultatene ble en kompensasjon gjennomført. Dette for å sikre at fluorescens fra et fluorkrom ikke forstyrrer påvisning av andre fluorokromer. Fluorokromene PE og FITC frigir fotoner med bølgelengder som er ganske like hverandre, slik at kompensering er spesielt viktig for å skille disse fra hverandre. Kompenseringen innebærer å farge kuler med de samme fluorokromene som er benyttet i forsøket og deretter kjøre en automatisk kompensasjon på flowcytometeret.

Resultatene av analysen viser prosent påvist celler med gitt primærantistoff og fluorkrom, av alle celler registrert i den aktuelle brønnen. 100 % er alle cellene registrert i hver brønn, som ble inkludert etter gating. Gatingen for melk ble lik for alle brønner og alle prøver, det ble imidlertid ikke gjennomført en korrigering for innhold av epitelceller i melkeprøvene. Gatingen for de ulike brønnene med blod er også like, men forskjellig fra melk, for å fange opp hovedpopulasjonen av cellene (K. Lybeck, personlig kommunikasjon, 23.04.2019).

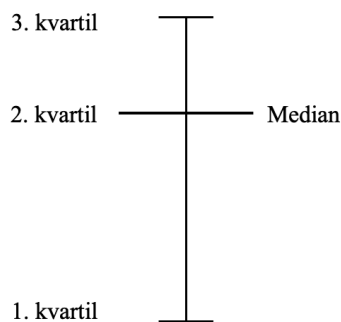
Etter justeringene ble resultatene eksportert til Microsoft Excel for videre bearbeiding og statistikk. I forsøket er det biveileder Kari Lybeck ved Veterinærinstituttet som gjennomført gating og utvalg av celler til resultatene.

## 4.7 Statistisk analyse

Til gjennomføring av statistiske analyser er dataprogrammet Graph Pad Prism 8.0.2 (GraphPad Software., 2019) benyttet. Gjennomførte tester er en Wilcoxon signed-rank-test samt Spearman-korrelasjon. Disse testene beregner en  $P$ -verdi ut ifra to grupper i par, hvor det ikke er en forutsetning med et normalfordelt utvalg. For Spearman-korrelasjon er det i tillegg beregnet en verdi for  $r$ , som vil variere fra -1 til 1.

Årsaken til at det er benyttet tester som ikke forutsetter normalfordeling er at det er få dyr i datagrunnlaget.

I tillegg er median og kvartiler benyttet til å si noe om henholdsvis sentrum av alle målinger og spredningen av målingene. 2. kvartil markerer medianen i alle målingene. Hvor 1. kvartil er medianen mellom 2. kvartil og laveste måling og 3. kvartil mellom 2. kvartil og høyeste måling. Figur 12 viser hvordan disse målene er presentert i resultatet.



Figur 12 Fremstilling av kvartiler og median, slik det benyttes i resultatkapitlet.

Grenseverdien for  $P$  ved signifikante forskjeller er satt til 0,05. Denne grenseverdien kalles signifikansnivå og viser sannsynligheten for at feil slutning trekkes på bakgrunn av de statistiske beregningene (Moore & McCabe, 2002). Begrepet tendens blir benyttet for  $P$ -verdier mellom 0,051 og 0,1.

## 5 Resultater

Bakgrunnen for de presenterte resultatene er registreringer og analyser fra totalt 9 kyr og deres 10 kalver, ett sett tvillinger.

### 5.1 Klinisk helsestatus til dyr i forsøket

De kliniske undersøkelsene visste ingen tegn til sykdom hos dyrene i forsøket. Blodprøvene analysert ved Sentrallaboratoriet visste enkelte avvik fra referanseverdiene:

- 6302: Mengde nøytrofile granulocytter var over referanseintervallet.
- 6274: Mengde monocytter var over referanseintervallet.

Totalt antall hvite blodceller var innenfor referanseintervallet for begge dyr.

Registrerte hendelser på helsekort og celletallet til kyrne i forsøket er presentert i tabell 14. Celletallet er analysert hos TINE ved bruk av Somacount FCM, prøvene er fra etter endt råmelksperiode. Ku 6274 viste seg å ha tilbakeholdt etterbyrd, noe som ble påvist på dag 2 i forsøket, etter tilsyn av veterinær. 6274 ble ikke behandlet, men etterbyrden ble fjernet av veterinæren. Dette tilfellet ble ikke registrert i Kukontrollen, kun notert i fjøset.

*Tabell 14 Oversikt over celletall og eventuelle helsekort-registreringer i Kukontrollen for mordyr i forsøket. Målinger for celletall er fra ulike målinger de 3 påfølgende månedene etter kalving, vanlig melk. Helsekortregistreringene er fra 2 måneder før og senest 4 måneder etter kalving.*

Ku	Celletall <sup>1</sup> , $\times 10^3$			Helsekort
	1	2	3	
6302	60	100	50	Ingen merknader
6305	40	130	40	Klinisk mastitt, en måned etter kalving.
6284	110	260	10	Klinisk mastitt, 3,5 måneder etter kalving
5843	1220	130	440	Mangler <sup>2</sup>
6540	70	10		Ingen merknader
6576	10	20		Ingen merknader
6577	30	30		Ingen merknader
6274	10	10		Behandlet for klinisk mastitt 21.11.2018, i forbindelse med avsining.
6565	30	80		Ingen merknader

<sup>1</sup> Somatisk celletall, antall i  $10^3$  pr. ml. melk.

<sup>2</sup> Denne kua ble utmeldt av Kukontrollen 04.04.2019 og har ikke funnet helsekortet.



## 5.2 Analyseresultater av melkeprøver

Tabell 15 viser resultat av kjemisk analyse av samtlige råmelksprøver analysert hos TINE, samt verdiene etter BRIX-målingene. Det understrekes at instrumentet ved laboratoriet ikke er kalibrert for råmelk og så høye verdier som er funnet her er ansett som utenfor det normale målespekteret (S. H. Jønvik, personlig kommunikasjon, 11.03.2019). På grunn av dette må en se på resultatene noe kritisk.

Tabell 15 Resultat av kjemiske analyse hos TINE og måling av BRIX-verdier av råmelk.

Ku	Fett	Protein	Laktose	Celletall <sup>1</sup>	Urea	FFS	Frysepunkt	Brix
	%	%	%	$\times 10^3/ml$	mmol/l	mmol/l	°C	%
6302	7,91	13,19	3,12	1120	2,6	1,7	-0,605	20,9
6305	6,95	14,79	3,04	1060	2,6	4,8	-0,606	24,9
6284	5,11	8,7	3,82	6930	2,5	3,7	-0,56	28,7
5843	6,95	13,06	3,24	950	2,5	3,5	-0,615	22,1
6540	5,88	12,13	2,66	570	3,4	1,5	-0,595	20,3
6576	11,23	15,42	2,41	210	3,4	3,5	-0,615	24,6
6577	5,71	5,4	4,32	680	4,4	1,1	-0,534	26,8
6274	6,24	12,63	2,54	1170	3,3	3,4	-0,545	21,4
6565	10,51	10,52	3,57	430	3,7	2,7	-0,602	25,2

<sup>1</sup> Somatisk celletall.

### 5.3 Registrert opptak av melk

Tabell 16 viser kalvenes opptak av melk i løpet av forsøksperioden. Registreringene viser forskjellig opptak av melk totalt i løpet av forsøksperioden, noe som i stor grad er avhengig av kalvingstidspunkt i forhold til tidspunkter for melketildelinger.

Tabell 16 Registrert opptak av råmelk og konsentrasjon av IgG i serum.

Ku	Kalv	Kalvingstidspunkt		Vekt		Opptak av melk		IgG i serum <sup>2</sup>
		dato	kl.	ved fødsel	Brix <sup>1</sup>	første tildeling	Totalt <sup>3</sup>	dag 2
				kg	%	liter	liter	g/liter
6302	6796	10.10.18	10:00	53,5	20,9	3,8	11,1	49
6305	6805	24.10.18	02:00	35,5	24,9	2,3	9,5	28
	6806	24.10.18	02:00	35,0	24,9	3	8,1	24
6284	6812	30.10.18	03:48	41,0	28,7	2,9	9,0	38
5843	6816	06.11.18	07:45	44,0	22,1	1,9	10,4	49
6540	6849	09.01.19	06:15	41,1	20,3	3,2	11,1	30
6576	6850	11.01.19	09:45	41,1	24,6	3,1	10,3	53
6577	6854	16.01.19	06:45	40,0	26,8	2,75	12,2	57
6274	6858	26.01.19	07:25	44,2	21,4	3,5	17,5	- <sup>4</sup>
6565	6864	12.02.19	13:00	38,0	25,2	3	12,8	- <sup>4</sup>

<sup>1</sup> Målt med Milwaukee Brix refraktometer.

<sup>2</sup> Analyseresultat fra Mastittlaboratoriet (TINE SA, Molde).

<sup>3</sup> Totalt opptak av melk i løpet av forsøksperioden, før blodprøve på dag 2.

<sup>4</sup> Mangler analyse.

### 5.4 Resultater av analyse for cellepopulasjoner

Ved presentasjon av resultatene for cellepopulasjoner i melk og blod er tre dyr markert med tall, punkt 1, 2 og 3. Disse viser til henholdsvis kalv 6805, kalv 6806 (tvillingene) og ku 6274. Grunnen til at disse er markert er fordi de har avvikende resultater sammenlignet med øvrige dyr.

For enkelte individer er det feil i analysene for enkelte celletyper og derfor er disse ekskludert fra de presenterte resultatene i kapitlene 5.4.1 Cellepopulasjon i blod hos kalv, 5.4.2

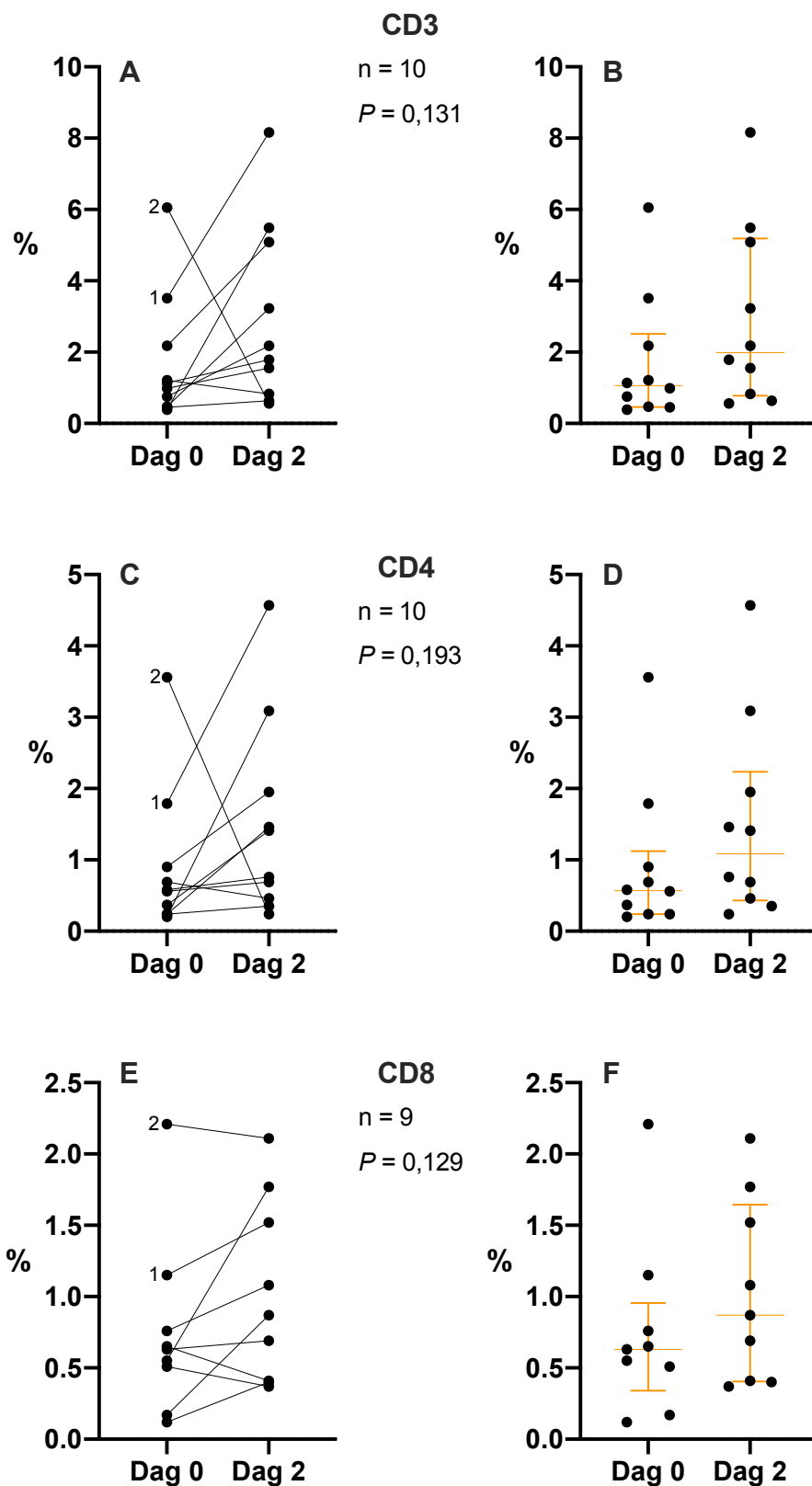
Cellepopulasjon i råmelk og 5.4.3 Korrelasjon mellom cellepopulasjoner: Råmelk ved dag 0 og blod hos kalv på dag. På grunn av dette varierer *n* mellom de ulike grafene presentert.

Det er viktig å nevne at resultatene er oppgitt som prosentvise andeler av de registrerte cellene utvalgt ved avgrensingen (i gaten). Derfor kan resultater som viser en økning eller reduksjon for visse celletyper skyldes endringer i absolutte verdier hos andre celletyper.

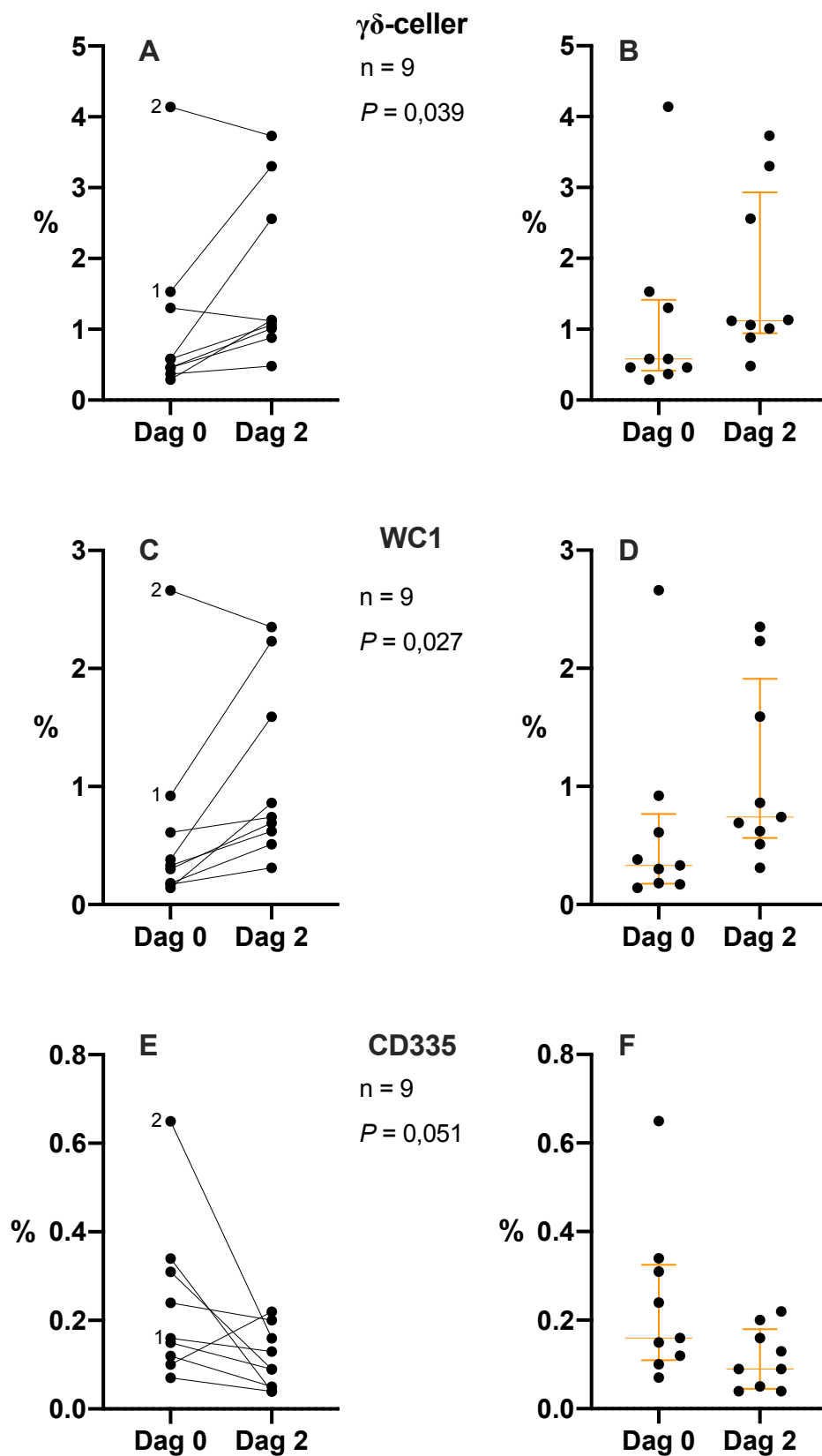
### 5.4.1 Cellepopulasjon i blod hos kalv

Det presiseres at verdier for dag 0 er av blod tatt før første tildeling av råmelk, innen de første seks timer etter fødsel. Blodprøver på dag 2 er tatt mellom 44 og 52 timer etter fødsel. Figur 13 til 16 viser resultatene for cellepopulasjon i blod hos kalv, på dag 0 og 2.

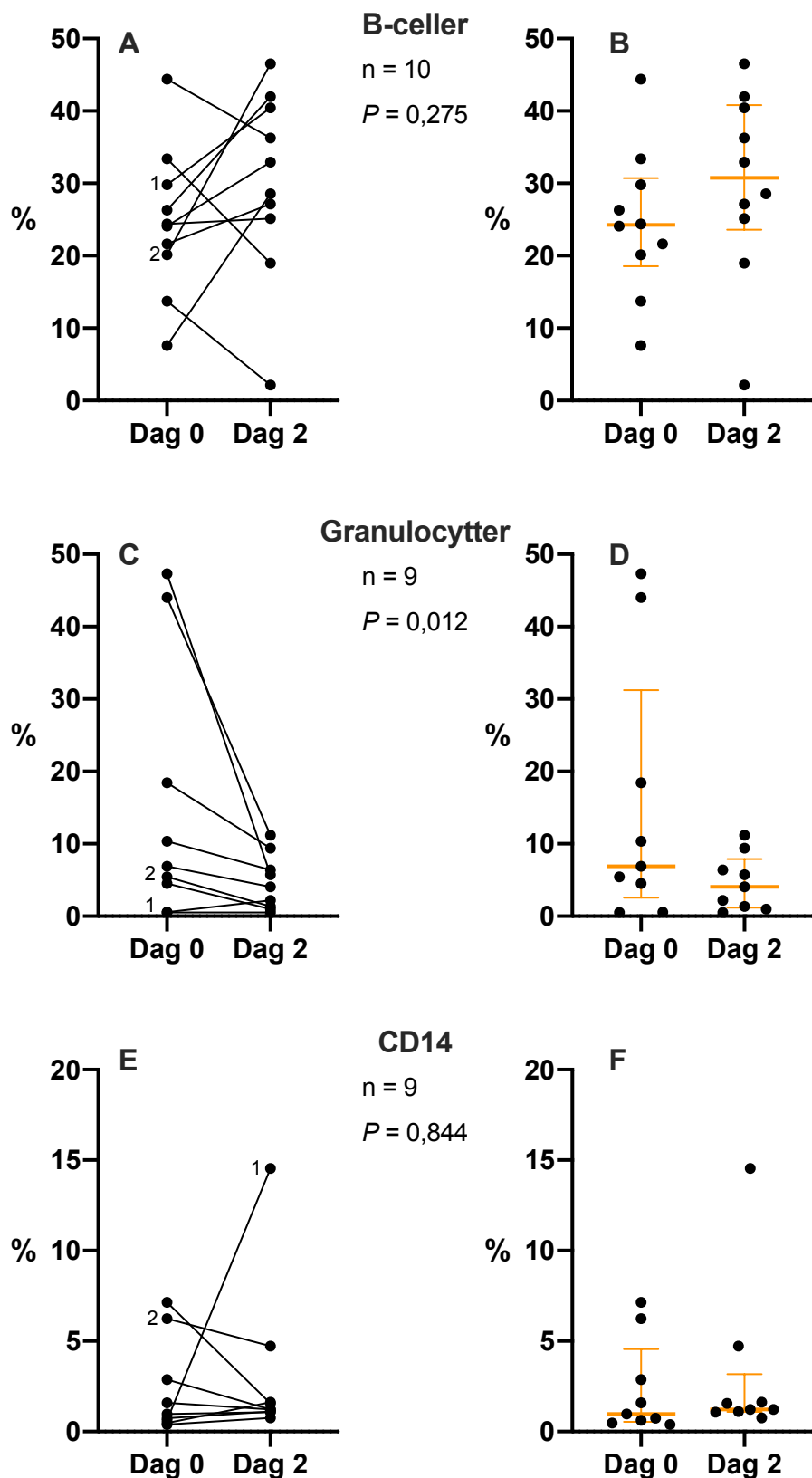
I figurene presentert under er alle dyr med fullstendige analyseresultater inkludert. Ved å ekskludere tvillingene og beregne nye  $P$ -verdier for dag 0 mot dag 2, vil det også være en signifikant endring av CD3 ( $P=0,023$ ) og en tendens for CD4 ( $P=0,055$ ), men ikke for CD8. For  $\gamma\delta$  T-cellene vil forskjellen fortsatt være signifikant, men med en noe høyere  $P$ -verdi.



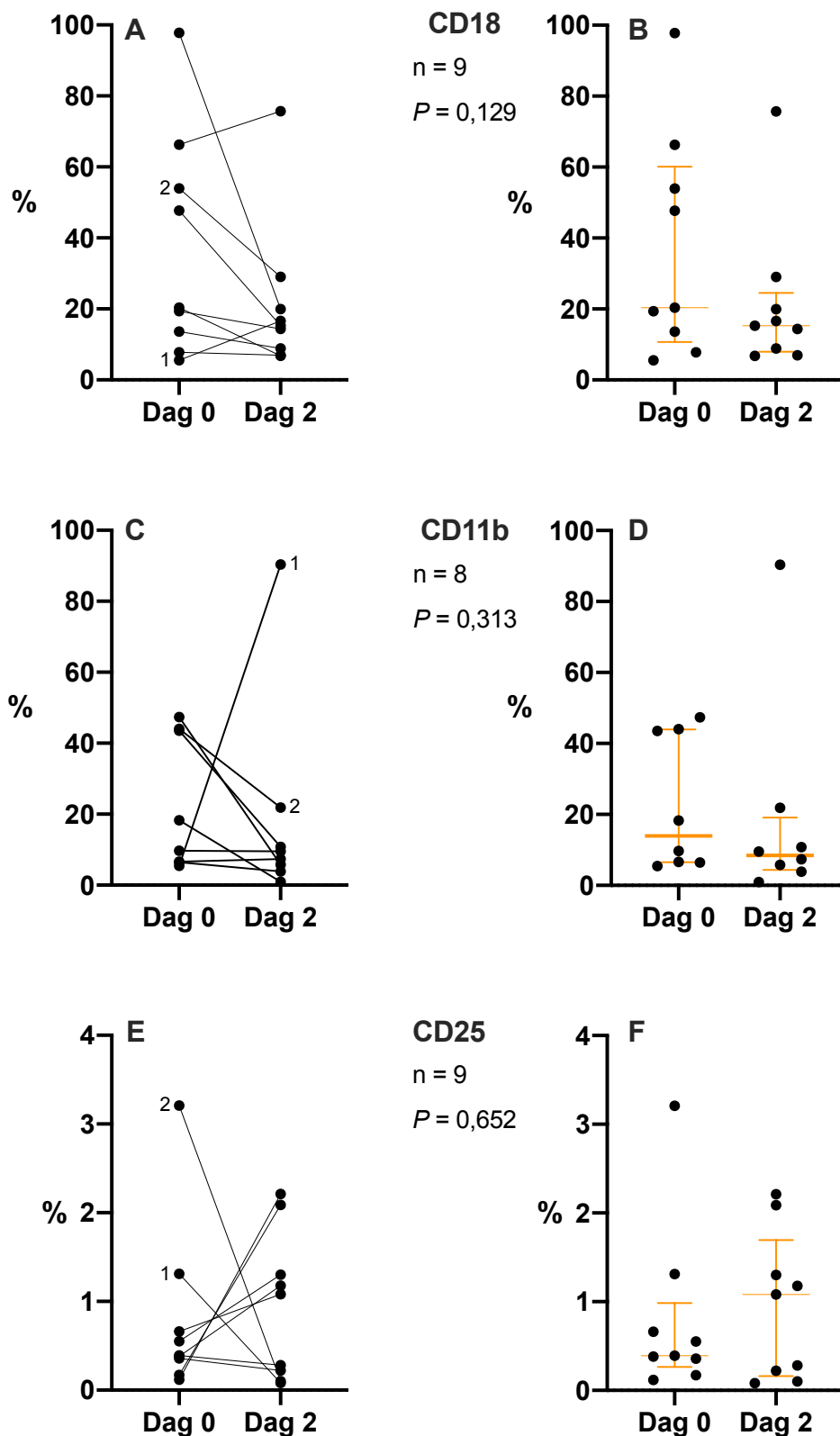
Figur 13 Leukocytter i blod hos kalv. Hver prikk viser til et individ og resultater for samme dyr ved dag 0 og 2 er forbundet med en strek (venstre). Median og kvartiler (for gruppen) er vist i figuren til høyre. P refererer til beregnede P-verdier. n = antall dyr. Punkt 1=6805, punkt 2=6806 (tvillingene). CD3 = alle T-lymfocytter. CD4 = T-hjelpeceller. CD8 = Cytotoksiske T-celler.



Figur 14 Leukocytter i blod hos kalv. Hver prikk viser til et individ og resultater for samme dyr ved dag 0 og 2 er forbundet med en strek (venstre). Median og kvartiler (for gruppen) er vist i figuren til høyre. P refererer til beregnede P-verdier. n = antall dyr. Punkt 1=6805, punkt 2=6806 (tvillingene).  $\gamma\delta$ -celler =  $\gamma\delta$  T-lymfocytter. WC1 = WC1-celler. CD335 = NK-celler.



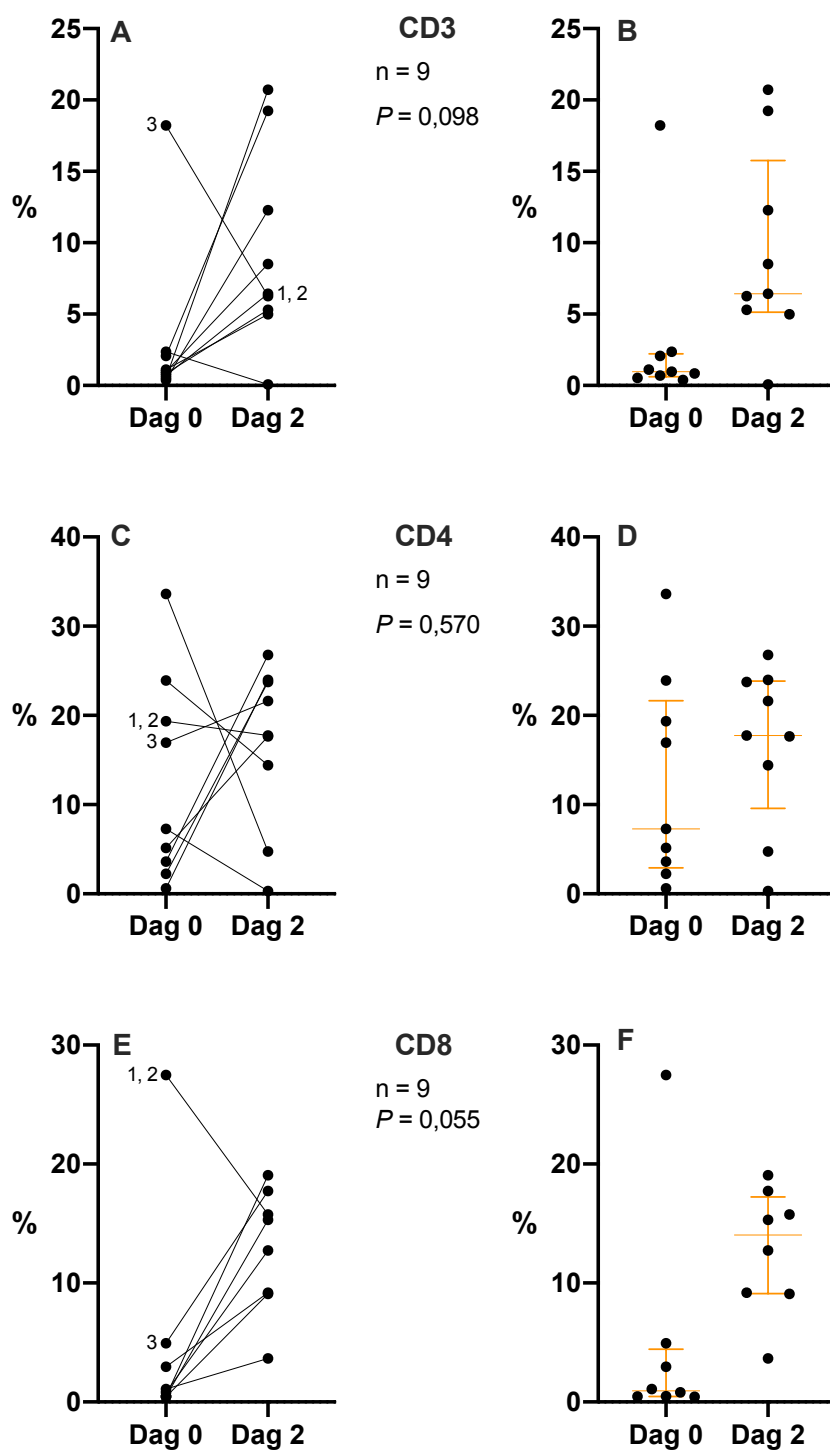
Figur 15 Leukocytter i blod hos kalv. Hver prikk viser til et individ og resultater for samme dyr ved dag 0 og 2 er forbundet med en strek (venstre). Median og kvartiler (for gruppen) er vist i figuren til høyre. P refererer til beregnede P-verdier. n = antall dyr. Punkt 1=6805, punkt 2=6806 (tvillingene). B-celler = B-lymfocytter. Granulocytter = Nøytrofile, eosinofile og basofile granulocytter. CD14 = Monocytter/makrofager.



Figur 16 Leukocytter i blod hos kalv. Hver prikk viser til et individ og resultater for samme dyr ved dag 0 og 2 er forbundet med en strek (venstre). Median og kvartiler (for gruppen) er vist i figuren til høyre. P refererer til beregnede P-verdier. n = antall dyr. Punkt 1=6805, punkt 2=6806 (tvillingene). CD18 = Granulocytter og monocyter. CD11b = Granulocytter, monocyter/makrofager, dendrittiske celler og lymfocytter. CD25 = IL-2α på lymfocytter, NK-celler og granulocytter.

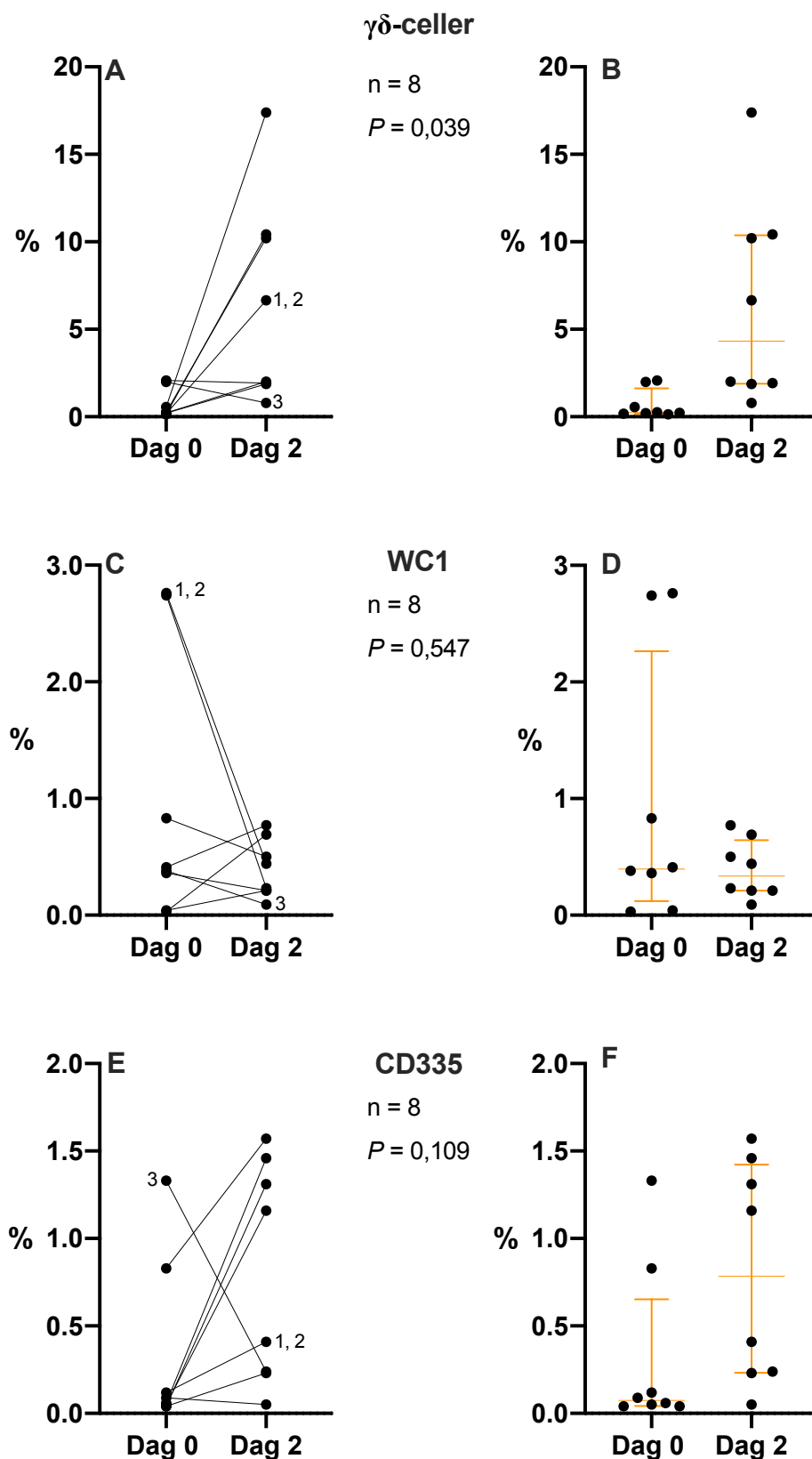
## 5.4.2 Cellepopulasjon i råmelk

Figur 17 til 20 viser resultatene for cellepopulasjon i råmelk fra ku, på dag 0 og 2.

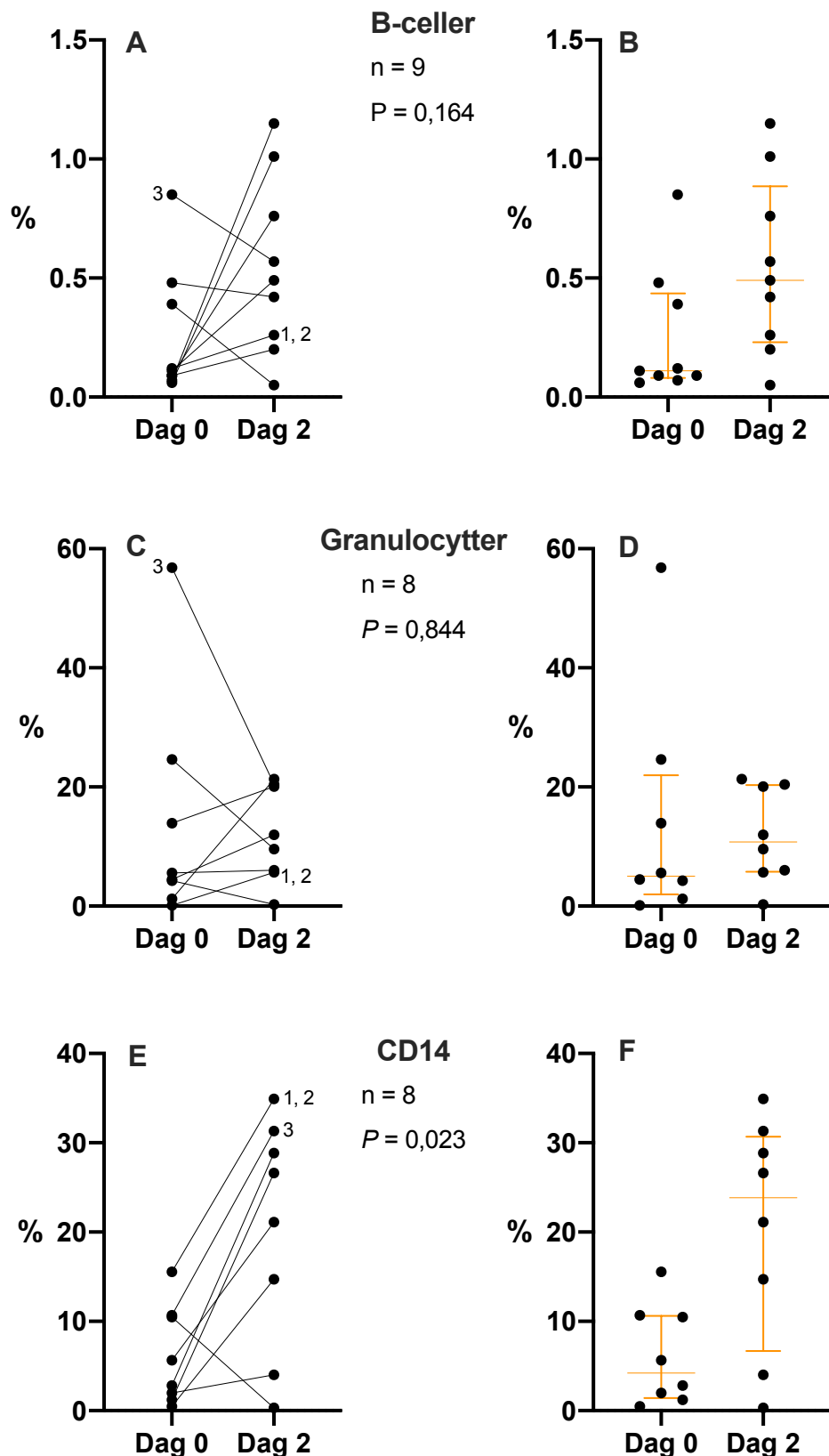


Figur 17 Leukocytter i råmelk. Hver prikk viser til et individ og resultater for samme dyr ved dag 0 og 2 er forbundet med en strek (venstre). Median og kvartiler (figurer til høyre) for gruppen. P refererer til beregnede P-verdier. n = antall dyr. Punkt 1,2=ku 6305, mor til tvillingene. Punkt 3=ku 6274. CD3 = alle T-lymfocytter. CD4 = T-hjelpeceller. CD8 = Cytotoksiske T-celler.

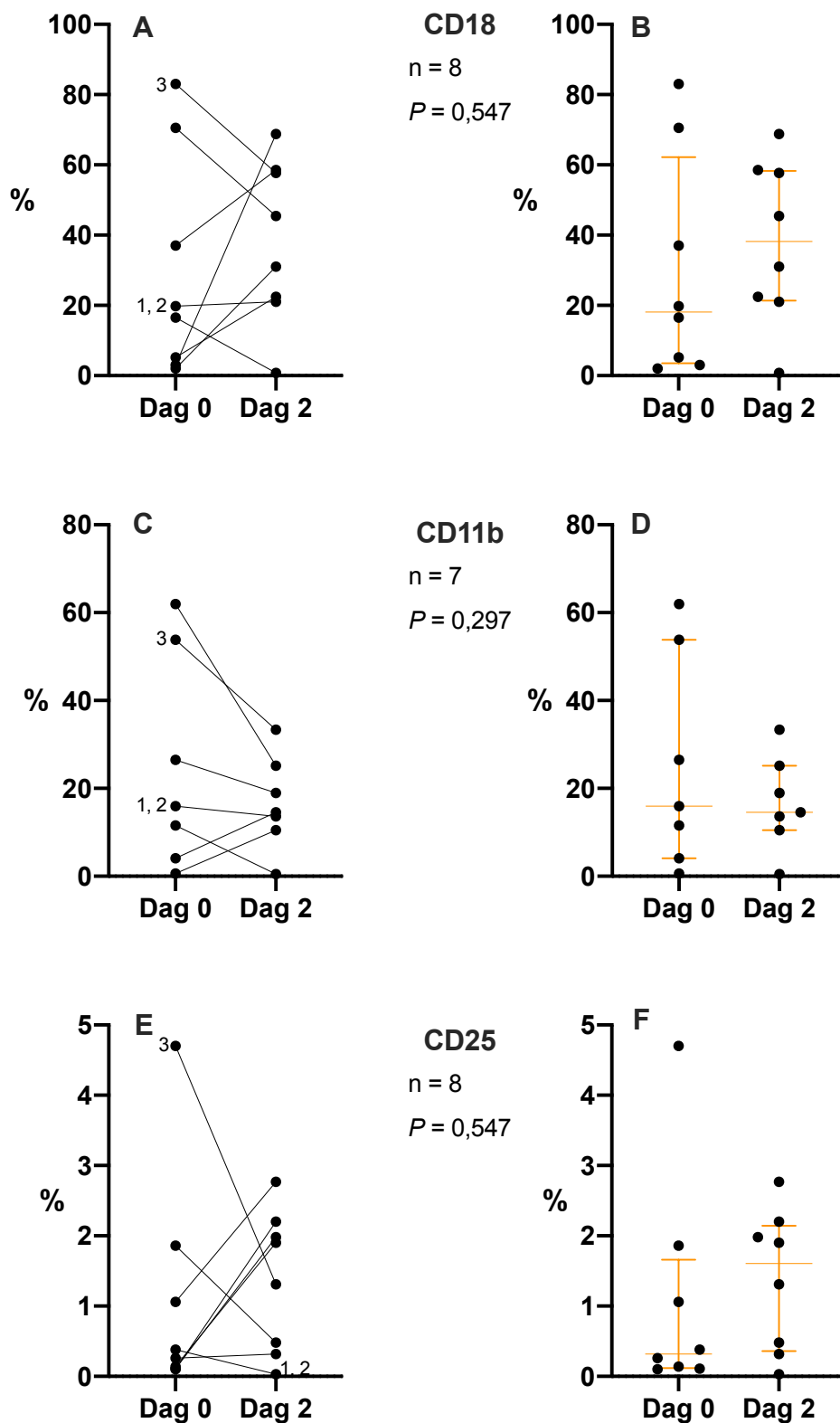




Figur 18 Leukocytter i råmelk. Hver prikk viser til et individ og resultater for samme dyr ved dag 0 og 2 er forbundet med en strek (venstre). Median og kvartiler (figurer til høyre) for gruppen. P refererer til beregnede P-verdier. n = antall dyr. Punkt 1,2=ku 6305, mor til tvillingene. Punkt 3=ku 6274. γδ-celler = γδ T-lymfocytter. WC1 = WC1-celler. CD335 = NK-celler.



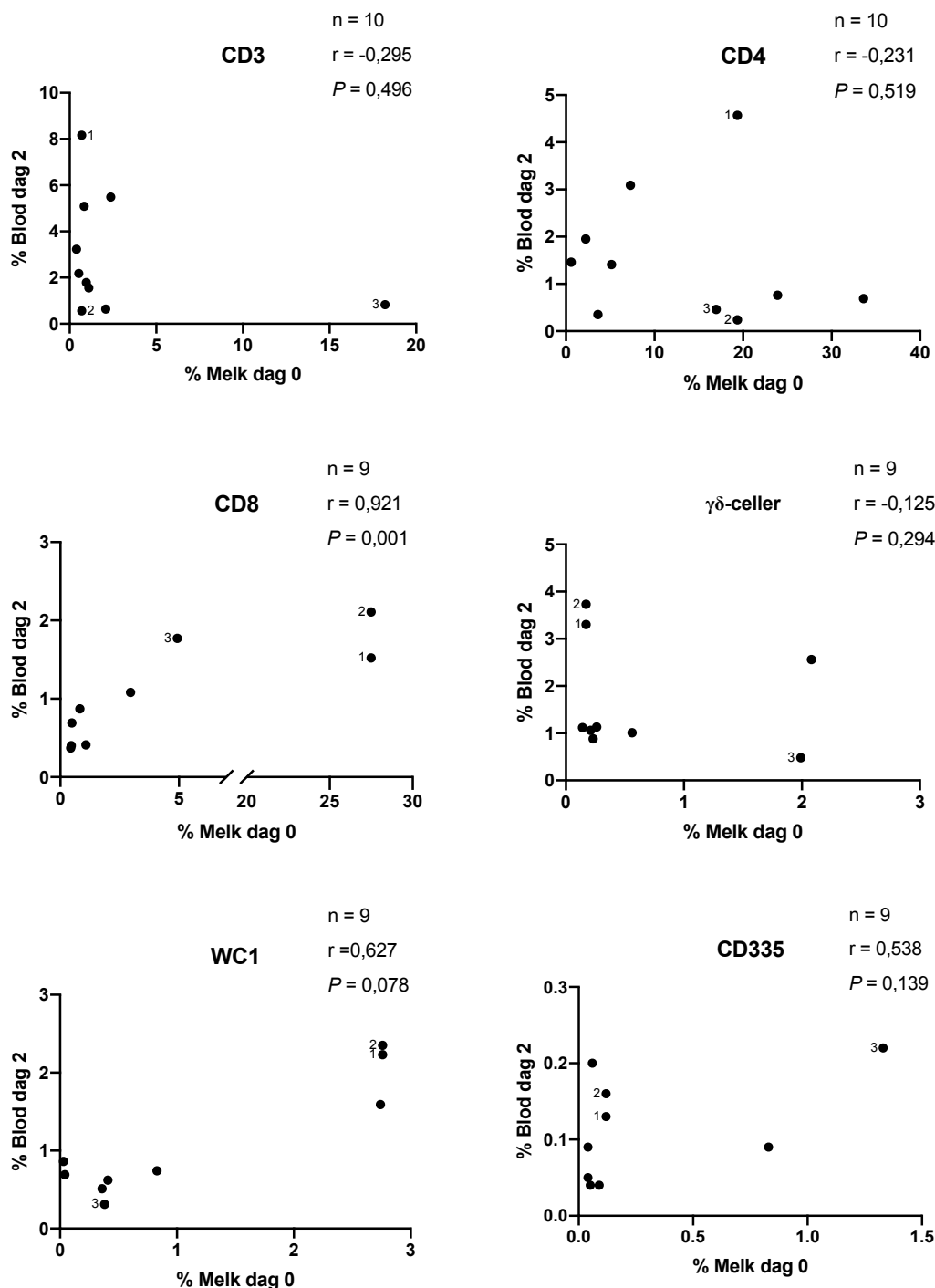
Figur 19 Leukocytter i råmelk. Hver prikk viser til et individ og resultater for samme dyr ved dag 0 og 2 er forbundet med en strek (venstre). Median og kvartiler (figurer til høyre) for gruppen. P refererer til beregnede P-verdier. n = antall dyr. Punkt 1,2=ku 6305, mor til tvillingene. Punkt 3=ku 6274. B-celler = B-lymfocytter. Granulocytter = Nøytrofile, eosinofile og basofile granulocytter. CD14 = Monocytter/makrofager.



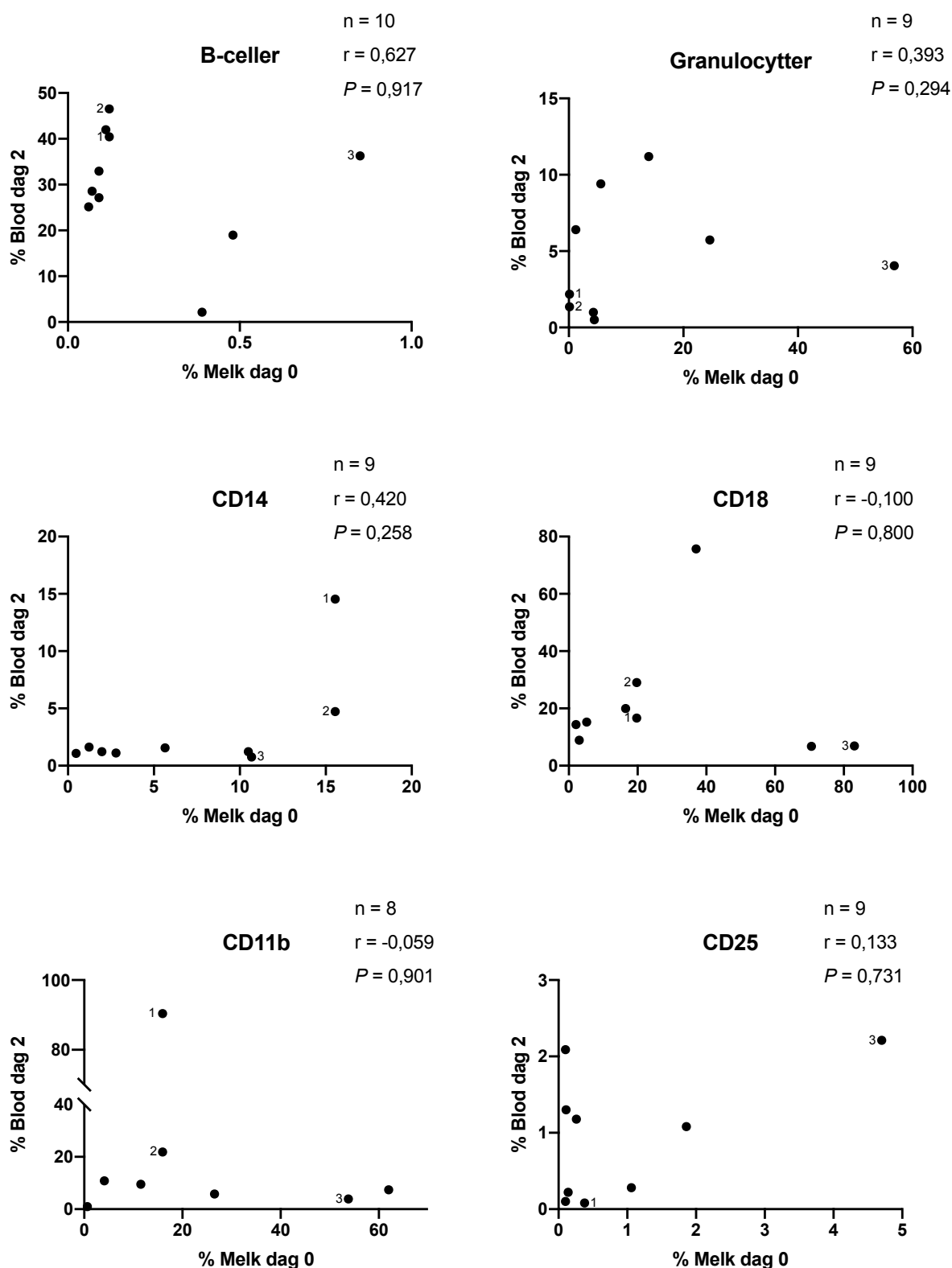
Figur 20 Leukocytter i råmelk. Hver prikk viser til et individ og resultater for samme dyr ved dag 0 og 2 er forbundet med en strek (venstre). Median og kvartiler (figurer til høyre) for gruppen. P refererer til beregnede P-verdier. n = antall dyr. Punkt 1,2=ku 6305, mor til tvillingene. Punkt 3=ku 6274. CD18 = Granulocytter og monocytter. CD11b = Granulocytter, monocytter/makrofager, dendrittiske celler og lymfocytter. CD25 = IL-2 $\alpha$  på lymfocytter, NK-celler og granulocytter.

### 5.4.3 Korrelasjon mellom cellepopulasjoner: Råmelk ved dag 0 og blod hos kalv på dag 2

Figur 21 og 22 viser korrelasjon mellom resultater for råmelksprøver fra dag 0 (x-akse) og blodprøve fra kalvene på dag 2 (y-akse). I figurene er også beregnede  $P$ -verdier og  $r$  oppgitt.



Figur 21 Korrelasjon mellom råmelksprøver fra dag 0 og blodprøver fra dag 2 fra kalv. Punktene 1, 2 og 3 viser til henholdsvis kalv 6805, 6806 og ku 6274. CD3 = alle T-lymfocytter. CD4 = T-hjelpceller. CD8 = Cytotoksiske T-celler.  $\gamma\delta$ -celler =  $\gamma\delta$  T-lymfocytter. WC1 = WC1+-celler. CD335 = NK-celler.



Figur 22 Korrelasjon mellom råmelksprøver fra dag 0 og blodprøver fra dag 2 fra kalv. Punktene 1, 2 og 3 viser til henholdsvis kalv 6805, 6806 og ku 6274. B-celler = B-lymfocytter.

Granulocytter = Nøytrofile, eosinofile og basofile granulocytter. CD14 = Monocytter/makrofager.

CD18 = Granulocytter og monocytter. CD11b = Granulocytter, monocytter/makrofager, dendrittiske celler og lymfocytter. CD25 = IL-2α på lymfocytter, NK-celler og granulocytter.

## 6 Diskusjon

### 6.1 Kjemiske analyser av råmelk

De kjemiske analysene av råmelka fra kyrne i forsøket viser forhøyede verdier for fett og protein, noe som er forventet i råmelk. Innholdet av laktose er som kjent lavere i råmelk enn i vanlig melk, noe som også var tilfellet i våre resultater (Blum & Hammon, 2000). Mengden frie fettsyrer var høyere sett i forhold til forventet nivå i vanlig melk, noe som har en sammenheng med et høyere fettinnhold (Hermansen, Nielsen, Larsen & Sejrsen, 2003). Resultatene i vårt forsøk samsvarer relativt godt med litteraturen, men på grunn av usikkerheten rundt kvaliteten på målingene kommenteres ikke de kjemiske analysene ytterligere. Innholdet av IgG i råmelka, ut ifra målte Brix-verdier, viser at samtlige prøver ligger over kravet for middels kvalitet og viser derfor generelt god kvalitet på råmelka (Dragset & Whist, 2015).

### 6.2 Opptak av råmelk og immunglobuliner

Resultatene for opptak av råmelk og konsentrasjonen av IgG i serum til kalvene viste at samtlige kalver i forsøket har fått tilstrekkelig mengde IgG, om man tar utgangspunkt i grenseverdien på 30 g Ig/liter serum for å unngå FPT (Roy, 1990).

### 6.3 Cellepopulasjon

Enkeltdyr med avvikende resultater fra flow-analysen ble markert i resultatene, dette var tvillingkalvene (6805 og 6806) og ku 6274. Ku 6274 hadde tilbakeholdt etterbyrd. Kalvene skilte seg ut fra de øvrige individene for enkelte verdier. Årsaken til at tvillingene viste avvikende verdier sammenlignet med de andre kalvene kan skyldes tidspunkt for prøvetaking. Tvillingene ble født på natten og prøvene av disse ble tatt seks timer etter fødsel, sammenlignet med de øvrige kalvene som i hovedsak ble tatt prøver av like etter fødsel. Det er usikkert hvordan utsatt prøvetidspunkt kan ha påvirket resultatene, men siden forsøksperioden er relativt kort kan det tenkes at seks timer har en betydning for resultatene.

#### 6.3.1 Cellepopulasjon i blod hos kalv

I dette forsøket fant vi forskjeller i andel av de ulike leukocytene i blod hos kalv i løpet av forsøksperioden, men resultatene varierte avhengig av celletype. Det som var tydelig for de aller fleste celletypene var at variasjonen mellom de individuelle resultatene økte på dag 2. Siden resultatene var oppgitt i prosent kan endringer av en celletype påvirke hvordan

resultatene for en annen celletype fremstilles. Kampen, Olsen, Tollersrud, Storset og Lund (2006) har i sitt forsøk målt både absolutte verdier og andeler, noe som gjør det mulig å avdekke slike sammenhenger. Under blir resultatene for de ulike celletypene diskutert ytterligere.

Lymfocytterne er differensiert i seks ulike grupper og for T-lymfocytterne, differensiert med markørene CD3 (alle), CD4 (hjelpecellene), CD8 (de cytotoksiske) og  $\gamma\delta$  T-celler, fant vi i vår studie signifikante økning i blod kun for  $\gamma\delta$  T-cellene. Resultatene for CD3, CD4 og CD8 viste ingen signifikant endring, men det var individuelle forskjeller i økning eller reduksjon for andelen av disse celletypene. De individuelle variasjonene i vårt forsøk kan skyldes en endret mengde av andre celletyper i blod og ikke bare en endring i den spesifikke celletypen, siden vi har sammenlignet andeler. Panousis et al. (2018) fant at de absolutte verdiene for lymfocytter i blod hos kalv var stabilt fra dag 1 til 2. Våre undersøkelser har differensiert undergruppene ytterligere og kan derfor ikke direkte sammenlignes. Det kan imidlertid tenkes at den samlede andelen Panousis et al. (2018) fant ikke blir påvirket av en endret sammensetning av de ulike lymfocytt-typene. Wilson, Zolnai, Rudas og Frenyo (1996) fant imidlertid en signifikant reduksjon fra dag 1 til 2 for CD8-celler, men ingen signifikant endring av CD4-celler. Videre fant de ingen signifikant endring for  $\gamma\delta$  T-celler fra dag 1 til 2, noe som ikke samsvarer med våre resultater. Grunnen til ulike funn kan skyldes ulik metode, blant annet benyttet Wilson et al. (1996) andre kloner av antistoffene som markører for CD8 og  $\gamma\delta$  T-cellene ved flow-analyse. I tillegg kan det tenkes at ulik gating av resultatene etter analysen kan ekskludere eller inkludere ulike mengder celler og dermed påvirke andelen celler påvist med den aktuelle markøren. Kampen et al. (2006) fant i sine resultater en reduksjon i andel  $\gamma\delta$  T-celler fra uke 1 til 20 etter fødsel, og at dette hadde en sammenheng med økte absolutte mengder av B-celler og CD4-celler. I vår studie er ikke absolutte nivåer undersøkt, men det er sannsynlig at slike sammenhenger vil påvirke de observerte endringene i våre resultater også.

I tillegg til celletypene nevnt over ble undergruppen WC1-celler (en type  $\gamma\delta$  T-celler) undersøkt. For WC1-celler var det en signifikant økning fra dag 0 til dag 2. Endringene for WC1 har like endringer som  $\gamma\delta$  T-celler, noe som er forventet siden en stor andel av  $\gamma\delta$  T-cellene uttrykker WC1 (Guzman, Price, Poulsom & Hope, 2012). Kampen et al. (2006) fant WC1-reseptorer på mellom 66 og 75 % av  $\gamma\delta$  T-cellene i blod hos kalv og Davis et al. (1996) hevder at det er en høy andel WC1-celler i blod hos unge dyr, slik som kalv. Nivåene av  $\gamma\delta$  T-

celler som ble funnet av Davis et al. (1996) og Kampen et al. (2006) var betydelig høyere enn det våre resultater viste. Kampen et al. (2006) sine funn viste et nivå på omtrent 25 %  $\gamma\delta$  T-celler i blod hos kalv ved første leveuke, resultatene var basert på blodprøver fra kalver med varierende alder fra dag en til dag syv og ikke direkte sammenlignbar med våre resultater. Davis et al. (1996) hevder det er høyest innhold av  $\gamma\delta$  T-cellene i blod hos nyfødte kalver for deretter å reduseres med økende alder. På grunn av dette virker det lite trolig at ulik alder ved blodprøvetaking er årsaken til forskjellene mellom våre og Kampen et al. (2006) sine resultater. Resultatene fra vårt forsøk viste en økning fra dag 0 til 2, som er motstridende til Davis et al. (1996). Utover dette ser det ut til at Kampen et al. (2006) benyttet samme prosedyre for farging av celler som i dette forsøket, men avgrensningen av cellene (gatingen) kan være ulik.

I vårt forsøk skilte tvillingene seg ut for T-cellene (CD3, CD4, CD8,  $\gamma\delta$  og WC1) med høyere nivå på dag 0 enn de andre individene. Det er usikkert hvorfor disse to kalvene skilte seg ut fra de andre. Som nevnt var tidspunkt for blodprøver utsatt for disse kalvene, sammenlignet med de øvrige kalvene og det er uvisst om det kan ha effekt på resultatene slik som observert. Årsaken til at tvillingene skilte seg ut kan skyldes et begrenset utvalg i studien, som gjør at individuelle målinger vises bedre. Det kan tenkes at dette hadde sett annerledes ut med et større utvalg. Forsøkene til både Kampen et al. (2006) (n=15) og Panousis et al. (2018) (n=254) viste stor spredning mellom individer, også for absolutte verdier av disse typene lymfocytter i blod. Det er også interessant hvordan resultatene for tvillingene endret seg i motsatt retning i forhold til hverandre fra dag 0 til 2, også for andre celletyper enn lymfocyttene. Siden disse er tvillinger ville det vært forventet med mer samsvar mellom verdiene deres. Disse resultatene viser at den individuelle variasjonen vil være betydelig og at det er naturlig. Det kan ikke utelukkes at feil ved bearbeiding av prøvene og analysene kan skyldes avvikende resultater.

For B-cellene var det ingen signifikant forskjell mellom andelen på dag 0 og dag 2. Kampen et al. (2006) viste en jevn økning i andel og absolutte verdier for B-celler i løpet av de første 8 leveukene i sine undersøkelser. Årsaken til at våre resultater ikke samsvarer med Kampen et al. (2006) er nok fordi vi bare har undersøkt utviklingen de første 48 timene etter fødsel. Dersom forsøket hadde vart lengre ville kalvene blitt utsatt for nye antigener, og utviklet immunforsvaret. Det vil da være forventet at antall B-celler ville økt.



Felles for samtlige markører for lymfocytene var en økt spredning på dag 2, sammenlignet med dag 0, uten at endringene var signifikante for hele gruppen. Selv om det ikke var signifikante endringer fra dag 0 til dag 2 for alle celletypene, var det trolig en endret sammensetning av lymfocytene i blodet. Både Panousis et al. (2018) og Brun-Hansen, Kampen og Lund (2006) viste økte absolutte mengder av lymfocytter totalt i sine forsøk. Det er ikke påvist i dette forsøket siden nivåene er undersøkt som andeler.

I tillegg til disse undergruppene av lymfocytter er NK-cellenne (CD335) undersøkt. Ut ifra våre resultater er det tydelig at nivåene av NK-celler i blod hos kalv like etter fødsel var svært lave, med en tendens til reduksjon fra dag 0 til 2. Kampen et al. (2006) rapporterte en gjennomsnittlig andel på 3% NK-celler i blodet hos kalv i uke 1. Det er et høyere enn våre resultater, men det ser ut til at en spesifikk måling hos Kampen et al. (2006) drar opp gjennomsnittet betydelig. Dette kan bety at de øvrige registreringene var nærmere våre verdier.

For granulocytter i blod hos kalv fant vi i vår studie en signifikant reduksjon fra dag 0 til dag 2. Det ble imidlertid ikke differensiert mellom nøytrofile, eosinofile og basofile granulocytter i analysen, slik andre studier har gjort (Kampen et al., 2006; Panousis et al., 2018). I blod hos nyfødte kalver er det vist at de nøytrofile granulocytene dominerer den totale mengden granulocytter, med et omtrentlig nivå på 47-48 % av alle leukocytene (Jain, 1993). Til sammenligning var andelen for de eosinofile og basofile henholdsvis 1,4 % og 0,4 % (Jain, 1993). Også andre har rapportert lave verdier for absolutte mengder eosinofile og basofile granulocytter, sammenlignet med nøytrofile granulocytter (Brun-Hansen et al., 2006; Mohri, Sharifi & Eidi, 2007). Ut ifra dette kan det forventes at granulocytene målt i blod hos kalv domineres av nøytrofile granulocytter også i dette forsøket. Funnene i vår studie viste en reduksjon fra dag 0 til 2, noe som samsvarer med Knowles et al. (2000) og Panousis et al. (2018), som rapporterer en reduksjon i antall nøytrofile granulocytter i blod fra henholdsvis fra fødsel til tre dager etter, og fra dag en til to etter fødsel. Brun-Hansen et al. (2006) undersøkte mer langsiktige endringer i blodverdier hos kalv, og viste at det absolutte nivået av nøytrofile granulocytter gikk ned fra første leveuke til omtrent 6 uker etter fødsel.

For monocytene (CD14) viste resultatene våre ingen signifikante forskjeller mellom dag 0 og 2, men en redusert spredning på dag 2 sammenlignet med dag 0. Knowles et al. (2000) fant en reduksjon i absolutt antall monocytter fra tre timer etter fødsel og til neste dag, for deretter å øke igjen til dag tre. Det er ikke presentert *P*-verdier i dette studiet, så det er vanskelig å vite

om funnene var signifikante. Panousis et al. (2018) fant også en økning i absolutt antall monocytter fra dag en til dag to. Noe som kan tyde på at det er en del variasjon mellom individer.

For markørene CD18, CD11b og CD25 fant vi i dette studiet ingen signifikante forskjeller fra dag 0 til 2. Årsaken til dette kan være at disse overflatemarkørene er å finne på flere ulike typer leukocytter. For eksempel er CD25 en markør som finnes på en liten andel av ulike lymfocytter, NK-celler og granulocytter. CD18 er på både monocytter og granulocytter. Selv om det er signifikant endring for granulocytterne er det ikke påvist noen sammenheng for CD18, fordi monocyttene også påvirker resultatet. Det samme gjelder CD11b, som er på granulocytter, monocytter/makrofager, dendritiske celler og lymfocytter. Det er derfor fokusert mer på de andre markørene benyttet i forsøket, da disse bidrar med mer spesifikk informasjon om cellepopulasjonen i blod. Dersom forsøket hadde vist signifikante endringer for disse markørene, kunne det imidlertid vært interessant å identifisere hvilken celletype som stod for økningen.

CD25 er reseptoren for IL-2 $\alpha$  og finnes på lymfocytter, NK-celler og granulocytter. CD25 oppreguleres ved aktivering, for eksempel ved infeksjon. I tillegg finnes CD25 på regulatoriske T-celler, som er en undergruppe av CD4 cellene (Tizard, 2018). Vi fant ingen signifikante endringer for CD25 og det var en forholdsvis lav andel celler som uttrykte IL-2 $\alpha$ . Dette samsvarer med funn av Reber et al. (2008), hvor de fant relativt lave mengder av CD25 i blod hos kalv, under 5 % fra 24 til 48 timer etter fødsel. Kampen et al. (2006) fant at i gjennomsnitt 6,6 % av CD-cellenes uttrykte CD25 og lavere andeler for de øvrige lymfocytterne i forsøket. Dette forklarer hvorfor resultatene våre viste en lav andel CD25, selv om andelen av de celletypene CD25-resptoren kan være på er av høyere andel. Studien til Kampen et al. (2006) undersøkte lymfocytter i blod hos kalv i en lengre periode enn det som ble gjort i vårt forsøk. Resultatene våre viser at det kan forventes å finne lave nivåer av CD25 i blod hos kalv. Imidlertid fant Reber et al. (2008) et signifikant høyere innhold av CD25 hos kalver tildelt intakt råmelk sammenlignet med de tildelt cellefri råmelk. Alle kalver i forsøket fikk tildelt fersk intakt råmelk, slik at vi kan ikke gjøre en slik sammenligning direkte med dette forsøket.

Langel et al. (2015) og Panousis et al. (2018) har påpekt at det kan være forskjeller mellom raser når det gjelder fordeling av leukocytter i blod hos kalv, og kan være noe av forklaringen på at resultatene varierer mellom studier da det er brukt ulike raser i de fleste studiene.

### 6.3.2 Cellepopulasjon i melk

I vårt forsøk fant vi en stor variasjon i antall somatiske celler i råmelka, og antallet varierte fra  $2,1 \times 10^5$  til  $6,93 \times 10^6$  pr. ml. Costa et al. (2017) hevder at vanlig variasjon for somatisk celletall i råmelk fra storfe er fra  $1 \times 10^6$  til  $2,5 \times 10^6$  pr. ml. Ut ifra dette var samtlige målinger i vårt forsøk, med unntak av ku 6284 med  $6,93 \times 10^6$  celler pr. ml, innenfor intervallet definert av Costa et al. (2017). Tidligere studier viser at celletallet i melk er relativt konstant i løpet av laktasjonen, med unntak av den første uka etter kalving og så fremt det ikke oppstår en infeksjon i juret (Malik et al., 2018; Miller, Norman, Wiggans & Wright, 2004). Den første uka etter kalving er celletallet høyere. Dette skyldes ikke nødvendigvis en infeksjon, men de fysiologiske forhold i juret like før og etter kalving (McGrath, Fox, McSweeney & Kelly, 2016; Nguyen & Neville, 1998). McGrath et al. (2016) forklarer at årsaken til det høye celletallet like etter kalving kan skyldes lekkasje i de tette celleforbindelsene mellom epitelcellene i juret, noe som fører til økt tilførsel av celler fra blodet og over i juret og dermed råmelka.

I dette forsøket ble andelen av de ulike typene leukocytter i råmelk undersøkt. For CD3- og CD8-celler ble det observert en tendens til økning i andelen av disse cellene fra dag 0 til 2. Både CD4, CD8 og  $\gamma\delta$  T-celler uttrykker CD3, slik at det er forventet å se en sammenheng mellom disse. Årsaken til en svakere sammenheng (høyere *P*-verdi) for CD3-cellene enn for CD8-cellene skyldes nok at det ikke er noen tendens til endring for CD4-cellene. I tillegg til disse tendensene fant vi en signifikant økning i andel  $\gamma\delta$  T-celler og CD14-celler fra dag 0 til 2. I motsetning til resultatene for blod ble det ikke observert en tydelig sammenheng mellom WC1-celler og  $\gamma\delta$ -celler i melk. Dette kan tyde på at  $\gamma\delta$ -celler i melk ikke uttrykker WC1 i like stor grad som i blod.

Andelen monocytter/makrofager (CD14) er signifikant høyere på dag 2 i forhold til dag 0. McDonald og Anderson (1981) fant at makrofagene var den dominerende celletypen i melk etter kalving, noe som ikke samsvarer med våre resultater på dag 0. På dag 2 var derimot andelen monocytter/makrofager høyere enn de øvrige celletypene ved å sammenligne verdier for median i målingene. Ved å sammenligne medianen på dag 2 for de ulike celletypene i melk var det høyest andel av monocyttene, som samsvarer med funnene til Gomes et al. (2011).

Resultatene viste svært lavt nivå av NK-celler (CD335) i råmelk. I følge Tizard (2018) er omtrent 2 % av alle lymfocytter i blod hos voksne storfe NK-celler. Ut ifra dette kan det forventes å finne en lav andel NK-celler i melk, siden cellene i råmelk stammer fra cellene i blod på grunn av de fysiologiske forholdene i juret (McGrath et al., 2016; Nguyen & Neville, 1998).

For de øvrige leukocytterne som ble undersøkt i forsøket var det ingen signifikante endringer fra dag 0 til dag 2. Det var allikevel en stor variasjon mellom individene og årsaker til dette kan være ulike laktasjonsnummer, fysiologiske og individuelle forhold (Jensen & Eberhart, 1981; Le Jan, 1996). Også Schwarz et al. (2011) antyder at sammensetningen av celler i melk endrer seg med endret celletall og at endret sammensetning av cellepopulasjonen ikke trenger å være forbundet med sykdom. I vårt forsøk ble ikke sammenhengen mellom celletall og populasjonen av leukocytter vurdert, og dette er derfor ikke ytterligere diskutert.

For ku 6274, som hadde tilbakeholdt etterbyrd, ble det registrert verdier for leukocytterne i melk som skilte seg betydelig fra de andre dyrene. Dette dyret hadde en forhøyet andel CD3-celler og granulocytter på dag 0, sammenlignet med de øvrige. Det samme var gjeldende for NK-celler og B-celler, men andelen av disse celletypene var svært lav. I tillegg hadde ku 6274 en høyere andel celler som uttrykker CD25 i melk på dag 0. Dette kan skyldes at CD25 er reseptoren for interleukin-2 $\alpha$ , som vil oppreguleres ved aktivering av immunforsvaret, og er dermed å finne på blant annet T og B-lymfocytter, NK-celler og granulocytter. Moretti et al. (2015) undersøkte blodverdier hos storfe med tilbakeholdt etterbyrd, på dag tre etter kalving. Resultatene deres viste ingen signifikant forskjell i lymfocytter i blod hos kyrne med og uten tilbakeholdt etterbyrd. De undersøkte ikke forekomsten av CD25, men fant imidlertid en signifikant lavere konsentrasjonen av nøytrofile granulocytter i blodet hos kyr med tilbakeholdt etterbyrd. Til sammenligning viser resultatene for ku 6274 et høyere innhold av granulocytter på dag 0 og et nivå likt de øvrige dyrene på dag 2. Årsakene til at resultatene ikke samsvarer er nok knyttet til at Moretti et al. (2015) målte verdier i blod på dag tre etter fødsel, mens i dette forsøket er det undersøkt i råmelk fra første utmelking. Det er derfor vanskelig å si om de avvikende verdiene i cellepopulasjon for ku 6274 på dag 0, og den tilbakeholdte etterbyrden, kan skyldes en ukjent fysiologisk tilstand i dyret i tiden før kalving. Andelen av de ulike celletypene i melk var for 6274 på nivå med de øvrige dyrene på dag 2.

Det er lite aktuell litteratur angående leukocyttopopulasjonen i råmelk, og McGrath et al. (2016) hevder at leukocyttopopulasjoner og hvordan disse endrer seg i råmelk ikke er

undersøkt tidligere. Gomes et al. (2011) har imidlertid presentert resultater av leukocyttopopulasjonen i råmelk, og viser en fordeling av somatiske celler i råmelk hvor 13 % er nøytrofile granulocytter, 0,3 % eosinofile granulocytter, 16 % lymfocytter og 70 % store celler (monocytter/makrofager og epitelceller). Artikkelen til Gomes et al. (2011) er skrevet på portugisisk, noe som begrenser forståelsen for studien og gjør vurdering av blant annet metoden vanskelig. Resultatene fra vårt forsøk viser et gjennomsnittlig innhold av granulocytter på omtrent 13,3 % i råmelk (dag 0). Det er i resultatene tydelig at ett dyr drar opp gjennomsnittet betydelig og medianen er, til sammenligning, en del lavere. De øvrige resultatene fra Gomes et al. (2011) er utfordrende å sammenligne med våre forsøk på grunn av ulike grupperinger av cellene i råmelk. Imidlertid ser det ut til at Gomes et al. (2011), i likhet med McDonald og Anderson (1981), har funnet at monocytter/makrofager er den dominerende celletypen i råmelk, men det er uvisst hvor stor andel av de store cellene funnet i studien til Gomes et al. (2011) som er monocytter/makrofager og epitelceller.

Den manglende litteraturen gjeldende leukocytter i råmelk, taler for at det vil være nyttig å undersøke leukocytterne i råmelk og hvordan disse endrer seg i tida like etter fødsel.

### **6.3.3 Korrelasjon mellom cellepopulasjoner: Råmelk ved dag 0 og blod hos kalv på dag 2**

Våre resultater viser en signifikant korrelasjon mellom CD8-celler i råmelk og blod hos kalv på dag 2, samt en tendens for WC1-cellene. Dette indikerer at det kan være en sammenheng mellom andel leukocytter i råmelk fra mor og i blod hos kalv. Disse resultatene støtter funnene til Liebler-Tenorio et al. (2002) og Reber et al. (2006), som har rapportert å ha funnet en overføring av maternale leukocytter fra råmelk og over til kalvens blodsirkulasjon. For de øvrige leukocytterne fant vi i dette forsøket ingen slik sammenheng. En mulig årsak til dette muligens kan relateres til Reber et al. (2006) sine funn. Hvor de overførte leukocytter markert med fluoriserende molekyler forsvant fra kalvens blodsirkulasjon 36 timer etter tilførsel av råmelk. Ut ifra dette betyr det at cellene tilført ved første råmelkstildeling i vårt forsøk potensielt har passert over i lymfoid vev på det tidspunkt blodprøvene ble tatt på dag 2, og ikke lenger var å finne i blod. Sheldrake og Husband (1985) skisserer en teori om at overføring av maternale leukocytter er mulig i perioden hvor tarmen tar opp intakte makromolekyler, som gjennomsnittlig varer i 24 timer etter fødsel. Ved å se disse teoriene sammen kan det tenkes at maternale leukocytter tilført kalven i løpet av det første døgnet kan bli tatt opp over tarmen og dermed påvirke nivået av leukocytter på dag 2. Det betyr at korrelasjonen for CD8- og WC1-cellene kan relateres til en potensiell overføring av maternale

leukocytter fra råmelk. Det er da sannsynlig at leukocytene ikke stammer fra råmelk som ble tildelt i timene like etter fødsel, men i løpet av det første levedøgnet. En annen årsak til at det ikke er funnet flere korrelasjoner, selv om det kan ha vært en overføring, kan nok relateres til at andeler er sammenlignet og størrelsen på utvalget gjør at individuelle forskjeller gir stor effekt. En annen faktor som vil påvirke resultatene er hvordan kalvene sin modning og frigjøring av leukocytter i løpet av de to første levedøgnene.

Til tross for at våre resultater viste en sammenheng mellom WC1-celler i melk og blod, ble ikke det samme funnet for  $\gamma\delta$  T-cellene. Som nevnt var det en sammenheng mellom disse i blod hos kalv, men en slik sammenheng ble ikke funnet like tydelig i råmelk. Dette kan skyldes at voksent storfe har andre nivåer av WC1-celler sammenlignet med kalver, siden kalver har høyere innhold av  $\gamma\delta$  T-celler i blod. En annen årsak kan være at  $\gamma\delta$  T-cellene i råmelk spesielt har andre mengder WC1-celler enn i blod. At det ikke ble funnet noen sammenheng mellom  $\gamma\delta$  T-celler i råmelk og kalveblod samsvarer med funn av Langel et al. (2015), hvor kalver tildelt fryst og fersk råmelk ikke hadde forskjellige nivå av  $\gamma\delta$  T-celler i blod. Langel et al. (2015) har imidlertid ikke undersøkt forekomst av WC1 celler, slik som her.

#### 6.4 Metode

Flow-cytometri er godt etablert metode for å differensiere ulike typer celler, også leukocytter, på en effektiv måte (Tizard, 2018). I vårt forsøk var det enkelte utfordringer ved bearbeidingen av råmelksprøvene før analyse i flow-cytometeret. Dette var i hovedsak knyttet til tellingen av celler, som skulle sikre tilstrekkelig antall celler ved analysen og at forholdet mellom antistoffer og celler var optimalt. Årsaken til at tellingen av celler var utfordrende var på grunn av innholdet av epitelceller og døde celler. Disse forholdene kan ha påvirket kvaliteten på fargingene ved at det ble for mange døde celler i forhold til de levende, som var de vi ønsket å farge. Ulike sentrifugehastigheten ble forsøkt og denne ble lik som rapportert i tidligere forsøk (Koess & Hamann, 2008). Det ble også benyttet en sil for å få med kun de minste cellene og dermed ekskludere epitelceller, men denne kunne nok med fordel vært enda tettere. I tillegg ble det satt en tidsbegrensning på tre timer fra uttak av råmelksprøven og frem til bearbeiding av prøven på laboratoriet, for å unngå ytterligere celledød. Samtlige prøver i forsøket var på laboratoriet innen de skisserte tre timene og råmelksprøvene nedkjølt under transport. Det ble ikke undersøkt i hvilken grad disse tiltakene har hatt effekt på celledød, men Meganck et al. (2014) fant i et pilotforsøk ingen signifikant forskjell mellom prøver av

råmelk analysert like etter prøveuttak sammenlignet med 12 og 24 timer etter. Det viste seg også at enkelte av de ulike råmelksprøvene var mer utfordrende å analysere enn andre, men det er ikke identifisert noen konkret årsak til dette.

En annen utfordring med bearbeidingen av prøvene og flow-analysen var alle de manuelle stegene. Resultatene fra de første analysene sammenlignet med de sist viste en forbedring i arbeidet på laboratoriet og understreker at manuelle feil eller små forskjeller i gjennomføringen påvirket kvaliteten på analysene. Ved å inkludere flere prøver og analyser, altså flere dyr, kan det bidra til å redusere betydningen av disse feilene. Begrensningene tilknyttet antall dyr i forsøket handlet om både tilgjengelige midler for å dekke prøvetaking og analyser, men også antall kyr som kalvet i tidsperioden for forsøket. Kyr som kalvet ble, som forklart tidligere, tatt med i forsøket på bakgrunn av passende kalvingstidspunkt for å få gjennomført analysene innen tre timer. Dette begrenset raskt hvilke dyr som var aktuelle i forsøket, siden kyr som kalvet på kveld og natt ikke ble med. Ved større prosjekt, med større økonomiske rammer, kan man enten inkludere flere kyr uavhengig av kalvingstidspunkt eller gjennomført prøveuttak i en lengre tidshorisont enn i dette forsøket.

Metoden på laboratoriet var relativt arbeidskrevende og en rasjonalisering av arbeidet var relativt begrenset, på grunn av tilgangen på sentrifuger og flow-cytometer gjorde at det ble en del venting. Derfor var det å gjennomføre flere analyser samtidig ikke nødvendigvis særlig tidsbesparende. Bearbeidingen av melkeprøver var mest tidkrevende og flow-analyse kun av blodprøver kan gjennomføres på en del kortere tid.

Helt konkret er det ved fremtidige forsøk nødvendig å vurdere en mindre sil (cell strain), inkludere en markør for epitelceller ved analysen, og i tillegg få både absolutte og prosentvise verdier for de ulike celletypene for å vurdere disse verdiene sammen.

## 6.5 Betydning og fremtidig bruk av funnene i forsøket

Det er en godt etablert sannhet at immunglobulinene i råmelk er avgjørende for kalvens immunitet og helse i tiden etter fødsel, men også videre i livet. Det er i dag vanlig praksis å fryse ned råmelk, siden dette bevarer både næringsstoffene og immunglobulinene (Langel et al., 2015; Tizard, 2018). Hvis det er slik at cellene i råmelka bidrar til et bedret immunforsvar hos kalven, taler dette imot dagens praksis hvor fryst råmelk blir tildelt kalven som erstatning til mors egen melk. Ut ifra teorien kan det tyde på at den nyfødte kalven bør få fersk råmelk fra mor, siden denne inneholder blant annet immunglobuliner, levende leukocytter og veksthormoner som er av betydning for kalven. Fryst råmelk kan imidlertid være et godt supplement til den ferske råmelka om kalvens egen mor ha lite eller ingen råmelk, men da er anbefalingen at denne bør ha et høyt innhold av IgG ( $\geq 50$  g IgG/liter råmelk) og ikke gi råmelk med ukjent kvalitet med tanke på innhold av Ig.

Det understrekes at å gi råmelk uansett er det viktigste ved føring av den nyfødte kalven og dette er godt dokumentert. Faktorer som mengde melk tildelt, innhold av immunglobuliner og tid fra fødsel og til første tildeling er svært viktige.



## 7 Konklusjon

Resultatene fra forsøket viste at det skjer en endring i sammensetningen av de ulike typene leukocyter i både råmelk fra mor og i blod hos kalv, fra dag 0 til 2 etter fødsel. I råmelk ble det observert signifikante forskjeller fra dag 0 til 2 for  $\gamma\delta$  T-celler ( $P=0,039$ ) og monocytter ( $P=0,023$ ), samt en tendens til forskjell for CD3-celler ( $P=0,098$ ) og CD8-celler ( $P=0,055$ ). I blod fra kalv ble det funnet signifikante økning for  $\gamma\delta$  T-celler ( $P=0,039$ ) og WC1-celler ( $P=0,027$ ), samt en signifikant reduksjon for granulocytter ( $P=0,012$ ). I tillegg ble det observert en tendens til reduksjon andel i NK-celler ( $P=0,051$ ). Disse funnene støtter hypotesene om en endret sammensetning av leukocyter i både kolostrum og kalveblod fra dag 0 til dag 2.

Forsøket viste også signifikant korrelasjon mellom CD8- og WC1-celler i råmelk på dag 0 og blod hos kalv på dag 2, men ingen signifikante sammenhenger for de andre leukocyttypene som ble undersøkt. Disse funnene indikerer at det kan være en sammenheng mellom type og andel leukocyter i råmelk fra mor og innholdet i kalvens blod. Dette underbygger teorien om en overføring av maternale leukocyter via råmelk til kalvens blod, slik som tidligere forskning har vist (Langel et al., 2015; Liebler-Tenorio et al., 2002; Reber et al., 2006).

Funnene i dette forsøket, sammen med tidligere forskning, støtter teorien om at råmelk trolig bidrar med flere komponenter som er av betydning for kalvens immunforsvar, enn kun antistoffer. Det er derfor viktig å undersøke dette videre, slik at rådgivningen knyttet til fôring av den nyfødte kalven blir mest mulig optimal.

## 8 Referanseliste

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai, S. (2016). *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System* (5. utg.). St. Louis, MO: Elsevier Health Sciences.
- Abcam. (u.å.). *Introduction to flow cytometry* [Illustrasjoner]. Hentet fra <https://www.abcam.com/protocols/introduction-to-flow-cytometry>
- Barrington, G. M. & Parish, S. M. (2001). Bovine Neonatal Immunology. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 17(3), 463-476. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30001-3](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30001-3)
- Besser, T. E., Gay, C. C. & Pritchett, L. (1991). Comparison of three methods of feeding colostrum to dairy calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 198(3), 419-422.
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(00\)00222-0](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(00)00222-0)
- Brun-Hansen, H. C., Kampen, A. H. & Lund, A. (2006). Hematologic values in calves during the first 6 months of life. *Veterinary Clinical Pathology*, 35(2), 182-187. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2006.tb00111.x>
- Concha, C. (1986). Cell types and their immunological functions in bovine mammary tissues and secretions--a review of the literature. *Nordisk veterinærmedicin*, 38(5), 257-272.
- Cortese, V. S. (2009). Neonatal Immunology. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 25(1), 221-227. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2008.10.003>
- Costa, J. F. D. R., Novo, S. M. F., Baccili, C. C., Sobreira, N. M., Hurley, D. J. & Gomes, V. (2017). Innate immune response in neonate Holstein heifer calves fed fresh or frozen colostrum. *Research in Veterinary Science*, 115, 54-60. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.01.008>
- Davis, W. C., Brown, W. C., Hamilton, M. J., Wyatt, C. R., Orden, J. A., Khalid, A. M. & Naessens, J. (1996). Analysis of monoclonal antibodies specific for the  $\gamma\delta$  TcR. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 52(4), 275-283.
- Day, M. J. & Schultz, R. D. (2014). *Veterinary immunology: principles and practice*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- DeNise, S. K., Robison, J. D., Stott, G. H. & Armstrong, D. V. (1989). Effects of passive immunity on subsequent production in dairy heifers. *Journal of Dairy Science*, 72(2), 552-554. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(89\)79140-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(89)79140-2)

- Devery-Pocius, J. E. & Larson, B. L. (1983). Age and previous lactations as factors in the amount of bovine colostrum immunoglobulins. *Journal of Dairy Science*, 66(2), 221-226. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(83\)81780-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(83)81780-9)
- Donovan, D. C., Reber, A. J., Gabbard, J. D., Aceves-Avila, M., Galland, K. L., Holbert, K. A., ... Hurley, D. J. (2007). Effect of maternal cells transferred with colostrum on cellular responses to pathogen antigens in neonatal calves. *American journal of veterinary research*, 68(7), 778.
- Dragset, K. I. & Whist, A. C. (2015). Den livsviktige starten. Hentet 27.02 2019 fra <https://medlem.tine.no/fagprat/oppdrett/den-livsviktige-starten>
- Geno. (2017, 09.08.2017). Karakteristikk hos NRF Hentet 26.02 2019 fra <https://www.geno.no/Start/Geno-Avler-for-bedre-liv/om-nrf-kua/Karakteristikk-hos-NRF/>
- Godden, S. (2008). Colostrum management for dairy calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 24(1), 19-39. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2007.10.005>
- Gomes, V., Madureira, K. M., Della Libera, A. M. M. P., Blagitz, M. G., Alves, M., Baptistella, F. & Benesi, F. (2011). Cell dynamics of Holstein cow colostrum immediately after parturition. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 63(5), 1047-1053. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352011000500001>
- Gonzalez, D. D. & Dus Santos, M. J. (2017). Bovine colostrum cells-the often forgotten component of colostrum. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 250(9), 998. <https://doi.org/10.2460/javma.250.9.998>
- GraphPad Software. (2019). Prism (Versjon 8.0.2) [Programvare]. Hentet fra <https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>
- Gulliksen, S. M., Jor, E., Lie, K. I., Løken, T., Åkerstedt, J. & Østerås, O. (2009). Respiratory infections in Norwegian dairy calves. *Journal of Dairy Science*, 92(10), 5139-5146. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2224>
- Gulliksen, S. M., Lie, K. I., Sølverød, L. & Østerås, O. (2008). Risk factors associated with colostrum quality in Norwegian dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 91(2), 704-712. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0450>
- Gulliksen, S. M., Lie, K. I. & Østerås, O. (2009). Calf health monitoring in Norwegian dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 92(4), 1660-1669. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1518>

- Guzman, E., Price, S., Poulson, H. & Hope, J. (2012). Bovine  $\gamma\delta$  T cells: cells with multiple functions and important roles in immunity. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 148(1-2), 161-167. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.03.013>
- Hagiwara, K., Kataoka, S., Yamanaka, H., Kirisawa, R. & Iwai, H. (2000). Detection of cytokines in bovine colostrum. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 76(3-4), 183. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(00\)00213-0](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(00)00213-0)
- Hermansen, J. E., Nielsen, J. H., Larsen, L. B. & Sejrsen, K. (2003). Mælkenes sammensætning og kvalitet. I F. Strundsholm & K. Sejrsen (Red.), *DJF Rapport: Kvægets ernæring og fysiologi. Bind 2 – Fodring og produktion* (bd. 54). Tjele Danmarks JordbrugsForskning.
- Holloway, N. M., Tyler, J. W., Lakritz, J., Carlson, S. L. & Holle, J. (2001). Serum immunoglobulin G concentrations in calves fed fresh and frozen colostrum. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 219(3), 357-359. <https://doi.org/10.2460/javma.2001.219.357>
- Jain, N. C. (1993). *Essentials of veterinary hematology*. Philadelphia: Lea & Febiger.
- Jaster, E. H. (2005). Evaluation of quality, quantity, and timing of colostrum feeding on immunoglobulin G1 absorption in Jersey calves. *Journal of Dairy Science*, 88(1), 296-302. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72687-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72687-4)
- Jensen, D. L. & Eberhart, R. J. (1981). Total and differential cell counts in secretions of the nonlactating bovine mammary gland. *American journal of veterinary research*, 42(5), 743-747.
- Jochims, K., Kaup, F. J., Drommer, W. & Pickel, M. (1994). An immunoelectron microscopic investigation of colostral IgG absorption across the intestine of newborn calves. *Research in Veterinary Science*, 57(1), 75-80. [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(94\)90085-X](https://doi.org/10.1016/0034-5288(94)90085-X)
- Kampen, A. H., Olsen, I., Tollersrud, T., Storset, A. K. & Lund, A. (2006). Lymphocyte subpopulations and neutrophil function in calves during the first 6 months of life. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 113(1-2), 53-63. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.04.001>
- Knowles, T. G., Edwards, J. E., Bazeley, K. J., Brown, S. N., Butterworth, A. & Warriss, P. D. (2000). Changes in the blood biochemical and haematological profile of neonatal calves with age. *Veterinary Record*, 147(21), 593-598. <https://doi.org/10.1136/vr.147.21.593>

- Koess, C. & Hamann, J. (2008). Detection of mastitis in the bovine mammary gland by flow cytometry at early stages. *Journal of Dairy Research*, 75(2), 225-232.  
<https://doi.org/10.1017/S0022029908003245>
- Korhonen, H., Marnila, P. & Gill, H. S. (2000). Milk immunoglobulins and complement factors. *British Journal of Nutrition*, 84(S1), 75-80.  
<https://doi.org/10.1017/S0007114500002282>
- Langel, S. N., Wark, W. A., Garst, S. N., James, R. E., McGilliard, M. L., Petersson-Wolfe, C. S. & Kanevsky-Mullarky, I. (2015). Effect of feeding whole compared with cell-free colostrum on calf immune status: The neonatal period. *Journal of Dairy Science*, 98(6), 3729-3740. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8422>
- Le Jan, C. (1996). *Cellular components of mammary secretions and neonatal immunity: a review*.
- Lea, T. (2006). *Immunologi og immunologiske teknikker* (3. utg. utg.). Bergen: Fagbokforlaget.
- Liebler-Tenorio, E. M., Riedel-Caspari, G. & Pohlenz, J. F. (2002). Uptake of colostrum leukocytes in the intestinal tract of newborn calves. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 85(1-2), 33-40. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(01\)00404-4](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(01)00404-4)
- Malik, T. A., Mohini, M., Mir, S. H., Ganaie, B. A., Singh, D., Varun, T. K., ... Thakur, S. (2018). Somatic cells in relation to udder health and milk quality-a review. *J. Anim. Health Prod*, 6(1), 18-26. <https://doi.org/10.17582/journal.jahp/2018/6.1.18.26>
- McDonald, J. S. & Anderson, A. J. (1981). Total and differential somatic cell counts in secretions from noninfected bovine mammary glands: the peripartum period. *American journal of veterinary research*, 42(8), 1366-1368.
- McGrath, B. A., Fox, P. F., McSweeney, P. L. & Kelly, A. L. (2016). Composition and properties of bovine colostrum: a review. *Dairy science & technology*, 96(2), 133-158.  
<https://doi.org/10.1007/s13594-015-0258-x>
- Meganck, V., Goddeeris, B. M., Stuyven, E., Piepers, S., Cox, E. & Opsomer, G. (2014). Development of a method for isolating bovine colostrum mononuclear leukocytes for phenotyping and functional studies. *The Veterinary Journal*, 200(2), 294-298.  
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.02.021>
- Miller, R. H., Norman, H. D., Wiggans, G. R. & Wright, J. R. (2004). Relationship of test-day somatic cell score with test-day and lactation milk yields. *Journal of Dairy Science*, 87(7), 2299-2306. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)70051-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)70051-X)

- Milwaukee Instruments. (u.å.). *MA871 Digital Brix Refractometer* [Bilde]. Hentet fra <http://www.milwaukeeinst.com/site/products/products/digital-refractometers/165-products-g-digital-refractometers-g-ma871>
- Mohri, M., Sharifi, K. & Eidi, S. (2007). Hematology and serum biochemistry of Holstein dairy calves: age related changes and comparison with blood composition in adults. *Research in Veterinary Science*, 83(1), 30-39. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2006.10.017>
- Moore, D. S. & McCabe, G. P. (2002). *Introduction to the Practice of Statistics* (4. utg.). New York, NY: W. H. Freeman and Company
- Moretti, P., Probo, M., Morandi, N., Trevisi, E., Ferrari, A., Minuti, A., ... Giordano, A. (2015). Early post-partum hematological changes in Holstein dairy cows with retained placenta. *Animal reproduction science*, 152, 17-25. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.11.019>
- Nguyen, D.-A. & Neville, M. (1998). Tight Junction Regulation in the Mammary Gland. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 3(3), 233-246. <https://doi.org/10.1023/A:1018707309361>
- Overrein, H., Whist, A. C., Sølvsberg, K. M. & Nyhus, L. T. (2016). *Godt kalveoppdrett* [Brosjyre]. TINE Rådgivning og medlem.
- Panousis, N., Siachos, N., Kitkas, G., Kalaitzakis, E., Kritsepi-Konstantinou, M. & Valergakis, G. E. (2018). Hematology reference intervals for neonatal Holstein calves. *Research in Veterinary Science*, 118, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.01.002>
- Peter, A. T. (2013). Bovine placenta: a review on morphology, components, and defects from terminology and clinical perspectives. *Theriogenology*, 80(7), 693-705. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.06.004>
- Pitt, J., Barlow, B. & Heird, W. C. (1977). Protection against experimental necrotizing enterocolitis by maternal milk. I. Role of milk leukocytes. *Pediatric research*, 11(8), 906.
- Quigley, J. D., Lago, A., Chapman, C., Erickson, P. & Polo, J. (2013). Evaluation of the Brix refractometer to estimate immunoglobulin G concentration in bovine colostrum. *Journal of Dairy Science*, 96(2), 1148-1155. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5823>
- Reber, A. J., Donovan, D. C., Gabbard, J., Galland, K., Aceves-Avila, M., Holbert, K. A., ... Hurley, D. J. (2008). Transfer of maternal colostrum leukocytes promotes development of the neonatal immune system: Part II. Effects on neonatal lymphocytes. *Veterinary*

- 
- Immunology and Immunopathology*, 123(3), 305-313.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.02.009>
- Reber, A. J., Lockwood, A., Hippen, A. R. & Hurley, D. J. (2006). Colostrum induced phenotypic and trafficking changes in maternal mononuclear cells in a peripheral blood leukocyte model for study of leukocyte transfer to the neonatal calf. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 109(1-2), 139-150.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2005.08.014>
- Riedel-Caspari, G. (1993). The influence of colostrum leukocytes on the course of an experimental *Escherichia coli* infection and serum antibodies in neonatal calves. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 35(3-4), 275-288.  
[https://doi.org/10.1016/0165-2427\(93\)90039-7](https://doi.org/10.1016/0165-2427(93)90039-7)
- Robinson, R. & Pellenz, S. (2013). *What is flow cytometry (FACS analysis)?* [Illustrasjon]. Hentet fra <https://www.antibodies-online.com/resources/17/1247/what-is-flow-cytometry-facs-analysis/>
- Robison, J. D., Stott, G. H. & DeNise, S. K. (1988). Effects of passive immunity on growth and survival in the dairy heifer. *Journal of Dairy Science*, 71(5), 1283-1287.  
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(88\)79684-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(88)79684-8)
- Roy, J. H. B. (1990). *The calf: Management of health* (5. utg.). London: Butterworths.
- Schwarz, D., Diesterbeck, U. S., König, S., Brügemann, K., Schlez, K., Zschöck, M., ... Czerny, C.-P. (2011). Flow cytometric differential cell counts in milk for the evaluation of inflammatory reactions in clinically healthy and subclinically infected bovine mammary glands. *Journal of Dairy Science*, 94(10), 5033-5044.  
<https://doi.org/10.3168/jds.2011-4348>
- Sehested, J., Pedersen, R. E., Strundsholm, F. & Foldager, J. (2003). Spædkalvens fordøjelsesfysiologi og ernæring. I F. Strundsholm & K. Sejrsen (Red.), *DJF Rapport: Kvægets ernæring og fysiologi. Bind 2 – Fodring og produktion* (bd. 54, s. 9-38). Tjele: Danmarks JordbrugsForskning.
- Sheldrake, R. F. & Husband, A. J. (1985). Intestinal uptake of intact maternal lymphocytes by neonatal rats and lambs. *Research in Veterinary Science*, 39(1), 10-15.  
[https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(18\)31762-4](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)31762-4)
- Sjaastad, Ø. V., Sand, O. & Hove, K. (2010). *Physiology of domestic animals* (2. utg.). Oslo: Scandinavian Veterinary Press.

- Stott, G. H., Marx, D. B., Menefee, B. E. & Nightengale, G. T. (1979a). Colostral immunoglobulin transfer in calves I. Period of absorption. *Journal of Dairy Science*, 62(10), 1632-1638. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(79\)83472-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(79)83472-4)
- Stott, G. H., Marx, D. B., Menefee, B. E. & Nightengale, G. T. (1979b). Colostral immunoglobulin transfer in calves II. The rate of absorption. *Journal of Dairy Science*, 62(11), 1766-1773. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(79\)83495-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(79)83495-5)
- Stott, G. H., Marx, D. B., Menefee, B. E. & Nightengale, G. T. (1979c). Colostral immunoglobulin transfer in calves. III. Amount of absorption. *Journal of Dairy Science*, 62(12), 1902-1907. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(79\)83521-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(79)83521-3)
- Svensson, C. & Hultgren, J. (2008). Associations Between Housing, Management, and Morbidity During Rearing and Subsequent First-Lactation Milk Production of Dairy Cows in Southwest Sweden. *Journal of Dairy Science*, 91(4), 1510-1518. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0235>
- Svensson, C., Lundborg, K., Emanuelson, U. & Olsson, S.-O. (2003). Morbidity in Swedish dairy calves from birth to 90 days of age and individual calf-level risk factors for infectious diseases. *Preventive veterinary medicine*, 58(3-4), 179-197. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(03\)00046-1](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(03)00046-1)
- Ten Napel, J., De Haas, Y., De Jong, G., Lam, T. J., Ouweltjes, W. & Windig, J. J. (2009). Characterization of distributions of somatic cell counts. *Journal of Dairy Science*, 92(3), 1253-1264. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0824>
- Thermo Fisher Scientific. (2014). *Molecular Probes Tutorial Series—Introduction to Flow Cytometry* [Video]. Hentet fra <https://www.youtube.com/watch?v=sfWWxFLtpQ>
- Thermo Fisher Scientific. (u.å.-a). *Flow Cytometry Compensation Beads* [Illustrasjon]. Hentet fra [https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/cell-analysis/flow-cytometry/flow-cytometry-calibration/flow-cytometry-compensation-tools.html?gclid=Cj0KCQiAn4PkBRCDARIsAGHmH3e1Yxr1yHPBOVHPIHhsPfgZywHoeHk6jVgKZMplH8JCl19krr2B3PYaAt2CEALw\\_wcB&s\\_kwcid=AL!3652!3!256299603002!p!!g!!compensation%20beads&ef\\_id=Cj0KCQiAn4PkBRCDARIsAGHmH3e1Yxr1yHPBOVHPIHhsPfgZywHoeHk6jVgKZMplH8JCl19krr2B3PYaAt2CEALw\\_wcB:G:s&s\\_kwcid=AL!3652!3!256299603002!p!!g!!compensation%20beads](https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/cell-analysis/flow-cytometry/flow-cytometry-calibration/flow-cytometry-compensation-tools.html?gclid=Cj0KCQiAn4PkBRCDARIsAGHmH3e1Yxr1yHPBOVHPIHhsPfgZywHoeHk6jVgKZMplH8JCl19krr2B3PYaAt2CEALw_wcB&s_kwcid=AL!3652!3!256299603002!p!!g!!compensation%20beads&ef_id=Cj0KCQiAn4PkBRCDARIsAGHmH3e1Yxr1yHPBOVHPIHhsPfgZywHoeHk6jVgKZMplH8JCl19krr2B3PYaAt2CEALw_wcB:G:s&s_kwcid=AL!3652!3!256299603002!p!!g!!compensation%20beads)
- Thermo Fisher Scientific. (u.å.-b). *How a Flow Cytometer Works* [Illustrasjon]. Hentet fra <https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/flow-cytometry-basics/flow-cytometry-fundamentals/how-flow-cytometer-works.html>



- 
- TINE. (2016). Regler for gårdsvei, mjølkerom og fjøs hos TINEs mjølkeprodusenter Hentet 13.03 2019 fra <https://medlem.tine.no/praktisk-informasjon/tines-regelverk/attachment/373852?ts=1520cd5e015>
- Tizard, I. R. (2018). *Veterinary Immunology* (10. utg.). St. Louis, MO: Elsevier Health Sciences.
- Tønjum, T. (2018). Klebsiella. Hentet 07.05 2019 fra <https://sml.snø.no/Klebsiella>
- Veal, D. A., Deere, D., Ferrari, B., Piper, J. & Attfield, P. V. (2000). Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells. *Journal of immunological methods*, 243(1-2), 191. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(00\)00234-9](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(00)00234-9)
- Virtala, A.-M. K., Mechor, G. D., Gröhn, Y. T. & Erb, H. N. (1996). The effect of calfhoo diseases on growth of female dairy calves during the first 3 months of life in New York State. *Journal of Dairy Science*, 79(6), 1040-1049. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(96\)76457-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(96)76457-3)
- Weaver, D. M., Tyler, J. W., VanMetre, D. C., Hostetler, D. E. & Barrington, G. M. (2000). Passive transfer of colostral immunoglobulins in calves. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 14(6), 569-577. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2000.tb02278.x>
- Wilson, R. A., Zolnai, A., Rudas, P. & Frenyo, L. (1996). T-cell subsets in blood and lymphoid tissues obtained from fetal calves, maturing calves, and adult bovine. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 53(1-2), 49-60. [https://doi.org/10.1165/2427\(95\)05543-6](https://doi.org/10.1165/2427(95)05543-6)



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

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
Norway