



Norges miljø- og biovitenskapelige universitet

NMBU Veterinærhøgskolen
Institutt for produksjonsdyrmedisin
Stasjonærklinisk seksjon

Fordypningsoppgave 2019/2020

Produksjonsdyrmedisin og mattrygghet

Forekomst, betydning og antibiotikaresistensmønster hos *Pasteurella multocida* i øvre luftveier hos kalv

Occurrence, relevance and antibiotic resistance of
Pasteurella multocida in the upper respiratory tract
of calves

Forfattere:
Margareth Baardset Kroknes
Marlen Strømsøy Langedal
Kull 2014

Veiledere:
Maria Stokstad
Thea Blystad Klem
Ane Mohn Bjelland

Innhold

Forord	3
Sammendrag.....	4
Definisjoner og forkortelser	6
Innledning	7
<i>Luftveisinfeksjon hos storfe</i>	
<i>Studiens relevans for veterinærfaget</i>	
Formål.....	17
Materiale og metoder.....	18
<i>Utvalg av besetninger og dyr</i>	
<i>Kliniske registreringer</i>	
<i>Prøvemateriale og prosedyre for uttak av nesesvaber</i>	
<i>Laboratorieundersøkelser</i>	
<i>Statistiske metoder</i>	
Resultater	27
<i>Kliniske funn</i>	
<i>Laboratorieundersøkelser</i>	
<i>Sammenheng mellom forekomst av <i>P. multocida</i> og klinisk score</i>	
<i>Sammenligning av dyp nesesvaber med vanlig nesesvaber</i>	
Diskusjon	36
<i>Utvalg av besetninger og dyr</i>	
<i>Kliniske funn</i>	
<i>Prøvemateriale</i>	
<i>Valg av prøveuttaksmetode</i>	

Laboratorieundersøkelser

Mulige feilkilder

Studiens relevans for veterinærfaget

Konklusjon	46
Takk til bidragsyttere	47
Summary	47
Referanser	49
Vedlegg	52

Forord

Luftveisinfeksjoner er kanskje det største helsemessige problemet vi ser hos kalver i Norge i dag. Det utsetter kalvene for dårlig dyrevelferd, og gir dessuten store økonomiske tap. En annen problemstilling rundt luftveisinfeksjoner er antibiotikaresistensen behandlingene kan medføre. Da antibiotikaresistens har store konsekvenser for både humanhelsen og dyrehelsen i verden er dette noe som bør tas på alvor.

Selv om det er mye fokus på problemene med luftveisinfeksjoner hos kalver er det gjort svært få studier på bakterielle luftveisinfeksjoner hos kalver i Norge. De bakterielle luftveisinfeksjonene kommer ofte sekundært til virusinfeksjoner, eller som følge av stressbelastning. Det blir gjort lite diagnostikk av praktiserende veterinærer i felt. Vi har valgt dette som tema for fordypningsoppgaven vår da det er et stort behov for en kartlegging av bakterielle agens i luftveiene hos kalver i Norge, og vi fikk muligheten til å knytte oss til et pågående forskningsprosjekt. I dette prosjektet ble flere forhold undersøkt enn det som er inkludert i denne oppgaven. Vi deltok selv i den praktiske innsamlingen av prøvemateriale i en av de to besetningene, og utførte noe av laboratoriearbeidet.

Sammendrag

Tittel: Forekomst, betydning og antibiotikaresistensmønster hos *Pasteurella multocida* i øvre luftveier hos kalv.

Forfattere: Margareth Baardset Kroknes og Marlen Strømsøy Langedal

Veiledere: Maria Stokstad, Institutt for produksjonsdyrmedisin (hovedveileder)

Ane Mohn Bjelland, Institutt for mattrygghet og infeksjonsbiologi

Thea Blystad Klem, Veterinærinstituttet

Luftveislidelser er vanlig hos kalver og medfører store økonomiske og dyrevelferdsmessige konsekvenser. Det er den sykdomsgruppen som gir flest rapporterte sykdomstilfeller, og dessuten flest antibiotikabehandlinger hos kalv i Norge. I studiet vårt har vi undersøkt hvilke bakterier som finnes i øvre luftveier hos 60 utvalgte kalver i to framføringsbesetninger på Østlandet. Besetningene ble besøkt én gang. Kalvene ble undersøkt klinisk og det ble tatt to typer nesevaber (vanlig og dyp) fra alle kalvene.

Ved dyrking fra nesevaberne ble det funnet at de tre vanligst forekommende bakteriene var *Pasteurella multocida*, Koagulase negative stafylokokker (KNS) og *Enterococcus spp.* *P. multocida* er den eneste av disse som er beskrevet å kunne forårsake luftveisinfeksjoner.

P. multocida-isolatene ble resistenstestet mot en rekke antibiotika. Av disse ble det bare funnet resistens mot streptocillin og amoksicillin med klavulansyre. Alle isolatene var sensitive for benzylpenicillin, samt trimetoprim/sulfametoksazol, tetrasykliner, enrofloxacin og florfenikol.

For å undersøke sammenhengen mellom funn av *P. multocida* i neselimhinna og klinisk luftveissykdom ble kalvenes kliniske funn sammenholdt med forekomsten av *P. multocida* i bakteriekulturen fra nesevaberne. Vi kunne ikke påvise noen sammenheng mellom høy forekomst av *P. multocida* og klinisk sykdom hos kalvene.

For å undersøke om man like gjerne kan bruke vanlig nesevaber som diagnostisk metode som dyp nesevaber, ble disse to prøveuttaksmetodene sammenlignet med hensyn til forekomst av *P. multocida*. Den dype nesevaberen var antatt å være en bedre diagnostisk metode på grunn av mindre forurensing i prøvematerialet, men krever sedert dyr. Disse to metodene gav imidlertid omtrentlig likt resultat.

I denne studien har vi funnet at *P. multocida* er en vanlig forekommende bakterie i øvre luftveier hos kalver, basert på dyrkning både fra dyp og vanlig nesevaber. *P. multocida*-isolatene i studien ble også resistenstestet, og alle isolatene ble funnet til å være følsomme for benzylpenicillin. Det ble ikke funnet noen korrelasjon mellom klinisk sykdom og forekomst av *P. multocida*.

Definisjoner og forkortelser

BAL	Bronko-alveolær lavage
BCoV	Bovint coronavirus
BRSV	Bovint respiratorisk syncytialvirus
BVDV	Bovint virusdiaré virus
<i>H. somni</i>	<i>Histophilus somni</i>
KNS	Koagulase negative stafylokker
<i>M. bovis</i>	<i>Mycoplasma bovis</i>
<i>M. haemolytica</i>	<i>Mannheimia haemolytica</i>
PIV3	Parainfluenzavirus 3
<i>P. multocida</i>	<i>Pasteurella multocida</i>
PCR	Polymerase chain reaction
VI	Veterinærinstituttet

Innledning

Luftveisinfeksjon hos storfe

Forekomst

Luftveissykdom hos storfe er ganske utbredt, både i Norge og internasjonalt (1). Det er den sykdomsgruppen som gir flest rapporterte sykdomstilfeller, og dessuten flest antibiotikabehandlinger hos kalv i Norge (2), og fører med seg store økonomiske og dyrevelferdsmessige konsekvenser (3-5). Forekomsten varierer mellom besetninger og distrikt (6). Flere av de bakterielle agens som er knyttet til luftveissykdom er også en del av normalfloraen i nese, munn og svelg (6).

Sykdomstegn og risikofaktorer

Luftveislidelse er en multifaktoriell tilstand der sykdom oppstår som et resultat av et komplekst samspill mellom dyr, smittestoff og miljø (1, 3). Det kan forekomme alt fra milde luftveissymptomer til mer omfattende lungebetennelser, og i verste fall død (7). Mindre alvorlige infeksjoner kan gi mildere symptomer som hoste og neseflod. Mer alvorlige tilfeller kan gi høy feber, nedsatt allmenntilstand og respirasjonsvansker (6). Redusert tilvekst kan oppstå blant annet som en konsekvens av et lavere fôropptak. Dyr i laktasjon vil kunne få redusert ytelse som kan sees som et plutselig fall i melkeproduksjonen. Kalver ser ut til å få mer alvorlige symptomer og blir mer syke av luftveissykdom sammenlignet med voksne storfe (4). Risikofaktorer for utvikling av luftveissykdom hos kalv er for lite råmelk av god kvalitet, dårlig luftkvalitet, høyt antall dyr i samme bing, at den nyfødte kalven står sammen med andre kalver de første dagene etter fødsel og om det er mer enn 8 ukers aldersforskjell mellom kalvene som står i samme bing (8).

Smittestoff og smittemåte

Flere agens, både virale og bakterielle, kan gi luftveissykdom hos storfe (3). Ofte får dyra en primær infeksjon med et virus, som gjør dyra mottakelige for en sekundær bakteriell infeksjon. De virusene som er aktuelle i Norge er bovint respiratorisk syncytialvirus (BRSV), bovint coronavirus (BCoV) og bovint parainfluenzavirus 3 (PIV3) (1). Bovint parainfluenzavirus type 3 gir mest sannsynlig ikke klinisk sykdom alene, men øker risikoen for andre virusinfeksjoner, samt sekundære bakterielle infeksjoner (8). Andre luftveivirus som er aktuelle i andre land er bovint virusdiarévirus (BVDV) og bovint herpesvirus 1 (3). Disse er vi per dags dato frie for i Norge og vil ikke bli omtalt ytterligere (9). Virusene som fører til luftveissykdom smitter via aerosoler i luften, direkte kontakt mellom individer og besetninger samt ved indirekte kontakt med blant annet utstyr og innredning (1).

Bovint respiratorisk syncytial virus (BRSV) er et enkelttrådet RNA-virus tilhørende *Paramyxoviridae*, som finnes enzootisk i de fleste land inkludert Norge. BRSV er et av de viktigste virusene knyttet til luftveissykdom hos storfe, og fører til store økonomiske konsekvenser i storfehold ved å gi luftveissykdom hos storfe. Den viktigste årsaken til smitte av BRSV og andre virussykdommer er kjøp og salg av livdyr (10, 11).

Bovint coronavirus (BCoV) tilhører familien *Coronaviridae*, og er et enkelttrådet RNA-virus som klassifiseres i 4 subtyper, hvor BCoV tilhører betacoronavirus. Bovint coronavirus affiserer øvre og nedre del av luftveiene, i tillegg til tarm. Hos voksne dyr gir bovint coronavirus hovedsakelig en hemoragisk enteritt, som i litteraturen omtales som "Vinterdysenteri" (5). Hos kalver gir viruset både luftveissykdom og diaré (12).

Av bakterielle agens er *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni*, *Trueperella pyogenes* og *Mycoplasma bovis* beskrevet å kunne gi luftveissykdom hos storfe (13). De fire første er normalt tilstede i øvre luftveier hos kalv, men kan gi sykdom sekundært til virusinfeksjoner (13).

M. bovis er hittil ikke påvist i Norge, men gir store økonomiske tap, dårlig dyrehelse og dårlig dyrevelferd i Europa og verden forøvrig. Denne bakterien er svært vanskelig å behandle da den er resistent mot flere typer antibiotikum. I tillegg er suksessraten dårlig ved behandling med antimikrobielle midler som bakterien skal være sensitiv for. Denne bakterien er med andre ord svært uønsket å få etablert i norske besetninger. Et overvåkingsprogram ble etablert i 2020 for å oppdage en eventuell introduksjon av denne infeksjonen.

De bakteriene som er mest aktuelle som sekundære luftveisinfeksjoner hører til i familien Pasteurellaceae der de mest aktuelle bakteriene er *P. multocida*, *M. haemolytica* og *H. somni* (14). *P. multocida* er en gram negativ stavbakterie, som er naturlig forekommende i munn, svelg og øvre respirasjonsveier hos dyr. Denne bakterien er beskrevet å være en av de mest aktuelle sykdomsfremkallende bakteriene i samspill med virus innenfor luftveissykdom hos storfe, selv om den også ser ut til å være normalt forekommende i øvre luftveier hos friske kalver. *P. multocida* er i noen studier beskrevet å kunne gi luftveissykdom hos kalv og svekkede individer alene, uten at andre agens er tilstede (14).

Tidligere studier av *P. multocida* og andre bakterielle agens i luftveier hos kalv

Da *P. multocida* er den vanligst forekommende bakterien knyttet til luftveissykdom i vårt studie vil denne bli beskrevet nærmere.

Det finnes lite forskning på *P. multocida* i luftveier hos kalver i Norge, men i verden forøvrig finnes det studier som sier noe om denne bakterien sin betydning for utvikling av luftveissykdom. Resultatene fra denne forskningen må likevel tolkes med forsiktighet idet forholdene i Norge skiller seg fra disse studiene på flere områder. Mye av forskningen er gjort i land med et helt annet klima, med mye større besetninger, et annet miljø og sannsynligvis med helt andre agens i luftveiene.

I internasjonale studier er *P. multocida* påvist hos både friske og syke kalver. Hvorvidt bakterien har betydning for sykdomsutvikling er det derimot ikke enighet om. I en kanadisk studie utført nylig var *P. multocida* den bakterien som var påvist i flest prøver fra syke dyr. Den var påvist i 54.8 % av prøvene, etterfulgt av *M. haemolytica* (30.5 %) og *H. somni* (22.9 %) (15). Forskjellige studier viser likevel motstridene resultater når det gjelder evnen bakterien har til å fremkalle sykdom både alene og i samspill med andre agens.

I en studie fra Finland ble *P. multocida* funnet oftere i luftveiene ved trakealskylleprøver hos syke kalver enn hos friske. Likevel fant de ingen assosiasjon med sykdom dersom bakterien eksisterte som eneste agens. I denne studien konkluderte de med at *P. multocida* er en opportunist, og ikke en primærårsak til sykdom (13). I en annen studie som også var gjort i Finland var konklusjonen en helt annen. Her fant de at *P. multocida* var det eneste undersøkte agenset som viste en klar sammenheng med klinisk sykdom. Dette gjaldt særlig om den var det eneste agenset som var til stede (16).

Det er også diskutert om forskjellige serovarianter av *P. multocida* har ulik evne til å fremkalle sykdom. Klassifiseringen av *P. multocida* baseres på kapselstrukturen og lipopolysakkaridene til bakterien. Serogrupperne benevnes som A, B, D, E og F, mens

serotypene benevnes fra 1–16. Av disse er serogruppe A den som er hyppigst isolert hos kalver med luftveisinfeksjoner i flere studier (13, 16, 29, 30). I en studie utført i Mexico (29) var 25% av *P. Multocida* isolatene hos kalvene fra serogruppe A og D, hvor serotype 3 utgjorde 77%. En studie fra India (31) undersøkte hvilke serovarianter det fantes av denne bakterien hos storfe, og konkluderte med at A:3 var den hyppigst rapporterte varianten. To andre studier fant ut at serogruppe A utgjorde hhv 80% og 92% av isolatene (14, 30). Hvilke varianter vi har i Norge er usikkert da det ikke er blitt gjort undersøkelser på området.

Forskningen på bakterielle agens i luftveier hos kalv under norske forhold er svært mangelfull. Vi vet lite om hvilke bakterier som forekommer, og hvilken betydning de har for klinisk sykdom. Det finnes også lite vitenskapelig dokumentasjon fra Norge om de aktuelle bakterienes sensitivitet til ulike antibiotika.

Ulike former for luftveissykdom på besetningsnivå

På besetningsnivå finner vi flere ulike former for luftveissykdom. Noen ganger er det snakk om akutte utbrudd, mens det andre ganger forekommer kroniske tilfeller hos besetninger som får luftveisproblemer over tid.

Det finnes flere former for akutte luftveisinfeksjoner. Dersom besetningen er naiv, altså at den ikke har vært eksponert for det aktuelle agenset tidligere får man gjerne et utbrudd som rammer store deler av besetningen samtidig. Dette er typisk for virusinfeksjoner som BRSV (17) og BCoV (12).

Enzootisk pneumoni er en form for akutt luftveissykdom som stort sett rammer kalver under 6 måneder, og ofte i alderen 2-10 uker. Denne sykdommen opptrer gjerne ved dårlig

management og suboptimalt miljø. Ofte, men ikke alltid, vil kalvene være utsatt for en primær virusinfeksjon som gir innpass for bakterielle sekundærinfeksjoner i nedre luftveier. Lave antistoffnivåer på grunn av lite råmelk eller at kalvene befinner seg i et immunologisk vakum predisponerer for denne sykdommen. Det samme gjelder stressfaktorer som inadekvat ventilasjon, introduksjon av nye dyr til gruppen og høy dyretetthet. Bakterier som ofte isoleres fra dyr med enzootisk pneumoni er *Mycoplasma bovis*, *P. multocida* og *M. haemolytica* (18).

En annen form for akutt luftveissykdom hos kalver er «shipping fever». Denne sykdommen har multifaktorielle årsaker, og opptrer ofte der kalver fra forskjellige besetninger blir samlet i en stor gruppe. Stressfaktorer som avvenning, transport, utmattelse, sult, dehydrering, for lav eller for høy temperatur, samt miksing av dyr fra forskjellige besetninger bidrar til å redusere vertens immunforsvar. Dette åpner for endogene infeksjoner ved proliferasjon av opportunistiske bakterier i øvre luftveier, etterfulgt av kolonisering i nedre luftveier og en kranioventral bronkopneumoni. Bakterier som ofte isoleres fra disse kalvene er *M. haemolytica*, og noen ganger *P. multocida* og *H. somni* (18).

Kroniske luftveisinfectionsjoner kan forekomme på besetningsnivå dersom man ikke klarer å bekjempe det aktuelle agenset, eller om man får reintroduksjon av smittestoff. *M. bovis* er en bakterie som kan gi kroniske luftveislidelser i besetninger da den er svært vanskelig å få under kontroll. Bakterien er vanskelig å bekjempe, og spres dessuten lett mellom dyr og mellom besetninger (19).

I fremføringsbesetninger hvor det blir kjøpt inn dyr fra forskjellige produsenter vil man hele tiden kunne få reintroduksjon av smittestoff og dermed risikere kroniske luftveislidelser. Dyra

som blir introdusert til besetningen kan ha med seg smittestoff, eller være mottakelige for smittestoff som finnes i besetningen de kommer til. Innkjøp av nye kalver vil dermed kunne opprettholde smittepresset, og kalvene kan bli syke flere ganger i løpet av en sesong. Disse virusinfeksjonene kan utvikle seg til mer alvorlige luftveislidelser dersom det oppstår bakterielle sekundærinfeksjoner. Disse kan i sin tur gi kroniske skader i lungevevet (12).

Forebygging

På verdensbasis benyttes flere ulike strategier for å forebygge kliniske luftveislidelser hos storfe. Av disse kan det nevnes profylaktisk/metafylaktisk antibiotikabehandling, vaksiner, miljøutbedringer og økt biosikkerhet ved gjennomføring av overvåkingsprogram som i Norge (1). Vaksinene som er utarbeidet mot de forskjellige luftveisinfeksjonene er omdiskuterte, da de viser seg å ha begrenset effekt (20). Profylaktisk antibiotikabehandling har blitt benyttet i mange land, men kan medføre antibiotikaresistens (21). Utvikling av antibiotikaresistens avhenger blant annet av mengde antibiotika som blir brukt, valg av medikament og utførelsen av behandlingene med hensyn til dose, varighet av behandlinger og administrasjonsmåte.

Felles for de nevnte luftveislidelsene er at et godt fungerende immunforsvar hos verten, gode miljøbetingelser og lavt smittepress bidrar til å redusere forekomsten (3). Tiltakene for å utbedre disse faktorene er mange. Inntak av nok råmelk av god kvalitet, redusere stressnivået, ha gode rengjøringsrutiner, lite trafikk av dyr og mennesker i fjøset, fungerende smittesluser og god luftkvalitet er vesentlig for å begrense luftveisinfeksjoner (6).

Diagnostikk og behandling

BRSV og BCoV kan påvises på forskjellige måter. Man kan påvise RNA fra virusene direkte ved bruk av PCR, men man kan også undersøke for antistoffer mot agensene både i blod,

individmelk og i tankmelk, som viser at individene eller besetningen har gjennomgått en infeksjon (22).

Diagnostikk knyttet til mistanke om bakterielle luftveisinfeksjoner hos kalver er lite brukt i praksis i Norge. Av diagnostiske metoder som kan benyttes er vanlig nesessvaber, dyp nesessvaber, trachealskylleprøver og bronko-alveolær lavage (BAL) aktuelt (23). En vanlig nesessvaber er den enkleste og minst invasive prøveuttaksmetoden, men kan også påvise bakterier som ikke er årsaken til sykdom, som finnes i nesen som normalflora eller forurensning fra miljøet. Den dype nesessvaberen er ubehagelig og krever sedasjon da en nesessvaber med overtrekksrør føres langt caudalt i nesehulen. Også her kan tolkningen av prøvesvaret være utfordrende da prøvene kan inneholde normalflora. En prinsipiell forskjell mellom dyp og vanlig nesessvaber er at den dype har et beskyttelsesdeksel over svaberen for å begrense kontaminering av prøvematerialet. Med trachealskylleprøver og BAL vil man påvise bakterier fra de nedre luftveiene og er derfor prøver som er enklere å tolke. Disse er derimot invasive metoder som er praktisk vanskelig å gjennomføre. BAL-prøver kan dessuten inneholde forurensninger dersom sonden føres ned i oesophagus i stedet for ned i luftrøret. At prøveuttaket utføres på korrekt måte er altså avgjørende for å få representative resultater, slik som med andre prøvetakingsmetoder. BAL-prøver blir i dag lite benyttet i praksis.

Tidligere undersøkelser viser motstridende resultater når det kommer til sammenhengen mellom dyrkingsresultater basert på forskjellige diagnostiske uttaksmetoder. En amerikansk studie sammenlignet funn av infeksjose agens i trachealskylleprøver fra 100 holsteinkalver med luftveissykdom i alderen 31-74 dager med BAL, dype nesessvabere og vanlige nesessvabere fra de samme dyrene (23). Når de sammenlignet forekomsten av BRSV i

trachealskylleprøver med dyp og overfladisk nesevaber ble det påvist moderat overensstemmelse, mens det for BAL-prøvene var god overensstemmelse med trachealskylleprøver. Overensstemmelsen med trachealskylleprøver var veldig god for både vanlig nesevaber, dyp nesevaber og BAL når det kom til forekomst av *M. haemolytica*, *P. multocida* og *M. bovis*. Resultatene deres viste dessuten at kontaminasjon av prøver ikke var til hinder for å påvise de samme bakteriene i vanlige nesevabre som i trachealskylleprøver.

Også andre studier har sammenlignet prøver fra øvre og nedre luftveier. En studie utført på 183 kalver, hvorav 144 hadde tegn til luftveissykdom, konkluderte med at BAL prøver gav tolkbare resultater i 79,2 % av prøvene, mens dype nesevabre bare gav tolkbare resultater i 31,2% av prøvene (24). Et annet studie viste stor variabilitet i sammenhengen mellom dype nesevabere og BAL hos enkeltindivider, men når tallene ble tolket på besetningsnivå var det god overensstemmelse mellom dype nesevabere og BAL. I sammenligningen mellom vanlige og dype nesevabere er det foreslått at dype gir et mer pålitelig resultat. Dette studiet inkluderte både friske og syke kalver (25). Tidligere undersøkelser viser med andre ord varierende resultater når det kommer til sammenligningen av forskjellige diagnostiske metoder.

Laboratoriediagnostikken av bakterielle agens i luftveiene har tradisjonelt sett basert seg på å dyrke og isolere bakterier på agarskåler etterfulgt av identifisering ved hjelp av biokjemiske tester. Dette har sine begrensninger siden flere av agensene ikke vokser på vekstmediene som rutinemessig brukes i det diagnostiske arbeidet, deriblant *M. bovis* (19). Det kan dessuten være vanskelig å identifisere bakterier som finnes i et lavt antall i en blandingsflora uten selektive medier eller PCR. Det er derfor i noen studier benyttet PCR, som i sin tur har en ulempe i at prøven får positivt utslag ved funn av både levende og døde bakterier.

I Norge er vi i en særegen situasjon i forhold til at de bakterielle luftveisagensene som påvises er antatt sensitive for benzylpenicillin (26). Dette omfatter gram-positive bakterier i tillegg til gram-negative bakterier som *P. multocida*, *M. haemolytica* og *H. somni*. Av forskjellige årsaker blir det likevel benyttet en betydelig andel bredspektrede antibiotikum i Norge (27). Lite dokumentasjon på hvilke bakterielle agens som finnes, samt antibiotikasensitiviteten blant disse er en av årsakene. En annen årsak kan være for lite kunnskap knyttet til norske terapianbefalinger. Det er også sannsynlig at mange opplever liten effekt av penicillin på grunn av for sen igangsetting av behandling og påfølgende kroniske forandringer i lungevevet. Da det er store kunnskapshull tilknyttet de bakterielle agensene i luftveiene hos norske kalver trengs det mer dokumentasjon på at terapianbefalingene som finnes i dag (26) er riktige.

Studiens relevans for veterinærfaget

Vi vet relativt lite om hvilke bakterier som faktisk finnes i luftveiene til norske kalver, og hvilken rolle de spiller i utviklingen av luftveissykdom. Sensitiviteten til ulike antibiotikum er heller ikke tilstrekkelig undersøkt for disse bakteriene. For å vite om terapianbefalingene som finnes er optimale skulle man hatt bedre dokumentasjon om dette. Forskning fra utlandet tilfører ikke tilstrekkelig anvendbar kunnskap da norske forhold skiller seg mye fra de utenlandske, både med tanke på store forskjeller mellom besetningene og produksjonssystemene, og sannsynligvis en annen sammensetning av etiologiske agens. Det at luftveissykdom utgjør den viktigste sykdomsgruppen hos kalver, og gir dårligere økonomi og dårligere dyrevelferd tilsier at det er behov for mer forskning på området (28).

Det finnes lite dokumentasjon når det kommer til diagnostiske prøveuttaksmetoder og det er få studier som sammenligner vanlig og dyp nesesvaber. Dyp nesesvaber er mer tidkrevende og medfører en større påkjenning for kalven. Det har likevel en stor fordel ved at prøvetakingsområdet er mer skjermet for forurensning fra miljøet. Da det finnes lite dokumentasjon på hvor stor betydning dette har vet man ikke om man like gjerne kan bruke vanlig nesesvaber som diagnostisk verktøy. Om dette kunne blitt gjort ville terskelen for uttak av prøver før behandling vært mye lavere for praktiserende veterinærer, og dessuten vært en mindre påkjenning for dyret.

Formål

Hovedformålet med denne studien var å studere smittestoff i øvre luftveier hos kalver i framføringsbesetninger i Norge, med hovedfokus på *P. multocida*.

Dette ble gjort ved å besvare følgende spørsmål:

- 1: Hvilke bakterielle agens er til stede i øvre luftveier hos kalv?
- 2: Hvilket antibiotikaresistensmønster uttrykkes hos *P. multocida* isolert fra øvre luftveier?
- 3: Er det sammenheng mellom forekomst av bakterier i øvre luftveier og klinisk sykdom hos kalv?
- 4: Gir vanlig og dyp nesesvaber tilnærmet samme resultat ved bakteriologisk analyse?

Materiale og metoder

Uttaket foregikk over en dag i hver besetning i desember 2018 og januar 2019. Materialet består av vanlige og dype nesevabre og kliniske registreringer av 60 kalver fordelt på to besetninger.

Utvalg

Utvalg av besetninger

Det ble først etablert samarbeid med en veterinær i felt med interesse for å delta i prosjektet, og begge besetningene ble valgt ut i et praksisområde på Eina på Toten, etter følgende inklusjonskriterier: Det skulle være større framfôringsbesetninger som tidligere har hatt problemer med luftveissjukdom. Produsenten måtte være villig til å delta. Det skulle være mulig å utføre prøveuttak 2-3 uker etter innsett, og dyra i besetningene kunne være vaksinerte mot luftveisinfeksjoner.

Besetning A er en rein framfôringsbesetning med rundt 600 dyr. Besetningen er medlem av storfekjøttkontrollen. Det kjøpes inn oksekalver til besetningen fra hele Østlandet, både NRF og kjøttferaser. Dyrene kommer ofte i små puljer, og størrelsen på dyra varierer ved ankomst (70-200 kg, oftest rundt 100 kg). Dyra kjøpes inn bare fra besetninger som har rød status for BRSV og BCoV. Dyra som kjøpes inn står i karantene under låvebrua i 6-8 uker. Denne avdelingen er åpen, med 3 tette vegger. Dyra går på halmtalle, og alle kalvene går i samme bing. Besetningen har tidligere hatt problemer med luftveislidelser, men etter at de startet et vaksineregime mot luftveislidelser hvor det ble brukt "Bovilis Bovipast RSP vet.", oppgir produsenten og veterinæren at problemene har blitt mindre. Denne vaksinen inneholder antigener mot BRSV, PIV3, og *M. haemolytica*. Dyra vaksineres to ganger når de står i

karanteneavdelingen. Første vaksine settes 3-7 dager etter ankomst så lenge de ikke viser tegn til sykdom, og den neste fire uker senere.

Besetning B er en storfebesetning med både ammeku, en framfôringsenhet og en samdrift med melkeproduksjon. Samdrifta med melkeproduksjon ligger ikke på gården, men noen kilometer unna. På gården er det to fjøs, hvor et av de er et nyere ammekufjøs og det andre er et eldre fjøs med okser til framfôring. Framfôringsbesetningen består av rundt 150 okser, hvorav både NRF, charolais og andre krysninger av kjøttferaser inngår. Besetningen er medlem av storfekjøttkontrollen. Oksekalvene til framfôring rekrutteres fra samdrifra og fra ammekubesetningen. De minste kalvene som flyttes til fjøset for framfôringsoksene er 70-80 kg. De fleste er da avvente fra melk, men ikke alle. Besetningen har hatt en del problem med luftveislidelser, men oppgir å ha mindre problemer nå enn før. Samdrifta med melkekyr har nylig fått grønn status for BRSV og BCoV, men besetningen med ammeku er ikke testet. Besetningen vaksineres ikke mot luftveissykdom.

Utvalg av dyr i besetningene

På forhånd av prøveuttaket ble det besluttet at det skulle tas ut prøver av 30 dyr fra hver besetning. Disse viste varierende grad av tegn på luftveissjukdom.

Kliniske registreringer

Klinisk undersøkelse med vekt på tegn på luftveislidelse ble utført på alle utvalgte dyr før de ble sedert. I denne undersøkelsen inngikk å vurdere oppførsel, telle respirasjonsfrekvens og observere hoste og utflod fra nese. Kalvene ble så sedert med Rompun®, 0,2 mg/kg. Etter sedasjon ble det også målt rektaltemperatur av kalvene.

Score	Respirasjons- frekvens (Pust/min)	Rektal- temperatur (°C)	Hoste	Utflod fra nese	Oppførsel	
0	≤ 49	≤ 39,5	Ingen hoste observert	Normal	Kvikk, alert	uftveier hos kalver
1	50-54	39,6 -39,9	Sporadisk hoste	Serøs eller mukøs	Mildt nedstemt	
2	55-64	40 - 40,4	Mer enn en sporadisk hoste per 10. min	Mucopurulent eller purulent	Moderat nedstemt	Klinisk score
3	65-74	40,5-40,9	-	-	Veldig nedstemt	
4	75-85	> 40,9	-	-	-	Det ble brukt

et scoringssystem hvor de fem parameterne ble gradert med stigende score fra 0-4 etter hvor alvorlig symptomene ble vurderet til å være. Systemet er modifisert etter Klem et al (2019) (10). I scoringssystemet får kalvene en total klinisk score mellom 0 og 15, hvor 0 viser fullstendig fravær av aktuelle kliniske symptomer, og 15 er sykest.

Tabell 1: Klinisk scoringssystem for luftveissykdom

Prøvemateriale

Fra hver kalv ble det tatt ut vanlige nesesvabre (N) og dype nesesvabre (D). Dype nesesvabre ble tatt ut fra kaudale del av nesehulen i begge nesebor. Denne ble beskyttet mot forurensning med et overtrekksrør på veg inn og ut av neseboret for å begrense kontaminering av svaberen. Dette ble tatt ut på sederte dyr. Det ble også tatt ut BAL-prøver fra utvalgte dyr i begge besetningene, men disse ble ikke tatt med i resultatene på grunn av kontaminasjon av prøvematerialet.

Prosedyre for uttak av nesesvabre

Begge neseborene ble tørket med gaskompress. Først ble det tatt to vanlige nesesvabre, en fra hvert nesebor, ved å føre svaberen ca. 5 cm inn i nesehulen og gni den mot slimhinnen.

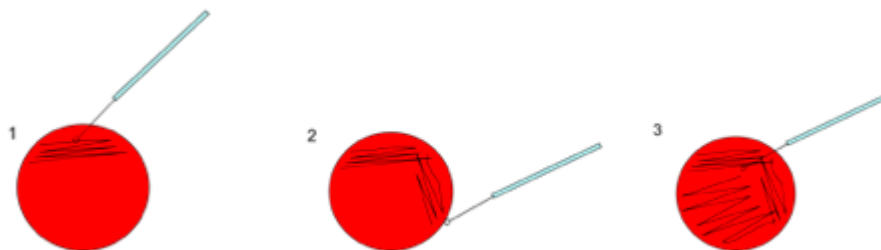
Svaberen ble overført til Aimies transportmedium (Copan Italian Spa) og merket. Deretter ble

det tatt ut to dype nesesvabre, en fra høyre og en fra venstre nesebor. Her var det viktig at dyret var godt sedert og at hodet var tilstrekkelig fiksert. Neseboret ble rengjort med en ny kompress, før avstanden fra nesebor til mediale øyevinkel ble målt. Den tildekte svaberen ble ført inn ventralt i neseboret tilsvarende den lengden vi målte opp fra nesebor til mediale øyevinkel. Røret ble trukket 3-4 cm tilbake før svaberen ble ført ut av beskyttelseshylsen tilsvarende langt. Svaberen ble rullet bestemt mot den pharyngeale mukosa i 30-45 sek. Svaberen ble deretter ført inn i beskyttelseshylsen igjen, og trukket ut av neseboret. Enden på svaberen ble klippet av med en ren saks, ført ned i Aimies transportmedium og merket.

Laboratorieundersøkelser

Bakteriologisk diagnostikk av luftveisprøver fra kalv

Svaberprøver fra øvre luftveier (vanlig nesesvaber og dyp nesesvaber) ble sådd ut fra Aimies transportmedium til blodskål (Blood agar base no. 2, Difco) med 5% storfeblod og blåskål (Bromthymolblue-Lactose-Agar, Merck) (Figur 1) etter standard metode med mål om å fortynne prøvematerialet for å oppnå enkeltkolonier. Etter utsæd av prøvemateriale ble det i tillegg sådd ut en linje med *Staphylococcus pseudintermedius* på blodskålen som kilde til V-faktor for identifikasjon av hemofile bakterier, deriblandt *H. somni*. Dette er standard prosedyre i diagnostikken. Både blodskål og blåskål ble deretter inkubert over natten ved 37 °C.

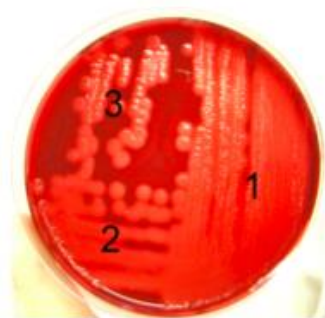


Figur 1. Fortynningsmetode for bakterieutstryk på blodskål. Pødeøsen brennes av for hvert steg for å ikke føre med seg bakterier fra et utstryk til det neste. Målet er å få frem enkeltkolonier.

Vekst på blodskålene ble kvantifisert etter hvor langt ut i utstryket (fortynningen) det ble identifisert bakterievekst etter skala illustrert i tabell 2.

Tabell 2. Kvantifisering av vekst på blodskålene.

Kategori:	
Svært sparsom forekomst	Vekst kun i starten av første fortynning, <5 kolonier
Sparsom forekomst	Vekst kun i første halvdel av første fortynning, <15-20 kolonier
Moderat forekomst	Vekst kun i første fortynning.
Rikelig forekomst	Vekst i første og andre fortynning
Meget rikelig forekomst	Vekst i første, andre og tredje fortynning.



Figur 2. 1: Første fortynning, 2: Andre fortynning, 3: Tredje fortynning. Denne skålen viser «Meget rikelig forekomst».

Vekst av *P. multocida*, andre aktuelle bakteriearter og muggsopp ble i første omgang tatt ut basert på typisk kolonimorfologi og lukt. Typisk for *P. multocida*-kolonier på blodskål etter et døgns inkubasjon ved 37°C er god vekst av glatte, runde, transparente og til dels mukoide kolonier på 1-2 mm i diameter med en særpregen lukt av indol.

Dersom en eller noen få spesifikke bakterie(r) vokste i større grad ut i høyere fortynning enn andre bakteriearter ble begrepet «dominert av» brukt. Det kunne være dominans av en enkelt bakterieart, flere bakteriearter og/eller av muggsopp.

Forekomst av *P. multocida* ble gradert på en skala fra 0-4. I denne graderingen ble det tatt utgangspunkt i om bakterien var til stede, om den dominerte i bakteriekulturen og mengden bakterieflora.

Tabell 3. Gradering av forekomst av *P. multocida* på blodskålen

Grad 0	<i>P. multocida</i> er ikke påvist
Grad 1	<i>P. multocida</i> er en del av blandingsflora
Grad 2	Moderat forekomst av blandingsflora dominert av <i>P. multocida</i>
Grad 3	Rikelig forekomst av blandingsflora dominert av <i>P. multocida</i>
Grad 4	Meget rikelig forekomst av blandingsflora dominert av <i>P. multocida</i>

Potensielle *P. multocida* og andre potensielt patogene bakterier ble sekundært sådd ut på blodskål og inkubert over natten ved 37 °C.

Følgende biokjemiske tester ble satt opp for verifisering av *P. multocida*: Indol, mannitol, trehalose og urea. En potensiell koloni ble overført til et rør for hver enkelt biokjemisk test. Hver test ble inkubert til dagen etter ved 37 °C før avlesning av resultatet.

Avlesningen av de biokjemiske testene ble gjort på følgende måte:

Indol: Det ble tilsatt noen dråper med indol-reagens. Denne gir fargeomslag til en rød ring øverst i mediet ved positiv reaksjon, mens det ved negativ reaksjon blir en gul ring. Ved positiv reaksjon har bakterien produsert enzymer som spalter aminosyren tryptofan til indol. Indolen påvises ved å tilsette et reagens som inneholder p-dimetylamino-benzaldehyd, som binder seg til indol og danner et rødfarget produkt. Dersom man ikke observerer omslag, kan man inkubere prøven noe lengre og prøve på nytt.

Mannitol: I denne testen er mediet tilsatt et karbohydrat (mannitol) og en pH-indikator.

Dersom bakteriene kan spalte mannitol dannes det syrer som senker pH, og man får en positiv reaksjon ved et gult fargeomslag av mediet.

Trehalose: Dette er også en karbohydrattest som fungerer på samme måte som mannitoltesten, men her brukes karbohydratet trehalose i stedet.

Urea: I denne testen undersøkes det om bakteriene danner enzymet urease. Urease spalter urea og danner ammoniakk. Dette fører til basisk pH, som gjør til at pH-indikatoren i mediet skifter farge til rosa/rød ved positiv reaksjon.

Etter avlesning ble verifiserte *P. multocida* isolater overført til kryorør med frysebuljong av typen Luria Bertani med 20% glycerol, og lagret ved -80 grader.

Muggsopp ble sendt til Veterinærinstituttet for artsidentifisering.

Resistenstesting

Antibiotikasensitivitetstesting ble utført ved hjelp av diskdiffusjonsmetoden med følgende antibiotikatabletter: Benzylpenicillin 10 µg, amoksisillin + klavulanat 20 +10 µg, streptomycin 10 µg, trimetoprim + sulfametoksazol (SxT25) 1,25 + 23,75 µg, tetrasyklin 30 µg, enrofloxacin 10 µg og florfenikol 30 µg. Alle antibiotikatabletter var av typen Rosco NeoSensitabs med unntak av florfenikol 30 som var av typen fra Oxoid™ Antimicrobial Susceptibility Disks.

Prinsippet for agardiffusjonsmetoden er at bakterieisolat såes ut på en agarskål før tabletter for ulike antibiotika legges på den samme agarskålen. Antibiotika i tablettene diffunderer ut i agaren og inhiberer bakterieveksten avhengig av hvor følsomme bakteriene er for det bestemte antibiotikumet. Diameteren på hemmingssonen rundt tablettene er avgjørende for

plasseringen i tre ulike følsomhetskategorier; følsom, intermediær eller resistent.

Hemmingssonene er definert av The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), og varierer fra et antibiotikum til et annet, og også mellom ulike bakteriearter. Diameteren på hemningssonen er korrelert med MIC verdien til bakteriene, som angir laveste konsentrasjon av antibiotikumet som må til for å hemme veksten av bakteriene.

Tre kolonier fra renkultur ble oppløst i 5 ml fysiologisk saltvann før bakterieløsningen ble justert til en konsentrasjon lik McFarland standard 0,5. Bakterieløsningen ble deretter sådd ut på Mueller Hinton agar (Difco) ved hjelp av en steril bomullspinne og en platekarusell (Retro C80) for jevn spredning av bakterieløsningen. Deretter ble antibiotikatablettene lagt på skålen. Skålene ble deretter inkubert i 35°C i 18 timer.

Statistiske metoder

Korrelasjon mellom forekomst av *P. multocida* og klinisk score

For å undersøke om det er en sammenheng mellom mengden *P. multocida* i bakterieveksten i de analyserte prøvene og klinisk sykdom hos kalv ble disse to parametrene plottet inn i korrelasjonsfunksjonen til Microsoft® Excel®.

Analyse av vanlig og dyp nesevaber

For å undersøke om det var sammenheng mellom resultatene fra de dype og de vanlige nesevabrene ble forekomsten av *P. multocida* i bakterieveksten i disse prøvene sammenlignet. Forekomsten av *P. multocida* ble gradert fra 0-4 som vist i Tabell 3. Her ble det fokusert på hvorvidt differansen mellom verdiene gitt dyp og vanlig nesevaber var lav nok til å si at begge typer prøvemethoder gav omtrentlig like godt resultat. Det ble regnet ut en

gjennomsnittlig differanse for alle kalvene. En maksimal differanse på 1 ble satt for å kunne konstatere en sammenheng mellom resultatene fra de to prøvemethodene.

Da den gjennomsnittlige differanseverdien ikke tar hensyn til hvilken av metodene som viste høyest og lavest forekomst av *P. multocida* ble det også regnet ut et gjennomsnitt av forekomst av bakterien for de to metodene.

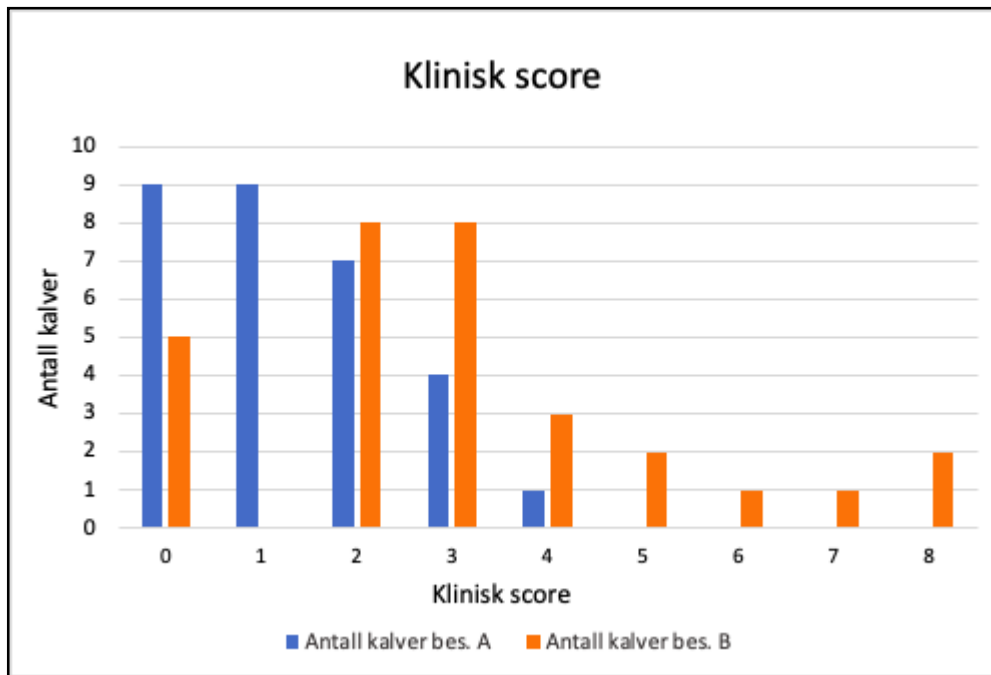
Andre laboratorietester

Det ble sendt inn svaberprøver fra hver besetning til analyse for BRSV og bovint coronavirus. Utvalget av prøver baserte seg på å velge annenhver kalv, ved å bare analysere kalvene som ble tildelt oddetall. Disse prøvene ble analysert ved VI med deres standard metode for påvisning av RNA fra BRSV og BCoV.

Resultater

Kliniske funn

I de to besetningene var den totale kliniske scoringen relativt lav. Hele 50 av 60 kalver hadde en samlet klinisk score mellom 0 og 3. Besetning A hadde jevnt over en lavere klinisk score enn besetning B, som hadde kalver i nesten alle kategorier fra 0-8. Ingen av kalvene hadde en samlet klinisk score over 8.



Figur 3. Samlet klinisk score i de to besetningene. 50 av 60 kalver (83,3%) hadde en score mellom 0 og 3.

Det ble observert en del hoste i begge besetningene til tross for at oppførselen stort sett var normal, altså at kalven var kvikk og alert. 29 av de 60 kalvene (48,3%), hostet en eller flere ganger i løpet av 10 minutter. Likevel hadde nesten ingen av kalvene anmerkninger på oppførsel da hele 58 av kalvene hadde 0 i score på dette parameteret. Ellers var det varierende funn av utflod fra nese i besetningene. Omtrentlig halvparten hadde ingen synlig neseflod, mens det hos resten var observert enten serøs/mukøs eller mucopurulent/purulent utflod. Enkelte av kalvene hadde også avvik på rektaltemperatur, selv om flesteparten lå innenfor referanseområdet for normalverdier.

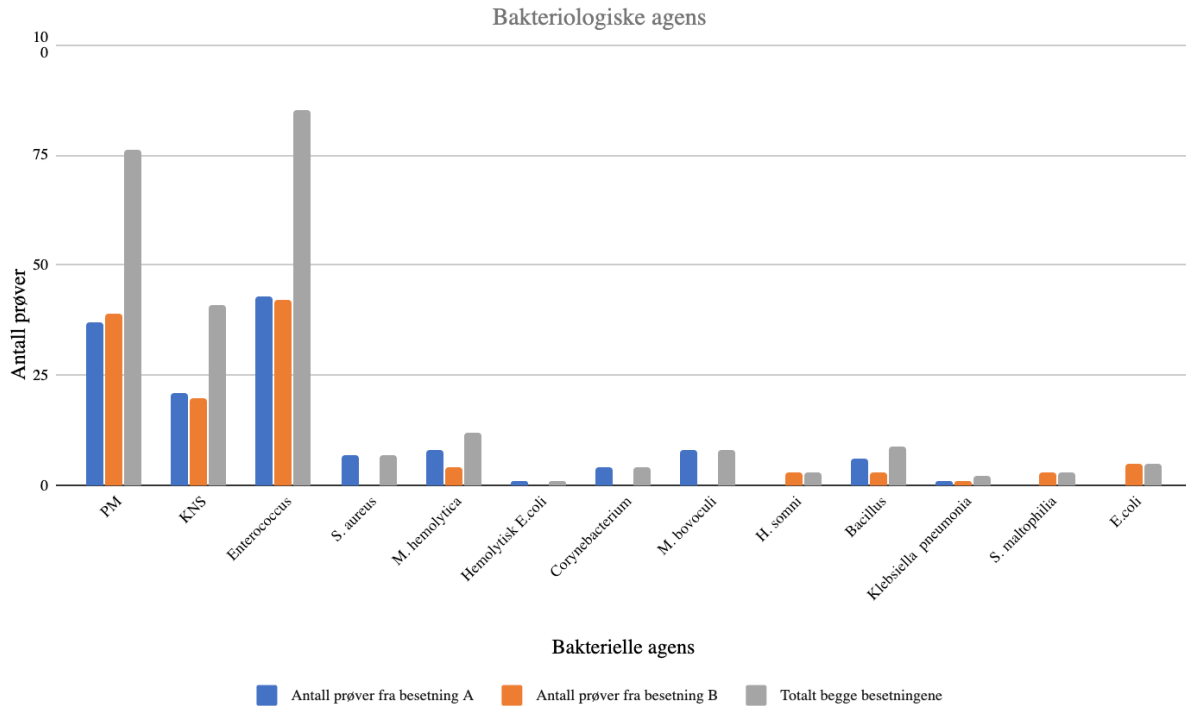
Tabell 4. Antall kalver med de ulike graderingene av de kliniske parametrene.

KLINISK SCORE HOS DE 60 KALVENE					
Score	Respirasjonsfrekvens	Rektaltemperatur	Hoste	Utfloed fra nese	Oppførsel
0	52	44	31	31	58
1	1	11	13	15	1
2	5	5	16	14	1
3	1	0	-	-	0
4	1	0	-	-	-

Labratorieundersøkelser

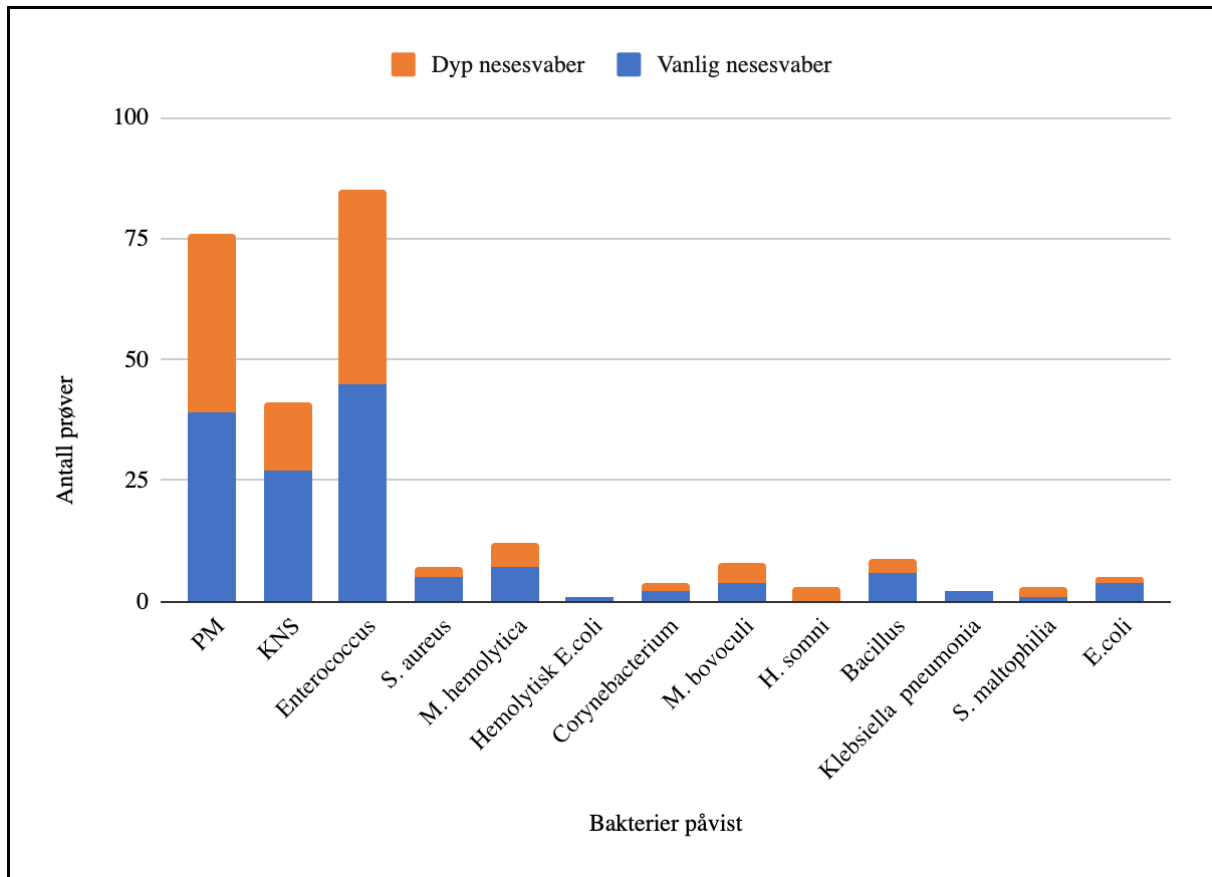
Bakterier påvist hos kalvene

Flere ulike bakterier ble påvist i nesensvabrene hos kalvene fra de to besetningene. De hyppigst forekommende bakteriene var *Enterococcus spp.*, etterfulgt av *P. multocida* og deretter koagulase-negative stafylokokker (KNS). Av til sammen 120 prøver, som omfatter både de vanlige og de dype nesensvabrene fra alle kalvene var det hhv 85 (70,8%), 76 (63,3%) og 41 (34,2%) positive prøver for disse tre bakteriene. Utover dette var det 12 (10%) positive prøver for *M. haemolytica*, 9 (7,5%) positive prøver for *Bacillus sp.*, og et mindre antall positive prøver for *Moraxella boviculi*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (heriblant noen hemolytiske *E. coli*), *Corynebacterium sp.*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *H. somni* og *Klebsiella pneumoniae*.



Figur 4. Resultater for bakteriologisk analyse av alle prøvene fra dyp og vanlig nesensvaber.

P. multocida ble påvist i 39 (65%) av de 60 vanlige nesensvabrene, og i 37 (61,7%) av de 60 dype nesensvabrene. KNS ble påvist i 27 (45%) av de vanlige nesensvabrene og i 14 (23,3%) av de dype nesensvabrene. 45 (75%) av de vanlige nesensvabrene og 40 (66,7%) av de dype nesensvabrene var positive for *Enterococcus*. *S. Aureus* ble påvist i 5 (8,3%) av de vanlige nesensvabrene og 2 (3,3%) av de dype, imens *M. haemolytica* ble påvist i 7 (11,7%) av de vanlige nesensvabrene og 5 (8,3%) av de dype nesensvabrene. De resterende bakteriene som er vist i figur 5 ble påvist i liten grad. Hemolytisk *E. coli* og *Klebsiella pneumoniae* ble bare påvist i vanlig nesensvaber, mens *H. somni* bare ble påvist i dyp nesensvaber.



Figur 5: Bakterielle agens påvist i de dype nesesvabrene og de vanlige nesesvabrene i alle prøvene.

Muggsopp

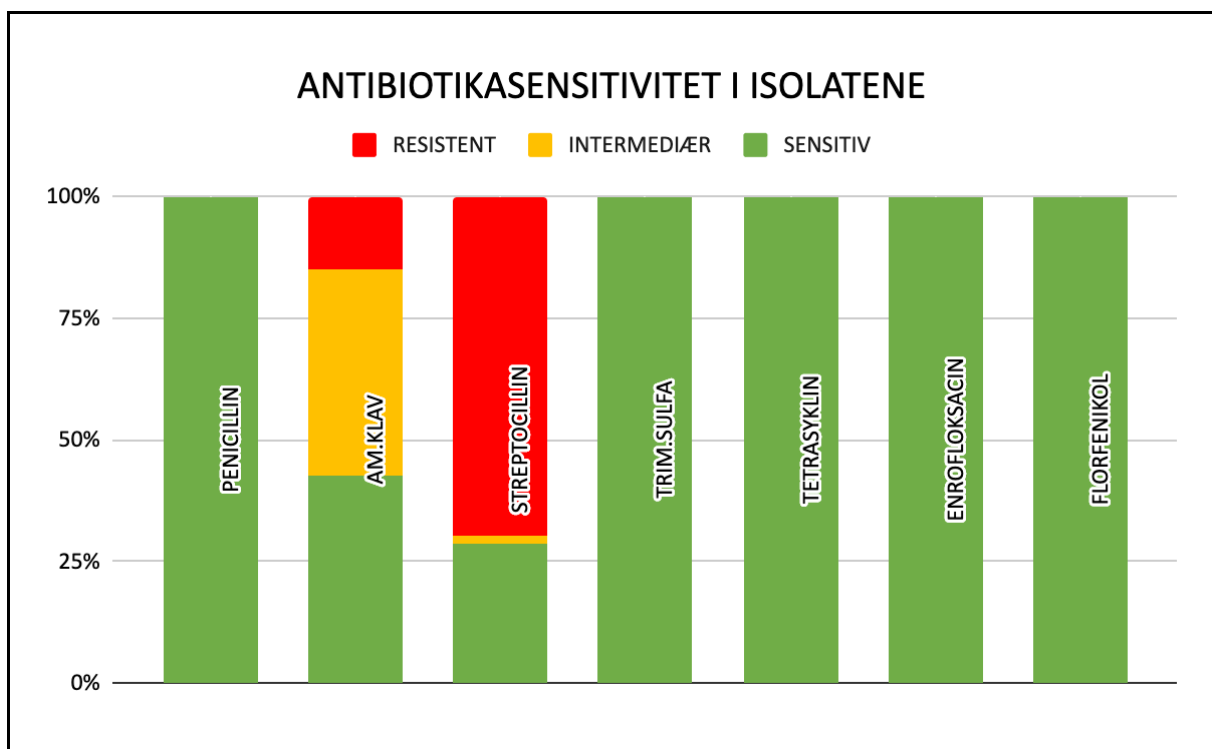
I besetning B ble det påvist vekst av muggsopp på 36 av 60 prøver (60%). Disse prøvene ble sendt videre til Veterinærinstituttet og identifisert som *Lichtheimia* sp. I besetning A var det ikke vekst av muggsopp på noen av de 60 prøvene.

Antibiotikasensitivitet hos *P. multocida*

Alle de testede isolatene var sensitive for benzylpenicillin, trimetoprim/sulfamethoksazole, tetrasyklin, enrofloxacin og florfenikol. For streptocillin og amoksisillin med klavulansyre ble det derimot påvist en del resistens. Resistensmønsteret var størst for streptocillin med 71% resistente eller intermediære prøver, mens det for amoksisillin m/klavulansyre utgjorde 58%.

Tabell 5. Antibiotikafølsomhet hos *P. multocida* isolert fra vanlig nesesevaber og dyp nesesevaber.

OPPSUMMERING - RESISTENSMØNSTER I ISOLATENE							
	PENICILLIN	AM.KLAV	STREPTOCILLIN	TRIM.SULFA	TETRASYKLIN	ENROFLOKSACIN	FLORFENIKOL
SENSITIV	73	31	21	73	73	73	73
INTERMEDIÆR	0	31	1	0	0	0	0
RESISTENT	0	11	51	0	0	0	0
SUM	73	73	73	73	73	73	73



Figur 6. Antibiotikafølsomhet hos *P. multocida* isolert fra vanlige nesesevabre og dype nesesevabre.

Virus påvist hos kalvene

Resultatene er oppgitt i tabell 6.

Tabell 6. Positive prøver for BRSV og BCoV i besetning A og besetning B.

	BRSV	BCoV	Antall prøver
Besetning A	0	1 (6,7%)	15
Besetning B	0	12 (80%)	15
Begge besetningene	0	13 (43,3%)	30

Forekomst av *P. multocida* i bakteriekulturene

Dominans og mengde av *P. multocida* ble gradert på en skala fra 0 til 4. Fordelingen av de ulike graderingene i de to besetningene var tilnærmet lik (Tabell 7). Om man ser begge besetningene under ett var det en overvekt av forekomst grad 0 og grad 2, som utgjorde hhv 44 (36,7%) og 40 (33,3%) av 120 prøver. Bare 3 av prøvene fra de to besetningene var av grad 4. Med andre ord ser vi ikke noe tendens til at *P. multocida* dominerer i forekomst i bakteriefloraen, men heller at den er en del av en blandingsflora i de øvre luftveiene hos disse kalvene.

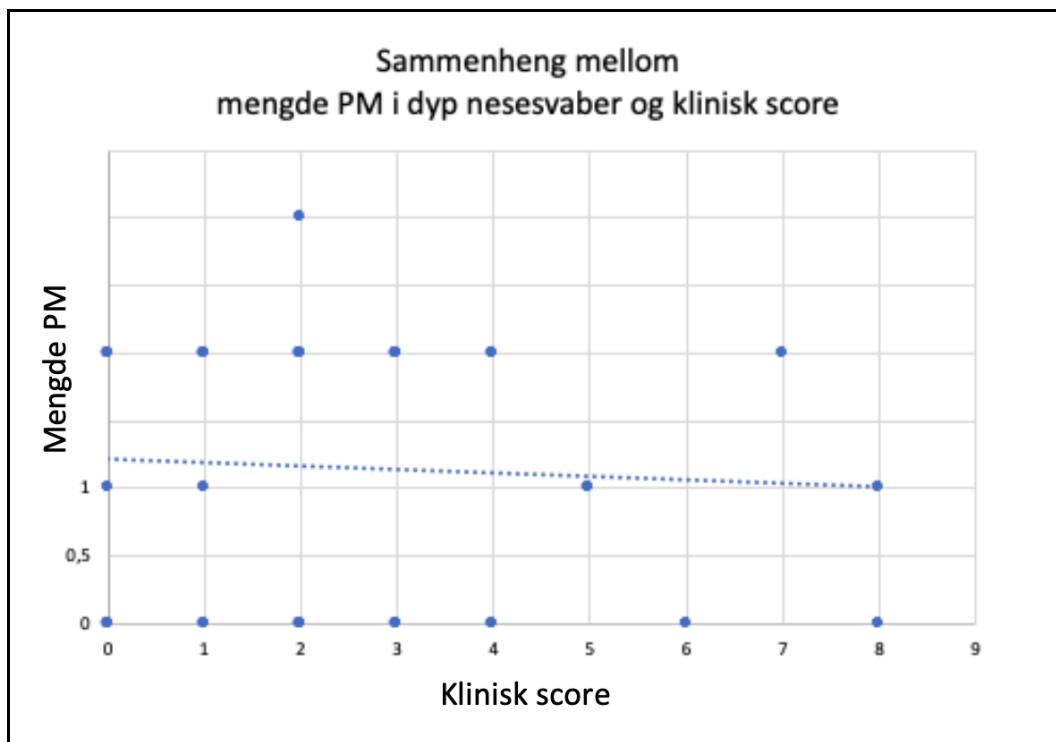
Tabell 7. Antall prøver plassert i de ulike gradene av forekomst av *P. multocida*

	Forekomst grad 0	Forekomst grad 1	Forekomst grad 2	Forekomst grad 3	Forekomst grad 4	Antall prøver
Besetning A	23 (38,3%)	5 (8,3%)	21 (35%)	9 (15%)	2 (3,3%)	60
Besetning B	21 (35%)	8 (13,3%)	19 (31,7%)	11 (18,3%)	1 (1,7%)	60
Totalt	44 (36,7%)	13 (10,8%)	40 (33,3%)	20 (16,7%)	3 (2,5%)	120

Sammenheng mellom forekomst av *P. multocida* og klinisk score

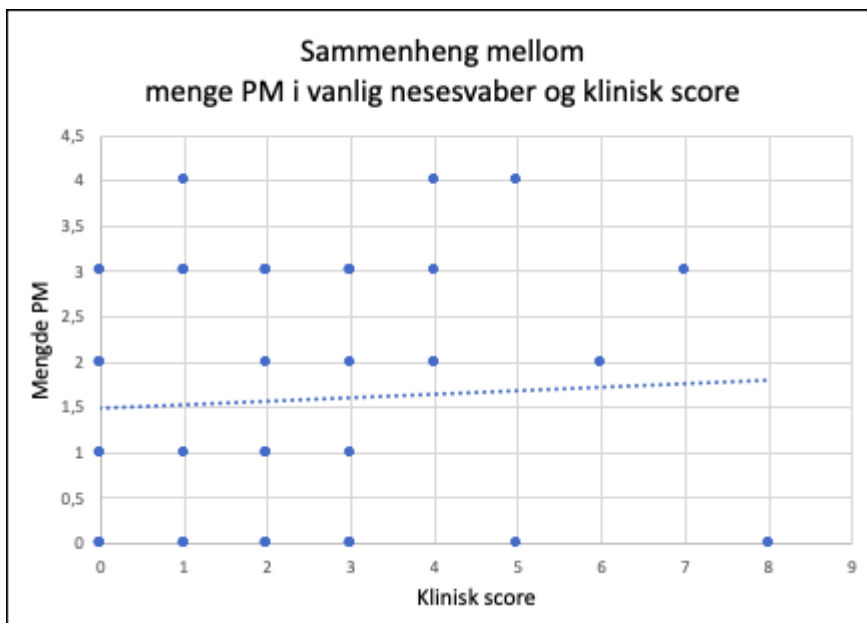
For å undersøke om mengden av *P. multocida* i bakteriekulturen hadde en sammenheng med klinisk luftveissykdom hos kalvene, ble korrelasjonen mellom disse to variablene regnet ut.

Her ble det tatt utgangspunkt i resultatene fra den dype nesesvaberen. På x-aksen i figur 7 sees klinisk score, mens det på y-aksen sees forekomst av *P. multocida*. Da korrelasjonslinjen peker i noe negativ retning, og har en verdi på -0,05, har vi ingen korrelasjon mellom forekomst av *P. multocida* i dyp nesesvaber og klinisk score hos kalvene. Med andre ord ser det ikke ut til at en høy forekomst av *P. multocida* har noe sammenheng med klinisk luftveissykdom hos kalv.



Figur 7. Korrelasjon mellom mengde *P. multocida* i dyp nesesvaber og klinisk score. Det er tilsynelatende ingen sammenheng mellom høy *P. multocida* forekomst og klinisk luftveissykdom hos kalvene.

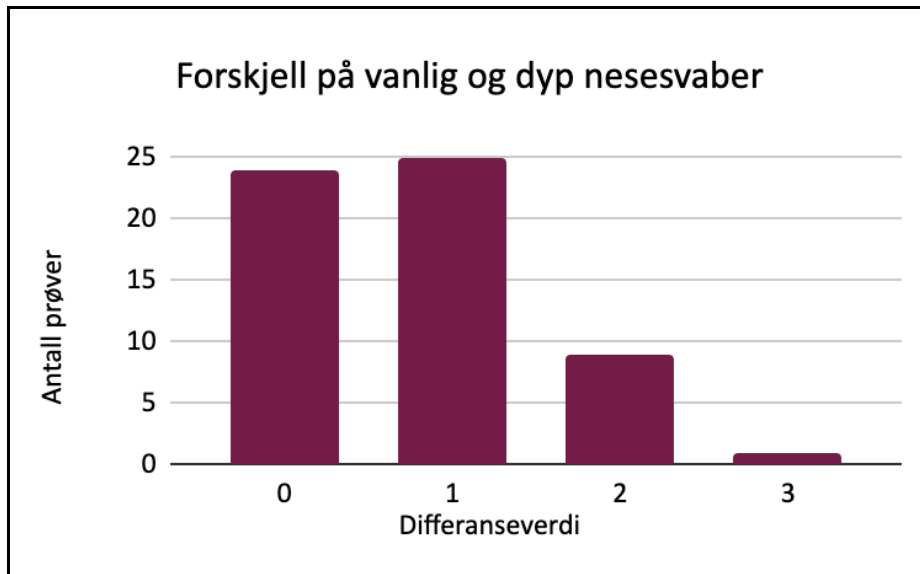
For å undersøke om det kunne påvises en sammenheng mellom forekomst av *P. multocida* og høy klinisk score ved bruk av vanlig nesesevaber ble korrelasjonen også regnet ut med verdiene for den vanlige nesesevaberen. Korrelasjonslinjen peker her i en svak positiv retning. Det er likevel en så svak korrelasjon at vi ikke har påvist noen sammenheng mellom forekomst av *P. multocida* og klinisk score.



Figur 8. Det kan heller ikke påvises noen klar sammenheng mengde *P. multocida* og klinisk score dersom man bruker tallene fra den vanlige nesesevaberen.

Sammenligning av dyp nesesevaber med vanlige nesesevaber

Differansen mellom forekomst av *P. multocida* i dyp og vanlig nesesevaber ble regnet ut for alle de 60 kalvene. Av disse differansene ble det regnet ut et gjennomsnitt, som ble på 0,82. Bare 10 av 60 differanseverdier var på over 1. Da vi aksepterte en gjennomsnittlig differanseverdi på maks 1 som terskel for å si at de to metodene er omtrentlig like gode, kan vi konkludere med at dyp og vanlig nesesevaber gir omtrentlig likt resultat.



Figur 9. Den gjennomsnittlige differanseverdien for forekomst av *P. multocida* i dyp og vanlig nesesvaber var i gjennomsnitt på 0,82.

Den gjennomsnittlige forekomsten av *P. multocida* var 1,16 for den dype nesesvaberen, og 1,58 for den vanlige. Dette viser at *P. multocida* var noe mer forekommende i den vanlige nesesvaberen enn den dype.

Diskusjon

Utvalg av besetninger og dyr

Begge de utvalgte besetningene lå i samme distrikt, hadde tidligere historikk med luftveissykdom, var i samme vektgruppe og var framfôringsbesetninger. Dette styrker den interne validiteten. Framfôringsbesetninger har et stort antall dyr i samme aldersgruppe, så det var mulig å velge et stort antall dyr fra hver besetning. Den interne validiteten vil i denne sammenheng si noe om hvor representativt vårt resultat er for andre kalver i framôringsbesetninger på Østlandet.

Da det bare var to besetninger med i studiet kan man diskutere om utvalget er stort nok, men antallet inkluderte kalver totalt sett i forhold til antall besetninger var av akseptabel størrelse. Av disse kalvene var det både kalver med og uten symptomer på luftveissykdom. Planen var å velge ut 15 dyr som viste symptomer på luftveissykdom og 15 dyr som var friske fra hver besetning. Dette ble vanskelig da mange av dyra viste seg å ha milde kliniske tegn selv om de var oppfattet av eier som friske.

Kliniske funn

De kliniske registreringene vi utførte var registreringer som er aktuelle ved luftveissykdom. Da disse dyrene ofte vil få endret oppførsel, økt respirasjonsfrekvens, hoste, neseflod og økt rektaltemperatur (10) vurderte vi disse fem kliniske parametrene til å være de mest aktuelle. Parameterne ble tillagt vekt ut i fra deres betydning for utvikling av sykdom. Å bruke en slik type gradering gir et mer presist bilde av alvorlighetsgraden enn å bare skille mellom frisk og syk. I dette forsøket var dette en spesielt anvendbar metode idet det var få veldig syke og få helt friske individer.

Det at det var mange kalver som viste lette luftveissymptomer er sannsynligvis vanlig i fremføringsbesetninger med mange kalver. Store besetninger har flere potensielle smittekilder, og iallefall luftveisinfectionsjoner forårsaket av virus er svært smittomt (1). Det kan med andre ord tenkes at utvalget vårt kan være representativt for andre fremføringsbesetninger i landet.

De kliniske sykdomstegnene som ble observert hos flest kalver var hoste og neseflod. Men selv om omtrentlig halvparten av kalvene hadde hoste, og halvparten hadde neseflod var det

bare 2 av 60 kalver som hadde avvik i oppførsel. Det kan derfor tenkes at hoste kan skyldes infeksjon i øvre luftveier, og at dette ikke gir allmenne sykdomstegn. Dyr som er klinisk syke kan ha dårligere dyrevelferd enn friske dyr selv om det ikke er snakk om alvorlig sykdom. Syke dyr har vist seg å gi dårligere økonomi idet fôrutnyttelsen blir dårligere, veksthastigheten reduseres, noen dyr ikke overlever og da dette medfører flere veterinærbesøk (4).

Det at det var få friske og få alvorlig syke kalver kan på noen områder ha vært en svekkelse for studiet. Dette gjelder spesielt betydningen av *P. multocida* for utvikling av sykdom. Resultatene våre viste ingen korrelasjon mellom høy forekomst av *P. multocida* og høy klinisk score. Det er uvisst om man kunne påvist en korrelasjon med sykdom om utvalget vårt hadde inkludert flere alvorlig syke kalver. På den andre siden burde metodikken vi har valgt kunne avdekke en potensiell sammenheng. Forekomsten av bakterien i bakteriekulturen ble i likhet med klinisk score gradert på en numerisk skala, og gir derfor en detaljert beskrivelse av dens tilstedeværelse. En metodikk som fanger opp små variasjoner vil med andre ord forbedre våre forutsetninger mye for å undersøke *P. multocida* sin betydning for utvikling av luftveissykdom.

Prøvemateriale

Ved utførelse av dyp nesevaber opplevde vi at vi måtte gi mer sedasjon til flere av kalvene, da de reagerte på at vi førte svaberen langt bak i nesen. Dette gjorde at prøveuttaket ble mer tidkrevende enn planlagt, og det var tydelig at kalvene opplevde det som ubehagelig. Uttak av den vanlige nesevaberen opplevde vi som problemfritt.

Videre arbeid med prøvematerialet

Denne fordypningsoppgaven inngår i et pilotprosjekt, og isolatene som er brukt vil bli videre fullgenomsekvensert for å identifisere antibiotikaresistensgener, virulensgener og serotype(r). Virulensgener som blant annet koder for evne til å bevege seg ned til nedre luftveier kan tenkes å være en viktig faktor. Dette vil bli undersøkt nærmere i forskningsprosjektet «Norwegian Airways».

Valg av prøveuttaksmetode

Siden det ble påvist omtrent like mye *P. multocida* i vanlig som dyp nesesvaber, indikerer dette at det er uvesentlig for resultatet hvilken av prøveuttaksmetodene man bruker. Både den vanlige og den dype nesesvaberen har sine fordeler og ulemper. En av fordelene med den dype nesesvaberen er at det gjør arbeidet med laboratorieanalysene enklere siden normalfloraen lenger nede i respirasjonstraktus er mer sparsom sammenlignet med øvre luftveier. Med den dype nesesvaberen blir det derfor mindre vekst av kontaminanter og normalflora på skålene, og derfor enklere å plukke ut aktuelle kolonier. På den andre siden er det mer krevende å utføre den dype nesesvaberen sammenlignet med den vanlige. Den dype nesesvaberen er en større påkjenning for kalvene, og er dessuten mye mer ressurskrevende for veterinæren og bonden.

Hovedårsaken til at det tas så lite prøver ved luftveisinfeksjoner hos kalver, er at det er praktisk vanskelig, og dessuten kostbart å utføre denne diagnostikken. De alvorligste luftveisinfeksjonene finner oftest sted i nedre luftveier, og det å ta trachealskylleprøver eller BAL er både invasivt og vanskelig. Selv om det er uenigheter omkring samsvaret mellom forekomst av luftveisbakterier i øvre og nedre respirasjonstraktus, mener enkelte studier at vanlige og dype nesesvabre har god diagnostisk verdi (23).

Da vårt studie ikke undersøker samsvaret mellom bakterieforekomst i øvre og nedre luftveier, og heller ikke avdekker noen sammenheng mellom forekomst av *P. multocida* i øvre luftveier og klinisk sykdom, er det liten evidens for å kunne bruke den dype eller den overfladiske nesesvaberen som diagnostisk verktøy for valg av terapi for enkeltdyr. Man kan likevel dra nytte av disse metodene ved kartlegging av opportunistiske bakterier og deres egenskaper i øvre luftveier tatt i forskningsøyemed. Dette kan være nyttig i den videre kartleggingen av bakteriefloraen hos kalver fra andre geografiske områder i Norge, og dessuten antibiotikasensitiviteten blant disse. I sin tur vil dette danne et bedre grunnlag for å foreslå terapianbefalinger.

I valget mellom å bruke vanlig eller dyp nesesvaber må man ta hensyn til fordelene og ulempene ved disse to metodene. I denne studien ser det ut som at fordelene med enklere laboratorieanalyser for den dype nesesvaberen veier mindre enn de praktiske ulempene ved uttaket. Derfor anbefaler vi å heller bruke vanlig enn dyp nesesvaber.

I den større studien vi er en del av vil det bli utført BAL-prøver da dette vil kunne vise en klarere sammenheng med sykdom. Det ble tatt BAL-prøver av utvalgte kalver i studien vår også, men da dyrkning viste stor grad av kontamineringsflora, sannsynligvis på grunn av problemer med uttaket valgte vi å ikke ta med resultatene i studien. Uten BAL-prøver kan man ikke fastslå en sikker sammenheng mellom bakterieforekomsten i nesene og i nedre luftveier, og vi kan derfor ikke gi terapianbefalinger på grunnlag av våre resultater.

Laboratorieundersøkelser

Påvisning av bakterielle agens

At *P. multocida* var en av de bakteriene som ble påvist i størst omfang, sammen med KNS og enterokokker, støtter opp om internasjonal litteratur hvor *P. multocida* har blitt regnet for å være en opportunist i luftveiene hos kalver (14).

Både enterokokker og KNS er bakterier som finnes i miljøet, og som regnes som forurensning eller normalflora, heller enn patogener. Enterokokker er bakterier som tilhører normalfloraen i tarm, mens KNS i tillegg til å finnes i miljøet, også kan være kommensaler på hud og slimhinner. Med andre ord forventer vi ikke at disse bakteriene har bidratt til klinisk sykdom hos kalvene.

Det ble i vårt forsøk undersøkt spesielt for *M. bovis* ved real-time PCR ved VI, uten at denne bakterien kunne påvises (data ikke presentert). Det er viktig å inkludere denne bakterien i videre studier da dette er en svært uønsket bakterie å få etablert i Norge.

Resistensmønster hos *P. multocida*

De varierende resultatene fra undersøkelsen av antibiotikafølsomhet hos *P. multocida* både understøtter noen «etablerte sannheter» og åpner for flere spørsmål. Det at *P. multocida* er sensitive for både benzylpenicillin, trimetoprim/sulfamethoksazole, tetrasyklin og enrofloksacin støtter opp om påstanden at forekomsten av antibiotikaresistente luftveispatogener hos kalv i Norge er lav. Likevel viser tall fra Vetreg at bredspektrede antibiotikum utgjør omtrent halvparten av behandlingene mot luftveisinfectionsjoner hos storfe i Norge. Dette omfattet i 2017 preparatene Resflor® (20%), Terramycin® (6%), Zactran®

(6%), Borgal/Tribriksen ® (5%), Streptocilin ® (4%), Clamoxyl ® (4%), Terramycin ® (3%) og Baytril ® (2%).

I vårt forsøk var *P. multocida* den hyppigst forekommende bakterien som har vært forbundet med luftveisinfeksjoner hos kalver (14). Da denne i alle tilfellene var sensitiv for benzylpenicillin ser det ut som at bruk av bredspektret antibiotikum mot luftveisinfeksjoner forårsaket av *P. multocida* er unødvendig. Om dette bare gjelder for en spesiell serovariant av *P. multocida* er ukjent. Det er også uvisst hvilket resistensmønster som finnes hos andre bakterier som kan forårsake luftveisinfeksjoner. For å få en mer fullverdig oversikt over antibiotikaresistensen i norske fremføringsbesetninger er det behov for ytterligere studier.

Muggsopp

I den ene besetningen ble det påvist muggsopp hos et stort antall av individene. Denne besetningen hadde også en høyere klinisk score i gjennomsnitt enn den besetningen med mindre påvisning av muggsopp. Dette kan tyde på at muggsopp har en betydning for klinisk sykdom. Her hadde det vært interessant med ytterligere studier på området.

Mulige feilkilder

Studiet er en del av et pilotprosjekt og ble utført etter grundig planlegging. Det var heriblant utarbeidet standardiserte metoder for prøveuttakene som ble etterfulgt i begge besetningene. Etterarbeidet på laboratoriene var dessuten utført av personell med mye erfaring, noe som reduserer antall feilkilder. Likevel finnes det forbedringspotensialer i studiet.

Det at den ene besetningen var vaksinert kan ha påvirket forekomsten av agens og luftveissykdom hos de aktuelle kalvene. Dette både på grunn av immuniteten kalvene kan få

mot de aktuelle agensene (30), men også fordi beskyttelse mot virusinfeksjonene vil redusere forekomsten av sekundære bakterielle infeksjoner. På grunn av samspillet som forekommer mellom agensene i luftveiene (27) kan det tenkes at forekomsten av *P. multocida* indirekte kan ha blitt påvirket av denne vaksinen. En uvaksinert besetning ville muligens hatt høyere forekomst av BRSV og PIV3, og dermed også høyere forekomst av *P. multocida*. En vaksinert besetning kan dessuten ha en bedre immunstatus, og dermed lavere klinisk score enn en tilsvarende uvaksinert besetning.

M. haemolytica, som er en komponent i vaksinen, skulle man forvente å se en lavere forekomst av i en besetning som er vaksinert. Dette var ikke tilfelle i våre resultater. Besetningen som var vaksinert hadde flere positive prøver for *M. haemolytica* enn den uvaksinerte besetningen. Det ble heller ikke påvist betydelig lavere forekomst av *P. multocida* i den vaksinerte besetningen. Årsaken til dette kan være manglende effekt av vaksinen, eller at vaksinen har blitt gitt til unge kalver som fremdeles hadde maternal immunitet, noe som motvirker effekten av vaksinen. Forskjellen mellom de to besetningene kan også skyldes andre forhold som påvirker forekomsten av agens i øvre luftveier som for eksempel oppstallingsforhold og luftkvalitet.

Under de kliniske registreringene ble temperaturen tatt etter sedering av kalvene. Dette var av praktiske hensyn da prøvetakingen var meget tidkrevende. Sedasjonen kan ha gitt en noe lavere temperatur enn det som var reelt, og dermed kan kalvene ha blitt tildelt en noe lavere klinisk score. På den andre siden kunne temperaturmåling utført på våkne dyr ha stresset de og gitt en for høy temperatur. Betydningen av sedasjonen har sannsynligvis ikke utgjort en stor forskjell da temperaturen ble det første som ble prioritert når kalvene var sedert.

En annen feilkilde er muligheten for kontaminasjon av de dype nesestablene. Dersom disse ikke var tilstrekkelig dekket av plasthylsen på vei inn og ut av nesehulen, kunne det forekomme kontaminering av svaberen fra rostrale del av nesen. Det er dessuten mulig å føre nesestablene *for* dypt inn i nesehulen, og dermed påføre svaberene kontaminasjon fra pharynx. Da vi på forhånd hadde målt opp avstanden som skulle tilsvare korrekt plassering av nesestablene, og alle prøvetakerne var gitt god opplæring, er det lite sannsynlig at dette utgjør en stor fare for feilaktige resultater.

Den eksterne validiteten i studien er noe usikker. Studiet inkluderte bare to besetninger, så det kan ikke uten videre konkluderes med at resultatene er gjeldende for framfôringsbesetninger i hele Norge. Det kan tenkes at miljøet for tilsvarende kalver er noe annerledes i andre deler av landet, og at det dessuten kan forekomme lokale forskjeller av gårdsdriften. Det er heller ikke kjent om forekomsten av *P. multocida* eller antibiotikaresistensen for bakterien er lik i andre deler av Norge. Sistnevnte blant annet fordi bruk av antibiotika er noe som varierer i forskjellige deler av landet. På den andre siden er de forskjellige rasene som ble undersøkt i studiet forekommende over hele landet. Det finnes også felles retningslinjer for hold av husdyr i hele Norge da større aktører som Animalia, Tyr og Tine gir rådgivning i alle regioner. Det kan tenkes at studiet også er relevant for både kvigekalver og kalver i melkekubesetninger. Bakteriefloreaen hos kvigekalver er sannsynligvis ikke veldig forskjellig fra bakteriefloreaen hos oksekalver. Ganske mange av kalvene i studiet vårt er også rekruttert fra melkekubesetninger, da NRF-oksekalver blir benyttet i kjøttproduksjonen. For å konkludere med statusen i hele Norge trengs det ytterligere studier.

Studiets relevans for veterinærfaget

I denne studien har vi kartlagt at diagnostiske metoder med dyrkning fra dyp og vanlig nesevaber gir tilsvarende likt resultat for påvisning av *P. multocida*. Det at man like gjerne kan benytte en vanlig nesevaber som en dyp kan være med på å forenkle den videre kartleggingen av luftveisbakterier i øvre luftveier hos kalver i resten av Norge. Kartlegging av agens i øvre luftveier kan dessuten være nyttig for besetninger med gjentakende eller kroniske problemer med luftveisinfeksjoner. Det er mer sannsynlig at dette vil bli utført av praktiserende veterinærer i felt når man heller kan bruke en vanlig nesevaber enn en dyp. Hyppigere prøvetakinger øker dessuten sannsynligheten for å oppdage eksotiske luftveissykdommer som for eksempel *M. bovis*. Det å benytte seg av diagnostiske metoder som dyp og overfladisk nesevaber vil bli enda mer nyttig dersom man i senere studier kan påvise en sammenheng mellom funn i dyp/vanlig nesevaber fra øvre luftveier og BAL-prøver fra nedre luftveier.

Alle *P. multocida*-isolatene i studien var sensitive for benzylpenicillin. Resistenstesting av andre bakterielle agens knyttet til luftveissykdom som *Mannheimia haemolytica*, *Histophilus somni* og *Trueperella pyogenes* har vi ikke utført. Uten BAL-prøver kan vi ikke fastslå en sikker sammenheng mellom bakterieforekomsten i øvre og i nedre luftveier, og vi kan derfor ikke vurdere terapianbefalinger på grunnlag av våre resultater.

Konklusjon

Studiet vårt viser at bakteriefloraen i øvre luftveier hos kalver fra to framføringsbesetninger på Østlandet var sammensatt av mange bakteriearter. En av de bakteriene som ble påvist hos flest kalver med dyp og vanlig nesevaber var *P. multocida*. Vi kunne ikke påvise noen sammenheng mellom høy forekomst av denne bakterien og klinisk sykdom hos kalvene.

Resistensundersøkelsene våre viser at *P. multocida* stort sett er sensitive for de undersøkte antibiotikatyperne. Ingen av bakteriene var resistente mot verken benzylpenicillin, trimetoprim/sulfametoksazol, tetrasykliner, enrofloksacin eller florfenikol. Det var likevel funn av resistente og intermediære bakterier for streptocillin og amoksicillin med klavulansyre. Dette er i tråd med tidligere funn og anbefalinger om å bruke benzylpenicillin ved behandling av luftveislidelser hos storfe.

Når det gjelder diagnostiske metoder ser det ut som at vanlig nesevaber og dyp nesevaber gir tilnærmet samme svar når det gjelder funn av *P. multocida*. Den største ulempen med den vanlige nesevaberen er at den gir mer forurensning ved dyrkning enn den dype nesevaberen. Den dype nesevaberen krever sedasjon av dyret noe som er en belastning for dyret og mer tidkrevende for veterinæren. Det hadde vært nyttig å undersøke om disse funnene også samsvarte med BAL-prøver. For å konkludere med om resultatene våre er gjeldende for kalver i hele Norge trengs det ytterligere studier.

Takk til bidragsytene

Vi ønsker å takke Maria Stokstad for veiledning gjennom hele skriveprosessen, i tillegg til planlegging og utførelse av prøveuttak. Vi ønsker også å takke Ane Mohn Bjelland for å ha utført laboratorieanalysene, samt for hjelp til bearbeiding av mye data. Vi vil også takke Thea Blystad Klem for bearbeiding av en rekke data, samt god hjelp til planlegging og utførelse av prøveuttak. Takk til Lars Petter Overn Løken for utvalg av besetninger i hans praksisområde. Til slutt vil vi takke bøndene Jonas Ring og Edvard Løken for at de ville stille sine besetninger til disposisjon i forsøket.

Summary

Title: Occurrence, relevance and antibiotic resistance of *Pasteurella multocida* in the upper respiratory tract of calves

Authors: Margareth Baardset Kroknes and Marlen Strømsøy Langedal

Supervisor: Maria Stokstad, Department of Production Animal Medicine (PRODMED)

Ane Mohn Bjelland, Department of Paraclinical Sciences

Thea Blystad Klem, The Veterinary Institute

Respiratory disorders represent the most common cause of illness in norwegian calves. It has major impacts on farmers' economy and is a great problem for animal welfare. Moreover, it is the most common cause of antibiotic treatment of cattle in Norway.

In our study, we have detected which bacterias that can be found in the upper respiratory tract of 60 selected calves on two farms in the eastern part of Norway. The collection of samples

was done on two different dates, and we only visit the farms once. We performed a clinical exam on the calves, and two types of nasal swabs were collected from each calf.

The three most common bacterias detected were *Pasteurella multocida*, Enterococci and Coagulase-Negative Streptococci. *P. multocida* is the only one of these three that have been found to cause respiratory tract infections in previous studies.

P. multocida was tested for its sensitivity to a variety of antibiotics. Resistance was detected to Streptocillin and Amoxicillin with Clavulanic acid. The bacterias were found to be sensitive to Benzylpenicillin, in addition to Trimethoprim Sulfamethoxazole, Tetracycline, Enrofloxacin and Florfenicol in all samples.

To investigate whether *P. multocida* can cause clinical respiratory symptoms in calves, we compared the clinical status of the calves with the relative abundance of *P. multocida* in the bacterial culture. We could not detect any association between cultures dominated by this bacteria, and the presence of clinical disease.

In order to investigate whether the superficial nasal swab is an equally good diagnostic method as the deep nasal swab, these two methods were compared with regard to the presence of *P. multocida*. In conclusion, these two methods yielded approximately the same results.

In this study, we found that *P. multocida* is commonly occurring in both healthy and sick calves. There was no significant difference in the occurrence of this bacteria in superficial and deep nasal swabs. Furthermore, *P. multocida* was found to be sensitive to Benzylpenicillin in all samples. No correlation was found between clinical disease and high prevalence of *P. multocida*.

Referanser

1. Stokstad M, Klem TB, Myrmel M, Oma VS, Toftaker I, Osteras O, et al. Using Biosecurity Measures to Combat Respiratory Disease in Cattle: The Norwegian Control Program for Bovine Respiratory Syncytial Virus and Bovine Coronavirus. *Front Vet Sci.* 2020;7:167.
2. Animalia. Årsmelding Storfekjøttkontrollen 2019. 2020 [Available from: <https://www.animalia.no/globalassets/storfekjottkontrollen-dokumenter/arsmelding-storfe-2019.pdf>].
3. FRCVS PSBDSDCD. Respiratory Disease in Dairy and Beef Rearer Units NADIS animal health skills2009 [Available from: <https://www.nadis.org.uk/disease-a-z/cattle/calf-management/respiratory-disease-in-dairy-and-beef-rearer-units/>].
4. Klem TB, Kjaestad HP, Kummen E, Holen H, Stokstad M. Bovine respiratory syncytial virus outbreak reduced bulls' weight gain and feed conversion for eight months in a Norwegian beef herd. *Acta Vet Scand.* 2016;58:8.
5. Toftaker I, Holmoy I, Nodtvedt A, Osteras O, Stokstad M. A cohort study of the effect of winter dysentery on herd-level milk production. *J Dairy Sci.* 2017;100(8):6483-93.
6. Animalia. Luftveisinfeksjon hos storfe – årsaker og forebyggende tiltak 2014 [Available from: https://www.animalia.no/contentassets/8c7e093049bb4caaac1a3ab13087d4f0/luftveisbrosjyre_2014.pdf].
7. Gulliksen SM, Lie KI, Loken T, Osteras O. Calf mortality in Norwegian dairy herds. *J Dairy Sci.* 2009;92(6):2782-95.
8. Gulliksen SM, Jor E, Lie KI, Loken T, Akerstedt J, Osteras O. Respiratory infections in Norwegian dairy calves. *J Dairy Sci.* 2009;92(10):5139-46.
9. Hofshagen M SS, Gjevne AG, Torp M.,. Surveillance Programmes 2017 – Summary of Results. : Veterinærinstituttet; 2018 [Available from: <https://www.vetinst.no/rapporter-og-publikasjoner/rapporter/2019/surveillance-programmes-summary-of-results-2018>].
10. Klem TB, Sjurseth SK, Sviland S, Gjerset B, Myrmel M, Stokstad M. Bovine respiratory syncytial virus in experimentally exposed and rechallenged calves; viral shedding related to clinical signs and the potential for transmission. *BMC Vet Res.* 2019;15(1):156.
11. Mattilsynet. Bovin respiratorisk syncytial virus (BRSV) 2014 [Available from: https://www.mattilsynet.no/dyr_og_dyrehold/dyrehelse/dyresykdommer/brsv/].
12. Saif LJ. Bovine respiratory coronavirus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2010;26(2):349-64.

13. Autio T, Pohjanvirta T, Holopainen R, Rikula U, Pentikainen J, Huovilainen A, et al. Etiology of respiratory disease in non-vaccinated, non-medicated calves in rearing herds. *Vet Microbiol.* 2007;119(2-4):256-65.
14. Dabo SM, Taylor JD, Confer AW. *Pasteurella multocida* and bovine respiratory disease. *Animal Health Research Reviews.* 2007;8(2):129-50.
15. Timsit E, Hallewell J, Booker C, Tison N, Amat S, Alexander TW. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, and *Histophilus somni* isolated from the lower respiratory tract of healthy feedlot cattle and those diagnosed with bovine respiratory disease. *Vet Microbiol.* 2017;208:118-25.
16. Nikunen S, Hartel H, Orro T, Neuvonen E, Tanskanen R, Kivela SL, et al. Association of bovine respiratory disease with clinical status and acute phase proteins in calves. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2007;30(3):143-51.
17. Klem TB, Rimstad E, Stokstad M. Occurrence and phylogenetic analysis of bovine respiratory syncytial virus in outbreaks of respiratory disease in Norway. *BMC Vet Res.* 2014;10:15.
18. MSD MANUAL Veterinary manual. Enzootic Pneumonia of Calves and Shipping Fever Pneumonia 2015 [Available from: <https://www.msdsvetmanual.com/respiratory-system/respiratory-diseases-of-cattle/enzootic-pneumonia-of-calves-and-shipping-fever-pneumonia>].
19. Maunsell FP, Woolums AR, Francoz D, Rosenbusch RF, Step DL, Wilson DJ, et al. *Mycoplasma bovis* infections in cattle. *J Vet Intern Med.* 2011;25(4):772-83.
20. Murray GM, O'Neill RG, More SJ, McElroy MC, Earley B, Cassidy JP. Evolving views on bovine respiratory disease: An appraisal of selected control measures - Part 2. *Vet J.* 2016;217:78-82.
21. Fertner M, Toft N, Martin HL, Boklund A. A register-based study of the antimicrobial usage in Danish veal calves and young bulls. *Prev Vet Med.* 2016;131:41-7.
22. Maria Stokstad. Respiratorisk syncytialvirus (BRSV) og coronavirus (BCoV) hos storfe BUSKAP2016 [Available from: [https://www.buskap.no/journal/2016/8/m-335/Respiratorisk_syncytialvirus_\(BRSV\)_og_coronavirus_\(BCoV\)_hos_storfe](https://www.buskap.no/journal/2016/8/m-335/Respiratorisk_syncytialvirus_(BRSV)_og_coronavirus_(BCoV)_hos_storfe)].
23. Doyle D, Credille B, Lehenbauer TW, Berghaus R, Aly SS, Champagne J, et al. Agreement Among 4 Sampling Methods to Identify Respiratory Pathogens in Dairy Calves with Acute Bovine Respiratory Disease. *J Vet Intern Med.* 2017;31(3):954-9.
24. Van Driessche L, Valgaeren BR, Gille L, Boyen F, Ducatelle R, Haesebrouck F, et al. A Deep Nasopharyngeal Swab Versus Nonendoscopic Bronchoalveolar Lavage for Isolation of Bacterial Pathogens from Preweaned Calves With Respiratory Disease. *J Vet Intern Med.* 2017;31(3):946-53.

25. Godinho KS, Sarasola P, Renoult E, Tilt N, Keane S, Windsor GD, et al. Use of deep nasopharyngeal swabs as a predictive diagnostic method for natural respiratory infections in calves. *Vet Rec.* 2007;160(1):22-5.
26. Statens legemiddelverk. Terapi anbefaling: Bruk av antibakterielle midler til produksjonsdyr 2012 [Available from: https://legemiddelverket.no/Documents/Veterin%C3%A6rmedisin/Terapi%20anbefaling/Terapi%20anbefaling_bruk%20av%20antibakterielle%20midler%20til%20produks.pdf].
27. Veterinærinstituttet. NORM NORM VET 2017 - Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway. 2017.
28. Zhang M, Hill JE, Fernando C, Alexander TW, Timsit E, van der Meer F, et al. Respiratory viruses identified in western Canadian beef cattle by metagenomic sequencing and their association with bovine respiratory disease. *Transbound Emerg Dis.* 2019;66(3):1379-86.
29. Blanco-Viera FJ, Trigo FJ, Jaramillo-Meza L, Aguilar-Romero F. Serotypes of *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica* isolated from pneumonic lesions in cattle and sheep from Mexico. *Rev Latinoam Microbiol.* 1995;37(2):121-6
30. Ewers C, Lubke-Becker A, Bethe A, Kiebling S, Filter M, Wieler LH. Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status. *Vet Microbiol.* 2006;114(3-4):304-17
31. Kumar AA, Shivachandra SB, Biswas A, Singh VP, Singh VP, Srivastava SK. Prevalent serotypes of *Pasteurella multocida* isolated from different animal and avian species in India. *Vet Res Commun.* 2004;28(8):657-67.
32. Dabo SM, Confer AW, Murphy GL. Outer membrane proteins of bovine *Pasteurella multocida* serogroup A isolates. *Vet Microbiol.* 1997;54(2):167-83.

Vedlegg

Metodekompendiet

Rådata besetning A

Rådata besetning B



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Postboks 5003
NO-1432 Ås
67 23 00 00
www.nmbu.no