

Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper, idisslarmedicin, SLU



Sveriges lantbruksuniversitet

Luftvägsviroser hos förmedlingskalvar

Malin Johansson

Uppsala

2010

Luftvägsviroser hos förmedlingskalvar

Malin Johansson

Handledare: Madeleine Tråvén, Institutionen för kliniska vetenskaper, idisslarmedicin, SLU

Biträdande handledare: Anna Lundén, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU

Examinator: Bernt Jones, Institutionen för kliniska vetenskaper

Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2010

Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Institutionen för kliniska vetenskaper, idisslarmedicin, SLU

Kurskod: EX0239, Nivå X, 30hp

Nyckelord: Kalv, luftvägsinfektion, virus, BCoV, BAV-3, BRSV, BPIV-3, antikropp, ELISA

Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>

ISSN 1652-8697

Examensarbete 2011:17

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

SAMMANFATTNING

Utbrott med pneumoni i kalvbesättningar är förenat med både ökade arbetsinsatser och produktionsförluster för djurägaren. Av den anledningen är det av intresse att hålla sjukdomsutbrotten nere, något som ibland är lättare sagt än gjort då många olika infektiösa samspekar med såväl miljöfaktorer som kalvens egen fysiologi vid etablering och spridning av luftvägsinfektioner.

I den här studien ingick 30 förmedlingskalvar av mjölkkras som ursprungligen köptes in från 10 olika besättningar för att ingå i ett försök på Sveriges lantbruksuniversitet (SLU) i Uppsala. Strax efter att kalvarna anlät till stallokalerna insjuknade majoriteten av dem med varierande grad av luftvägssymptom, lös avföring/diarré och nedsatt allmäntillstånd, något som är mycket vanligt då kalvar från olika besättningar integreras.

De kalvar som visade påtagliga symptom på luftvägsinfektion behandlades med penicillin-prokain. Blodprov togs från alla individer i samband med ankomst samt 19-34 dagar senare strax innan avlivning. Blodproven analyserades med indirekt ELISA avseende antikroppar mot fyra virus som är vanligt förekommande i samband med utbrott av kalvpneumoni, nämligen BRSV (bovint respiratoriskt syncytialt virus), BCV (bovint coronavirus), BAV-3 (bovint adenovirus typ 3) och BPIV-3 (bovint parainfluenzavirus typ 3).

Varken BCV eller BPIV-3 hade någon avgörande roll i sjukdomsförloppet baserat på serumanalyserna. Inte heller kunde något aktivt infektiösa utbrott påvisas för BRSV men däremot tydde resultaten på att kalvar från två av besättningarna hade infekterats med BRSV innan de köptes in till projektet. Kalvarna från de här besättningarna uppvisade en markant högre behandlingsfrekvens än kalvar från de andra besättningarna, något som kan sammankopplas med virusets förmåga att på ett negativt sätt interagera med immunförsvaret, slemhinnor och cilierat epitel hos drabbade individer. Följden blir en generellt nedsatt motståndskraft mot sekundära patogener. Elva kalvar uppvisade en tydlig serokonversion mot BAV-3, vilket tyder på att denna infektion cirkulerade bland kalvarna under försökets gång.

SUMMARY

Outbreaks of pneumonia in calf groups are associated with both increased work load and production losses for the animal owner. For this reason it is of great interest to keep the incidence of infection low, something that can be easier said than done since many different pathogens interact with environmental factors as well as the physiology of the calf when it comes to the establishment and propagation of respiratory infections.

This study involved 30 dairy calves purchased from 10 different herds to be part of a trial at the Swedish University of Agricultural Sciences (SLU) in Uppsala. Shortly after their arrival to SLU, the majority fell ill with respiratory symptoms, loose feces/diarrhea and a decline in general condition, something that is very common when calves of different origins are co-mingled in this manner.

Calves with moderate to severe symptoms of respiratory disease were treated with penicillin-procaine. Blood samples were collected from all individuals at the point of arrival and then again 19-34 days later before the calves were euthanized. The blood samples were analyzed with indirect ELISA for antibody levels to four viral pathogens that are commonly associated with enzootic pneumonia, namely BRSV (bovine respiratory syncytial virus), BCV (bovine coronavirus), BAV-3 (bovine adenovirus type 3) and BPIV-3 (bovine parainfluenza virus type 3.)

Neither BCV nor BPIV-3 seemed to play an important role in this specific outbreak based on the serum-analyses. However, although there were no evidence of any active and propagating infection of BRSV in the calf group the results suggested that calves from two of the ten herds had been infected with BRSV before they were purchased. The individuals from these particular farms showed a markedly higher treatment-frequency compared to calves from the other farms. This is something that can be traced back to the virus ability to interact in a negative way with the cellular immune system, mucus membranes and ciliated epithelia resulting in a reduced general resistance to pathogens amongst affected calves. Eleven calves showed a marked increase, seroconversion, in antibodies directed against BAV-3, indicating an active BAV-3 infection spreading among the calves during the observation period.

SYFTE

Studiens syfte var att analysera blodserum från 30 kalvar, inköpta från 10 olika besättningar, med hjälp av indirekt enzyme linked immunosorbant assay (indirekt ELISA) avseende antikropps nivåer för några vanligt förekommande virala luftvägspatogener (BPIV-3, BAV-3, BCV och BRSV). Den bakomliggande orsaken till studien var att kalvarna strax efter ankomst till SLU insjuknade i luftvägssymptom och att vissa av dem fick kraftigare kliniska symptom än andra. Resultaten från de serologiska testerna jämfördes därför mot vilka ursprungsbesättningar kalvarna kom ifrån, samt vilka kalvar som blev så sjuka att de behövde behandlas för att undersöka om det fanns något samband mellan de olika parametrarna.

INLEDNING

Allteftersom kraven på nötköttsproduktionen har ökat och uppfödningen intensifierats har man även sett en ökning av luftvägsinfektioner hos kalvar (Roy, 1990). När luftvägsinfektioner bryter ut i kalvgrupper kan de sällan spåras till ett specifikt infektiösaämne eftersom sjukdomsförloppet är mycket komplext med samspel mellan virus, bakterier och mykoplasmer (Bengtsson et al. 2000, Roy, 1990). I en del besättningar kan en permanent cirkulerande infektion med enzootisk karaktär etableras, något som kan vara mycket svårt att få bukt med. Ordet 'enzootisk' definierar sjukdomsutbrottet som ihållande och oberoende av kontinuerlig tillförsel av patogener utifrån för att bibehållas i en population (Bengtsson et al. 2000).

Från första stund exponeras kalvar för infektiösa agens i sin omgivning. I en ladugård kan det finnas upp till 10^6 bakterieorganismer per kubikmeter luft (Ames, 1997) och en kalv är beroende av välfungerande cellulära och mekaniska barriärer samt cirkulerande och slemhinnebundna immunoglobuliner för att hålla infektioner i schack. En kalv är immunokompetent redan från födseln men under de första månaderna, innan det aktiva immunförsvaret hunnit utvecklas till fullo, är den beroende av de antikroppar som överförs passivt via moderns råmjölk (Kiorpes et al. 1988).

Luftvägssjukdomar anses vara den vanligaste typen av infektion hos kalvar som befinner sig i system med hög beläggning (Van Donkersgoed et al. 1993, Martin et al. 1989). Viral pneumoni ses oftast hos kalvar som nått en ålder av 1-5 månaders (Van Donkersgoed et al. 1993) men har rapporterats hos kalvar från en veckas till ett års ålder (Kahn et al. 2009, Kiorpes et al. 1988). Man brukar tala om ett infektionsfönster som uppstår då de passivt överförda antikropparna kraftigt minskat i kalvens blodbanor och det aktiva immunförsvaret ej ännu nått sin maximala kapacitet. I samband med detta kan ibland en infektionstopp i kalvbesättningen observeras (Kahn et al. 2009). Avtagande passiv immunitet, vilket brukar ses runt 2 månaders ålder, är med andra ord korrelerat till en ökad pneumoni-förekomst bland kalvar (Kiorpes et al. 1988). Enligt Van Donkersgoed et al., 1993, kan morbiditeten vid kraftiga utbrott ligga på 80-90 %, men mortaliteten når sällan över 5 %. Undantag finns dock då

dödligheten kan vara hög, ibland upp till 20 % eller till och med ännu högre (Kahn et al. 2009). I sådana fall har de primära virusinfektionerna ofta komplicerats av sekundärinfektioner (Roy, 1990).

Viral pneumoni hos ungt boskap yttrar sig som en infektiös inflammation i lungvävnaden med subkliniskt, kroniskt eller akut sjukdomsförlopp (Kiorpes et al. 1988). Den kliniska bilden kan variera från symptomfrihet till kraftig sjukdom (Verhoeff et al. 1984) med feber, nosflöde, hosta, tårflöde, ökad andningsfrekvens och försämrad tillväxt som följd (Ames, 1997). Diarré är i många fall också associerat med tillståndet (Roy, 1990). Vid lungauskultation av långt framskridna fall kan man ofta höra ökade andningsljud, vinanden och knäppanden, samt områden med nedsatta lungljud beroende på förtätning av lungvävnaden, så kallad konsolidering. Hos de individer som dör eller avlivas till följd av pneumoni blir den patologiska diagnosen vanligen bronkopneumoni med kranioventral utbredning (Ames, 1997).

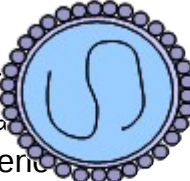
Man har i flertalet försök infekterat kalvar med specifika luftvägspatogener utan att lyckats framkalla några kliniska symptom (Valarcher et al. 2006). Detta stödjer teorin kring komplexiteten hos luftvägssjukdomar och det faktum att det inte är ett enskilt agens som är den bakomliggande orsaken utan ett samspel mellan flera patogener samt kalvens fysiologi och närmiljö (Van Donkersgoed et al. 1993). Det bör dock hållas i åtanke att utformning av försöksmodeller inte är enkelt och att brister i dessa också kan ligga till grunden för uteblivna kliniska symptom.

LITTERATURSTUDIE

Virus

De virus som i litteraturen brukar associeras med kalvpneumoni är BPIV-3 (bovint parainfluensavirus typ 3), BVDV (bovint virusdiarré-virus), BRSV (bovint respiratoriskt syncytialt virus), BAV (bovint adenovirus), BCV (bovint coronavirus), BHV-1 (bovint herpesvirus typ 1) och bovint rhinovirus (Ames, 1997), varav de fem första har påvisats i Sverige (Bengtsson et al. 2000). Då BVDV enligt statens veterinärmedicinska anstalt (Carlsson et al. 2009) i dagsläget anses i det närmaste utrotat i Sverige (2009 var 0,1 % eller färre av Sveriges besättningar infekterade) har inte det här viruset inkluderats i den serologiska undersökningen av kalvarna i studien.

BRSV- bovint respiratoriskt syncytialt virus



Genus	Pneumovirus
Familj	Paramyxoviridae
Genom	Icke-segmenterat, linjärt, enkelsträngat RNA
Nukleokapsid	Helikal symmetri, omges av ett lipidhölje
Virion:	Pleomorf, 150 – 300 nm

(Quinn et al. 2002)

BRSV (figur 1) är antigent närbesläktat med RSV hos får/get (ovint/capripneumonivirus, ORSV/CRSV), fågel (aviärt respiratoriskt syncytialt virus, ARSV) och människa (humant respiratoriskt syncytialt virus, HRSV). Sharma et al. (1990) visade enligt Elvander et al (1996) att får experimentellt kan infekteras med BRSV och att kalvar kan infekteras med HRSV.

BRSV är spritt över hela världen och har sedan slutet av 1960-talet, då det först isolerades efter ett utbrott i Schweiz, klassats som ett luftvägspatogen med hög morbiditet och låg mortalitet (Roy, 1990). Utbrotten kan i somliga fall anta epidemisk karaktär, vilket bland annat observerades i Japan på 1970-talet då över 40 000 nötkreatur insjuknade (Baker et al. 1997). Överföringen av viruspartiklar mellan individer sker via aerosoler eller genom direktkontakt, varefter virusreplikeringen initieras i kalvens luftvägsepitel (Quinn et al. 2002). Eftersom BRSV verkar cytotolytiskt på epitelceller kan en kraftig inflammation i övre och nedre luftvägarna uppstå i samband med infektion (Valarcher et al. 2006).


Kliniska symptom brukar kunna observeras först 2-8 dagar efter inokulering (Dinter et al. 1990). BRSV anses vara ett så kallat immunosuppressivt virus, vilket tillsammans med ansamling av cellulärt

debris och exudat i luftvägarna främjar sekundär bakterietillväxt och ett allvarligare sjukdomsförlopp (Quinn et al. 2002).

Själva viruspartikeln är känslig och tål exempelvis inte nedfrysning eller längre transporter och förvaring. Exakt hur och var viruset överlever i en besättning mellan sjukdomsutbrott är inte helt klarlagt men subkliniskt och även latent infekterade djur har tidigare misstänkts som tänkbara reservoarer då viruspartiklarna inte klarar sig länge fritt i miljön (Elvander, 1996). I en studie av Larsen et al (2000) ifrågasätts dock de här teorierna då virussekvensering visade att viruset var identiskt inom en besättning vid ett utbrott men varierade mellan olika utbrott i samma besättning. Baserat på de här resultaten drogs slutsatsen att det troligtvis skedde en nyintroduktion av virus i samband med nya utbrott snarare än att latent infekterade reaktiverades eller att kalvarna smittades av subkliniskt infekterade djur.

En primär infektion med BRSV ger ett humoralt antikroppssvar inom 8-10 dagar, då i form av IgM- och IgA- antikropsproduktion. En höjning av IgG-antikroppar kan vanligen detekteras först efter 2-3 veckor. De maternala antikroppar som huvudsakligen återfinns i blodbanorna hos kalvar är av typen IgG och har en halveringstid på ca 23 dagar (Elvander, 1996). Huruvida maternala antikroppar skyddar mot infektion med BRSV är debatterat. Key et al. (1984) konstaterade i en studie att kalvar med mycket varierande nivåer av antikropstitrar var mottagliga och att serumantikroppar därmed inte skulle ge något adekvat skydd mot infektion. Valarcher et al. (2006), å andra sidan menar att de i alla fall kan ge delvis skydd mot infektion efter undersökningar på både naturligt och experimentellt infekterade djur.

BCV – *bovint coronavirus*



Genus:	Coronavirus
Familj:	Coronaviridae
Genom:	Linjärt, enkelsträngat RNA
Nukleokapsid:	Helikal symmetri, omges av ett lipidhölje
Virion:	Pleomorf (skiftande utseende), 120-160 nm

(Quinn et al. 2002)

BCV (figur 2) är vanligt förekommande världen över och anses idag vara en viktig källa till produktionsförluster inom kött- och mjölkindustrin (Valarcher et al. 2006). Utöver att vara den bakomliggande orsaken till respiratoriska och intestinala störningar hos kalvar är BCV även ett känt agens i samband med shipping fever hos ungdjur och vinterdysenteri hos vuxen nötboskap (Quinn et al. 2002). I en studie utförd av O'Connor et al., 2001, i Kanada där BCV- prevalensen är hög precis som i Sverige, var 90

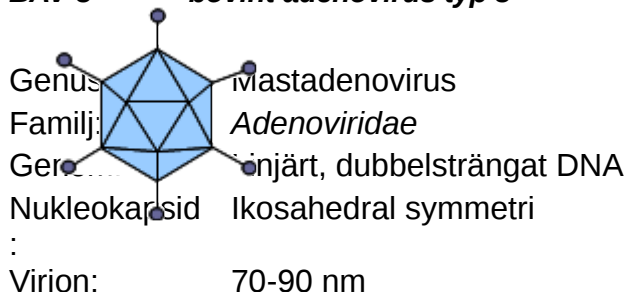
% av förmedlingskalvarna (vikt 247 ± 32 kg) som användes i försöket seropositiva vid ankomst.

Överföringssättet för viruset är fekalt-oralt men aerosolsmitta kan också förekomma (Radostit, 2007). Väl inne i värdjuret sker replikeringen framförallt i luftvägsepitel samt i enterocyter i distala tunntarmen och i colon med symptom från respektive organsystem som följd (Valarcher et al. 2006). Symptomen från luftvägarna kan vara milda om inte sekundärinfektioner tillstöter, vilket också demonstrerades i ett försök med experimentellt infekterade kalvar som utfördes av McNulty et al. (1996). Det kan dock inte utesluta att det finns andra virusstammar av bovina coronavirus som är kapabla att framkalla kraftigare symptom än de två isolat som användes i det försöket. Detta behandlas i en studie av Storz et al (2000) där sammanlagt 225 kastrerade handjur 4-8 månader gamla undersöktes avseende bakomliggande agens till shipping fever. 199 av djuren blev sjuka under försöksperioden, somliga med mycket kraftiga symptom som rektaltemperatur > 40 grader, sekret från nos och ögon samt andra tecken på luftvägssjukdom. Hos 170 av de sjuka djuren isolerades BCV.

I de fall där det gastrointestinala systemet drabbas kan virusreplikering i tarmslemhinnan ge upphov till kraftig diarré och påverkat allmäntillstånd. Då enterocyterna dör minskar den absorberande förmågan i tarmen och följden av detta kan bli dehydrering, acidosis och slutligen död om inte behandling sätts in i tid (Quinn et al. 2002). Hos vilda idisslare med diarré har coronavirus isolerats och det är numera känt att de inte bara kan bära på viruset utan att det även rör sig om virusstammar som kan infektera tamboskap (Radostits, 2007).

Den kliniska symptomdebuten hos kalv sker vanligen mellan 2 och 16 veckors ålder (Radostits, 2007). BCV- infektioner associeras över lag med låg mortalitet och hög morbiditet. Infektionen sprider sig snabbt till alla mottagliga djur inom en besättning, i en experimentell studie gick det exempelvis inte att förhindra att BCV spreds från de infekterade kalvarna till kontrollgruppen (Ohlson, 2010).

BAV-3 – *bovint adenovirus typ 3*



(Quinn et al. 2002)

BAV-3 (fig 3) isolerades för första gången 1965 från konjunktivalsvabb hos ett kliniskt friskt djur i England. Idag, 45 år senare, finns det 10

dokumenterade serotyper av BAV (Horner et al., 1989), vilka delas in i två undergrupper; I (BAV1, 2, 3 och 9) och II (BAV 4, 5, 6, 7, 8 och 10). Efter virusets upptäckt 1965 har det isolerats från såväl friska djur som hos djur med respiratoriska eller enteriska symptom (Mittal et al. 1995).

BAV finns över hela världen men vilken serotyp som dominerar skiljer sig mellan länder. I serologiska undersökningar har det visat sig att det kan föreligga hög incidens av ett specifikt BAV vid ett tillfälle men att serotypen helt plötsligt kan ha ersatts av en annan vid påföljande undersökningar i samma region (Dinter et al. 1990).

Viruspartiklarna är stabila i miljön och kan under bra förhållanden klara sig i många veckor utanför sitt värdjur (Quinn et al. 2002). Akut infekterade djur får pneumoenteriska symptom och utsöndrar virus via sekret från nos och konjunktiva samt via avföring och urin. Smitta sker fekalt-oralt eller via direktkontakt och beroende på infektionsväg ligger inkubationsperioden vanligen på 7 till 10 dagar. Den klassiska infektionstiden hos kalv är vid 3-4 veckor ålder (Dinter et al. 1990).

Hos kalvar har associationen mellan BAV-3 och respiratorisk sjukdom fastställts i flertalet försök, men graden av kliniska symptom har varierat mycket mellan olika undersökningar. I ett försök av Ide et al. (1969) inokulerades 8 kalvar med BAV-3 och 10 kalvar med BAV-1. Ingen av dessa kalvar utvecklade några respiratoriska symptom. Den enda följden blev en kortvarig och mild höjning av rektaltemperatur som ibland åtföljdes av partiell anorexi. I samband med resultatpresentationen lades det dock tyngd vid att det vid den här typen av försök är svårt att fastställa en lagom stor infektionsdos samt att efterlikna kalvarnas naturliga miljö och generella levnadsförhållanden. I en annan studie utförd av Lehmkuhl et al., 1975, inokulerades fyra kalvar med BAV-3 intratrachealt. De här kalvarna uppvisade efter inokulering tydliga kliniska symptom i form av en bifasisk febertopp med rektaltemperaturer upp emot 41 °C, hyperpné, dyspné och partiell anorexi. BAV-3 isolerades i samband med den akuta sjukdomsfasen från nössvabbar varför det kunde säkerställas att det verkligen var BAV-3 som gett upphov till symptomen.

Det troliga är att en naturlig infektion med BAV-3 många gånger förlöper subkliniskt eller med milda kliniska symptom då majoriteten av vuxna nötkreatur har antikroppar mot BAV-3. Efter en virusinfektionen kan dock sekundära patogener etablera sig och ge upphov till gravare symptom (Mittal et al. 1995).

BPIV-3 – bovint parainfluensavirus typ 3

Genus	Respirovirus
Familj	Paramyxoviridae
Genom	Linjärt, dubbelsträngat DNA
Nukleokapsid	Helikal symmetri, omges av ett lipidhölje



Virion: Pleomorf 150-200 nm

(Quinn et al. 2002)

BPIV-3 (figur 4) är liksom tidigare nämnda virus ubiquitärt (Härtel et al. 2004) och vanligt förekommande över hela världen, något som yttrar sig som en generellt hög serumantikroppstiter hos vuxna nötkreatur (Valarcher et al. 2006). I första hand associeras viruset med milda respiratoriska infektioner hos kalvar som i de fall där sjukdomen inte kompliceras av sekundära infektioner sällan leder till döden (Kapil et al. 1997). Ställt i förhållande till t.ex. BRSV anses BPIV-3 vara en "mildare" typ av virus men ändå en viktig patogen i samband med kalvpneumoni (Valarcher et al. 2006).

Predilektionsstället för BPIV-3 är cilierat respiratoriskt epitel i luftvägarna, samt alveolärt epitel och makrofager (Kapil et al. 1997). I de fall där viremi uppstår kan viruset även replikera sig i monocyter ute i blodbanorna. BPIV-3 anses ha immunosupprimerande effekt på leukocyter genom att minska den fagocyterande förmågan hos alveolarcellsmakrofager och inhibera monocytproliferation. Utöver detta påverkas även kalvens mukociliära system i luftvägarna negativt med följden att clearance minskar och att sekundära patogener därmed lättare kan få fäste (Valarcher et al. 2006).

Infektionen förlöper i många fall subkliniskt eller med mycket milda kliniska symptom, som nämnt ovan. Enligt Jolly et al., 1965, finns det dock flertalet väldokumenterade bevis på att BPIV-3 kan orsaka bronkiolit och lunginflammation hos kalv, särskilt då kalvarna är extra känsliga för infektioner som exempelvis i samband med för dåligt råmjölksintag (Carrière, et al. 1983). Maternala antikroppar ger vanligen bra skydd i ca 2 månader varefter serumtitern successivt minskar och kalven blir mer mottaglig för viruset. Klinisk sjukdom är vanligast mellan 2 och 8 månaders ålder (Kapil et al. 1997) och i de fall där det rör sig om en okomplicerad infektion tillfrisknar oftast drabbade individer på 3-4 dagar (Murphy et al. 1999). Serokonversion brukar ses först 14 dagar efter inokulering (Carrière et al. 1983).

Viruset är troligen mest uppmärksammat för sin involvering i ett respiratoriskt syndrom hos boskap som kallas för shipping fever. Det är ett relativt vagt begrepp med flera bakomliggande agens i kombination med stressande påverkan som exempelvis långa transporter.

Sekundärinfektioner

Kopplingen mellan virusinfektioner och nedsatt motståndskraft mot andra i omgivningen förekommande patogener fastslogs redan i början av 1900-talet. Idag har immunosuppression i samband med vissa virusinfektioner härletts till exempelvis en direkt effekt av virusreplikering på lymfocytfunktionen, lösliga immunosupprimerande faktorer som släpps ut från infekterade celler, viral infektion av makrofager med påföljande

funktionsnedsättning hos dessa eller virusorsakad immunologisk obalans med överaktivitet hos regulatoriska T-celler (Rouse et al. 1986).

Exempel på immunosupprimerande virus är BRSV som sänker den proliferativa reaktiviteten hos blodlymfocyter (Keles et al. 1998) och BPIV-3 som påverkar alveolarmakrofagsfunktionen genom att inhibera fagosom-lyosom fusionen (Tizard, 2004). Det är inte alla typer av luftvägsvirus som verkar direkt immunosupprimerande men de kan ändå bana vägen för sekundära infektioner genom att påverka luftvägsclearance och mekaniska barriärer i värddjuret (Bengtsson et al. 2000). Cilierat epitel är ett predilektionsställe för många virus typer och skador på detta i samband med virusreplikering minskar kroppens förmåga att avlägsna bakteriepartiklar, döda celler och annat debris från luftvägarna (Kapil, S. et al. 1997). De exsudatansamlingar som blir följderna av detta utgör en utmärkt grogrund för bakterier och kan alltså bidra till att andra typer av mikroorganismer får fäste (Quinn et al. 2002).

De patogener som vanligen brukar associeras med sekundärinfektioner i samband med kalvpneumoni är bland annat *Mannheimia haemolytica*, *Pasturella multocida*, *Histophilus somnus*, *Actinomyces pyogenes* (tidigare *Corynebacterium pyogenes*) och *Mycoplasma* spp. Olika typer av Mykoplasmer har isolerats från kalvar med lunginflammation, däribland *M. dispar*, *M. bovis* och *M. bovirhinus*. De två förstnämnda typerna är troligtvis de vanligast förekommande (Divers et al, 2008).

Generellt brukar sekundära bakteriella inslag kopplat till virusinfektioner associeras med ett allvarigare och mer långdraget sjukdomsförlopp samt ökad mortalitet (Bengtsson et al. 2000).

Råmjölk och passiv immunitet

Idag är det allmänt känt att kalvar är beroende av passivt överförda antikroppar, immunoglobuliner, från moderns råmjölk för att bibehålla en god hälsa under de första levnadsveckorna (Roe, 1982). Nyfödda kalvar som inte får adekvata mängder råmjölk löper ökad risk att drabbas av infektioner av olika slag och det har även observerats att de, när de väl insjuknar, får mer grav symptom än kalvar med god passiv immunitet. Kalvar är immunologiskt kompetenta redan ifrån födseln men skyddande nivåer av endogena antikroppar brukar inte uppnås förrän efter ca en månad och maximala nivåer först efter 2-3 månader (Radostiits, 2007).

Den huvudsakliga antikroppstypen i kolostrum är IgG, men det förekommer även både IgA och IgM (Radostiits, 2007). Efter att kalven druckit råmjölk tas immunoglobulinerna upp i tarmen genom pinocytos och transporteras därefter vidare ut i cirkulationen. I tarmen är dock upptag av immunoglobuliner endast möjlig under en begränsad tid varefter absorptionen gradvis avtar – det talas om att "tarmen stängs". Då IgM är en stor molekyl i förhållande till IgA och IgG kommer absorptionen av IgM att upphöra först, något som brukar ske ca 16 timmar efter födseln. För IgA upphör upptaget runt 22 timmar efter födseln och för IgG efter ca 27 timmar (Roy, 1979). Vanligen är förmågan till antikropsabsorption helt

förlorad 24-36 timmar efter födseln men en markant minskning kan ses redan efter 8-12 timmar varför kalven bör få i sig tillräckliga mängder råmjölk inom den här tidsramen. Väl ute i blodbanorna kommer antikropparna att börja brytas ner och efter 2-6 månader är de så gott som försvunna (Radostits, 2007).

Hur mycket immunoglobuliner råmjölk innehåller och hur stora volymer råmjölk en ko producerar varierar mycket från individ till individ. Ett starkt samband har dock konstaterat mellan immunoglobulinhalt och laktationsnummer hos nötkreatur där förstakalvare associerades med både lägst procentuell immunoglobulinhalt och lägst uppmätt råmjölksvolym. Maximal kolostral immunoglobulinmängd följer i stort kurvan för maximal mjölkproduktion där en topp brukar ses efter 3e-4e laktationen (Devery-Pocius et al. 1983).

Bevisligen har höga koncentrationer av serum-IgG samt IgA (dock inte IgM) hos kalvar vid 2,5 veckors ålder sammankopplats med en reducerad risk för luftvägsinfektion vid 2,5 månaders ålder (Roy, 1979).

Miljöfaktorer

Virala luftvägsinfektioners spridningsmönster i en kalvgrupp är inte enbart beroende av virulensen hos det aktuella infektionsämnet utan även av flertalet faktorer i kalvarnas närmiljö (Bengtsson et al. 2000). Ames, 1997, menar att luftfiltration, partikelavlägsnande och adhesionsmotstånd i luftvägarna, så kallade fysiska försvarsmekanismer, minskar hos kalvar som vistas i byggnader med felaktig temperatur, luftfuktighet eller höga nivåer av skadliga gaser. Vidare kan även det immunologiska skyddet påverkas negativt av bland annat näringsrelaterade brister, otillräcklig råmjölksgiva och stress i samband med exempelvis transport, överbeläggning eller omgrupperingar (Ames, 1997, Bengtsson et al. 2000).

Enligt Van der Fels-Klerx et al. (2000) har det fastställts att de viktigaste riskfaktorerna för lunginflammation hos kalvar 0-3 månader gamla är dålig luftcirkulation samt inköp av djur. Att just ventilationen väger tungt i samband med spridning av luftvägspatogener stöds av en studie utförd 1980 där det konstaterades att dödligheten hos kalvar upp till 12 veckors ålder låg på ca 0,7 % hos besättningar med god ventilation jämfört med 7 % hos besättningar med dåligt ventilerade byggnader (Roe, 1982). I slutna djurbyggnader ansamlas snabbt värme, fukt, damm, mikrober och skadliga gaser såsom koldioxid, metangas, ammoniak och vätesulfid om inte ventilationen fungerar tillfredsställande och ersätter den dåliga luften med frisk luft (Wathes et al. 1983, Roe, 1982). Det ska dock hållas i åtanke att för kraftig ventilering också kan vara skadligt då lufthastigheter över 0,3 m/s klassas som drag och leder till ökade värmeförluster (Wathes et al. 1983).

Kalvar är normalt relativt köldtåliga och klarar temperaturer även under fryspunkten så länge som de är skyddade från vind och regn, har torrt

underlag och bibehåller en god näringsmässig status (Roe, 1982). Den optimala temperaturen för en nyfödd kalv ligger dock på 10-25 °C och för en månadsgammal kalv på 0-25 °C (Wathes et al. 1983). Det finns inga direkta angivelser för en exakt optimal luftfuktighet men det har konstaterats att väldigt hög (över 90 %) eller väldigt låg (under 30 %) luftfuktighet har negativ inverkan på kalvhälsan (Wathes et al. 1983). Det optimala spannet för att minska överlevnaden hos patogener sågs vara mellan 55 och 75 % relativ luftfuktighet (Ames, 1997).

Att hålla unga djur inomhus är fördelaktigt då de skyddas från klimatextrema förhållanden, men som nämnts ovan är kraven på inhysningssystemen höga (Ames, 1997). Är byggnaderna underdimensionerade eller om miljön på annat vis inte är välanpassad till kalvens behov kan konsekvenserna bli allvarliga i form av kraftigt försämrad kalvhälsa.

Ekonomi

Det är svårt att sätta någon exakt siffra på hur stora de årliga ekonomiska förluster är som kan härledas till utbrott med pneumoni hos kalvar i våra svenska nötkreatursbesättningar. Mortaliteten är visserligen oftast låg men det finns andra kostnader relaterade till sjukdomsutbrott än de uppenbara som själva dödsfallen står för (Bengtsson et al. 2000). För de djur som tillfrisknar ses ofta en försämrad tillväxtkurva jämfört med individer som varit opåverkade under uppväxten, detta oberoende av om de blivit behandlade eller ej (Ames, 1997). Över lag anses sjukdomsförekomst hos unga kalvar få efterdyningar i negativ bemärkelse på parametrar såsom könsmognad, produktionsförmåga och den genomsnittliga livslängden i gruppen. Det här är speciellt viktigt att understryka i mjölkbesättningar där djuren måste bidra med några goda produktionsår för att kompensera för uppfödningsekostnaderna (Britney et al. 1984).

Morbiditeten i samband med luftvägsinfektioner är vanligen hög vilket innebär att de kan slå hårt mot besättningar på lång sikt, framför allt om de förekommer endemiskt. För djurägaren innebär utbrotten också ökade arbetsinsatser samt större utgifter avseende veterinär- och behandlingsekostnader (Bengtsson et al. 2000). Det lönar sig med andra ord att vara noggrann med planeringen av sina kalvgrupper, utformning av byggnader och den generella djurhanteringen i sin besättning.

MATERIAL OCH METOD

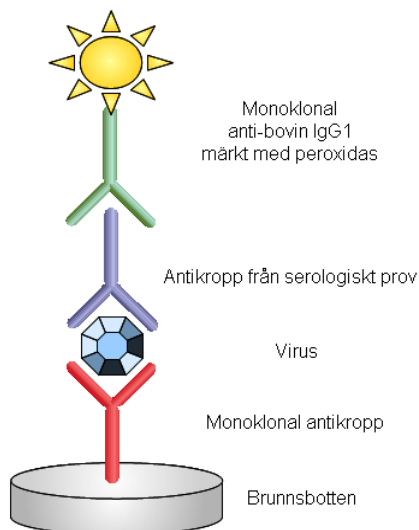
Kalvarna

30 kalvar köptes in från tio olika besättningar (A-J, se bilaga 2) i samband med ett försök och anlände till Sveriges lantbruksuniversitet, SLU, den 13/5-2009. Blodprov från alla individer togs dagen efter ankomst (14/5) och kalvarna delades in i grupper om 6 (se bilaga 1). Kalvarnas bakgrund avseende mödrar, inhysningssystem, sjukdomshistorik osv. är okänd, de

parametrar som finns dokumenterade är kalvnummer, besättningsnummer, födelsedatum samt vikt vid ankomst.

Efter det att kalvarna placerats i sina respektive grupper dröjde det inte länge innan gastrointestinala och respiratoriska störningar i form av lös avföring/diarré och hosta uppmärksammades. En del individer blev så pass allmänpåverkade att behandling i form av penicillinprokain (Penovet) fick sättas in (se bilaga 2). Kalvarna tillfrisknade så småningom och den 2/6-2009 inokulerades alla individer med lungmasklarver utom sex stycken som skulle fungera som kontroller.

Avlivning skedde i omgångar enligt en bestämd ordning. En kalv avlivades den 1/6-2009, 7 stycken den 3/6, 5/6, och 7/6 och slutligen 8 stycken den 16/6. Ett andra blodprov togs från samtliga kalvar samma dag som de avlivades.



Blodprovsanalyser

BAV-3

Bio-X Diagnostics Adenovirus 3 ELISA kit (BIO K 063) användes i försöket för att analysera förekomsten av antikroppar specifika för antigena determinanter hos Adenovirus typ 3. Detta är en indirekt ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, se figur 5) för test av blodserum eller mjölk. I det här fallet rörde det sig om blodserum taget från kalvarna vid två olika tillfällen, ett vid ankomst och ett strax innan avlivning.

Testet utfördes enligt instruktionen från tillverkaren. I de 96-brunnsplattor som medföljde kittet var brunnarna i kolumnerna med ojämna nummer (1, 3, 5, 7, 9 och 11) täckta med virusantigen medan brunnarna i kolumnerna med jämna nummer (2, 4, 6, 8, 10 och 12) enbart innehöll lysat av den cell-linje (bovina njurceller) som användes som substrat för att uppföröka viruset. På så vis fungerade raderna med jämna nummer som negativa kontroller genom att differentiera antikroppar riktade mot det specifika virusantigenet från antikroppar riktade mot cell-linjerna i virussubstratet. Den här metoden används för att minska antalet falskt positiva svar.

Utspänningsbuffert (dilution buffer) blandades till och serumproverna samt de positiva och negativa kontrollerna späddes med denna i förhållandet 10 µl/1 ml buffert (1:100) i varsitt glasrör. 100 µl av vardera spädning tillsattes sedan i brunnarna enligt anvisningarna. Plattorna inkuberades därefter i 37 °C i en timme.

Efter inkuberingen sköljdes brunnarna med tvättlösning tre gånger varefter ett konjugat (en peroxidasmärkt monoklonal anti-bovin IgG1-antikropp) tillsattes till brunnarna. Plattorna inkuberades en andra gång i 37 grader °C under en timme och brunnarna sköljdes sedan återigen tre gånger på samma sätt som tidigare. Slutligen tillsattes en indikatorlösning (väteperoxid + kromogen) till vardera brunn och plattorna inkuberades i rumstemperatur (ca 21 °C) under 10 minuter varefter stopplösning (svavelsyra) administrerades i brunnarna.

I de brunnar där bovina antikroppar fäst till virusantigen uppstod ett gult färgomslag som kunde avläsas av en spektrofotometer vid 450 nm våglängd.

BPIV-3

Precis som i den ovan beskrivna laborationen för BAV-3 analyserades förekomsten av serumantikroppar mot BPIV-3 med hjälp av en indirekt ELISA. Testet var utformat av SVANOVA Biotech Ab (SVANOVIR PIV3-Ab ELISA Kit) och den anvisning som medföljde stod till grunden för utförandet. Metoden var principiellt mycket lik den som beskrivits här ovan, förutom att virusantigenet är bundet direkt till plattan (utan monoklonal antikropp). Serumproverna analyserades i 96-brunnsplattor där brunnarna i kolumnerna med udda nummer var täckta med BPIV-3-antigen och brunnarna i kolumnerna med jämna nummer fungerade som kontroller.

PBS-Tween buffert blandades till och 100 µl av denna tillsattes sedan i de brunnar på 96-brunnsplattorna som skulle användas till serumproverna samt positiva och negativa kontroller. 4 µl av vardera serumprov samt kontrollerna tillfördes till brunnarna enligt exakt samma mönster som vid BAV-3-laborationen så att förhållandet 1:25 mellan prov och buffert erhöles. Plattorna inkuberades under en timmes tid i 37 grader °C.

Efter inkubering sköljdes brunnarna med PBS-Tween buffert tre gånger för att avlägsna obundet material. Efter sköljningen tillsattes konjugat (bovina monoklonala IgG-antikroppar konjugerade med peroxid) och plattorna inkuberades återigen en timme i 37 grader °C.

Tvättproceduren upprepades och efter detta tillfördes substratlösning innehållande H₂O₂ till vardera brunn. Plattorna inkuberades på nytt, den här gången i rumstemperatur i 10 minuter. Efter inkubering stoppades reaktionen med stopp-lösning (svavelsyra) och i brunnar innehållande serum med antikroppar riktade mot BPIV-3 skedde då ett gult färgomslag.

Slutligen avlästes optisk densitet i brunnarna med en spektrofotometer vid 450 nm våglängd.

ELISA-testerna för BCV och BRSV utfördes enligt samma princip med SVANOVIR® BCV-Ab ELISA-kit och SVANOVIR® BRSV-Ab ELISA-kit.

Beräkningar

De värden på optisk densitet (OD) som erhöles i samband med ELISA-testerna bearbetades enligt följande:

Beräkning av korrigerade värden

$(OD_{\text{korr}}): OD_{\text{serumprov}} - OD_{\text{kontroll}}$.

OD_{kontroll} brukar även benämnas "bakgrund".

Beräkning av Percent Positivity Values (PP)

Alla värden på OD_{korr} för serumproverna samt negativa kontroller (NegC) är relaterade till OD_{korr} hos de positiva kontrollerna enligt sambandet:

$PP = OD_{\text{korr}} \text{ för serumprov eller NegC} / OD_{\text{korr}} \text{ för Positiva kontroller} * 100$.
Värdet anges i procent.

Cutoff

Ett cutoff-värde är en bestämd PP-gräns för varje specifik analys där prover med värden som är lika stora eller högre än cutoff bedöms ha en signifikant höjning i antikropps nivå och därmed kan betraktas som positiva. Cutoff räknas alltså inte fram utan medföljer laborationsanvisningarna.

Cutoff för de olika analyserna:

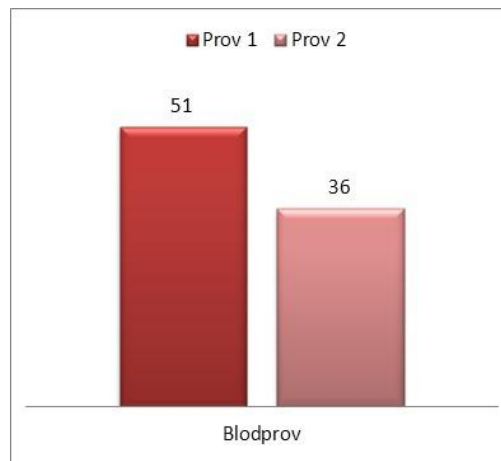
BCV, BPIV-3 och BRSV: $\geq 10 \%$

BAV-3: $\geq 14 \%$

RESULTAT

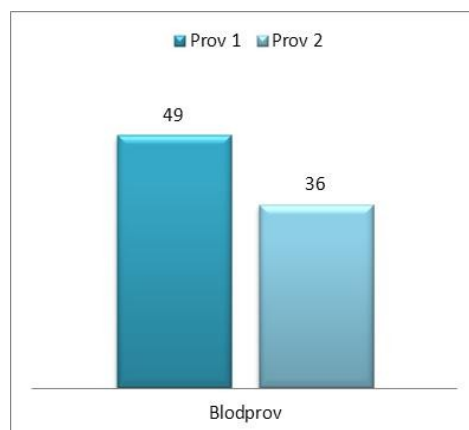
BCV

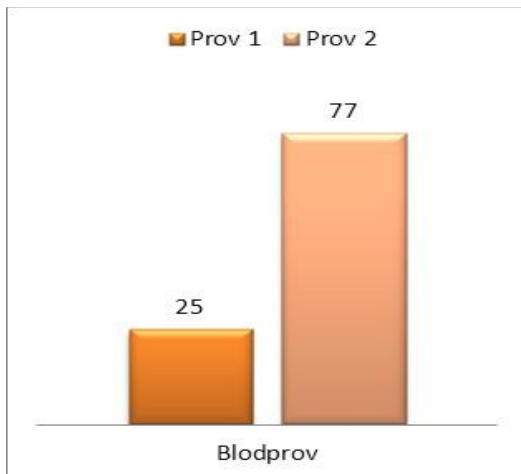
Inga av kalvarna hade ökade antikropps nivåer mot BCV vid det andra provtagningstillfället, utan sjunkande nivåer noterades hos samtliga individer. Hos kalvar från tre av besättningarna (B, C och E) låg värdena under cutoff vid både första och andra provtagningstillfället vilket kan tolkas som att de inte stött på smittan tidigare utan kommer från fria besättningar. I figur 6 illustreras förhållandet mellan antikropps nivåerna vid provtagningstillfälle 1 och 2.



BPIV-3

Hos alla kalvar utom en noterades en sjunkande antikropps nivå för BPIV-3. Den kalv som hade stigande antikropps nivå (från PP 53 till PP 127) var den enda som köptes in från besättning C varför ingen ytterligare information om antikroppsstatusen hos andra kalvar från gården kan redovisas. I stapeldiagrammet (figur 7) illustreras medelvärdena hos de kalvar som hade sjunkande antikropps nivåer för BPIV-3, dvs. 29 stycken av 30.





BRSV

Hos fyra kalvar sågs en tydlig stegring i antikroppar mot BRSV i serumproverna från det andra provtagningstillfället (figur 8). Två av de kalvarna kom från gård D och de övriga två från gård H. Kalvarna från resterande besättningar uppvisade antingen sjunkande eller ihållande låga antikropps nivåer. Alla tre kalvar från besättning E samt ensamkalvarna från besättningarna G och J hade mycket låga värden (mellan 0

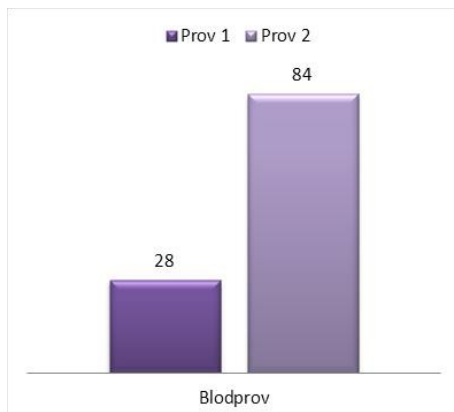
och 2) och har därför med största sannolikhet aldrig kommit i kontakt med BRSV.

BAV-3

Serumantikroppar

Ökande nivå: 11 kalvar uppvisade ökande antikropps nivåer i de parprov som togs. Den genomsnittliga ökningen i PP-värde hos de här individerna var 200 %, vilket redovisas i figur 9.

Minskande nivå: 17 kalvar hade tydligt minskande värden (figur 10).



Gråzon:

Ett par kalvar hade värden som låg mycket lika i båda parproven. Den ena kalven (nummer 14) låg på PP 75 i första provet och PP 74 i det påföljande, detta trots att den ingick i gruppen som avlivades sist varför det var ca 5 veckor mellan blodproven. Vid en så

lång tidsperiod mellan första och andra blodprovet skulle en tydligare sänkning ha varit förväntad om inte kalvens egen antikroppsproduktion aktiverats i något skede. Den andra kalven, nummer 17, hade PP 53 i första provet och PP 51 i det andra, avlivning skedde den 5/6 vilket innebar att det var 3,5 veckor mellan parproven. Även här hade en tydligare sänkning varit trolig om kalven inte reagerat på viruset i någon utsträckning.

Fördelning av fall

Kalvar från 7 av 10 besättningar hade ökande antikropps nivåer mot BAV-3 och serokonversion förekom i alla 5 boxarna i försöksstallarna:

Box	Antal fall	Box	Antal fall
A1	1	I1	1 (2)
A2	4	I2	3
		I3	2 (3)

Siffrorna inom parentes är antalet drabbade kalvar inklusive de individer som placerats i "gråzonen" baserat på antikropps nivå.

DISKUSSION

Antikroppsanalyserna för BCoV och BPIV-3 gav inte svar på varför kalvarna blev sjuka då i stort sett alla individer uppvisade en fallande eller låg antikropps nivå för de här virustyperna. Det enda undantaget var en kalv med ökande antikropps nivå för BPIV-3 som troligtvis blivit infekterad innan den anlände till SLU. Att antikropps nivåerna minskar beror på att de passivt överförda immunoglobulinerna som erhållits via råmjölken successivt bryts ned och inte ersätts såvida inte kalven stöter på en infektion och börjar producera endogena immunoglobuliner (Key et al 1984).

Antikroppar mot BRSV låg generellt på en avtagande eller låg nivå i kalvgruppen. Det som noterades var dock att två kalvar från gård D och två från gård H hade ökande PP-värden, vilket tyder på att de nyligen kommit i kontakt med smittan. Eftersom BRSV ger upphov till sjukdom med hög morbiditet (Dinter et al, 1990) skulle ett utbrott i försöksstallarna troligen ha lett till antikroppsstegringar hos många fler kalvar än de fyra som registrerades i samband med undersökningen. Baserat på det här kriteriet gjordes bedömningen att kalvarna troligen hade infekterats i sina hembesättningar och inte efter ankomst till SLU. När det gäller övriga kalvar från gård D och H ligger många på en relativt hög men avtagande antikropps nivå, vilket kan tolkas som att även de stött på viruset och börjat producera endogena antikroppar i något skede. Det vanligen snabba spridningsförloppet för en BRSV-infektion i en kalvbesättning (Dinter et al, 1990) talar för att om ökande antikropps nivåer registreras hos enskilda individer är det troligtvis många fler som nyligen har varit smittade eller är på väg att insjukna.

Ett intressant samband observerades mellan besättningsursprung och behandlingsfrekvens hos kalvarna i det här försöket. I bilaga 2 åskådliggörs vilka djur som behandlades satt i relation till vilken gård de härstammade ifrån, och här framgår det tydligt att kalvar från vissa gårdar drabbades extra hårt. Alla 9 kalvar från gård D behandlades med penicillin samt 2 av 3 kalvar från gård H, medan kalvar från andra gårdar, som I och E, helt verkar ha klarat sig ifrån kraftigare kliniska symptom. Det bör dock omnämnas att två av de nio kalvarna från gård D snarare behandlades av profylaktiska än direkt kliniska skäl då det noterades att individer från den här besättningen verkade bli väldigt påverkade av den cirkulerande infektionen. Vid en närmare titt på serumanalyserna för individerna från gård D och H kan det fastställas, vilket beskrivs här ovan, att den gemensamma nämnaren är nyligen cirkulerande infektioner med BRSV i besättningarna. Sambandet överensstämmer med det faktum att BRSV anses kunna bana vägen för sekundära infektioner genom att skada mekaniska barriärer såsom cilierat epitel och slemhinnor (Bengtsson et al. 2000). I litteraturen omnämns även BRSV som ett "immunosupprimerande virus" med förmågan att sänka den proliferativa reaktiviteten hos blodlymfocyter (Keles et al. 1998).

Vidare kan också tilläggas att de kalvar som kom från besättning E låg nära 0 i antikropps nivå mot både BRSV och BCV och därmed troligen kommer från en gård som är fri från de aktuella virustyperna. Ingen av de här kalvarna var, som nämnts ovan, i behov av behandling mot sekundärinfektioner.

Ett utbrott med BAV-3 har förekommit bland kalvarna i försöksstallarna baserat på serumanalyserna av parproven. 11 kalvar uppvisade en tydlig ökning, serokonversion, och ytterligare två låg inom en "gråzon" som var svår att tolka. De drabbade kalvarna kom från sju olika besättningar och serokonversion mot BAV-3 förekom i alla kalvboxarna i försöksstallarna. Det var dock fler kalvar (23 av 30) som uppvisade någon grad av kliniska symptom än som hade stegrande antikropps nivåer mot BAV-3. Här bör det dock hållas i åtanke att det endast är BAV av serotyp 3 som analyserats och att det i dagsläget finns ytterligare 9 olika serotyper dokumenterade (Horner et al., 1989), varför eventuellt fler fall skulle kunna konstateras om ytterligare tester hade utförts. Dessutom hade 4 av 6 kalvar i den sista avlivningsgruppen (avlivning skedde 34 dagar efter ankomst) serokonverterat och ytterligare en kalv låg i den gråzon som omnämns här ovan. Detta väcker misstanken om att kalvar som avlivats tidigare, första gruppen redan 19 dagar efter ankomst, eventuellt inte hunnit serokonvertera innan det sista blodprovet togs. Det finns även fler exempel på respiratoriska virus som såsom reovirus, rhinovirus och enterovirus (Radostits, 2007), för vilka det idag inte finns någon rutindiagnostik. Huruvida de här virustyperna förekom i försöksstallarna är alltså inte undersökt.

Inget tydligt samband kunde ses mellan ursprungsbesättningar, kalvbox i försöksstallarna och kalvdata i frågan om vilka som infekterades med BAV-3 i det här försöket.

TACK

Till min handledare Madeleine Tråvén, Institutionen för kliniska vetenskaper, SLU, Uppsala, för intressanta diskussioner, stort engagemang och god vägledning under arbetets gång.

Tack också till:

Biträdande handledare Anna Lundén, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU, Uppsala, för att vi fick använda prover och kalvdata i studien och för värdefulla synpunkter på manuskriptet.

Stefan Alenius, Institutionen för kliniska vetenskaper, SLU, Uppsala, som visat stort intresse för ämnet och bidragit med betydelsefull kunskap i samband med tolkningen av provresultaten.

Maj Hjort, SVA, för några mycket givande och roliga dagar i labbet i samband ELISA-testernas utförande.

LITTERATURFÖRTECKNING

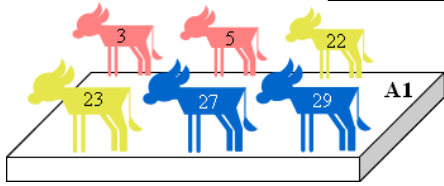
- Ames, T. R. 1997. Dairy calf pneumonia, the disease and its impact. *Veterinary clinics of North America: food animal practice*. Vol 13, no 3: 379-390.
- Baker, J. C., Frey, M. L. 1997. Bovine respiratory syncytial virus. *Veterinary clinics of North America: food animal practice*. 13: 425-54.
- Bengtsson, B., Viring, S. 2000. *Luftvägsinfektioner hos kalv- projekt, panorama och behandlingsstrategier*. In: Allmänt veterinärmöte, Uppsala. Sida 153-158.
- Britney, J. B., Martin, S. W., Stone, J. B., Curtis, R. A. 1984. Analysis of early calthood health status and subsequent dairy herd survivorship and productivity. *Preventive veterinary medicine*. 3: 45-52.
- Carlsson, U., Lahti, E., Elvander, M. 2009. *Surveillance of zoonotic and other animal disease agents in Sweden 2009* [online]. ISSN 1654-7098. Available online: <http://www.sva.se/upload/pdf/Tj%C3%A4nster%20och%20produkter/Trycksaker/Surveillance2009.pdf> [2010-11-09].
- Carrière, P. D., Maxie, M. G., Wilkie, B. N., Savan, M., Valli, V. E. O., Johnson, J. A. 1983. Exposure of calves to aerosol of parainfluenza-3 virus and *Pasturella haemolytica*. *Canadian journal of comparative medicine*. 47: 422-432.
- 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: 221-226.
- Dinter, Z., Morein, B. 1990. *Virus infections of ruminants*. Volume 3. Elsevier Science Publishers. Amsterdam.
- Divers, T. J., Peek, S. F. 2008. *Rebhun's diseases of dairy cattle*. 2nd edition. Missouri, Elsevier Inc.
- Elvander, M. 1996. *A study of bovine respiratory syncytial virus infections in swedish dairy cattle*. Doctoral thesis, SLU , Uppsala.
- Jolly, R. D., Ditchfield, J. 1965. Bronchopneumonia of calves caused by Parainfluenza virus type 3. *The Canadian veterinary journal*. Vol 6, no. 11: 295-297.
- Härtel, H., Nikunen, S., Neuvonen, E., Tanskanen, R., Kivelä, S-L., Aho, P., Soveri, T., Saloniemä, H. 2004. Viral and bacterial pathogens in bovine respiratory disease in Finland. *Acta veterinaria scandinavica*. 45: 193-200.
- Horner, G. W., Hunter, R., Bartha, A., Benkii, M. 1989. A new subgroup 2 bovine adenovirus proposed as the prototype strain 10. *Archives of virology*. 109:121-124.
- Ide, P. R., Thomson, R. G., Ditchfield, W. J. B. 1969. Experimental adenovirus infection in calves. *Canadian journal of comparative medicine*. 33: 1-9.
- Kahn, C., Line, S. 2008. *Merck veterinary manual*, Enzootic pneumonia of calves [online]. 9th edition. Whitehouse Station, New Jersey, USA. Available at: <http://www.merckvetmanual.com/mvm/index.jsp?cfile=htm/bc/121207.htm&word=enzootic> [2010-11-09].
- Kapil, S., Basaraba, R. J. 1997. Infectious bovine rhinotracheitis, parainfluenza-3, and respiratory coronavirus. *Veterinary clinics of North America: food animal practice*. Vol 13, no 3: 455-468.

- Keles, I., Woldehiwet, Z., Murray, R. D. 1998. In-vitro studies on mechanisms of immunosuppression associated with bovine respiratory syncytial virus. *Journal of comparative pathology*. 18: 337-345.
- Key, D. W., Derbyshire, J. B. 1984. Serological studies of parainfluenza type 3 virus, bovine adenovirus type 3 and bovine respiratory syncytial virus infection in beef calves. *Veterinary microbiology*. 9: 587-592.
- Kiorpes, A. L., Butler, D. G., Dubielzig, R. R., Beck, K. A. 1988. Enzootic pneumonia in calves: clinical and morphologic features. *The Compendium on continuing education for the practicing veterinarian*. Vol 10, no 2: 248-257.
- Larsen, L. E., Tjørnehøj, K., Viuff, B. 2000. Extensive Sequence Divergence among Bovine Respiratory Syncytial Viruses Isolated during Recurrent Outbreaks in Closed Herds. *Journal of clinical microbiology*. 38(11): 4222–4227.
- Lehmkuhl, H. D., Smith, M. H., Dierks, R. E. 1975. A bovine adenovirus type 3: isolation, characterization, and experimental infection in calves. *Archives of virology* 48, 39-46.
- Martin, S. W., Bateman, K. G., Shewen, P. E., Rosendal, S., Bohac, J. E. 1989. The frequency, distribution and effects of antibodies, to seven putative respiratory pathogens, on respiratory disease and weight gain in feedlot calves in ontario. *Canadian journal of veterinary research*. 53: 355-362.
- McNulty, M. S., Bryson, D. G., Allan, G. M., Logan, E. F. 1984. Coronavirus infection of the bovine respiratory tract. *Veterinary microbiology*. 9: 425-434.
- Mittal, S. K., Middleton, D. M., Tikoo, S. K., Babiuk, L. A. 1995. Pathogenesis and immunogenicity of bovine adenovirus type 3 in cotton rats (*Sigmodon hispidus*). 213: 131-139.
- Mittal, S. K., Middleton, D. M., Tikoo, S. K., Prevec, L., Graham, F. L., Babiuk, L. A. 1996. Pathology and immunogenicity in the cotton rat (*Sigmiodon hispidus*) model after infection with a bovine adenovirus type 3 recombinant virus expressing the firefly luciferase gene. *Journal of general virology*. 77: 1-9.
- Murphy, F. A., Gibbs, E. P., Horzinek, M. C., Studdert, M. J. 1999. *Veterinary virology*. 3rd edition. London, Academic press.
- O'Connor, A. S., Wayne, M., Nagy, É., Menzies, P., Harland, R. 2001. The relationship between the occurrence of undifferentiated bovine respiratory disease and titer changes to bovine coronavirus and bovine viral diarrhoea virus in 3 Ontario feedlots. *The Canadian journal of veterinary research*. 65: 137-142.
- Ohlson, A. *Bovine coronavirus and bovine respiratory syncytial virus infection in dairy herds. Prospects for control*. Doctoral thesis no 2010:51. Faculty of veterinary medicine and animal science, SLU, Uppsala.
- Quinn, P. J., Markey, B. K., Carter, M. E., Donnelly, W. J., Leonard, F. C. 2002. *Veterinary microbiology and microbial disease*. Oxford, Blackwell publishing.
- Radostits, O. M., Gay, C. C., Hinchcliff, K. W., Constable, P. D. 2007. *Veterinary medicine, a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. 10th edition. Spanien, Saunders, Elsevier.
- Roe, C. P. 1982. A review of environmental factors influencing calf respiratory disease. *Agricultural Meteorology*. 26: 127-144.
- Rouse, B. T., Horohov, W. 1986. Immunosuppression in viral infections. *Reviews of infectious diseases*. Vo 8, no 6: 850-868.

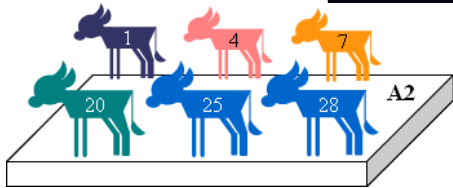
- Roy, J. H. B. 1979. Symposium: disease prevention in calves, factors affecting susceptibility of calves to disease. *Journal of dairy science*. 63: 650-664.
- Roy, J. H. B. 1990. *The Calf, volume 1 management of health* . 5th edition. Kent, Butterworths.
- Storz, J. Purdy, C. W., Lin, X., Burell, M., Truax, R. E., Briggs, R. E., Frank, G. H., Loan, R. W. 2000. *Isolation of respiratory bovine coronavirus, other cytotidal viruses, and Pasturella spp from cattle involved in two natural outbreaks of shipping fever*. Vol 216, no 10: 1599-1604.
- Tizard, I. R. 2004. *Veterinary immunology, an introduction*. 7th edition. Philadelphia, Saunders, Elsevier.
- Valarcher, J. F., Hägglund, S. 2006. Viral respiratory infections in cattle. *Proceedings of the XXIV World buiatrics congress*. Nice, Frankrike.
- Van der Fels-Klerx, H. J., Horst, H. S., Dijkhuizen, A. A. 2000. Risk factors for bovine respiratory disease in dairy youngstock in the Netherlands: the perception of experts. *Livestock production science*. 66: 35-46.
- Van der Fels-Klerx, H. J. 2001. *Modelling epidemiological and economic consequences of bovine respiratory disease in dairy heifers*. Wageningen University, Nederländerna.
- Van Donkersgoed, J. Ribble, C. S., Boyer, L. G., Twonsend, H. G. G. 1993. Epidemiological study of enzootic pneumonia in dairy calves in Saskatchewan. *Canadian journal of veterinary research*. 57: 247-254.
- Verhoeff, J. Van Nieuwstadt, A. P. K. M. I. 1984. BRS virus, PI3 virus and BHV1 infections of young stock on self-contained dairy farms: epidemiological and clinical findings. *The veterinary record*. 114: 288-293.
- Wathes, C. M., Jones, C. D. R., Webster, A. J. F. 1983. Ventilation, air hygiene and animal health. *The veterinary record*. 113:554-559.

BILAGA 1

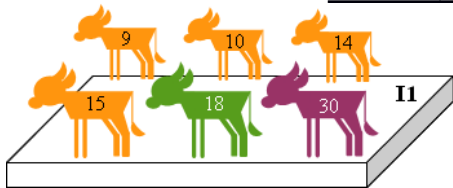
Kalv	Ålder	Vikt	Beh	Hosta	Avf
	3	110	132		H
	5	75	88		H
	22	73	79	B	H
	23	76	72		H
	27	61	98		(H)
	29	52	73		(H)



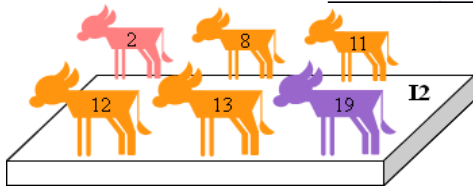
Kalv	Ålder	Vikt	Beh	Hosta	Avf
	1	57	125		H
	4	76	90	B	(H)
	7	76	76	B	H
	20	67	79		H D
	25	64	91		H
	28	56	74		L



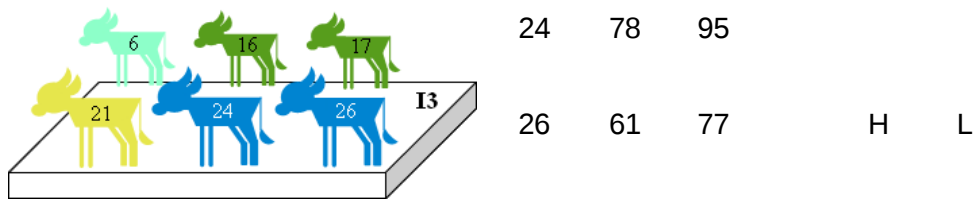
Kalv	Ålder	Vikt	Beh	Hosta	Avf
	9	67	94	B	
	10	67	123	B	H
	14	55	78	B	(H)
	15	?	71	B	
	18	61	63		L
	30	81	119		D



Kalv	Ålder	Vikt	Beh	Hosta	Avf
	2	113	119		
	8	68	89	B	L
	11	68	85	B	H
	12	75	81	B	H L
	13	56	90	B	H L
	19	?	72	B	H D



Kalv	Ålder	Vikt	Beh	Hosta	Avf
	6	107	103		(H)
	16	64	70		
	17	107	66		
	21	?	87	B	



Gruppering av kalvarna efter ankomst till SLU.

Beh = Behandling (Bensylpenicilin), H = Hosta, Avf = Avföring, L = Lös avföring, D = Diarré. Ålder är angivet i dagar och vikt i kg. Färgerna på kalvarna representerar vilken besättning de härstammar ifrån och numret på plattorna vilka boxar de stod i under sin vistelse i försöksstallarna.

BILAGA 2

Behandlingar		
Kalvnr	Gård	Behandl
1	A	
2	B	
3	B	
4	B	B
5	B	
6	C	
7	D	B
8	D	B
9	D	B
10	D	B
11	D	B
12	D	B
13	D	B
14	D	B
15	D	B
16	E	
17	E	
18	E	
19	F	B
20	G	
21	H	B
22	H	B
23	H	
24	I	
25	I	
26	I	
27	I	
28	I	
29	I	
30	J	