

DNA  
DIAGNOSTIC

DNA  
DIAGNOSTIC

# Salmonella dublin sanering

Brug af ny fæcesundersøgelse – Salmonella 4 Cow

Jørgen Katholm

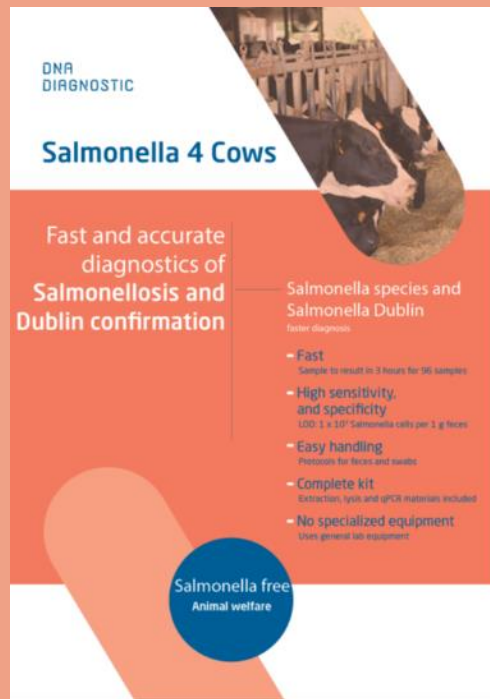
LVK 26 November 2019 – Hobro



# Privat dansk firma – DNA Diagnostic, Århus

- \\ Startet i 1992 – Nu privatejet
- \\ Sælger test kit til Leukæmi hos mennesker
- \\ Udviklede i 2014 testkit Mastit 4 til mælkeprøver – mastitis, og goldkopprøver
- \\ GUDP projekt med Københavns Universitet og LVK
  
- \\ Pneumo 4 test til test af kalve for lungebetændelse 4 bakterier 5 virus svaber og skylleprøve
- \\ Enterit 4 Calves test ved diarre hos kalve 4 bakterier 2 parasitter 2 vira
- \\ Enterit 4 Swine test ved diarre hos svin 4 bakterier
- \\ Nu også
- \\ Para TB test for paratuberkulose ved køer
- \\ Salmonella 4 cows – Salmonella ved køer og kalve

# DNA DIAGNOSTIC



DNA  
DIAGNOSTIC

## Salmonella 4 Cows

Fast and accurate  
diagnostics of  
**Salmonellosis and  
Dublin confirmation**

Salmonella species and  
Salmonella Dublin  
*faster diagnosis*

- **Fast**  
*Sample to result in 3 hours for 96 samples*
- **High sensitivity,  
and specificity**  
*LOD: 1 x 10<sup>3</sup> Salmonella cells per 1 g feces*
- **Easy handling**  
*Protocol for feces and swabs*
- **Complete kit**  
*Extractors, lysis and qPCR materials included*
- **No specialized equipment**  
*Uses general lab equipment*

Salmonella free  
Animal welfare

# Salmonella 4 Cows

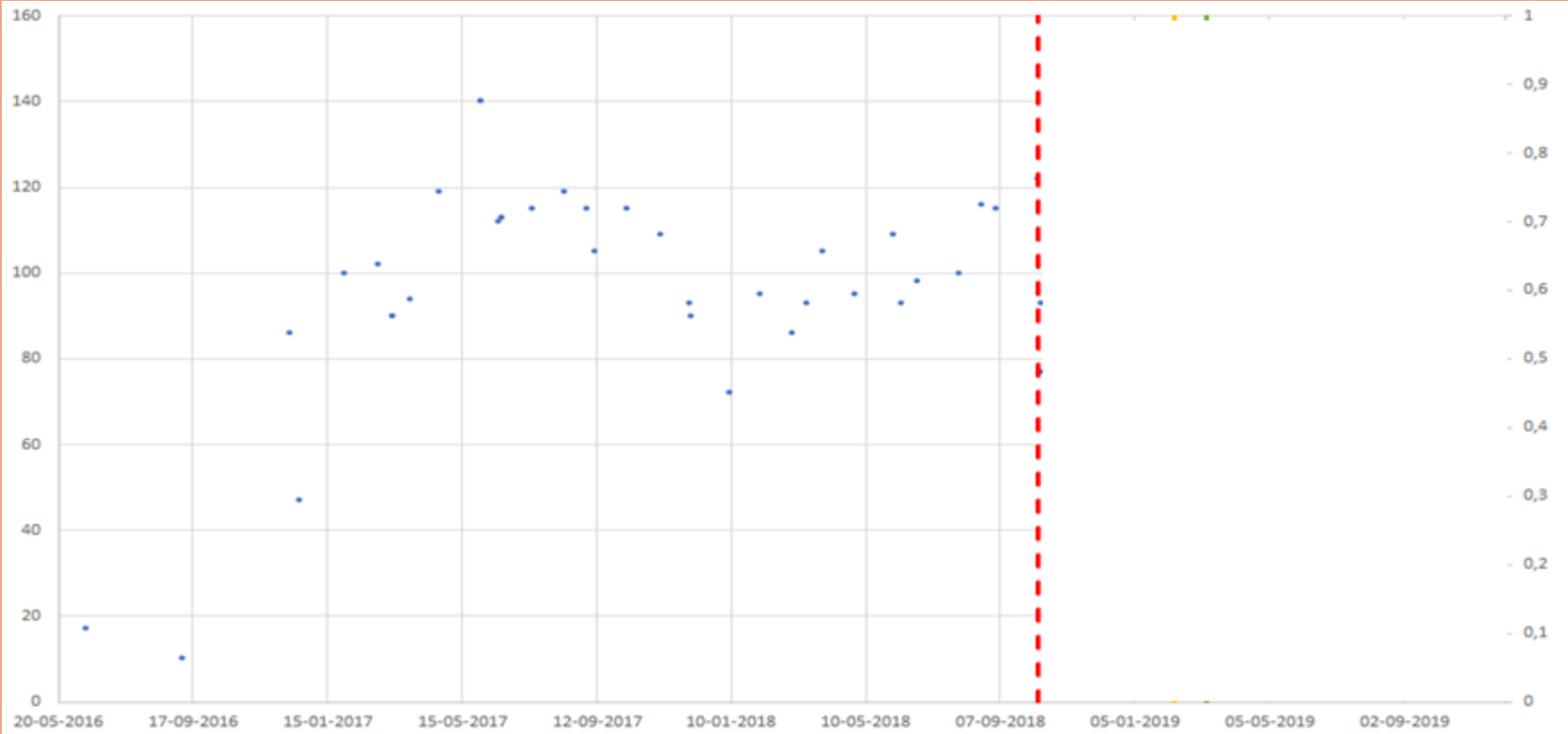
# Sanering for Salmonella ved brug af fæces test

- \ Først og fremmest - Alle hygiejne og smittebeskyttelses forslag skal følges
- \ Har i Nyinfektion eller tegn på bakterie i stalden ??
- \ ELISA test på enkeltdyr mælk/blod kan benyttes til at påvise nyinfektion i dyre området
- \ Miljøundersøgelse Gylletank – sokkeprøver – blandeprøver dybstrøelse kan også benyttes til at påvise nyinfektion
- \ HVIS NYINFEKTION I EN GRUPPE AF KREATURER
- \ Fæces undersøgelser kan benyttes til at finde udskillere i et område med nyinfektion

# Miljø prøver 8 besætninger November 2018 Gylleprøver pos

		FAM (IAC)	ROX (Sal.)	SAL Dublin
02	Mælkekalve Lade	27,06		
02	Kalve	30,86		
02	3-6 mdr Fællesbokse	30,55		
56	Fællesbokse Kalve	27,12		
56	Lakterende køer	30,70		
56	Mælkefodret kalve enkeltboks	27,03		
56	Gylle dåse	28,64		
56	Gylle dåse	28,53		
02	Kalve hytter	27,04		
19	Ungdyr	29,22		
02	Close up Gold	28,22		
17	Gylle dåse	27,47	32,67	34,86
17	Gylle dåse	27,18	33,03	34,69
17	Kalve mælkefodret	27,12		
17	3 - 6 Mdr kalve	27,44		
17	Kvier spalter	28,70		
17	Sygeboks	27,80		
17	Lakterende køer	28,51		
17	Kalve dåse	28,72		
17	Gylle dåse	27,73		
17	Gylle dåse	28,10		
99	Grebning	27,75		
19	Gylle dåse	28,32		
19	Gylle dåse	30,31		
26	Nykælvere	27,29		
26	Fælleboks Nykælvere	27,16		
26	Kælvnings kvier	27,52		
26	Mælkefodret kalve	27,23		
26	Kalve fællesboks hytter	27,08	35,29	35,89
26	Lakterende	27,21		
02	Kælvningsboks	27,17		
02	Lakterende	30,40		
02	Gylle dåse	28,49	35,10	NoCt
02	Gylle dåse	27,55	32,98	35,16
19	Fællesboks Kalve	27,09		
19	Kælvningsboks	27,11		
19	Goldkøer Kælvnng kvier	27,53		
19	Lakterende	28,30		
19	Unge kalve	27,23		
17	Mælkefodret kalve	27,07		
17	Fællesboks kalve	27,19		
17	Kælvningsboks	27,29		
17	Udlevering	27,05		
17	Lakterende 1 kalvs	27,60		
018		31,53		
700		29,99		
224	Para Tb klinik	28,82		
995	Mangler fra und sidste uge	29,24		

# Besætning men S. dublin - tankprøver før oktober 2018



# Salmonella projekt udvikling PCR til fæces prøver

- \\ En besætning 300 køer
- \\ 55 køer ELISA over 100 OD enkeltko test 7 Positive
- \\ 401 Øvrige kvier og køer Pool prøver 2 positive
- \\ Sidste aflivet 8 marts 2019
  
- \\ ELISA godt til kontrol af smittespredning..
- \\ ELISA test på køer udpeger for mange køer som problem køer.
- \\ Kun få køer er faktisk udskillere.
- \\ Contrary to previous recommendations, the detection of carriers by the use of repeated antibody testing is not likely to be a plausible control option in most Salmonella Dublin-infected dairy herds. Liza Nielsen et al., 2012



# Sandsynlighed for udskiller i ELISA grupper - 14 besætninger

## N = 3097

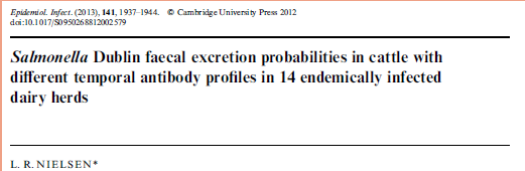


Table 1. Temporal antibody profile (TAP) criteria and distributions of animals, observations, faecal culture-positive observations and age in 14 dairy herds that were endemically infected with *S. Dublin* in Denmark in Denmark between 2000 and 2002

Group and short explanation	Criteria	No. of animals*	n (%) observations	n (%) faecal culture-positive observations†	Average age, years (95% CI)
TAP1: Persistently high antibody levels	The current and the previous two samples $\geq 80$ ODC%	126	182 (2.8%)	3 (1.7%)	3.8 (3.6–4.1)
TAP2: Recent increase in antibody levels	The current sample $\geq 50$ ODC% and the previous one or two samples $< 25$ ODC%	214	214 (3.2%)	6 (2.8%)	2.7 (2.4–2.9)
TAP3: Fluctuating or moderately high antibodies	One of the previous samples $\geq 25$ ODC%, but not three samples $\geq 80$ ODC%	1696	4022 (61%)	31 (0.8%)	3.4 (3.3–3.4)
TAP4: Recent low antibody levels	The current and the previous one or two samples $< 25$ ODC%	1061	2196 (33%)	6 (0.3%)	2.9 (2.8–3.0)

CI, Confidence interval; ODC%, background-corrected optical density value.

The TAPs were based on the two or three most recent samples from each animal aged  $\geq 180$  days. The TAP groups were mutually exclusive.

\* Number of animals represented in the number of observations.

† Percentage of the sample event observations in which *S. Dublin* bacteria were isolated.

- \ Persistent høje ELISA      Sidste prøve og to tidligere over eller lig OD 80      1,7%      3
- \ Sidste prøve  $\geq$  OD 50 og de tidligere en eller to prøver under OD 25      2,8%      6
- \ En af tidligere prøver over OD 25 men sidste prøver under OD 80      0,8%      31
- \ Denne eller tidligere en eller to prøver under OD 25      0,3%      6

# 48 pool prøver 4 dage/ko reproducerbarhed og opformering

- \ Der blev i 4 dage udtaget gødningsprøver fra 48 køer med højt OD på mælk
- \ Alle prøver fra samme ko blev blandet i en prøve
- \ Prøverne blev testet med Salmonella 4 cows og 7 prøver var positive
- \ 4 køer højpositive positive på alle test dage
- \ 3 køer over Ct 33,7 variation i positive prøver

# I alt 9 positiv fæces qPCR med Salmonella 4 cow test

Positive  
Salmonella 4 cow

DYR. NR.	STATUS	UDTAGET ELISA	PRØVE MATERIALE	ELISA	UDTAGET qPCR Fæces	qPCR Ct	Slagtet
1	Ko	10-08-2018	Mælk	129	10/10 2018	33,7	30/10 2018
2	Ko	10-08-2018	Mælk	106	10/10 2018	36,4	22/01 2019
3	Ko	10-08-2018	Mælk	120	10/10 2018	27,7	09/10 2018
4	Ko	10-08-2018	Mælk	145	10/10 2018	26,8	09/10 2018
5	Ko	10-08-2018	Mælk	132	10/10 2018	24,6	09/10 2018
6	Ko	10-08-2018	Mælk	120	10/10 2018	26	30/10 2018
7	Ko	08-02-2019	Mælk	126	07/02 2019	28,3	20/02 2019
8	Kvie	18-04-2018	Blod	5	07/03 2019	36,3	08/03 2019
9	Ko	10-08-2018	Mælk	104	10/10 2018	37,1	09/10 2018

# Follow up ydelseskontrol prøver ELISA test mm.

- 8 Marts ydelseskontrol 55 køer - ingen serokonvertering af 1 kalvs køer
- 12 April ydelseskontrol 28 køer - ingen serokonvertering af 1 kalvs køer
- 10 May ydelseskontrol 39 køer - ingen serokonvertering af 1 kalvs køer
- 21 Juni ydelseskontrol 87 køer - ingen serokonvertering af 1 kalvs køer
- 9 Aug ydelseskontrol 48 køer - ingen serokonvertering af 1 kalvs køer
- 5 Sept Ingen serokonvertering 4 blod kvier på mark neg 0-13, 0-0, 0-29, 18-45
- 12 Sept Tank falder langsomt - ELISA test alle køer 13 OD stigning > 20
- Sept 26 83 køer med OD over 80 - testet med qPCR enkeltdyr Negative
- Okt 2 3 manglende køer enkeltdyr Neg
- 11 Okt ELISA udvalgte dyr (7352 - 0 blod marts 100 nu i mælk nykælver 25/9)
- Okt 16 12 køer antistofstigning > OD 20 qPCR direkte + opformering Negative
- Okt 24 152 køer Nykælvere siden 1 juli testet direkte + opformering Negative
- Okt 29 2 miljø + 1 kø prøve

# Test af 13 køer med > OD 20 stigning i ELISA 12/9 2019 qPCR 11 oktober

DYR. NR.	res1	mat	res2	dato2	mat2	res3	dato3	mat3	FØDSELS DATO
14	60	Mælk	15	21-06-19	Mælk	28	10-08-18	Mælk	27-06-2011
19	131	Mælk	98	08-03-19	Mælk	127	07-12-18	Mælk	19-09-2014
03	77	Mælk	32	21-06-19	Mælk	36	10-08-18	Mælk	28-11-2014
54	114	Mælk	85	08-03-19	Mælk	118	07-12-18	Mælk	21-09-2015
88	88	Mælk	61	08-02-19	Mælk	76	10-08-18	Mælk	03-11-2015
43	61	Mælk	0	12-04-19	Mælk	0	08-03-19	Mælk	11-10-2016
58	103	Mælk	6	09-08-19	Mælk	11	12-10-18	Mælk	28-10-2016
19	126	Mælk	45	20-03-19	Blod	39	18-04-18	Blod	28-01-2017
32	86	Mælk	11	12-04-19	Mælk	10	08-03-19	Mælk	27-02-2017
87	38	Mælk	12	21-06-19	Mælk	42	20-03-19	Blod	07-06-2017
91	52	Mælk	4	21-06-19	Mælk	12	20-03-19	Blod	18-06-2017
15	39	Mælk	0	20-03-19	Blod	0	18-04-18	Blod	12-08-2017
29	140	Mælk	9	20-03-19	Blod	0	17-01-18	Blod	01-09-2017

152 Nykælvere siden juli testet qPCR  
26 oktober

Alle Negative

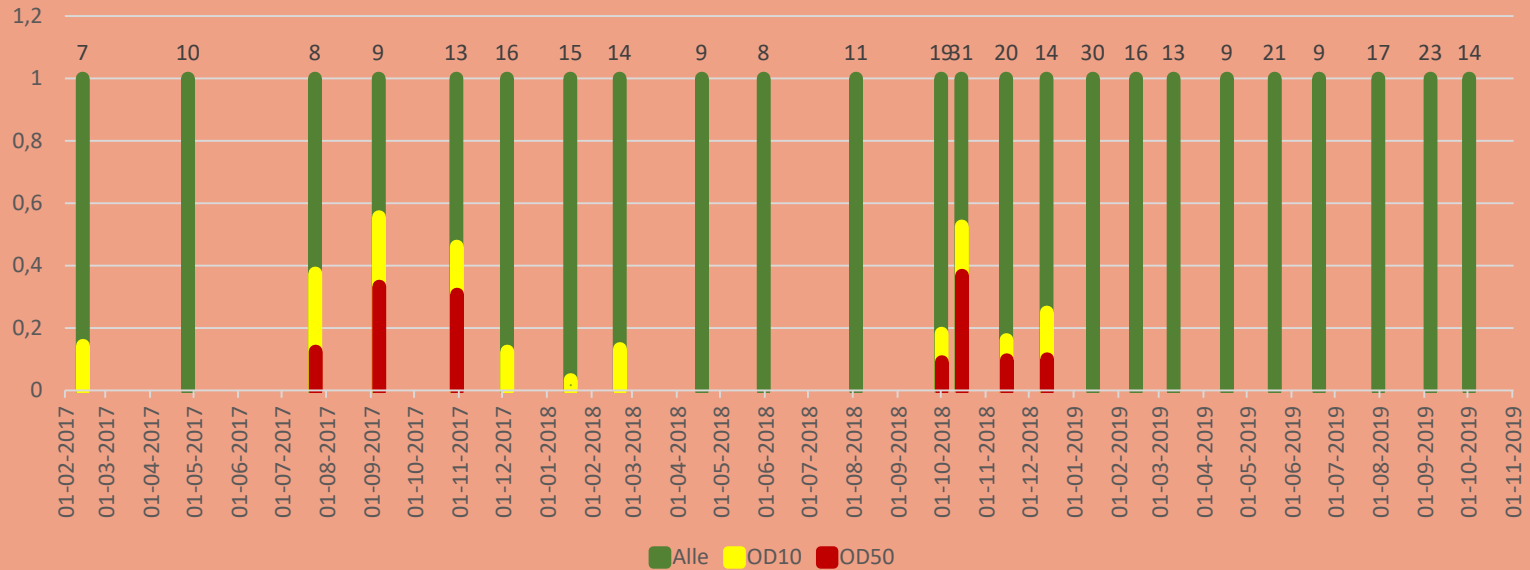
ko 52 ELISA stigning 11 Oktober OD 1 - 100

qPCR result	Dyr. Nr.	res 0	dato0	res1	dato1	Lakt. nr.	Dg. e.kælv.	Kg.EKM	Ud-sæt
26 Oktober	27			75	11-08-2017	8	14		
Negativ	51	1	11-10-2019	0	20-03-2019	1	30	24,0	
Negativ	52	100	11-10-2019	1	20-03-2019	1	27	17,2	Ja
Negativ	56	45	11-10-2019	18	05-09-2019	1	33	30,0	
Negativ	67			49	20-03-2019	1	27	30,3	

# Follow up ydelseskontrol prøver mm.

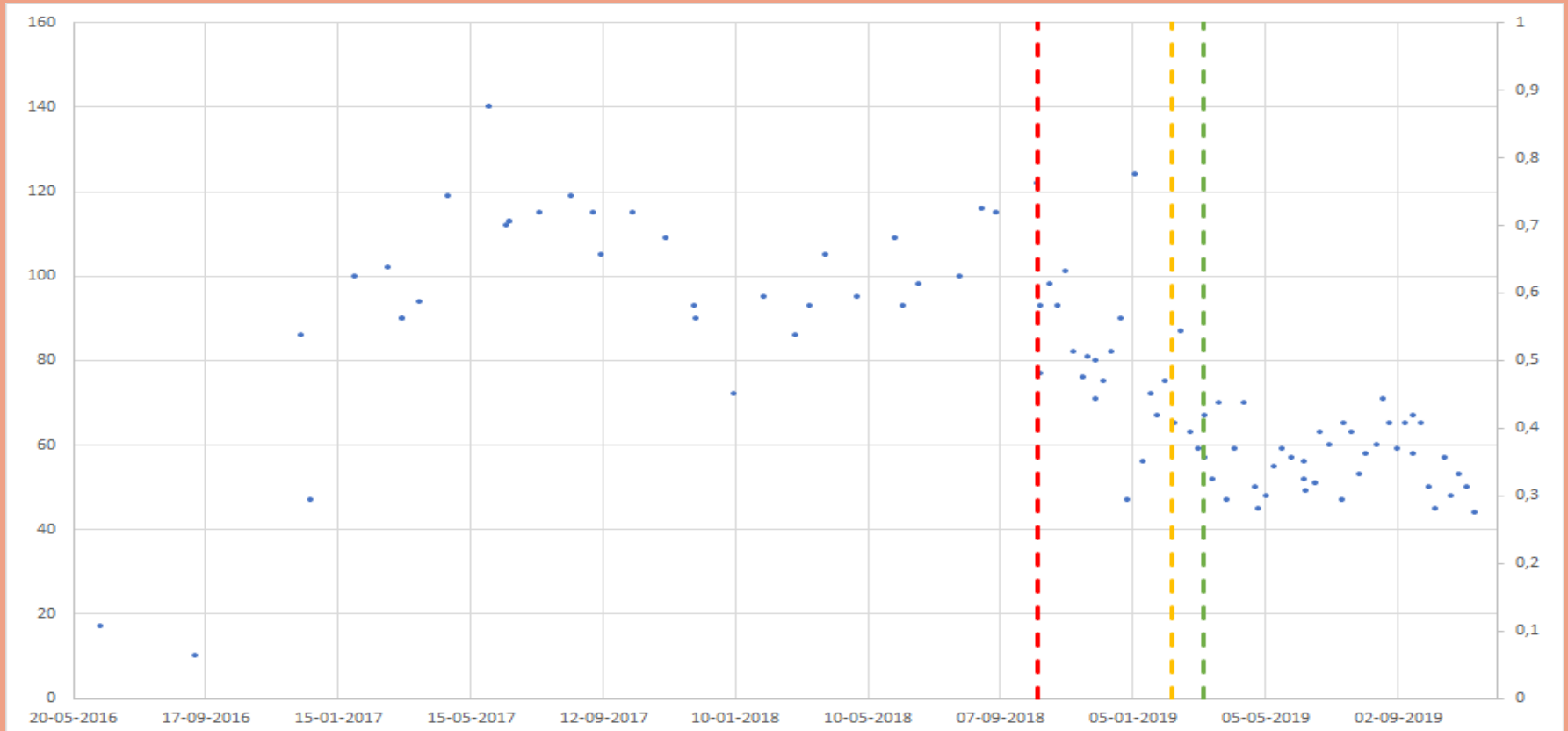
- \ 21 Juni ydelseskontrol 87 - ingen seroconvertering af 1. kalvs køer
- \ 9 Aug ydelseskontrol 48 - ingen seroconvertering af 1. kalvs køer
- \ 5 Sept Ingen serokonvertering 4 blod kvier på mark neg 0-13, 0-0, 0-29, 18-45, 12/9
- \ 12 Sept Tank falder langsomt – Ejer - ELISA test alle køer 13 OD stigning > 20
- \ Sept 26 83 køer med OD over 80 - testet med qPCR enkeltdyr Negative qPCR
- \ Okt 2 3 manglende køer Negative
- \ 11 Okt ELISA udvalgte dyr (ko 52 - 0 blod marts 100 nu i mælk nykælver 25/9)
- \ Okt 16 13 køer antistofstigning > OD 20 qPCR direkte + opformering Negative
- \ Okt 24 152 køer Nykælvere siden 1 juli testet direkte + opformering Negative
- \ Okt 29 1 gylle 1 miljø + 1 ko prøve direkte + opformering Negative
- \ Nov 14 7 miljø – Sokkeprøver opformering 7 t Negative
- \ Nov 19 Ydelseskontrol nye kvier - Ingen serokonvertering ELISA

# ELISA på kalve over 3 mdr. test hver måned – efter testdato





# Udvikling efter 1. oktober 2018 – Tank nu 44 😊 og 50



## Malkekøer Status 1 Prøver ved kvier 3 mdr – 1 md før kælvning

OPFORMERING	Salmonella sp.	S. Dublin
GI stald store kvier	29,2	33,9
GI stald dybstrøelse	28,5	30,2
Ny stald kvier Stor	28,7*	30,7
Ny stald kvier mellem	30,8	33,3
Ny stald Kalve små	No Ct	No Ct

\* Pos direkte Salmonella sp Ct 34,9

## Malkekøer status 2 ca ½ - 1 år

OPFORMERING	Salmonella sp.	S. Dublin
Kælvningsareal	No Ct	No Ct
Goldkøer	No Ct	No Ct
Kvier	No Ct	No Ct

# Malkekvæg Status 1 (tanktiter)

## Kvier blodprøver antistof positive

\*Pos direkte Salmonella sp Ct 34,3

	Salmonella sp.	S. Dublin
Kvier 1-2 mdr	No Ct	No Ct
Kvier 2 – 3	39,7	No Ct
Kvier 3 mdr	26,9*	29,3
Kvier i kostald 4 mdr	29,3	31,6
Kvier i kostald	No Ct	No Ct
Kvier i kostald	31	No Ct
Kvier i kostald	No Ct	No Ct
Kvier i kostald 8-9 mdr	No Ct	No Ct
Bokse Kvier	No Ct	No Ct
Bokse Kvier	No Ct	No Ct
Bokse Kvier	No Ct	No Ct
Slagtekalve boks samme lev	No Ct	No Ct
Slagtekalve boks samme lev	No Ct	No Ct
Slagtekalve boks samme lev	No Ct	No Ct
Slagtekalve boks samme lev	No Ct	No Ct

## Slagtekalve 4 – 7 mdr. Status 3 (alle leverandører status 1) Bokse spalter

OPFORMERING	Salmonella sp.	S. Dublin
1	28,5*	30,7
2	29,5	32,8
3	34,6	No Ct

\*Pos direkte Salmonella sp Ct 34,6

## Malkekøer status 2

Opformering	Salmonella sp.	S. Dublin
Goldko Stald	30,4	No Ct
Kviestald	No Ct	No Ct
Kælvnings/syge Boks	No Ct	No Ct
Malkende Hold 1	No Ct	No Ct
Hold 2	No Ct	No Ct
Hold 3	No Ct	No Ct

## Malkekøer status 2

Opformering	Salmonella sp.	S. Dublin
Nykælvere	No Ct	No Ct
Kvier	No Ct	No Ct
Malkende hold 2	30,2	No Ct
Malkende hold 1	No Ct	No Ct

## Malkekøer Status 2 (neg 2017) (pos 2017) (Neg 2017) (2018) Nu tank 60

Opformering	Salsp.	SalDu
Små kalve modsat kælvningsboks		
Antistof neg	No Ct	No Ct
Kvier på sengeboks		
Antistof pos	29,2	31,5
Malkende Køer	No Ct	No Ct
Kalve Boks	No Ct	No Ct



# Malkekøer nu lige i status 1

Opformering	Salsp.	SalDu
1+2	No Ct	No Ct
3+4	No Ct	No Ct
5+6	No Ct	No Ct
7+8	No Ct	No Ct
9+10	No Ct	No Ct
11	No Ct	No Ct

# Malkekvæg

Status 2 indkøb for 2 år siden

neg 2016, status 3 2018, nu tank 40, Statusprøve Neg

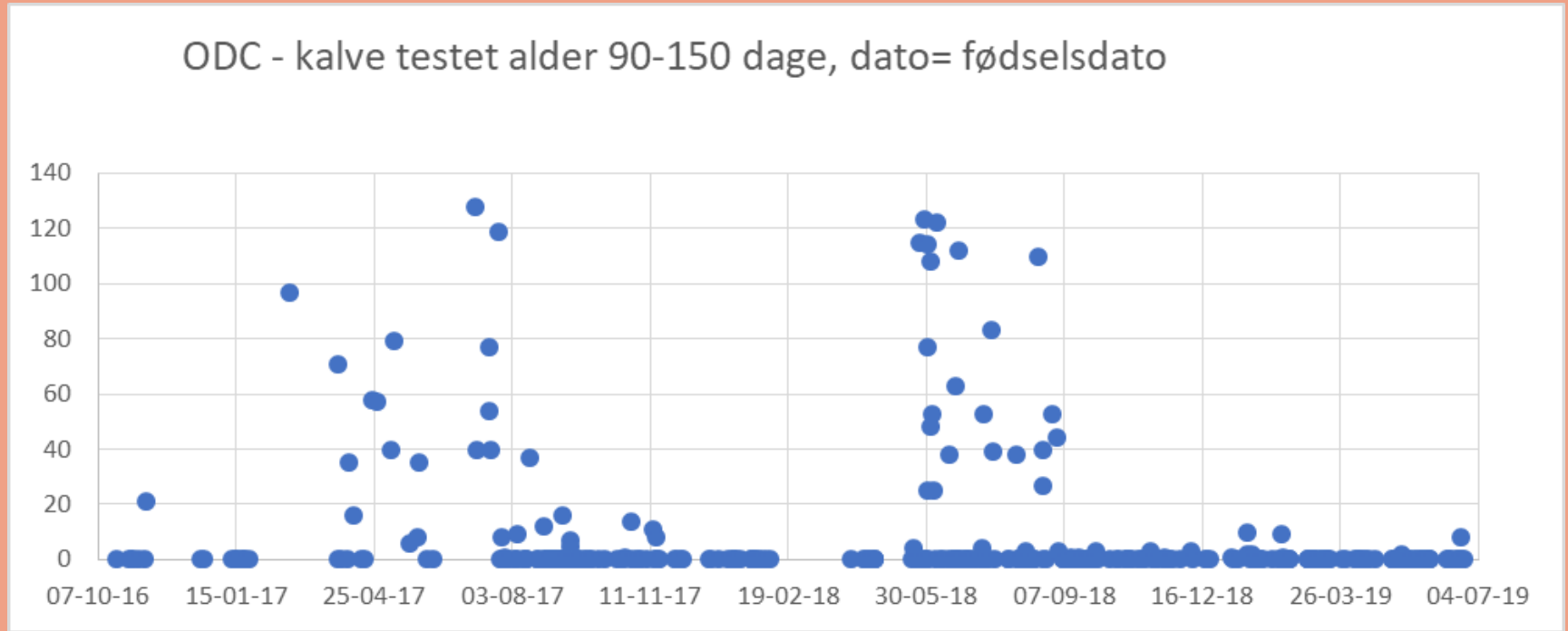
Opformering	Salsp.	SalDu
Kalve hytter 1	No Ct	No Ct
Kalve fælles 2	No Ct	No Ct
Kalve fælles 3	No Ct	No Ct
Kalve fælles 4	No Ct	No Ct
Kvier goldko stald	28,8*	32,4
Tyre/Kvier	30	31,9
Drægtige kvier	30,2	37,1
Malkende Køer	No Ct	No Ct
Kælve boks	No Ct	No Ct
Uden mærke	No Ct	No Ct

\*Pos direkte Salmonella sp Ct 33,9

# Easy to collect and handle manure samples

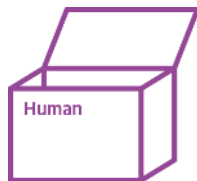


# ELISA på kalve over 3 mdr test hver måned – efter fødsels dato



Fødsels dato

# DNA Diagnostics product line:



## HemaVision

IVD test kits for screening of chromosome translocations associated with leukemia



## Mastit 4

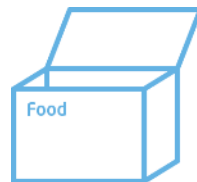
PCR test kits for mastitis bacteria screening in milk

## TBC 4

PCR test kit for screening of total bacterial count in milk

## Fresh Cow

PCR test kit for Fresh cow screening after calving



## Salmonella Velox

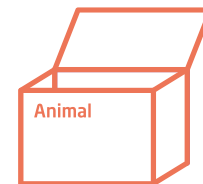
PCR test kits for Salmonella screening in all meat, poultry, fish, seafood, and swabs

## Salmonella Velox Cocoa

PCR test kits for Salmonella screening in cocoa and chocolate

## Infant 3

PCR test kit for Cronobacter spp., Enterobacteriaceae, and salmonella in infant formula-related products



## Pneumo 4

PCR test kit for detection of pathogens in animal infections e.g. Pneumonia  
New in virus as well

## ParaTB

PCR test kit for paratuberculosis

## Enterit 4 Calves

PCR test kit for diarrhea related pathogens in calves

## Enterit 4 Swine

PCR test kit for diarrhea related pathogens in swine

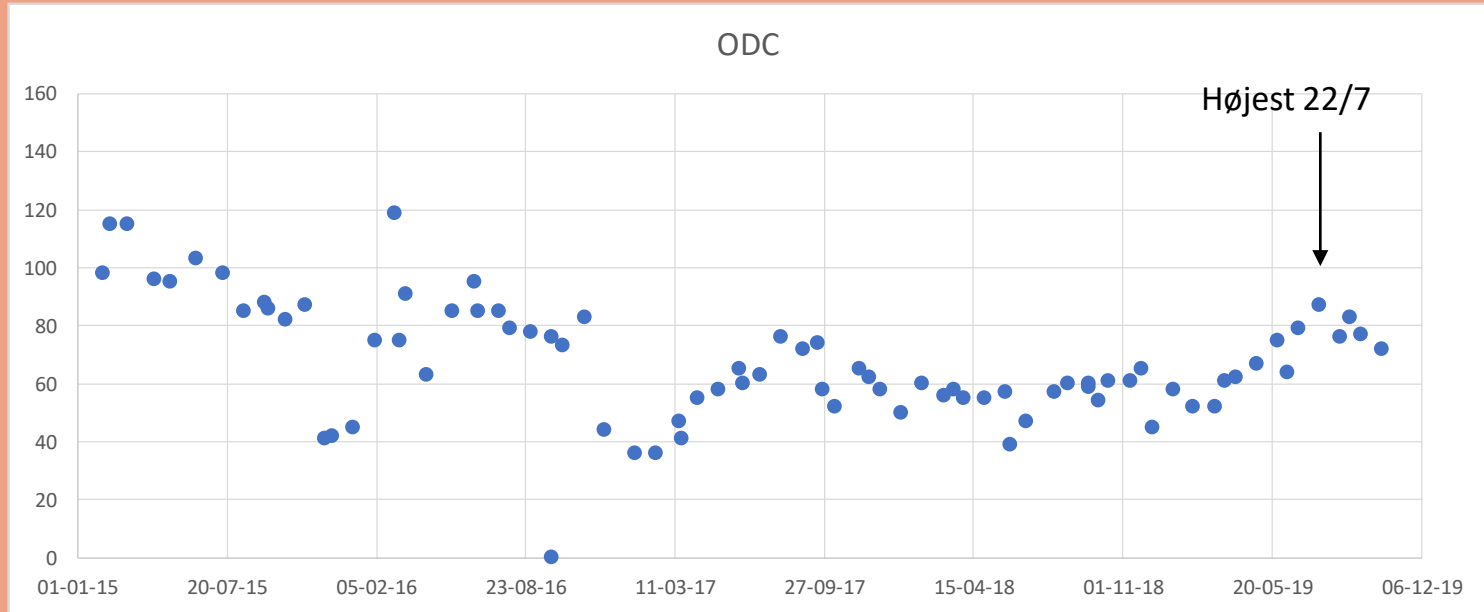
## Salmonella for Cow

PCR test kit for Salmonella in Cow feces

# Multiplex ELISA er nye serokonverteringer dublin eller andet

Dyreart	Materiale	Antal			
Kvæg	Blod	5			
Prøvenr./Mærke	Salmonella B, multiplex S/P værdi i %	Salmonella D, multiplex S/P værdi i %	Salmonella B/D ratio, multiplex -	Salmonella C, multiplex S/P værdi i %	
1	29	3	109	-3,7	65
2	53	46	86	-0,6	16
3	52	4	95	-3,1	41
4	98	44	31	0,3	1
5	32	3	39	-2,4	5

# Anden besætning stigning tank titer - kronisk inficeret



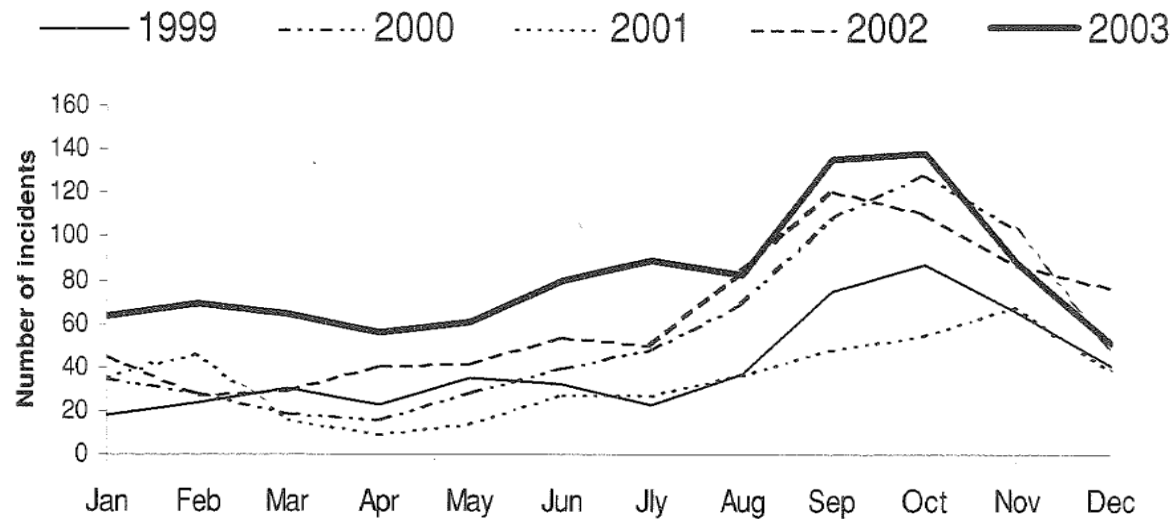
## Test i en anden besætning

∨ 25 juni	15 højeste køer slagtet inden prøver – ØV	
∨ 3 juli	62 køer enkelt test Eurofins	Negative
∨ 10 juli	363 køer 73 Pool	Negative
	Heraf 70 – 100 kvier med høj OD	
∨ 24 juli	95 køer                      19 Pool	Negative
∨ 14 august	161 køer 27 Pool	Negative



## Sæson variation mest i efteråret ( data UK 2004)

Figure 2: Seasonality of *S. Dublin* in cattle (1999 - 2003).



# Multiplex ELISA til differentiering af antistof svar DTU-Vet

## Serovars of Salmonellae – characterizations based on phenotypic expression of O and H antigens

2,200 serotypes; 2% responsible for 80% of disease

95% associated with serogroups B, C, D and E

### Type B – *typhimurium*, *agona*

**Of Recent Concern:** *S. typhimurium* DT 104 really is *S. enterica* var

Typhimurium DT104. It is a phage type DT (distinguished type) 104, with an antibiotic resistance gene that is chromosomally coded and involves integrons. It has a single 60-megadalton plasmid that gives it a unique plasmid profile.

Resistance to ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, sulfonamides and tetracycline gives it its name - R-type ACSSuT. The R-type ACSSuT pattern is considered a good marker for phage type DT-104 in the US and is the test most commonly used in this country. R-type ACSSuT pattern is not always DT-104.

Also not all DT-104's have the same resistance pattern. The resistance to chloramphenicol includes florfenicol. It was first detected in cattle in the UK and NW US at about the same time in the late 1980's. DT-104 is not a superbug per se but the case fatality rate among cattle and calves in a case-control study in the UK was 40-60% (higher figure in calves). Infected animals may shed in higher numbers and there are clinically normal carriers. There is some debate whether the prevalence of this serotype is increasing (appears so in the UK) or whether it peaked in 1995 and has declined since. In 4 of 5 outbreaks in the US, association was made between cattle or consumption of dairy products and the people infected. This phage type has been isolated from cattle in Wisconsin.

### Type C – *newport*, *montevideo*, *kentucky*, *infantis*

### Type D – *dublin*

Epidemiologically, this isolate was not common outside of CA until the late 80's, emerging for the first time in NY, PN and OH in 1988. Unlike other serotypes, *S. enterica* Dublin affect older calves (8 weeks of age or older) which is atypical for salmonellosis, presents as pneumonia and septicemia rather than the primarily diarrheal syndrome that is more commonly recognized.

### Type E – *anatum*