

Seroprævalensen af antistoffer mod Canin Herpesvirus 1 hos avlshunde i Østdanmark



af Nina Engelbrecht Diers
Hovedopgave ved fagdyrlægekursus vedrørende hund og kat
under Den Danske Dyrlægeforening
Maj 2009

Forord

Nærværende studie er lavet som afsluttende projekt på fagdyrlægeuddannelsen vedrørende hund og kat. Studiet har resulteret i denne rapport.

Rapporten er tilegnet dyrlæger, der ønsker at opdatere sin viden inden for herpesvirus hos hund. Samtidig er projektet et pilotprojekt for en landsdækkende undersøgelse af prævalensen af antistoffer mod canin herpesvirus 1 hos avlshunde i hele Danmark, med henblik på at redegøre for anbefaling af et standardvaccinationsprogram mod herpesvirus for drægtige tæver.

En stor tak til alle de avlshundeejere, som har ladet deres hunde lægge blod til projektet. En speciel tak til Merial Danmark A/S for økonomisk støtte til projektet, og til Vet Med Labor for sponsorering af projektet ved hjælp til finansiering af de laboratorieundersøgelser, der indgik i projektet.

Også tak til dyrlæge Birgitte Schjøth, Canicold International A/S, og dyrlæge Malene Jessen Petersen, Jersie Dyreklinik, for sparring og korrekturlæsning på rapporten. En speciel tak til professor John Versteegen, University of Florida, for faglig sparring vedrørende projektet.

God fornøjelse!

Dyrlæge Nina Engelbrecht Diers

Jersie Dyreklinik

Solrød

Indholdsfortegnelse

Abstract.....	4
Sammendrag.....	4
Indledning.....	4
Virus egenskaber.....	6
Herpesvirus patogenese.....	7
Prædisponerende faktorer.....	7
Symptomer.....	8
Voksne hunde.....	8
Hvalpe.....	8
Diagnostik.....	8
Tentativ diagnose.....	8
Konklusiv diagnose.....	9
Voksne hunde med symptomer.....	9
Tæven.....	9
Døde hvalpe.....	9
Differentialdiagnoser.....	9
Behandling.....	10
Prognose.....	10
Hvalpe.....	10
Præventive tiltag.....	10
Undersøgelsens formål.....	12
Materialer og metoder.....	12
Studiedesign.....	12
Udvælgelse af testhunde.....	12
Inklusionskriterier.....	13
Stikprøveberegning.....	13
Testen.....	14
Opsamling og opbevaring af prøvemateriale.....	15
Serumneutralisationstesten.....	15
Definition af positiv og negativ test.....	17
Spørgeskema.....	17
Data.....	17
Parring.....	17
Reproduktionsproblemer.....	18
Hundens alder.....	18
Samlevende hunde.....	18
Hundens køn.....	18
Resultater.....	19
Konklusion og diskussion.....	20
Perspektivering.....	21
Litteraturliste.....	23

Seroprævalensen af antistoffer mod Canine Herpes Virus 1 hos avlshunde i Østdanmark

af dyrlæge Nina Engelbrecht Diers, maj 2009

Abstract

Infection with canine herpes virus 1 (CHV-1) can cause fertility problems, abortions, stillbirths and neonatal death in affected dogs. In this study the seroprevalence of antibodies against CHV-1 in breeding dogs in Eastern Denmark has been investigated. The seroprevalence was found to be 26,4%, which is less than in other prevalence studies performed throughout Europe. The correlation between a positive herpes virus antibody titer and age has also been investigated, and a positive correlation between a positive herpes virus antibody titer and increasing age was found. In this study no correlation was found between a positive herpes virus antibody titer and problems with fertility, stillbirths or neonatal death. No correlation was found between a positive herpes virus antibody titer, neither whether the dog lived alone or with other dogs, if it has been mated or not, nor the sex of the dog.

Sammendrag

Infektion med canin herpesvirus 1 (CHV-1) kan være årsag til fertilitetsproblemer, aborter, dødfødsler og neonatal død hos inficerede hunde. I nærværende studie er seroprævalensen af antistoffer mod CHV-1 hos avlshunde i Østdanmark undersøgt, og fundet til at være 26,4%. Denne prævalens er lavere end de seroprævalenser, der er fundet i lignende prævalensundersøgelser hos avlshunde i andre lande i Europa. Samtidig er sammenhæng mellem seropositivitet og en række faktorer undersøgt. Der blev fundet en positiv korrelation mellem stigende alder og en positiv herpesvirus antistoftiter. Der blev ikke fundet nogen korrelation mellem en positiv herpesvirus antistoftiter og køn, eller hvorvidt hunden havde været parret eller ej. Ej heller blev fundet korrelation mellem en positiv herpesvirus antistoftiter, og hvorvidt hunden havde en historie med reproduktionsproblemer, eller hvorvidt der var andre hunde i husstanden.

Indledning

Canin herpesvirus 1 (CHV-1) blev for første gang beskrevet i 1965 af tre forskellige forskergrupper (Carmichael et al. 1965, Spertzel et al. 1965, Stewart et al. 1965). Siden er der lavet epidemiologiske studier, der antyder, at seroprævalensen af CHV-1 i Europa er stigende (Ronsse et

al 2002, Reading & Field 1998).

CHV-1 er gennem flere videnskabelige studier blevet belyst som årsag til reproduktionsproblemer hos hund i form af problemer med resorptioner, dødfødte hvalpe, neonatal død, nidationsproblemer og fertiliseringsproblemer (Ronsse et al. 2004, van Gucht et al. 2001, Carmichael & Greene 1998). Der er risiko for, at en stigning i seroprævalensen af CHV-1 vil medføre en stigning i reproduktionsproblemer forårsaget af CHV-1 i avlshundepopulationen. Derfor er det relevant at kende seroprævalensen af dette virus hos vores avlshunde. I Europa er der foretaget seroprævalensundersøgelser for tilstedeværelsen af antistoffer mod CHV-1 hos hunde i England, Belgien, Frankrig, Holland, Finland og Tyskland (Dahlbom et al. 2007, Ronsse et al. 2005, Guigal et al. 2002, Ronsse et al. 2002, Van Gucht et al. 2001, Rijsewijk 1999, Reading & Field 1998, Poulet et Dubourget 1993). Desuden er en større prævalensundersøgelse ved at blive udfærdiget i Norge (Linde-Forsberg, 2009 in prep).

Hos avlshunde er seroprævalensen af antistoffer mod CHV-1 fundet at være fra 20-30% i nogle studier til op mod 65-80% i andre studier. Generelt ses en tendens til, at prævalensen er stigende med tiden fra 1-13 % i 70'erne og op til 40-100 % efter år 2000 (se tabel 1). Dette kan skyldes en egentlig incidensstigning, men det kan også være et udtryk for, at man med tiden er blevet bedre til at påvise antistoffer mod herpesvirus.

Tabel 1: Epidemiologiske seroprævalensstudier af Canin Herpes Virus 1 gennem tiden.

År	Reference	Land	Population	Prævalens
1969	Lundgren & Clapper, 1969	USA	Tilfældig stikprøve	12,8 %
1974	Fulton et al, 1974	USA	Tilfældig stikprøve	6 %
1975	Bibrack & Schaudinn, 1976	Tyskland	Tilfældig stikprøve	12 %
1977	Osterhaus et al, 1977	Holland	Specifik population	2,8 %
1979	Delisle, 1982	Frankrig	Specifik population	0,5 %
1980	Engels et al, 1980	Schweiz	Tilfældig stikprøve	6,3 %
1980	Schwens et al, 1980	Belgien	Tilfældig stikprøve	1 %
1990	Takumi et al, 1990	Japan	Tilfældig stikprøve	26,2 %
1989-1991	Poulet & Dubourget, 1993	Frankrig	Avlshundepopulation	15,5 %
1994	Seo et al, 1994	Korea	Specifik population	28 %
1997-1998	Rijsewijk et al, 1999	Holland	Tilfældig stikprøve	39,3 %
1998	Reading & Field, 1998	UK	Tilfældig stikprøve	88 %
1998	Lacheretz & Cognard, 1998	Frankrig	Hunde med fertilitetsproblemer	43 %
2000	Ronsse et al. 2002	Belgien	Hunde med fertilitetsproblemer	46,1 %
2000	Guigal et al. 2002	Frankrig	Avlshundepopulation	30,6 %
2001	Van Gucht et al. 2001	Belgien	Avlshundepopulation	49,5 %
2005	Ronsse, 2005	Belgien	Incidensstudie	
2007	Dahlbom, 2007	Finland	Hunde med fertilitetsproblemer	100%

Tabellen på side 5 viser en række studier, der beskriver seroprævalensen af CHV-1 hos forskellige populationer af hunde gennem tiden. Der er til tider meget divergerende udfald af disse prævalensundersøgelser. F.eks. har Reading og Field i 1998 beskrevet en seroprævalens blandt hunde i Storbritannien på 88 %. Dette fund står i skarp kontrast til den seroprævalens på 39.3 % Rijsewijk et al. fandt hos hunde i Holland i samme periode (Rijsewijk et al. 1999). Man kan diskutere, om der virkelig er en sådan forskel på hundepopulationerne, eller om det er de forskellige studiedesign og testmetoder, der giver de divergerende udfald. Feks. kan forskellige cut-off værdier på henholdsvis ELISA og serumneutralisationstests have en stor effekt på udfaldet af undersøgelserne. Generelt gælder det, at testmetoderne er blevet mere raffinerede og dermed sandsynligvis også mere sikre med tiden. F. eks. Kan man se, at der i nogle af de første studier, ikke er tilføjet komplement til testen (Lundgren & Clapper 1969, Fulton et al. 1974). Det er vist, at tilføjelse af komplement til testen, kan øge titer værdien to til otte gange. Det er derfor sandsynligt, at nogle af de tidligst udførte tests har underestimeret den sande seroprævalens. Der er mange faktorer både med hensyn til test og studiedesign, som kan forårsager store svingninger i udfaldet af den undersøgte seroprævalens, derfor skal resultaterne og sammenholdelse af disse tolkes med forsigtighed.

Nærværende studie vil belyse seroprævalensen af antistoffer mod CHV-1 hos avlshunde i Østdanmark. Samtidig undersøges korrelationen mellem en positiv antistoftiter og alder, køn, parringsstatus, om hunden har en historie med reproduktionsproblemer, samt om hunden bor sammen med andre hunde eller ej.

Virus egenskaber

CHV-1 er et typisk α -herpesvirus. Det er et kapselbærende, opportunistisk virus med lav immunogen aktivitet. Virus har tropisme for både respiratoriske og genitale mucøse membraner samt centralnervesystemet.

Virus er meget følsomt overfor fedtopløsende midler, og inaktiveres hurtigt af almindelige desinfektionsmidler, så som klor eller sprit. Det er stabilt ved temperaturer mellem -70°C og $+40^{\circ}\text{C}$, men bliver hurtigt inaktiveret ved temperaturer over 40°C . Virus inaktiveres også ved -200°C , med mindre kryoprotektorer er tilføjet, som f.eks. i frostsæd. Det er ustabil ved pH-værdier under 5 og over 8 (Carmichael 2004). Virus vokser kun i celler fra Canidae arter, og væksten er bedst i

nyreceller eller testesceller. Væksten er optimal ved 35-37°C (Ronsse et al. 2003). Inficerede celler kan identificeres på på klassiske type A intracellulære inklusioner (Carmichael 2004).

Herpesvirus patogenese

Viral kontaminering kan ske via sekreter fra alle mucøse membraner, f.eks. vaginalslim, sæd, sved, spyt, urin og fæces. Føtus og føtale membraner kan ligeledes være kilde til viral kontaminering. Infektion sker hovedsageligt veneralt, transplacentalt eller oronasalt (Ronsse et al. 2003).

På grund af den lave immunogene aktivitet er virus i stand til at persisterer i en latent form og reaktiveres med regulære intervaller. Reaktivering sker især ved immunsuppression hos værtsdyret. Hos latent inficerede individer lagres herpesvirusgenomerne i ganglionneuroner og i lymfatisk væv (Ronsse et al. 2003, Miyoshi et al. 1999, Chesters et al. 1997)

Virale reaktiveringsperioder er bedre dokumenterede hos tæver end hos hanhunde. Hos tæver ses generelt reaktivering omkring østrus og fødsel (Okuda et al. 1993a). Hos både hanner og tæver ses reaktivering ved immunsuppression (Carmichael 2004, Okuda et al. 1993b). Viral reaktivering hænger ikke nødvendigvis sammen med neonatal død. Når moderdyret er inficeret på et tidligere tidspunkt, modtager hvalpene neutraliserende antistoffer gennem colostrum, således at de er bedre beskyttet mod virus i den kritiske periode.

Prædisponerende faktorer

Alle hunde kan inficeres med CHV-1, uanset immunstatus. Immunsupprimerede hunde er prædisponerede for at udvikle kliniske symptomer i forbindelse med infektion med CHV-1. Dermed kan anden sygdom, stress, kulde samt tævens østrus være prædisponerende faktorer (Ronsse et al. 2004, Okuda et al. 1993a, Okuda et al. 1993b).

Hvalpe under 2-3 uger er også prædisponerede for at blive syge af en CHV-1 infektion, idet de endnu ikke har en optimal termoregulering, og således kan deres immunsvaret ikke reagere optimalt ved infektion (Ronsse et al. 2003).

Andre luftvejssygdomme, så som kennelhoste, kan være prædisponerende for selve infektionen, idet klinisk kennelhoste fremmer den luftbårne smittespredning af CHV-1 (Ronsse et al. 2004). Samtidig kan kennelhoste prædisponere for, at hunden bliver syg af infektionen, idet immunsvaret er nedsat.

Symptomer

Voksne hunde

Hos voksne hunde ses slet ingen eller diskrete symptomer, så som forbigående papulovesiculære læsioner på de ydre genitalier. Ved sådanne læsioner kan observeres smerte under parring. Desuden er herpesvirus en vigtig årsag til luftvejssygdom hos især unghunde og ældre hunde, men også alment sunde og raske hunde kan afficeres, omend sjældnere. Derudover kan ses fertilitetsproblemer og nidationsproblemer, aborter, resorptioner og dødfødte hvalpe (Ronsse et al. 2004, Ronsse et al. 2003, van Gucht et al. 2001, Carmichael & Greene 1998).

Hvalpe

Hos hvalpe ses neonatal mortalitet på grund af viræmi. Hvalpene får symptomer på generaliseret celledød i form af kulderystninger, abdominal smerte, vokalisering, benbevægelser, epistonus og død inden for få dage. Hos hvalpe, der er over 2-3 uger gamle, ses symptomerne oftest som luftvejsinfektioner og konjunktivitis (Ronsse et al. 2003).

Diagnostik

Tentativ diagnose

En tentativ diagnose kan stilles, hvis:

- Der i et opdræt er udbrud af neonatal mortalitet inden for 14 dage efter fødslen.
- Der i et opdræt er problemer med resorptioner af fostre.
- Der er problemer med hypofertilitet eller infertilitet.
- Der foreligger en historie med luftvejsinfektioner.
- Der er observeret genitale læsioner hos avlshundene.
- Der ikke ses nogen makroskopiske forandringer ved post mortem undersøgelser (ikke obduktion) af døde hvalpe under 2 uger.
- Der ses klassiske nekrohæmorrhagiske foci på lunger og renal cortex (nutmeg) ved post mortem patologisk undersøgelse af døde hvalpe under 2 uger.

Konklusiv diagnose

Voksne hunde med symptomer

Voksne hunde med luftvejssymptomer eller konjunktivitis kan testes for CHV-1 ved hjælp af PCR på svaberprøver fra henholdsvis luftvejsslimhinderne og konjunktivalslimhinderne.

Tæven

Tæven kan testes for antistoffer mod CHV-1. Såfremt tæven ikke er vaccineret mod herpesvirus inden for de sidste 8 uger, vil en positiv antistoftiter være lig med en konklusiv diagnose. En højere sensitivitet kan opnås ved at teste under virale reaktiveringsperioder, f.eks. i østrus eller ca. 14 dage post partum (Okuda et al. 1993a).

Til at teste for antistoffer mod CHV-1 kan benyttes en serumneutralisationstest (SN-test) eller en ELISA-test. Hertil bruges serum fra tæven (uden anticoagulant), og gerne to prøver, som tages med 14 dages mellemrum omkring østrus, for at være sikker på reaktiveringstidspunktet.

Døde hvalpe

Ved postmortem undersøgelse af døde hvalpe kan findes klassiske intracellulære inklusioner ved histologisk undersøgelse af nyrer, lever, lunger og milt. Histologisk kan også findes meningoencephalitis læsioner (Ronsse et al. 2003).

Direkte immunofluorescens af nyrer fra nyligt afdøde hvalpe (testes eller fryses indenfor to timer efter død), eller PCR på lunger og nyrer kan påvise viruspartikler (Ronsse et al. 2003).

Differentialdiagnoser

Differentialdiagnostiske overvejelser inkluderer:

- Fading Puppy Syndrome (hvor CHV-1 i øvrigt menes at være involveret).
- Enhver tilstand, der forårsager neonatal mortalitet, som f.eks. toxic milk syndrome, mycoplasmosse eller neonatal septikæmi.
- Brucellose.
- Canin Parvovirus 1 (minut virus) (Carmichael 2004).
- Hypoluteodisme (for lavt progesteronniveau under drægtigheden, pga. hypofunktion af corpora lutea. Viser sig ved resorption af føtus) (Görlinger et al. 2005).

Behandling

Behandling er symptomatisk efter de kliniske tegn, der observeres hos hvalpene. Væske og eventuelt antibiotika kan gives efter behov. Varme med høj luftfugtighed er essentielt for hvalpenes overlevelse de første uger. Velkendt er, at hvalpes immunsvær først fungerer optimalt, når de har fuldt udviklet termoreguleringsevne, idet immunsværet virker bedst ved højere legemstemperaturer. Derved vil hvalpenes eget immunsvær lettere kunne bekæmpe virus, jo ældre hvalpene bliver.

Prognose

Hvalpe

Prognosen for hvalpene er bedre jo ældre hvalpene bliver, idet hvalpenes evne til egen termoregulering, og dermed deres immunsvær, øges.

Der er en tendens til, at infektionen er selvbegrænsende i tidligere inficerede opdræt (Ronsse et al. 2005). Ved efterfølgende drægtigheder kan hvalpene blive naturligt beskyttet af antistoffer gennem colostrum. De vil dog stadig blive bærere af virus, og kan derfor udskille virus i reaktiveringsperioder.

Præventive tiltag

CVH-1 er følsomt overfor temperaturer over 40°C samt UV-lys. Til gengæld kan virus overleve ekstrem kulde, hvis der er kryoprotektorer tilstede, som f.eks. i frossen sæd.

Hypothermi øger som nævnt risikoen for CHV-1 infektion hos nyfødte hvalpe, idet hypothermi hæmmer immunresponset hos hvalpene.

Derfor er det en god idé, at hvalpe i risiko for at være inficerede tørres straks efter fødslen og lægges på en varmegude eller i en inkubator med varme, og gerne med høj relativ luftfugtighed, mellem dieperioderne i de første to til tre uger efter fødslen.

Virus er følsomt overfor en række kemikalier, men rengøring med almindelig klorin klorhexidinsprit er nok til at neutralisere virus. En god hygiejne og hyppig rengøring kan derfor hjælpe med at begrænse infektionen i et opdræt.

I 2006 kom en vaccine mod CHV-1 på markedet i Danmark. Vaccinen er dræbt og virker ved at stimulere produktionen af seroneutraliserende antistoffer hos drægtige tæver, og giver således anledning til passiv immunisering af de nyfødte hvalpe gennem colostrum (Poulet et al. 2001). For

at opretholde antistofniveauet skal vaccinen gives til tæven to gange under drægtigheden. Optimalt gives den første fra en uge før parring til en uge efter parring, og den anden 7-14 dage før forventet fødsel (Poulet et al. 2001). Der er også blevet udviklet en levende attenueret vaccine, som består af en kuldeadapteret CHV mutant. Denne vaccine er dog ikke kommercielt tilgængelig.

Hvalpe i risiko for at blive inficeret kan injiceres med serum fra hyperimmune inficerede moderdyr (Verstegen, 2009). En sådan behandling er dog kun effektiv, hvis virusinfektionen ikke er generaliseret. Det vil sige, at hvis hvalpene først er blevet syge hjælper det ikke at injicere dem immunserum. Immunserum er ikke kommercielt tilgængeligt (Carmichael 2004).

Det har været forsøgt at give aviær poxvirus, som er en interferoninducer, til tæver inden parring og igen inden fødslen. Dette bevirker en ikke-specifik beskyttelse mod at hvalpene får en CHV-1 infektion med dødelig udgang (Carmichael 2004). Denne behandling er kontroversiel og er ikke blevet tilstrækkeligt undersøgt.

Antivirale midler har generelt ikke vist sig særligt virksomme mod CHV-1 infektion hos hvalpe (Carmichael 2004).

For at reducere mængden af virus i vagina, som kan kontaminere hvalpene under fødslen, kan man give tæven et vaginalt antiseptikum præpartum.

Risikoen for smitte fra tæve til hanhund ved parring kan minimeres ved hjælp af inseminering, og risikoen for hanhund til tæve kontaminering kan nedsættes ved midlertidigt at ekskludere hanhunde med mistænkelige genitale læsioner fra avlen. Det er dog vigtigt at huske på, at virus ikke kun smitter ved veneralt og transplacentalt, men også oronasalt via sekreter som spyt, øjenflåd og sved med mere.

Undersøgelsens formål

Formålet med nærværende undersøgelse var at bestemme seroprævalensen af antistoffer mod CHV-1 hos avlshunde i Østdanmark. Derudover var det ønskeligt at finde ud af, om der var korrelation mellem en positiv antistoftiter og følgende parametre:

- Hundens køn
- Hundes alder
- Om hunden har været parret eller ej.
- Om der er én eller flere hunde i husstanden.
- Om hunden har en historie med fertilitetsproblemer, dødfødsler eller neonatal død.

Materialer og metoder

De hunde, der indgik i undersøgelsen blev udvalgt ved tilfældig selektion af avlshunde på tilfældige geografiske lokalisationer i Østdanmark (Sjælland og Lolland-Falster). Den nødvendige stikprøvestørrelse blev beregnet på baggrund af antallet af avlshunde i Danmark, samt den forventede prævalens af herpesvirus. Den forventede prævalens blev sat til 50% procent på baggrund af prævalensstudier fra Belgien, Holland, Schweiz, Frankrig, Finland og Tyskland. Disse undersøgelser har vist divergerende udfald med hensyn til prævalensen i de forskellige populationer (Dahlbom et al. 2007, Ronsse et al. 2005, Guigal et al. 2002, Ronsse et al. 2002, Van Gucht et al. 2001, Rijsewijk 1999, Reading & Field 1998, Poulet et Dubourget 1993). Derfor blev den forventede prævalens sat 50 %, hvilket giver den størst mulige stikprøvestørrelse, der er repræsentativ for populationen.

Studiedesign

Undersøgelsen er lavet som et analytisk tværsnitstudie, hvor udvalgte hunde er testet for tilstedeværelsen af antistoffer mod CHV-1 ved hjælp af en serumprøve.

Udvælgelse af testhunde

I alt indgik 106 hunde i undersøgelsen. Hundene blev udvalgt ved tilfældig selektion af en række kenneler og privatejede hunde ud fra den geografiske lokalisation. Kennelerne og de private hjem,

blev kontaktet med henblik på deltagelse i undersøgelsen. To af de adspurgte kenneler takkede nej til deltagelse i undersøgelsen. Der har ikke været nogen udgifter forbundet med deltagelse i testen for de enkelte kennelejere/hundeejere udover transport til klinikken.

Inklusionskriterier

Følgende kriterier skulle opfyldes af hundene, for at de kunne indgå i undersøgelsen:

- Hundene skulle anvendes som avlshunde, dvs. være bosat i en kennel, være udstationeret fra en kennel eller bo hos en privat opdrætter.
- Hundene måtte ikke være blandingsrace.
- Hundene måtte ikke have været vaccineret mod herpesvirus.

Stikprøveberegning

Stikprøven er beregnet ved hjælp af Excel regneark ud fra formelen:

$$n = p(1-p)[(z_{\alpha/2})/L]^2 \quad (\text{Houe et al. 2003})$$

hvor p = den forventede prævalens, angivet som proportion, $Z_{1-\alpha/2}$ = 97,5% percentilen i en normalfordeling, $1-\alpha$ = konfidensniveauet, angivet som proportion, L = tilladelig standard deviation.

Anvendt i Excel vil formelen se ud som følger:

$$n = \text{required stikprøvestørrelse} = Z^2 * p * (1-p) / L^2$$

Definitioner:

$$p = 0,50$$

$$1-\alpha = 0,95$$

$$Z = 1,96$$

$$L = 0,1$$

Justeret for populationsstørrelse:

$$n (\text{justeret}) = \text{AFRUND.LOFT}(n/(1+n/N); 1; 1).$$

, hvor n = den fundne prævalens, N = populationsstørrelsen

Tabel 2: Beregning af stikprøvestørrelse ved hjælp af Excel regneark ud fra formelen $Z^2 * p * (1-p) / L^2$

Tilladelig error (L)	0,1
Populationsstørrelse (N)	200000
Konfidensniveau (1- α)	0,95
97,5% percentil ($Z_{1-\alpha/2}$)	1,96
Required Sample Size (n)	96,04
Rounded Sample Size (n)	97
Adjusted for Population Size (na)	96

Den forventede prævalens, p, sættes til 50%, dvs. som ved en ukendt prævalens, idet det ikke anses for troværdigt at benytte prævalenser fundet i de øvrige europæiske lande som forventet prævalens. Den totale population er det totale antal af registrerede avlshunde i Danmark, baseret på oplysninger fra Dansk Kennel Klub, Dansk Racehunde Union, Continental Kennel Club i Danmark samt Danske Hundeejeres Landsforening. Den totale population, N, er sat til 200.000 avlshunde. Den nødvendige stikprøvestørrelse er således beregnet til minimum 96 hunde. 106 hunde indgik i undersøgelsen.

Testen

Til detektion af antistoffer mod CHV-1 kan man anvende en enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test eller en serumneutralisations (SN) test. SN-testen er karakteriseret ved at have en høj specificitet, hvorimod ELISA-testen har en høj sensitivitet. I mange år har man tilføjet exogent komplement til SN-testen for at få en højere sensitivitet. De SN-tests, der anvendes i dag har dog fået udviklet en forholdsvis høj sensitivitet uden brug af komplement (Ronsse et al. 2003, Ronsse et al. 2002). Der er dog stadig kontrovertielle meninger om, hvilken test, der er mest nøjagtig at anvende. Nogle undersøgelser viser, at SN-testen er mest nøjagtig (Ronsse et al. 2003, Ronsse et al. 2002), mens andre undersøgelser viser at ELISA-testen er mest nøjagtig (Verstegen, 2009 in prep.). SN-testen er tilgængelig på de fleste større laboratorier, mens ELISA-testen er sværere tilgængelig. Merial har indtil for nyligt haft en ELISA-test på deres laboratorium. Denne er dog ikke længere tilgængelig.

Til undersøgelse af prøvematerialet i nærværende undersøgelse er valgt en SN-test. Det var ønskeligt at sammenligne ELISA- og SN-test, men det har ikke været muligt at finde en tilgængelig ELISA-test for nærværende undersøgelse.

Opsamling og opbevaring af prøvemateriale

Over en periode på 4 måneder, blev opsamlet blod fra de i alt 106 testhunde. 5 ml blod fra hver testhund blev udtaget med en 5 ml trekomponent sprøjte og en 21 G kanyle. Blodet blev med det samme overført til 4 eppendorfrør uden antikoagulant. Blodet blev henstillet i køleskab ved 4°C en time, hvorefter eppendorfrørene blev centrifugeret ved 600 g i 10 minutter. 1-2 ml serum blev høstet fra hver testhund og hældt på små plastrør med tætsluttende skruelåg (se illustration 1)



Illustration 1: Plastrør med tætsluttende skruelåg til opbevaring af serum ved -20°C.

Serumprøverne blev mærket og frosset ned til -20°C umiddelbart efter centrifugering. Alle 106 prøver blev sendt til laboratoriet samme dag. Alle prøver havde været frosset ned til -20°C indtil afsendelse til laboratoriet. Optøning af prøverne skete på vej til laboratoriet.

Serumneutralisationstesten

Hundeserumprøvernes evne til at neutralisere infektiviteten af CHV-1 blev analyseret ved hjælp af canin herpesvirus #11, MDCK celler. Testmaterialet blev tilsat 2%-komplement fra marsvin.

Serumprøverne blev først opvarmet til 56°C i 30 minutter for fuldstændigt at inaktivere evt. endogent komplement. Serumprøverne blev herefter fortyndet 1:2 i Eagles' minimum essential medium, således at der fremkom to af hver prøve, der blev fyldt i 96-brøndsplader. Herefter blev tilsat 5CH50 enheder marsvinekomplement opløst i 50 ml destilleret, demineraliseret vand pr.

brønd. Straks herefter blev ca. 50 plaquedannende virusenheder tilsat til hver brønd, og pladerne blev inkuberet ved 37°C i en time. Herefter blev pladerne anbragt på is for at stoppe reaktionen, og indholdet af hver brønd blev inoculeret på et flydende monolag af føtale minklungeceller (NBL-7), ligeledes på plader med 96 brønde (se illustration 2).

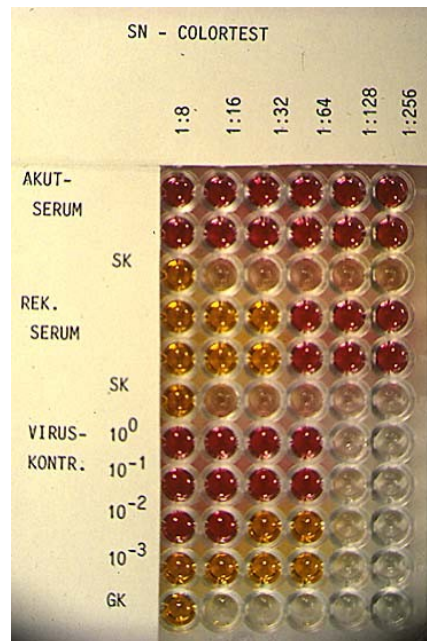


Illustration 2: Del af 96-brønds plade til brug ved serumneutralisationstest.

Disse blev sat i inkubatoren igen og aflæst efter 3-4 døgn. Aflæsningen skete ved at de cytopatiske effekter blev undersøgt under et lysmikroskop. Der blev udført kontroltests, hvor komplement blev erstattet af destilleret, demineraliseret vand i en mængde svarende til mængden af komplement i den egentlige test.

Titrene blev aflæst direkte fra testpladen efter Reed & Munch metoden, som er en klassisk statistisk metode til LD50 indenfor eksperimentel biologi (Reed & Muench, 1938). For hver prøve blev plaques talt og udtrykt som en procentdel af antallet af plaques i medierne uden serumkomplement. Serumneutralisationstiteren er defineret som den reciprokke værdi af den højeste serumopløsning, som producerer 50% plaque inhibering.

Definition af positiv og negativ test

En negativ test defineres som en test som viser en antistoftiter på $<1:8$. En positiv test defineres som en test, som viser en antistoftiter på $\geq 1:8$.

Spørgeskema

For hver hund er der udleveret et spørgeskema, hvori hundeejeren skulle besvare et række spørgsmål om hundens reproduktionshistorie, samt notere hundens fødselsdato, køn, race samt hvilke andre hunde, hunden evt. boede sammen med (se bilag 1).

Data

Titerværdier

Tabel 3: Herpesvirus antistoftiter fundet ved virusneutralisation.

Titerværdi	Test positiv	Test negativ
<1:8	-	78
1:8	6	-
1:12	1	-
1:16	4	-
1:64	2	-
1:96	1	-
1:128	5	-
1:256	5	-
1:384	1	-
1:448	2	-
1:512	1	-
I alt	28	78

Parring

21 ud 28 testpositive hunde havde været parret. 49 ud af 78 testnegative hunde havde været parret.

Tabel 4:

Resultater: Parret vs. ikke parret.

	Test+	Test-	
Parret+	21	49	70
Parret-	7	29	36
	28	78	106

Reproduktionsproblemer

18 hunde ud af 28 testpositive hunde havde en historie om fertilitetsproblemer, dødfødte hvalpe eller neonatal død. 35 ud af 78 testnegative hunde have en historie med reproduktionsproblemer.

*Tabel 5: Resultater:
Reproduktionsproblemer vs. ingen
reproduktionsproblemer.*

	Test+	Test-	
Mismate/død	18	35	53
Mismate/død	10	43	53
	28	78	106

Hundens alder

22 ud af 28 testpositive hunde var over to år gamle. 6 ud af 78 testnegative hunde var over 2 år gamle.

*Tabel 6: Resultater: Over 2 år vs. under
2 år.*

	Test+	Test-	
>2år	22	6	28
<2år	6	72	78
	28	78	106

Samlevende hunde

25 ud af 28 testpositive hunde boede sammen med andre hunde. 70 ud af 78 testnegative hunde boede sammen med andre hunde.

*Tabel 7: Resultater: Lever sammen med
andre hunde vs. lever alene.*

	Test+	Test-	
Samlev+	25	70	95
Samlev-	3	8	11
	28	78	106

Hundens køn

23 ud af 28 testpositive var tæver. 59 ud af 78 testnegative var tæver.

Tabel 8: Resultater: Tæve vs. hanhund.

	Test+	Test-	
tæve+	23	59	82
tæve-	5	19	24
	28	78	106

Resultater

Ud fra data er beregnet en seroprævalens for forekomsten af antistoffer mod CHV-1 hos avlshunde i Østdanmark. Denne prævalens er udregnet til

$$28/106 = 0,26415094 \approx 26,4\%$$

Det blev undersøgt, hvorvidt der var sammenhæng mellem en positiv test og følgende parametre:

- Om hunden havde været parret eller ej.
- Om hunden havde en historik med reproduktionsproblemer.
- Om hunden var over eller under 2 år.
- Om hunden boede sammen med andre hunde eller boede alene.
- Om hunden var en tæve eller en hanhund.

Data er blevet analyseret ved hjælp af det epidemiologiske computerprogram EpiCalc. Heraf findes følgende resultater (se bilag 2):

Parameter	OR	p-værdi
Har være parret	1,78	0,349906
Har haft reproduktionsproblemer (gået tom/døde hvalpe)	2,21	0,123039
Er over 2 år	44,00	0,0000001
Bor med andre hunde	0,95	0,769486
Tæve (vs. han)	1,48	0,658803

Der fandtes ingen korrelation mellem om hunden havde været parret eller ej og hvorvidt den var testet positiv for CHV-1. OR=1,78, dvs. hunde, der har været parret har 1,78 gange højere risiko for at være test positive end hunde, der ikke har været parret. Dette resultat er dog ikke signifikant på 95% konfidensniveau ($p=0,349906$).

Der fandtes en tendens til at en historie med reproduktionsproblemer er korreleret med et positivt testresultat. OR=2,21, dvs. hunden har over dobbelt så stor risiko for at være testet positiv, hvis den har en historie med reproduktionsproblemer. Dette resultat er dog ikke signifikant på 95% konfidensniveau, $p=0,123039$.

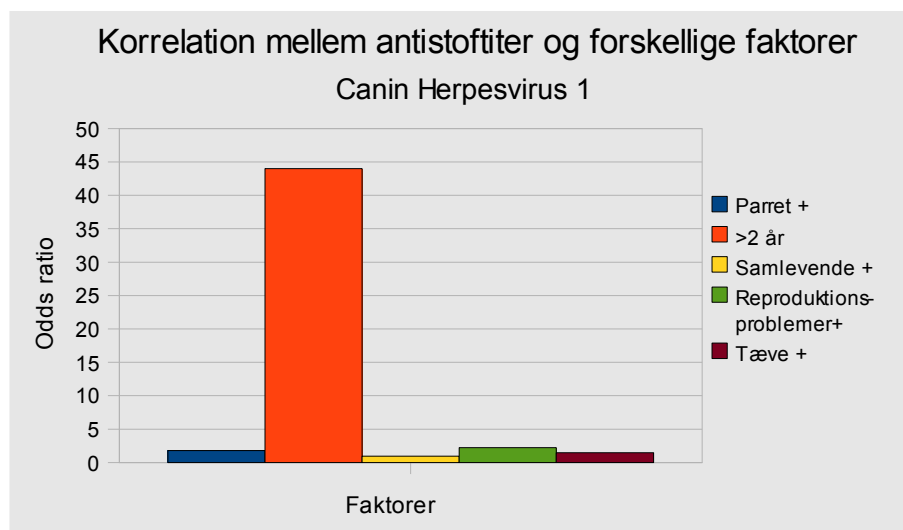


Illustration 5: Korrelation mellem antistoftiter af canin herpesvirus 1 og forskellige faktorer: Parret eller ej, alder, samlevende hunde, reproduktionsproblemer og køn.

Der fandtes en klar sammenhæng mellem hundens alder, og hvorvidt hunden var testet positiv for CHV-1. OR=44,00, dvs. hunde, der er over 2 år har 44 gange større risiko for at være testpositive, end hunde under 2 år. Resultatet er signifikant på 95%-konfidensniveau ($p < 0,0001$).

Der er ikke fundet nogen sammenhæng mellem, hvorvidt hunden bor alene eller sammen med andre hunde, og hvorvidt den var testet positiv for CHV-1, OR=0,95, $p=0,769486$. Der fandtes ej heller nogen sammenhæng mellem hundens køn, og hvorvidt den blev testet positiv for antistoffer mod CHV-1, OR=1,48, $p=0,658803$.

Konklusion og diskussion

Ud fra analyse af data kan konkluderes, at prævalensen af herpesvirus hos avlshunde i Østdanmark er 26,4%. Denne prævalens er betydeligt lavere end de prævalenser, der er fundet i øvrige nylige undersøgelser i Europa. Om det er rimeligt at konkludere, at denne prævalens er faktum, kan diskuteres. Her kan mange forskellige faktorer have en indflydelse.

En vigtig faktor er herpesvirus lave immunogene effekt og dermed begrænset persistens af antistoffer. Nogle kilder angiver at antistofniveauet efter infektion med, eller ved reaktivering af, CVH-1 kun persisterer i op til 60 dage. (Ronsse 2005). Derfor vil det være usandsynligt at kunne angive den sande prævalens af antistoffer mod CHV-1 hos avlshunde. SN-testen samt ELISA-testen vil derfor altid vise en stor andel af falsk negative sammenholdt med den sande prævalens. Dette betyder, at et stort antal af de hunde, der er testet negative for CHV-1, stadig vil kunne være bærere

af virus og dermed medvirke til en virusspredning, der vil være meget svær at finde kilden til.

En anden vigtig faktor er aflæsning af testen. Hvis man f.eks. forestillede sig, at cut-off værdien af laboratoriet havde været sat til 1:128 i stedet for 1:8, ville resultatet af undersøgelsen give en prævalens på 8,5 %. Dette betyder, at en væsentligt højere prævalens måske ville kunne observeres, hvis cut-off værdien havde været lavere end 1:8. Havde cut-off værdien derimod været 1:2, som den er i mange af de studier, der anvender en SN-test til bestemmelse af seroprævalensen, ville man måske kunne forvente en noget højere prævalens.

For et mere sikkert testresultat havde det været ønskeligt at udføre både en parret ELISA-test og en parret SN-test på testhundene. Et sådant studiedesign ville dog komme til langt at overskride budgettet for nærværende undersøgelse. Derfor vil resultatet kunne være vejledende, som pilotprojekt for f.eks. en landsdækkende undersøgelse af seroprævalensen af antistoffer mod herpesvirus. Men stående alene er det tvivlsomt, hvor pålideligt resultatet er.

I undersøgelsen er der ikke fundet nogen signifikant større risiko for seropositivitet hos hunde, der har været parret i forhold til hunde, der endnu ikke har været parret. Der er ej heller fundet større risiko for seropositivitet hos hunde, der bor sammen med andre hunde i forhold til hunde, der bor alene. Der ses en tendens til, at hunde, der har en historie med reproduktionsproblemer, har over dobbelt så stor risiko for at seropositivitet end hunde, der ikke har haft reproduktionsproblemer.

Umiddelbart vil det synes lidt underligt, at der ikke er fundet en mere signifikant korrelation mellem en positiv herpesvirusantistof titer og reproduktionsproblemer. Dette kan forklares med, at tæver, som har været inficeret nogen tid, alt andet lige vil have længere tid mellem reaktiveringsperioderne og dermed have et lavere antistofniveau end nyinficerede tæver. Det vil sige, der hvor reproduktionsproblemerne ses, er hos de nyinficerede dyr. En anden sammenhæng ville måske ses, hvis man undersøgte sammenhængen i en population af hunde med fertilitetsproblemer.

Perspektivering

Seroprevalensen af CVH-1 er i denne undersøgelse betydeligt lavere end i mange af de øvrige prævalensundersøgelser, der er foretaget på avlshunde andre steder i Europa. I nogle undersøgelser er der fundet seroprævalenser på op mod 100% hos avlshunde. Dette kan betyde, at vi i Østdanmark endnu kun er ved begyndelsesstadiet af udbredelsen af herpesvirus i Danmark. Det kunne være interessant at undersøge om den fundne seroprævalens i Østdanmark er gældende for resten af landet også, eller om der er tegn på geografisk variation. I en sådan undersøgelse bør som minimum anvendes både en ELISA-test og en SN-test for at øge testsikkerheden i forhold til nærværende

undersøgelse.

Der er lavet adskillige undersøgelser, som belyser udskillelsen af CHV-1 hos tæver. Disse beskriver alle, at tæver ikke udskiller virus konstant, men kun i reaktiveringsperioderne, det vil sige specielt omkring østrus og fødsel. Til dato findes der ingen dokumenterede undersøgelser på udskillelsen af virus hos hanhunde. Det betyder, at det ikke vides om hanhunde, ligesom hingste og hankatte, udskiller virus konstant, eller om de som tæverne kun udskiller virus i reaktiveringsperioder. Dette er et vigtigt aspekt i forbindelse med forebyggelse af virusspredning. Hvis hanhunde f.eks. konstant udskiller virus i sæden, kan det betyde, at smittede hanhunde burde ekskluderes fuldstændigt fra avlen. Der kunne udføres et studie af dette ved at undersøge sæden fra smittede hanhunde i et prospektivt kohortestudie, hvor hanhundredes sæd undersøges for tilstedeværelse af virus flere gange i løbet af en given periode.

En fuldstændig hindring af spredning af virus er nok utopi. Men flere tiltag kan iværksættes for at hindre tab af hvalpe. Et standardiseret vaccinationsprogram for drægtige tæver, ville være et af de punkter, hvorved man kan være med til at sikre en bedre overlevelse af hvalpe, uanset tævens CHV-1 status. F.eks. kunne tæven vaccineres, når den starter løbetid, 14 dage efter parring samt 14 dage inden termin.

Det kunne være et fremskridt at få udviklet en vaccine, som opretholder antistofniveauet i længere tid, men den lave frekvens af kliniske udbrud sammenholdt med eksisterende herpesvirusvacciners lave immunogene effekt, reducerer incitamentet for vaccineudvikling.

Litteraturliste

Bibrack B, Schaudinn W: 1976: *Untersuchungen über das vorkommen von herpesinfektionen bei hunden in der Bundesrepublik Deutschland mit hilfe eines neutralisations-schnelltest*, Zentralbl. Veterinarmedizin Reihe B, 23: pp. 384-390.

Carmichael LE: 2004: *Neonatal Viral Infections of Pups: Canine Herpesvirus and Minute Virus of Canines (Canine Parvovirus-1)*, In: Recent Advances in Canine Infectious Diseases, Carmichael LE (Ed.) International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org), 2004; A0102.0899

Carmichael LE, Greene CE: 1998: *Canine herpesvirus infection*, In: Infectious diseases of the dog and cat, ed. Grene CE, WB Saunders, Philadelphia: pp. 28-32.

Carmicael LE, Strandberg JD, Barnes FD: 1965: *Identification of a cytopathogenic agent infectious for puppies as a canine herpesvirus*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 120: pp. 644-650.

Chesters PM, Aasop R, Purewai A, Edington N: 1997: *Detection of latency-associated transcripts of equid herpesvirus 1 in equine leukocytes but not in trigeminal ganglia*, Journal of Virology, 71: pp. 3437-3443.

Dahlbom M, Johnsson M, Myllys V, Taponen J, Andersson M: 2007: *Seroprevalence of Canine Herpesvirus-1 and Brucella canis in Finnish Breeding Kennels with and without Reproductive Problems*, Reproduction of Domestic Animals, 44-1: pp. 128-131.

Delisle F: 1982: *L'herpèsvirose canine*, Rec. Médecine Veterinaire, 158: pp. 669-676.

Engels M, Mayr-Bibrack B, Ruckstuhl B, Metzler A, Wyler R: 1980: *Seroepizootiology of caninenherpesvirus in Switzerland and preliminary trials of a vaccine*. Zentralbl. Veterinarmedizin Reihe B; 27: pp. 257-267.

Linde-Forsberg C, 2009: Personlig meddelelse

Fulton RW, Ott RL, Duenwald JC, Gorham JR: 1974: *Serum antibodies against canine respiratory viruses: prevalence among dogs of eastern Washington*. American Journal of Veterinary Res., 35, 853-855.

Guigal PM, Fontbonne A, Buff S, Vincetti M, Thévenet F, Pavlowiez S, Guiot AL, Grandjean D, Poulet H: 2002: *Prevalence of antibodies against Canine Herpes Virus in French breeding kennels*. In: Versteegen J., Onclin K., Linde-Forsberg C. (eds), Proceedings of the third EVSSAR European Congress on Reproduction in Companion, Exotic and Laboratory Animals, Liège, May 2002. Presses de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Liège : Liège, 132.

Görlinger S, Galac S, Kooistra HS, Okkens AC: 2005: *Hypoluteodism in a bitch*, Theriogenology, 64: pp. 213-219.

Houe H, Ersbøll AK, Toft N, Agger, JF: 2003: *Veterinary epidemiology - from hypothesis to conclusion, 2 edition*, Samfundslitteratur, KVL-bogladen, Frederiksberg

Lacheretz A, Cognard S: 1998: *Epidémiologie et diagnostic sérologique de l'herpèsvirose canine*, Review Médecine Vétérinaire., 149: pp. 853-856.

Lundgren DL, Clapper WE: 1969: *Neutralization of canine herpesvirus by dog and human serums: a survey*, American Journal of Veterinary Res.; 30: pp. 479-482.

Miyoshi M, Ishii Y, Takiguchi M, Takada A, Yasuda J, Hashimoto A, Okazaki K, Kida H: 1999: *Detection of canine herpesvirus DNA in the ganglionneurins and lymph node lymphocytes of latently infected dogs*, Journal of Veterinary Medical Science; 61: pp. 375-379.

Okuda Y, Ishida K, Hashimoto A, Yamaguchi T, Fukushi H, Hirai K, Carmichael LE: 1993a: *Virus reactivation in bitches with a medical history of herpesvirus infection*, American Journal of Veterinary Research; 54: pp. 551-554.

Okuda Y, Hashimoto A, Yamaguchi T, Fukushi H, Mori S, Tani M, Hirai K, Carmichael LE: 1993b: *Repeated canine herpesvirus (CHV) reactivation in dogs by an immunosuppressive drug*, The Cornell Veterinarian; 83: pp. 291-302.

Osterhaus A, Berghuis DE, Vries J, Steur K: 1977: *Antiviral antibodies in dogs in the Netherlands*, Zentralbl. Veterinarmedizin Reihe B; 24: pp. 123-133.

Poulet H, Bubourget P: 1993: *L'herpès-virose canine*, Point Vétérinaire.; 25: pp. 69-75.

Poulet H, Guigal PM, Soulier M, Leroy V, Fayet G, Minke J, Chappuis G: 2001: *Protection of puppies against canine herpesvirus by vaccination of the dams*, Veterinary Records; 148: pp. 691-695.

Reading MJ, Field HJ: 1998: *A serological study of canine herpes virus-1 infection in the English dog population*, Archive of Virology; 143: pp. 1477-1488.

Reed, LJ, Muench, H: 1938: *A simple method of estimating fifty percent endpoints*, The American Journal of Hygiene; 27: pp. 493-497.

Rijsewijk FAM, Luiten EJ, Daus FJ, van der Heijden RW, van Oirschot JT: 1999: *Prevalence of antibodies against canine herpesvirus 1 in dogs in the Netherlands in 1997-1998*, Veterinary Microbiology; 65: pp. 1-7.

Ronsse V, Verstegen J, Onclin K, Guiot AL, Aeberlé C, Nauwynck HJ, Poulet H: 2002: *Seroprevalence of Canine Herpesvirus-1 in the Belgian dog population in 2000*. Reproduction of Domestic Animals; 37: pp. 299-304.

Ronsse V, Poulet H, Verstegen J, Thiry E: 2003: *L'herpès-virose canine*, Ann. Médecin Vétérinaire; 147: pp. 65-76.

Ronsse V, Verstegen J, Onclin K, Farnir F, Poulet H: 2004: *Risk factors and reproductive disorders associated with canine herpesvirus-1 (CHV-1)*, Theriogenology , 61: pp. 619-636.

Ronsse V, Verstegen J, Thiry E, Onclin K, Aeberlé C, Brunet S, Poulet H: 2005: *Canine herpesvirus 1 (CHV-1): clinical, serological and virological patterns in breeding colonies*, Theriogenology; 64: pp. 61-74.

Schwens A, Pastoret PP, Aguilar-Seiten: 1980:

Fréquence de l'infection par le virus herpétique canin (canine herpesvirus 1) en Belgique. Ann. Médecin Vétérinaire; 124: pp. 353-359.

Spertzel RO, Huxsoll DL, McConnell SJ, Binn LN, Yager RH: 1965: *Recovery and characterization of a herpes-like virus from dog kidney cell cultures*, Proc. Soc. Experimental Biol. Medicine; 120: pp. 651-655.

Seo LB, Seong WW, Lim CH: 1994: *Survey on the seroepidemiology of canine herpesvirus infection in Korea*, Korean Journal of Veterinary Res.; 34: pp. 647-652.

Stewart SE, David-Ferreira J, Lovelace E, Landon J: 1965: *Herpes-like virus isolated from neonatal and fetal dogs*, Science;148: pp. 1341-1343.

Takumi A, Kusanagi K, Tuchiya K, Xuan X, Azetaka M Takahashi E: 1990: *Serodiagnosis of canine herpesvirus infection-development of an enzymelinked immunosorbent assay and its comparison with two improved methods of serum neutralization test*, Japanese Journal of Veterinary Science;52: pp. 241-250.

Van Gucht S, Nauwynck H, Pensaert M: 2001: *Prevalence of canine herpesvirus in kennels and the possible association with fertility problems and neonatal death*, Vlaam. Diergeneeskd. Tijdschr.; 70: pp. 204-211.

Verstegen J, 2009: Personlig meddelelse.

BILAG 1

Herpesvirusundersøgelse	
Dato for udtagelse af blod:	Prøve nr: _____ (udfyldes af klinik)
Ejer: _____ Adresse: _____ Postnr/by _____ Tlf. _____ Evt. e-mail: _____	Dyrlæge Nina Diers Jersie Dyreklinik Jersie Strandvej 23 2680 Solrød Strand
Hundens navn: _____ Han _____ Tæve _____ Race: _____ Født: _____	
Er hunden blevet herpesvaccineret? _____ Hvis ja, hvornår _____ Har hunden haft samme bopæl siden 8 ugersalderen? _____	
For tæver : Har tæven været parret? ja / nej Har tæven været drægtig? Ja / nej Hvis ja, antal kuld _____ Har tæven resorberet fostre? Ja / nej Hvis ja, hvor mange gange? _____ Antal hvalpe i hvert kuld _____ Antal døde hvalpe under 3 uger _____	
For hanhunde: Antal parringer? _____ Har ikke været benyttet til avl _____ (sæt kryds) Antal kuld _____ Antal hvalpe pr. kuld? _____, (gennemsnit) Antal døde hvalpe under 3 uger _____ Eventuelle kommentarer: _____	

BILAG 2

Tables - 2-by-2 stratified

Parret

Stratum 1

		+	-		Total
	-----+	-----	-----	+	-----
+		21	49		70
-		7	29		36
	-----+	-----	-----	+	-----
Total		28	78		106

Risk ratio [95% CI] : 1,54 [0,73; 3,28]
Odds ratio [95% CI] : 1,78 [0,67; 4,69]
Yates corrected Chi-square : 0,87
p-value : 0,349906

Crude

		+	-		Total
	-----+	-----	-----	+	-----
+		21	49		70
-		7	29		36
	-----+	-----	-----	+	-----
Total		28	78		106

Risk ratio [95% CI] : 1,54 [0,73; 3,28]
Odds ratio [95% CI] : 1,78 [0,67; 4,69]
Yates corrected Chi-square : 0,87
p-value : 0,349906

Summary [95% CI]

Mantel-Haenszel risk ratio : 1,54 [0,73; 3,28]
Mantel-Haenszel odds ratio : 1,78 [0,67; 4,69]
Mantel-Haenszel Chi-square : 0,87
p-value : 0,352188

BILAG 2

Tables - 2-by-2 stratified

>2år/<2år

Stratum 1

		+	-		Total
	-----+	-----	-----	+	-----
+		22	6		28
-		6	72		78
	-----+	-----	-----	+	-----
Total		28	78		106

Risk ratio [95% CI] : 10,21 [4,62; 22,57]
Odds ratio [95% CI] : 44,00 [12,88; 150,27]
Yates corrected Chi-square : 49,67
p-value : 0,000000

Crude

		+	-		Total
	-----+	-----	-----	+	-----
+		22	6		28
-		6	72		78
	-----+	-----	-----	+	-----
Total		28	78		106

Risk ratio [95% CI] : 10,21 [4,62; 22,57]
Odds ratio [95% CI] : 44,00 [12,88; 150,27]
Yates corrected Chi-square : 49,67
p-value : 0,000000

Summary [95% CI]

Mantel-Haenszel risk ratio : 10,21 [4,62; 22,57]
Mantel-Haenszel odds ratio : 44,00 [12,88; 150,27]
Mantel-Haenszel Chi-square : 49,20
p-value : 0,000001

BILAG 2

Tables - 2-by-2 stratified Samlevende/ikke samlevende

Stratum 1

		+	-		Total
	-----+	-----	-----	+	-----
+		25	70		95
-		3	8		11
	-----+	-----	-----	+	-----
Total		28	78		106

Risk ratio [95% CI] : 0,96 [0,35; 2,68]
Odds ratio [95% CI] : 0,95 [0,23; 3,87]
Yates corrected Chi-square : 0,09
p-value : 0,769486

Crude

		+	-		Total
	-----+	-----	-----	+	-----
+		25	70		95
-		3	8		11
	-----+	-----	-----	+	-----
Total		28	78		106

Risk ratio [95% CI] : 0,96 [0,35; 2,68]
Odds ratio [95% CI] : 0,95 [0,23; 3,87]
Yates corrected Chi-square : 0,09
p-value : 0,769486

Summary [95% CI]

Mantel-Haenszel risk ratio : 0,96 [0,35; 2,68]
Mantel-Haenszel odds ratio : 0,95 [0,23; 3,87]
Mantel-Haenszel Chi-square : 0,09
p-value : 0,77054

BILAG 2

Tables - 2-by-2 stratified

Mismatch/død

Stratum 1

		+	-		Total
	-----+	-----	-----	+	-----
+		18	35		53
-		10	43		53
	-----+	-----	-----	+	-----
Total		28	78		106

Risk ratio [95% CI] : 1,80 [0,92; 3,53]
Odds ratio [95% CI] : 2,21 [0,91; 5,40]
Yates corrected Chi-square : 2,38
p-value : 0,123039

Crude

		+	-		Total
	-----+	-----	-----	+	-----
+		18	35		53
-		10	43		53
	-----+	-----	-----	+	-----
Total		28	78		106

Risk ratio [95% CI] : 1,80 [0,92; 3,53]
Odds ratio [95% CI] : 2,21 [0,91; 5,40]
Yates corrected Chi-square : 2,38
p-value : 0,123039

Summary [95% CI]

Mantel-Haenszel risk ratio : 1,80 [0,92; 3,53]
Mantel-Haenszel odds ratio : 2,21 [0,91; 5,40]
Mantel-Haenszel Chi-square : 2,36
p-value : 0,124820

BILAG 2

Tables - 2-by-2 stratified

Tæve/han

Stratum 1

		+	-		Total
	-----+	-----	-----	+	-----
+		23	59		82
-		5	19		24
	-----+	-----	-----	+	-----
Total		28	78		106

Risk ratio [95% CI] : 1,35 [0,57; 3,16]
Odds ratio [95% CI] : 1,48 [0,49; 4,44]
Yates corrected Chi-square : 0,20
p-value : 0,658503

Crude

		+	-		Total
	-----+	-----	-----	+	-----
+		23	59		82
-		5	19		24
	-----+	-----	-----	+	-----
Total		28	78		106

Risk ratio [95% CI] : 1,35 [0,57; 3,16]
Odds ratio [95% CI] : 1,48 [0,49; 4,44]
Yates corrected Chi-square : 0,20
p-value : 0,658503

Summary [95% CI]

Mantel-Haenszel risk ratio : 1,35 [0,57; 3,16]
Mantel-Haenszel odds ratio : 1,48 [0,49; 4,44]
Mantel-Haenszel Chi-square : 0,19
p-value : 0,660016