

# Kan et Brix Refraktometer måle IgG i pattegrise?



Dyrlæge Louise Høge Skovsmose



Køberupvej 33, 4700 Næstved

## Tak

Flere har været behjælpelige med tilblivelsen af denne fagdyrlægeopgave. Derfor skal der lyde en stor tak til:

- Torben Lorenzen og hans ansatte for at åbne dørene og stille besætning til rådighed
- Anja Kibsgaard, Ø-Vet for at være behjælpelig med udtagning af blodprøverne
- Professor Peter Heegaard og laborant Henriette Vorsholt, Innate Immunology and Metabolism Group, Experimental and Translational Immunology, Department of DTU Health Technology for at analysere blodprøverne.

## Resumé

Den høje pattegrisedødelighed i danske besætninger udgør et velfærdsmæssigt- og økonomisk problem. Det er essentielt for pattegrises overlevelse, at de optager råmælk, gerne  $\geq 10$  mg/ml IgG. De fleste undersøgelser af pattegrises optagelse af IgG er dyre og kræver, at prøverne analyseres på et laboratorium. Målet har derfor været at undersøge Brix måling som praktisk metode, hvor serum fra 24 timer gamle pattegrise er undersøgt. Formålet har været at undersøge, om Brix måling kan bruges til at måle IgG niveau i pattegrise.

I forsøget er 96 blodprøver udtaget fra pattegrise i én besætning. Blodprøverne er centrifugeret i besætningen og serum er afpippet til et håndholdt Refraktometer med Brix skala. Brix værdierne er aflæst fra 6% til 11%. IgG er bestemt vha. Sandwich - ELISA og værdierne svinger imellem 6,9 mg/ml - 61,3 mg/ml. Brix værdierne er lineært korreleret til IgG. Ligningen for tendenslinjen er  $y = 7,6x - 33,3$ . I Excel er der bestemt et 95% konfidensinterval for ligningens hældningskoefficient og skæring med y-aksen.

Brix måling er praktisk muligt og Brix måling kan bruges til at bestemme IgG niveau i pattegrise. En Brix værdi  $\geq 8,3$  % sikrer med ligningen fra det nedre 95% konfidensinterval et IgG niveau  $\geq 10$  mg/ml.

## Introduktion

I 2021 var pattegrisedødeligheden i konventionelle besætninger 15,2% frem til fravæning. Dette har været stigende siden 2016 (Hansen, 2022). Dette udgør således både et økonomisk og et velfærdsmæssigt problem. Det er essentielt for pattegrises overlevelse, at de får kolostrum. Pattegrise fødes med lave energidepoter og uden antistoffer. De er således afhængige af mælkens komplekse indhold af bl.a. kulhydrater, fedt, proteiner og maternelle antistoffer (Le Dividich et al., 2005). Soens placenta er epitheliochorial, hvilket er årsagen til, at der ikke overføres antistoffer imellem so og pattegrise via blodet i drægtighedsperioden (Dyce et al., 2002).

Antistoffer betegnes også som immunglobuliner. Disse kan underopdeles i immunglobulin G (IgG), immunglobulin A (IgA) og immunglobulin M (IgM) (Hurley, 2015)

Omkring faring udgør IgG i soens kolostrum ca. 80% af den totale koncentration af immunglobulin, og niveauet falder drastisk over det første døgn (Klobasa et al., 1987; Hurley et al., 2011). På grund af den store mængde IgG i råmælken er det ofte det immunglobulin, som kvantificeres i eventuelle undersøgelser (Hurley, 2015).

Pattegrisenes tarm er kun permeable for immunglobuliner i 24 - 36 timer efter faring (Kruse, 1983). Det er derfor vigtigt, at de nyfødte grise bl.a. får overført IgG for at være beskyttet imod sygdomsfremkaldende agens, indtil grisenes eget immunforsvar er modnet og kan danne antistoffer (Rooke et al., 2002).

I besætninger med høj pattegrisedødelighed kan det derfor være relevant, at undersøge om deres management omkring råmælksforsyning er tilstrækkelig.

Optagelsen af IgG fra råmælk kan måles i serum fra pattegrise. IgG i serum er indikator for optagelsen af råmælk og topper ca. 12 timer post partum (Klobasa et al., 1981).

Måling af IgG i serum kan bl.a. bestemmes vha. Sandwich - ELISA, Elektroforese, Radial immunodiffusion samt almindelig ELISA (Thorup et al., 2016); Schoos et al., 2021). Fælles for disse undersøgelser er, at de er tidskrævende, dyre og ikke kan laves i besætningen med det samme.

I litteraturen er det ikke præciseret hvilket serum IgG niveau i pattegrise, som sikrer god immunitet og overlevelse. Thorup et al., (2016) gengiver, at 10 mg/ml målt 12 timer efter faring er tilstrækkeligt, mens Cabrera et al., (2012) har udtaget blodprøver fra pattegrise 48 -

72 post partum og fundet 67% overlevelse blandt grise med IgG på 10 mg/ml og 91% overlevelse ved 22,5 mg/ml.

I et tredje forsøg er blodprøver udtaget 24 timer post partum. De pattegrise, som dør inden for de første 3 dage, havde en plasma IgG koncentration på 15 - 19 mg/ml, mens grise, som dør efter dag 4, har et niveau på 19 - 23 mg/ml. Grisene, som blev fravænet, havde et IgG niveau imellem 23 - 25 mg/ml 24 timer efter faring (Devillers et al., 2011).

Til sammenligning anvendes 10 mg/ml som minimumsværdi for IgG, når f.eks. kalveserum undersøges vha. Brix måling (Deelen et al., 2014). Selvom der i forsøgene fra Thorup et al., (2016), Cabrera et al., (2012) og Devillers et al., (2011) er udtaget blodprøver på forskellige tidspunkter, og de derfor ikke er helt sammenlignelige, må det antages, at IgG niveau på 10 mg/ml er absolut minimum også for pattegrise.

Det er tidligere konkluderet, at Brix måling vha. et Brix refraktometer kan bruges til at bestemme immunglobulin koncentration i serum fra 24 timer gamle pattegrise. Metoden er billig og kan tilmed foretages i stalden (Schoos et al., 2021). Værdier på refraktometeret aflæses i procent og angiver normalt sukkerindholdet i eksempelvis frugtjuice, men når refraktometeret bruges på ikke-sukkerholdige væsker tilnærmer Brix værdien den totale procent tørstof (Deelen et al., 2014). I undersøgelsen fra Schoos et al., (2021) er Brix målingerne signifikant korreleret med ELISA og elektroforese, dog bedst med elektroforese imellem de to analysemetoder. Ud fra elektroforese resultaterne er der udarbejdet Brix værdier, som indikerer lav, middel og højt niveau af serum immunglobulin koncentration, ikke specifikt til IgG. Lavt niveau <10mg/ml = 5,4% Brix, middel niveau ved 20 mg/ml = 7,0 % Brix og højt niveau >30 mg/ml = 7,9 % Brix. Det kunne være interessant at undersøge, om Brix måling ligeledes kan bruges til at bestemme IgG, og evt. bestemme en værdi, som sikrer minimum 10 mg/ml.

Under danske forhold er det muligt at undersøge IgG koncentration i serum på Danmarks Tekniske Universitet (DTU) vha. Sandwich - ELISA (Thorup et al., 2016). Målet med undersøgelsen er derfor at afprøve Brix refraktometri som praktisk metode.

Formålet er at undersøge om et Brix Refraktometer kan måle IgG i pattegrise.

## Materialer/Metode

Undersøgelsen blev udført i én dansk besætning med 1350 Danbred årssøer. Sundhedsstatus var Blå SPF + MYC + AP12. Besætningen havde ugedrift og farestalden bestod af traditionelle kassestier i farestalden.

Brix måling blev udført én gang på serum fra 1 dag gamle pattegrise. Dagen for udtagning af blodprøver blev planlagt til 24 timer efter den ugedag, de forventede flest faringer.

På dagen for blodprøveudtagningen havde 18 søer faret 24 timer forinden. Først efter blodprøveudtagning foretog de ansatte deres normale rutiner med kuldudjævning mm.

### Stikprøvestørrelse

Til beregningen af antal blodprøver, er det antaget, at der er overensstemmelse i 50% af målingerne imellem Brix måling og DTU's metode med en præcision på +/- 10% med et konfidensinterval på 95. Populationen er sat til 1000 grise. Stikprøvestørrelsen er beregnet til 97 blodprøver (se appendix 1)

De 97 grise, som skulle indgå i studiet, blev delt ud på de 18 kuld. Der skulle således indgå 6 grise pr. kuld. Blodprøverne blev udtaget fra v. Jugularis i 2 ml EDTA blodprøveglas. So nummer, lægnummer og pattegrisnummer er noteret ned på et dertil lavet skema (se appendix 2).

### Laboratorieundersøgelser

Efter endt blodprøveudtagning blev blodprøverne centrifugeret i besætningens forrum vha. en microcentrifuge fra Steinberg Systems (model SBS-LZ-4000/20-12) ved 2625 r/min i 10 min. Herefter blev en dråbe serum afpipetteret med en 3,5 ml plastikpipette. Serumdråben blev placeret under dækslet på et håndholdt Kolostrum Refraktometer med Brix skala (0 - 30) fra Kruuse. Dråben dækkede hele det optiske felt, og værdien er aflæst og noteret ned. Inden undersøgelse af næste prøve blev refraktometeret tørret rent med papir.

Blodprøverne er efterfølgende sendt til DTU, Department of Health Technology, og undersøgt ved Sandwich - ELISA. For hver blodprøve har det resulteret i to IgG værdier.

### Statistiske analyser

Alt data er indtastet i Microsoft Excel 2016. Den eksakte IgG værdi fra DTU er beregnet som gennemsnittet imellem de to værdier i Excel.

Minimum- og maksimumværdier, gennemsnit og median fra begge metoder er bestemt vha. Excel.

Brix værdien i procent blev plottet over for IgG koncentrationen (mg/ml) i et punktdiagram. Ud fra disse plots blev der indsat en tendenslinje, hvor ligning og den kvadrerede korrelation er vist i diagrammet. Ydermere er der vha. lineær regression i Excel bestemt et 95% konfidensinterval for tendenslinjens hældningskoefficient og skæring med Y-aksen. Ud fra det nedre 95% konfidensinterval er der udregnet en mindsteværdi for Brix, som sikrer IgG  $\geq 10$  mg/ml.

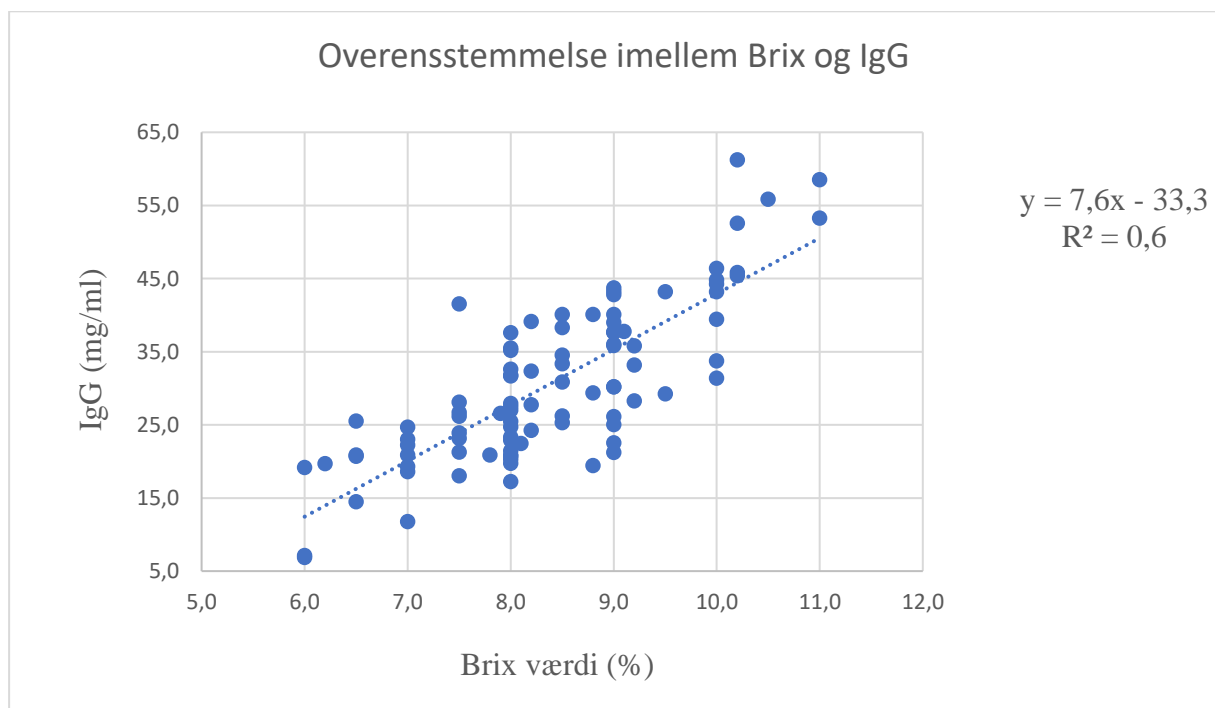
## Resultater

Ud af de beregnede 97 blodprøver lykkedes det at udtage 96 blodprøver. Prøve 16 er udgået pga. for lav værdi i IgG og prøve 33 er mistet efter endt blodprøveudtagning. I alt 94 blodprøver indgik således i undersøgelsen. Imellem 2 - 7 pattegrise/kuld indgik i undersøgelse.

Den mindste Brix værdi som blev aflæst var 6% og den højeste blev aflæst til 11% med et gennemsnit på 8,4% og en median på 8,2% Brix. Spredningen på IgG værdierne er 6,9 mg/ml - 61,3 mg/ml. Gennemsnittet er 30,6 mg/ml og medianen er på 26,5 mg/ml (se appendiks 3)

Af nedenstående figur 1 fremgår sammenhængen imellem aflæste Brix værdier (X-aksen) og IgG værdier (Y-aksen). Den indsatte tendenslinje viser en lineær sammenhæng.

Hældningskoefficient ( $7,6x$ ) og skæring med Y-aksen ( $- 33,3$  mg/ml) er angivet i ligningen i øverste højre hjørne. Overensstemmelse imellem data og den rette linje ses i  $R^2 = 0,6$ . Ligning bruges når en Brix værdi ( $x$ ) skal omregnes til en IgG værdi ( $y$ ).



Figur 1

Lineær regression fra Excel med øvre- og nedre 95% konfidensinterval (KI) for hældningskoefficienten (X-variabel 1) er vist i tabel 1 (komplet data output ses i appendix 4).

	<i>Koefficienter</i>	<i>Standardfejl</i>	<i>t-stat</i>	<i>P-værdi</i>	<i>Nedre 95%</i>	<i>Øvre 95%</i>
Skæring med Y-aks	-33,3	5,0	-6,6	0,0	-43,3	-23,3
X-variabel 1	7,6	0,6	12,8	0,0	6,4	8,8

Tabel 1

Hældningskoefficienten ligger med 95% sikkerhed imellem 6,4 og 8,8 og tilhørende ligninger kan udtrykkes således:

Ligningen for det nedre 95% KI:  $y = 6,4x - 43,3$

Ligningen for det øvre 95% KI :  $y = 8,8x - 23,3$

For at være sikker på at have målt et IgG niveau på 10 mg/ml anvendes ligningen for det nedre konfidensinterval, hvor Brix% (x-variabel) isoleres i ligningen.

Isolering af x :  $x = y + 43,3/6,4$

Brix værdi ved 10 mg/ml :  $10 \text{ mg/ml} + 43,3/6,4 = 8,3 \text{ \% Brix}$

Med Brix værdi på 8,3% har pattegrise med 95% sikkerhed minimum 10 mg/ml IgG.



## Diskussion

Med undersøgelsen er det bekræftet, at det i praksis er muligt at anvende Brix måling ude i en besætning. Det lykkedes ikke at udtage alle 97 blodprøver med 6 blodprøver fra hvert kuld som planlagt, men det lykkedes at få blodprøver fra alle kuld. Årsagen til det var, at pattegrisene var meget små, hvilket besværliggjorde blodprøveudtagningerne. Risikoen for strangulerende hæmatom vurderedes for høj på grise som forventeligt vejede under 700g, så disse grise indgik derfor ikke i undersøgelsen. Dette stiller krav til, at rutinen vedligeholdes regelmæssigt for at sikre høj nok velfærd og overlevelse af pattegrisene.

Brix målingerne kan laves fra pattegrisene er 12 timer, da Thorup et al., (2016) har vist IgG optaget er tilstrækkeligt her. Dette er i overensstemmelse med Klobasa et al., (1981).

Undersøgelsestidspunktet er dog planlagt hovedsageligt ud fra et praktisk aspekt. Det skal være muligt at planlægge besøg i staldene, dagen efter at hovedparten af faringerne har fundet sted, for at metoden er anvendelig. Med et undersøgelsestidspunkt som ligger ca. 24 timer post partum har det tilmed været muligt at sammenligne resultaterne med Schoos et al., (2021), som er de første, der har beskæftiget sig med Brix målinger på serum fra pattegrise.

Der er stor spredning i IgG resultaterne imellem grisene. En sådan spredning er normalt både imellem besætninger, blandt kuldsøskende og kuldene imellem. Dette kan genfindes i flere forsøg bl.a. i Kielland et al., (2015) og i Schoos et al., (2021). IgG gennemsnittet i de medvirkende besætninger fra Schoos et al., (2021) svingede fra 35 - 63 mg/ml med en spredning fra 0 - 115 mg/ml. Thorup et al., (2016) har tidligere beskrevet, ved forskellige analysemetoder, at gennemsnittet for IgG niveauer 12 timer post partum ligger på 30 mg/ml. Det gennemsnitlige IgG niveau fra dette studie forventes altså at ligge inden for normalområdet.

Spredningen fra 6 - 11% på Brix værdierne i denne undersøgelse er mindre end 3,5 - 12,1% Brix fundet i Schoos et al., (2021), men med tanke på, at der kun indgik én besætning i denne undersøgelse og spredningen af IgG ligeledes var mindre, stemmer det fint overens. Det er også muligt at spredning i denne undersøgelse reelt er større, idet de grise, som blev vurderet for små, ikke indgik i undersøgelsen. Medianen fra denne undersøgelse på 8,2% er dog stort set identisk med 8,4% fundet i Schoos et al., (2021) selvom at stikprøvestørrelsen i denne undersøgelse kun udgør en tredjedel.

Undersøgelsen viser en lineær sammenhæng imellem den målte Brix værdi og IgG værdierne.  $R^2$  korrelation på 0,6 viser at punkterne ligger rimelig tæt på den rette linje.

Overensstemmelsen kan selvfølgelig ønskes tættere på 1, som det ses i Deelen et al., (2014), hvor Brix% er korreleret til IgG bestemt vha. Radial Immunodiffusion. I den pågældende undersøgelse, er det kalveserum, som undersøges vha. et Brix Refraktometer. Her ønskes Brix > 8,4%, for at IgG niveauet i kalveserum er minimum 10 mg/ml. Dette stemmer med den værdi fundet i dette studie ved brug af det nedre 95% KI.

Schoos et al., (2021) anvender 5,4%, 7%, og 7,9% som udtryk for hhv. lav, middel og højt niveau af serum immunglobulin. Ved brug af samme cut off værdier på hhv. 10, 20 og 30 mg/ml kan lignende Brix værdier udregnes ved brug af ligningen fra figur 1. Der er således god overensstemmelse imellem resultaterne, selvom der anvendes forskellige analysemetoder, og at der i forsøget fra Schoos et al., (2021) er målt på den totale koncentration af immunglobulin. Ligningen fra figur 1 kan derfor principielt bruges til at udregne IgG niveau hos pattede grise. Usikkerheden opstår dog, når der ønskes sikkerhed for, at den aflæste Brix værdi svarer til minimum 10 mg/ml, som antageligt skal sikre pattede grisenes overlevelse. Derfor bør ligningen for det nedre 95% KI bruges i stedet.

Resultatet i denne undersøgelse er altså sammenligneligt med langt mere videnskabelige forsøg såsom Schoos et al., (2021) og Deelen et al., (2014). Dette til trods for at der i denne undersøgelse ikke er viden om IgG niveau i kolostrum, hvor meget råmælk grisene har optaget, fødselstidspunkt for første og sidste gris i kuldene og grisenes fødselsvægt.

Fremadrettet er der behov for afklaring af, hvornår blodprøver præcist skal udtages efter optagelse af råmælk, og hvilket IgG niveau i serum der sikrer god immunitet og overlevelse blandt pattede grise. Indtil en Brix værdi er korreleret til sådanne data forventes Brix værdi  $\geq 8,3$  % fra dette studie med 95% sikkerhed at sikre et IgG niveau  $\geq 10$  mg/ml. Resultatet skal dog vurderes ud fra det forbehold, at der heller ikke i denne undersøgelse er kigget på overlevelse.

## Konklusion

Et håndholdt Brix Refraktometer kan anvendes i praksis til bestemmelse af IgG i serum fra 1 dag gamle pattede grise. Der er fundet en lineær sammenhæng imellem Brix værdier og IgG værdier bestemt vha. Sandwich - ELISA. En Brix værdi på 8,3% sikrer med 95% sikkerhed et IgG niveau  $\geq 10$  mg/ml.

## Referencer

- Cabrera, R. A., Lin, X., Campbell, J. M., Moeser, A. J., & Odle, J. (2012). Influence of birth order, birth weight, colostrum and serum immunoglobulin G on neonatal piglet survival. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 3(1). <https://doi.org/10.1186/2049-1891-3-42>
- Deelen, S. M., Ollivett, T. L., Haines, D. M., & Leslie, K. E. (2014). Evaluation of a Brix refractometer to estimate serum immunoglobulin G concentration in neonatal dairy calves. *Journal of Dairy Science*, 97(6), 3838–3844. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-7939>
- Devillers, N., Dividich, J. L., & Prunier, A. (2011). Influence of colostrum intake on piglet survival and immunity. *Animal*, 5(10), 1605–1612. <https://doi.org/10.1017/S175173111100067X>
- Dividich, J. le, Rooke, J. A., & Herpin, P. (2005). Nutritional and immunological importance of colostrum for the new-born pig. *Journal of Agricultural Science*, 6, 469–485. <https://doi.org/10.1017/S0021859605005642i>
- Dyce, K. M., Sack, W. O., & Wensing, C. J. G. (2002). *Textbook of Veterinary Anatomy* (Third Edition), 206–207. SAUNDERS.
- Hansen, C. (2022). Landsgennemsnit for produktivitet i produktionen af grise 2021, NOTAT Nr. 2204. *SEGES INNOVATION*, 1–14.
- Hurley, W. L. (2015). Composition of sow colostrum and milk. In *The Gestating and Lactating Sow*, 193–229. Wageningen Academic Publishers. [https://doi.org/10.3920/978-90-8686-803-2\\_9](https://doi.org/10.3920/978-90-8686-803-2_9)
- Hurley, W. L., & Theil, P. K. (2011). Perspectives on immunoglobulins in colostrum and milk. In *Nutrients*, 3(4), 442–474. <https://doi.org/10.3390/nu3040442>
- Kielland, C., Rootwelt, V., Reksen, O., & Framstad, T. (2015). The association between immunoglobulin G in sow colostrum and piglet plasma. *Journal of Animal Science*, 93(9), 4453–4462. <https://doi.org/10.2527/jas.2014-8713>
- Klobasa, F., Werhahn, E., & Butler, J. E. (1981). Regulation of humoral immunity in the piglet by immunoglobulins of maternal origin. *Research in Veterinary Science*, 31(2), 195–206. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(18\)32494-9](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)32494-9)
- Klobasa, F., Werhahn, E., & Butler, J. E. (1987). Composition of Sow Milk during Lactation. *Journal of Animal Science*, 64, 1458–1466.
- Kruse, P. E. (1983). The importance of colostral immunoglobulins and their absorption from the intestine of the newborn animals. *Annals of Veterinary Research*, 14(4), 349–353.
- Rooke, J. A., & Bland, I. M. (2002). The acquisition of passive immunity in the new-born piglet. *Livestock Production Science*, 78(1), 13–23. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(02\)00182-3](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(02)00182-3)


Schoos, A., Spiegelaere, W. de, Cools, A., Pardon, B., Audenhove, E. van, Bernaerdt, E., Janssens, G. P. J., & Maes, D. (2021). Evaluation of the agreement between Brix refractometry and serum immunoglobulin concentration in neonatal piglets. *Animal*, *15*(1), 100041. <https://doi.org/10.1016/J.ANIMAL.2020.100041>

Thorup, F., & Nielsen, M. B. F. (2016). Optagelse af maternelle råmælksantistoffer hos pattedrise, Meddelelse Nr. 1085. *SEGES Videncenter for Svineproduktion, Den Rullende Afprøvning*.

# Appendix 1. Beregning af stikprøvestørrelse

mple size to estimat x +

epitools.ausvet.com.au/oneproportion

 EPITOOLS

Home Prevalence Freedom Studies Diagnostics Sampling

Analysed: Mon Jan 16, 2023 @ 20:16 UTC

## Inputs

Estimated Proportion	0.5
Desired precision of estimate	0.1
Confidence level	0.95
Population size	1000

## Results

### Sample size required for specified inputs

Large population	97
Population = 1000	89



## Appendiks 3. Rådata

	Antal i alt	So nr.	Gris nr.	Læg. Nr	Brix- værdi (%)	IgG (mg/ml) - beregnet gennemsnit fra DTU's data
• Kuld 1	1	8291	1	1	7,5	21,3
	2	8291	2	1	7,5	26,2
	3	8291	3	1	8,5	34,55
	4	8291	4	1	8,5	30,85
	5	8291	5	1	8,8	40,1
	6	8291	6	1	7,0	11,8
• Kuld 2	7	8284	1	1	8,8	19,45
	8	8284	2	1	10,0	33,75
	9	8284	3	1	8,5	25,3
	10	8284	4	1	8,0	17,25
	11	8284	5	1	9,0	42,8
	12	8284	6	1	8,0	31,8
• Kuld 3	13	8290	1	1	8,0	25,5
Udgår pga. værdi	14	8290	2	1	8,9	
	15	8290	3	1	9,0	26,15
	16	8290	4	1	9,0	35,85
	17	8290	5	1	9,0	40,1
	18	8290	6	1	7,8	20,9
• Kuld 4	19	8200	1	1	8,0	27,95
	20	8200	2	1	7,0	18,6
	21	8200	3	1	7,0	22,25
	22	8200	4	1	8,0	22,9
	23	8200	5	1	8,1	22,45
	24	8200	6	1	8,0	20,75
• Kuld 5	25	7049	1	4	10,0	43,2
	26	7049	2	4	10,2	52,6
	27	7049	3	4	10,0	44,25
	28	7049	4	4	11,0	58,55
	29	7049	5	4	10,5	55,85
	30	7049	6	4	11,0	53,3
• Kuld 6	31	7305	1	3	10,2	45,85
	32	7305	2	3	10,0	46,4
TABT!	33	7305	3	3		
	34	7305	4	3	8,0	20,85
	35	7305	5	3	10,2	61,25
• Kuld 7	36	7895	1	2	9,0	21,25
	37	7895	2	2	7,5	28,1
• Kuld 8	38	6306	1	6	9,1	37,8
	39	6306	2	6	8,0	37,6
	40	6306	3	6	6,5	20,9

	41	6306	4	6	7,5	26,7
	42	6306	5	6	7,0	19,3
	43	6306	6	6	7,0	24,7
	44	6306	7	6	7,9	26,6
• Kuld 9	45	6246	1	6	8,2	27,75
	46	6246	2	6	7,5	18,05
	47	6246	3	6	8,0	35,5
	48	6246	4	6	9,5	43,2
	49	6246	5	6	9,5	29,25
	50	6246	6	6	8,0	27,5
	51	6246	7	6	9,0	37,65
• Kuld 10	52	7834	1	2	8,5	40,1
	53	7834	2	2	7,0	23,05
• Kuld 11	54	7823	1	2	6,2	19,7
	55	7823	2	2	8,0	21,45
	56	7823	3	2	6,0	7,165
	57	7823	4	2	6,5	14,5
	58	7823	5	2	6,0	6,88
	59	7823	6	2	7,5	23,9
• Kuld 12	60	7367	1	3	6,5	20,7
	61	7367	2	3	10,2	45,4
	62	7367	3	3	10,0	31,4
	63	7367	4	3	8,0	20,3
	64	7367	5	3	8,0	32,6
	65	7367	6	3	10,0	44,85
• Kuld 13	66	6993	1	4	9,2	28,3
	67	6993	2	4	9,0	22,55
	68	6993	3	4	9,0	30,2
	69	6993	4	4	9,2	33,2
	70	6993	5	4	8,0	24,75
	71	6993	6	4	8,2	24,25
	72	6993	7	4	9,0	25,05
• Kuld 14	73	7293	1	3	6,0	19,2
	74	7293	2	3	8,5	33,35
	75	7293	3	3	7,5	23,15
	76	7293	4	3	9,0	43,75
	77	7293	5	3	10,0	39,45
	78	7293	6	3	7,5	41,55
	79	7293	7	3	9,0	43,25
• Kuld 15	80	7855	1	3	8,0	27
	81	7855	2	3	8,0	23,35
	82	7855	3	3	7,0	20,9
	83	7855	4	3	9,2	35,8
• Kuld 16	84	7430	1	3	8,5	38,3
	85	7430	2	3	8,0	35,2
	86	7430	3	3	9,0	37,7



	87	7430	4	3	8,0	19,75
• Kuld 17	88	7088	1	4	8,2	39,15
	89	7088	2	4	6,5	25,55
	90	7088	3	4	9,0	39
	91	7088	4	4	8,5	26,25
	92	7088	5	4	8,8	29,4
	93	7088	6	4	9,0	36,05
• Kuld 18	94	7885	1	2	8,2	32,35
	95	7885	2	2	9,0	30,2
	96	7885	3	2	8,0	31,7
Minimum					6,0	6,9
Maksimum					11,0	61,3
Gennemsnit					8,4	30,6
Median					8,2	26,5

## Appendiks 4. Lineær regression i Excel

RESUMEOUTPUT  
fra Excel

<i>Regressionsstatistik</i>	
Multipel R	0,800652121
R-kvadreret	0,641043818
Justeret R-kvadreret	0,637142121
Standardfejl	6,518655989
Observationer	94

ANOVA

	<i>fg</i>	<i>SK</i>	<i>MK</i>	<i>F</i>	<i>Signifikans F</i>
Regression	1	6981,523946	6981,524	164,2987	3,50572E-22
Residual	92	3909,344583	42,49288		
I alt	93	10890,86853			

	<i>Koefficienter</i>	<i>Standardfejl</i>	<i>t-stat</i>	<i>P-værdi</i>	<i>Nedre 95%</i>	<i>Øvre 95%</i>	<i>Nedre 95,0%</i>	<i>Øvre 95,0%</i>
Skæring med Y-aks	33,28487347	5,027324666	-6,62079	2,35E-09	-43,2695742	-23,3002	-43,2695742	23,30017274
X-variabel 1	7,620824052	0,594545206	12,81791	3,51E-22	6,440005954	8,801642	6,440005954	8,80164215