

Utveckling och standardisering av metodik för analys av klostridiesporer i träck

Anders Christiansson och Inger Andersson, Svensk Mjolk

Bakgrund

Lantbrukare som fått anmärkning och kvalitetsavdrag för höga sporhalter i mjölken måste kunna åtgärda problemet på ett effektivt sätt. Om problemet inte åtgärdas innebär det inkomstbortfall som kan vara mycket kännbara.

Det är därför av betydelse för lantbrukaren att veta hur högt ”sportrycket” är på gården. Analyser av ensilage ger en uppfattning om sporhalten i ensilage. En svårighet är emellertid att ta ut ett representativt prov från en ensilagebal eller silo, eftersom sporer inte är jämnt fördelade i partiet. Om istället prov tas ut från träcken har ensilage effektivt omblandats genom bearbetningen i kons matsmältningskanal och sporer fördelats jämnt. En tidigare svensk undersökning har visat att analyser av träck ger god överensstämmelse med sporhalt i mjolk och avsevärt högre korrelation än mellan mjolk och ensilage.

Under 2005/2006 drabbades många lantbrukare av avdrag för hög sporhalt i mjölken. Träckanalyser har prövats som rådgivningsverktyg i detta sammanhang men har inte alltid visat sig kunna förklara förekomsten av sporer i mjölken. Olika analysföretag erbjuder analyser av sporinnehållet i träck. En ringanalys där Svensk Mjolk skickade ut gödselprover med känd sporhalt till laboratorier som utför sådana analyser visade på mycket stor spridning i analysresultaten för samma prov. Vi fann också att analysmetoderna skiljde sig mellan de olika laboratorierna. Det är därför av yttersta vikt att ha en väl genomarbetad metod som utförs likformigt för att analysresultaten ska bli jämförbara.

Analys av klostridiesporer i mjolk görs vanligen med rörmetoden (MPN-metoden). Utmärkande för MPN-metoden är att konfidensintervallen för haltuppskattningarna är stora. Vid träckanalys kan rörmetoden användas, men eftersom halterna är höga kan även spädning och spridning på agarplatta användas. Denna metod ger teoretiskt sett högre precision och är enklare att utföra. Mätprincipen är koloniräkning och behöver inte nödvändigtvis ge samma resultat som rörmetoden som baseras på gasutvecklingen. För att kunna bedöma informationsvärdet i mikrobiologiska analysresultat är det nödvändigt att känna till och ta hänsyn till den variation i analys svar som uppträder i alla metoder vid upprepade analyser av samma prov.

Ett stort antal odlingssubstrat med olika sammansättning har beskrivits i litteraturen. Inget av dessa substrat leder till att man detekterar endast sporer av *Clostridium tyrobutyricum*, den art som vanligast orsakar ostjäsning. Men trots detta kan man för rörmetoderna och mjolk påvisa *Cl. tyrobutyricum* i 70% av rören (examensarbete hos Steins). I denna undersökning har traditionella analysmetoder utvärderats, eftersom de idag är de enda som är ekonomiskt möjliga att utföra i massanalys. Utgångspunkten i vårt substratval har därför varit att använda de substrat som är/varit aktuella i rutinanalyserna som används i mejeriernas kvalitetsprogram.

Av ovan nämnda skäl har vi jämfört olika metoder för att ta fram en standardiserad metod som försäkrar att bästa möjliga samstämmighet och informationsvärde fås mellan träck- och mjölkanalyser. För att kunna utnyttja träckanalyser och mjölkanalyser i rådgivningsarbetet är det viktigt att rådgivaren har en god förståelse för mätmetodernas begränsningar och möjligheter. I detta projekt har en sådan analysmetod tagits fram som förhoppningsvis ska kunna ge lantbrukaren och rådgivaren ett effektivt verktyg för att välja rätt åtgärder vid höga halter klostridiesporer i mjölken. Analysresultatet ska inte användas fristående utan användas tillsammans med rådgivarens bedömning av historiska mjölkbedömningsdata, bedömning av kornas renhet och spenrengöringsrutinerna.

Material och metoder

Provtagning

Prover på gödsel och tankmjölk från gårdar med olika sporhalt i mjölken baserat på resultat från ordinarie mjölkanalys insamlades inom Arlas område med hjälp av rådgivare från husdjursföreningarna. Totalt samlades prover från 43 gårdar. Gödselprovet (35-70 g) togs som ett samlingsprov från färsk gödsel taget på 2-4 ställen i ladugården. Mjolkprovet togs från mjölktanken genom manluckan med bulkotestprovtagare eller kloraminbehandlad skopa. Två provburkar om 50 ml vardera togs ut. Proverna märktes och frystes vid -20°C före transport till laboratoriet. Analyserna gjordes av Eurofins Steins Laboratorium, i Jönköping.

I samband med provtagningen noterades och bedömdes gårdens spenavtorkningsrutiner. Avtorkningsmetoderna kodades enligt följande:

1) ingen avtorkning; 2) torrt papper, 3) fuktig duk/papper; 4) fuktig och torr duk eller 5) annan, specificera. Noggrannheten vid användning av de olika avtorkningsmetoderna bedömdes som 1) bra; 2) acceptabla eller 3) dåliga. Det fanns också en möjlighet att skriva kommentarer på bedömningsformuläret. Rådgivarna behövde inte utöver följesedeln göra några särskilda anteckningar för projektet, men deras allmänna intryck av gårdarna redovisades muntligen i samband med utvärdering och tolkning av analysresultaten.

Övriga prover

En noggrann enkätundersökning av ensileringsförhållandena på gårdar med och utan sporproblem i mjölken gjordes i ett examensarbete vid SLU. Enkäten besvarades i samband med ett rådgivningsbesök. Gödselprover togs i flytgödselbrunnen på 22 gårdar med mycket hög sporhalt i mjölken och från 19 gårdar som inte haft sporanmärkning. De sistnämnda gårdarna besvarade samma enkät. Gödselproverna som analyserades med rörmetoden med BBB-substrat vid Eurofins Steins

laboratorium (enligt metodbeskrivning från oss) och ingår också i bedömningsunderlaget för denna rapport.

Analysmetoder

För detaljer i genomförandet av analysmetoderna se Svensk Mjölk Forskning Rapport nr 7070-P (2007). Den detaljerade beskrivningen bör följas för att kunna producera standardiserade resultat.

Mjölkproverna samt spädning -1 av träckprovet värmebehandlades vid 79-81°C i 10 minuter i vattenbad (detaljerad beskrivning i Svensk Mjölk-rapporten). Utspädning av träckproverna gjordes i 10-steg i peptonvatten.

Träckproven (43 st) analyserades med 4 olika metoder

- plattspridning med MRCM-substrat
- plattspridning med BBB-substrat, BBB-buljong med tillsats av 15 g agar per liter)

Plattspridning gjordes med ytspridning med 0,1 ml per platta. Mätområde 1×10^2 per g – 10^8 /g. Inkubering anaerobt i 4 dygn vid 37°C.

Ca 5 kolonier per prov konfirmerades med katalastest

- MPN-metodik med MRCM-substrat i rör med paraffinpropp
- MPN-metodik med BBB-substrat i rör med paraffinpropp

MPN-metoden utfördes i 6 rör med 9 ml substrat och 1 ml prov+ 6 rör med 9,9 ml substrat och 0,1 ml prov från vardera av spädningarna -3, -5, -7.

Mätområde ca 3×10^2 per g – 10^8 per g

Mjölken (43 st) analyserades med två metoder

- MPN-metodik med MRCM-substrat (6 x 1 ml +6 x 0,1 ml)
- MPN-metodik med BBB-substrat (6 x 1 ml + 6x 0,1 ml = ordinarie rutinmetod hos Steins, men med modifierade rörkombinationer för att erhålla bästa möjliga analysprecision över ett stort mätområde).

Mätområde 75-35000 sporer/l

MPN-analyserna gjordes i 16,5 mm rör med tillsats av substrat, prov och paraffinpropp. Inkubering av rören gjordes aerobt men med syreskydd av paraffin (cirka 13 mm hög propp), 4 dygn, 37°C. Rör räknades som positiva om paraffinproppen lyfts fullständigt från vätskeytan.

Repeterbarhet av analysresultat

För träck- och mjölkprover från 27 gårdar upprepades analyserna med BBB-rörmetoden. Dessa prover hade frysförvarats fram till det andra analystillfället.

Medelvärden för de två analystillfällena beräknades liksom repeterbarhetsstandardavvikelsen. 95%-iga konfidensintervall för analysosäkerheten beräknades.

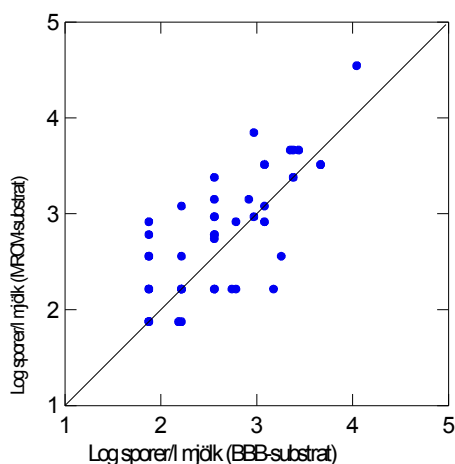
Statistisk analys

Analys (Wilcoxon signed rank test, Spearmans rangkorrelation) gjordes med Systat ver. 11 (Systat Software Inc. USA).

Resultat och diskussion

Mjölkanalys

Mjolkproverna analyserades med MPN (rör)-metoden och BBB-substrat eftersom detta är ordinarie rutinmetod i mjölkanalysverksamheten. Dessutom gjordes samma analys med MRCM-substrat. Anledningen till detta var att MRCM tidigare använts som substrat i rutinmetoden för mjölkanalysverksamheten. I Figur 1 jämförs resultaten. Sporhalten i mjolkproverna varierade mellan mindre än 100/l till mer än 10.000/l. Om analysmetoderna skulle ge likvärdiga resultat borde lika många punkter ligga på var sida om linjen, men analysvärdena med MRCM är i genomsnitt *högre* än för BBB (Wilcoxon signed rank test $p=0,04$). *Det är värt att notera att de förhöjda mjölkanalysvärdena som uppträdde under 2005/2006 alltså inte berodde på övergången till ett nytt substrat i mjolkbedömningsanalyserna.*



Figur 1. Jämförelse mellan analysresultat för mjölk med BBB- och MRCM-substrat

Träckanalys

I den inledande värderingen av träckanalysmetoderna utvärderades förekomst av katalaspositiva kolonier på plattorna samt graden av läsbarhet. BBB-plattor var betydligt lättare att avläsa än MRCM-plattor p.g.a. distinktare kolonier och mindre förekomst av utflytande kolonier (spridare). Katalaspositiva kolonier påträffades endast för ett av 43 prover på BBB-plattor medan för 12 av 43 prover på MRCM-platta fanns det katalaspositiva kolonier. I de flesta fallen understeg andelen sådana kolonier 50% av totalantalet på plattan. Vid jämförelse mellan metoderna

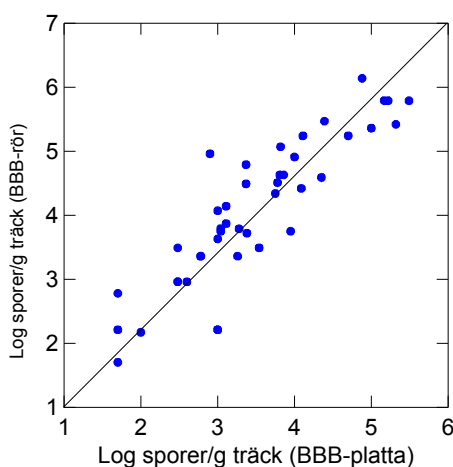
(korrelationsanalys och Wilcoxon signed rank test) utvärderades resultaten med och utan korrektion för förekomst av katalaspositiva kolonier.

Tabell 1 visar samvariationen i mätresultat mellan de olika träckanalysmetoderna. Det fanns en positiv samvariation mellan samtliga analysmetoder med värden från 0,54 till 0,88. Vid jämförelse mellan mikrobiologiska analysmetoder är det normalt att samvariationen inte är perfekt ens vid jämförelse av samma prover analyserade två gånger med samma metod. Det beror på att mikrobiologiska analysdata alltid är behäftade med en relativt stor analysvariation. Den bästa samstämmigheten (korrelationskoefficient 0,88) fanns mellan analys med BBB på platta och i rör (Tabell 1). Även rörmetoden för BBB och MRCM (0,80), samt rörmetoden med MRCM och BBB platta (0,74) gav hög samvariation.

Tabell 1. Samvariation i analysresultat för träck (Spearman-korrelationer)

	BBB platta	MRCM platta	BBB rör	MRCM rör
BBB platta	1.00			
MRCM platta	0.62	1.00		
BBB rör	0.88	0.55	1.00	
MRCM rör	0.74	0.54	0.80	1.00

Figur 2 Jämförelse mellan analysresultat för träck med BBB-medium och -platta respektive rör



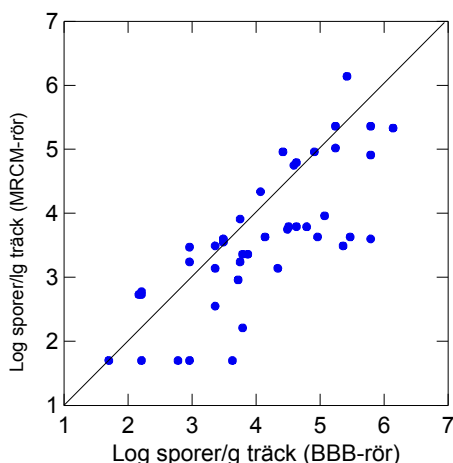
Att samvariation finns mellan analysresultaten med olika metoder behöver inte betyda att identiska analysresultat fås med metoderna. Detta illustreras i Figur 2. I genomsnitt blev analysvärdena cirka 0,5 logenheter högre i rör än på platta med BBB-medium. Skillnaden är statistiskt signifikant (Wilcoxon signed rank test $p < 0,001$). Plattspridning av träck på BBB och MRCM gav likvärdiga resultat (Wilcoxon signed rank test $p = 0,36$).

I Tabell 2 visas utvärdering med Wilcoxon signed rank test för samtliga kombinationer av träckanalysmetoder. Analysresultaten för BBB i rör var

Tabell 2. Parvisa jämförelser av skillnader i analysresultat (p-värden) för träck med Wilcoxon signed rank test. P-värden <0,05 anger signifikanta skillnader.

	BBB platta	MRCM platta	BBB rör	MRCM rör
BBB platta	1.00			
MRCM platta	0.36	1.00		
BBB rör	<0.001 ←	<0.001 ←	1.00	
MRCM rör	0.16	0.047 ←	0.001 ↑	1.00

signifikant högre än för MRCM på platta och även jämfört med MRCM i rör (Figur 3). Pilarna i Tabell 2 anger vilket substrat som gavs högst värde bland de skillnader som var statistiskt signifikanta. Sammanfattningsvis kan sägas att analys med BBB i rör gav högre resultat än analys på platta med båda substraten. BBB i rör gav högre analys värden än MRCM i rör. Den genomsnittliga skillnaden var 0,5 -1 logenheter. Plattmetoden gav likartat resultat för båda substraten men lägre än med BBB i rör. Valet av träckanalysmetod är därför av betydelse om kvantitativa jämförelser med mjölk ska kunna göras.



Figur 3. Jämförelse mellan analysresultat för träck med BBB och MRCM i rör

Jämförelser mellan mjölk- och träckanalys

Samvariationen i analysresultat mellan de olika träck- och mjölkanalys-metoderna visas i Tabell 3. Korrelationerna mellan mjölk- och träckresultat var generellt högre för mjölkanalyserna med MRCM än för mjölkanalyser med BBB. Träckanalys med rörmetoden gav högre korrelationer med mjölkanalysresultaten än träckanalys med plattspridning.

Tabell 3. Samvariation mellan mjölk och träckanalyser (Spearman-korrelationer)

	BBB platta	MRCM platta	BBB rör	MRCM rör
BBB mjölk (rör)	0.26	0.26	0.43	0.35
MRCM mjölk (rör)	0.58	0.42	0.75	0.60

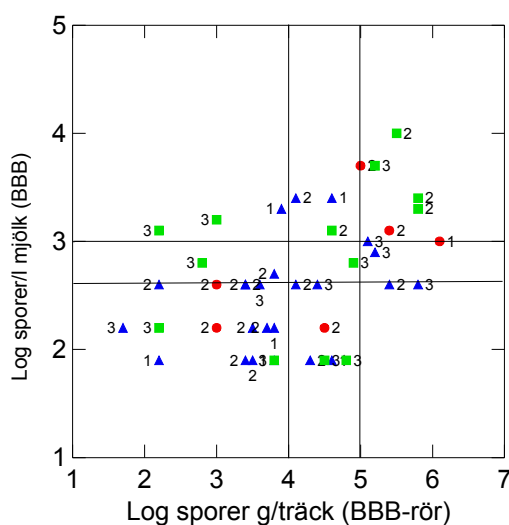
Det är dock svårt att enbart med ledning av korrelationskoefficienterna avgöra vilken kombination av analysmetoder som är optimal. Observera att de lägre korrelationerna mellan mjölk och träckanalyser kan ha andra orsaker än skillnader i analysmetod. Mjölkvärdena påverkas också av de åtgärder som görs på gården bl.a. i samband med

mjölkning. Träckanalyserna kommer i praktisk tillämpning också att jämföras med ordinarie mjölkanalyser, som görs med BBB i rör. Det är därför rimligt att välja denna metod för mjölkanalyser även vid utredande extraanalyser trots att korrelationskoefficienterna vid jämförelse med träck är lägre. Eftersom träckanalys i rör ger högre värden än på platta och BBB ger högre värden än MRCM i rör, så är det logiskt att även använda BBB i rör för träckanalysen. På detta sätt minimeras de skillnader i analysresultat som beror på valet av analysmetod. I fortsättningen utvärderades därför kombinationen träckanalys med BBB i rör och mjölkanalys med BBB rör.

Figur 4 visar utfallet vid analys med den valda metodkombinationen. Linjerna i figuren avskiljer gårdar med låg sporhalt <math><400/1</math> mjölk (log 2,6) och gårdar med mer än 1000 sporer (log 3) per liter. Träckanalysresultaten har delats upp i värden under log 4 (10.000/g), log 4-5 och mer än log 5 (100.000/g).

Avtorkningsrutiner och bedömning av noggrannhet för samtliga gårdar anges också. Röd cirkel: avtorkning med torrt papper, blå triangel: fuktig avtorkning, grön fyrkant: fuktig avtorkning följt av torr. Siffrorna står för bedömning noggrannheten vid användning av avtorkningsrutinen 1: Dålig, 2: tillfredsställande 3: noggrann.

Figur 4. Jämförelse mellan träckanalys med BBB-rör och mjölkanalys med BBB för de 43 gårdarna.



Att döma av dessa resultat klarar flertalet gårdar med mindre än 10.000 sporer/g gödsel att hålla en sporhalt under 400/l. Över denna gräns varierade sporhalten i mjölken. I intervallet log 4- log 5 sporer/g träck fanns det leverantörer som använde noggrann fuktig plus torr avtorkning och lyckades understiga 1000 sporer/l mjölk. Detta är säkert en effekt av goda rutiner och visar att i detta intervall kan sporhalten sänkas genom effektiv avtorkning. I samma intervall fanns även gårdar med dåliga eller sämre avtorkningsrutiner där mjölkens sporhalt inte understeg 1000/l. Noggrannheten vid avtorkning i denna grupp var mindre tillfredsställande och avtorkningsmetoderna inte de bästa. I vissa fall fanns det också smutsiga djur. Enstaka gårdar med torr avtorkning fanns i alla grupperna. Vid sporhalt över log 5 i träcken tillämpade flertalet leverantörer bra avtorkningsmetoder med tillfredsställande eller bra noggrannhet, men kunde ändå inte sänka sporhalten i mjölken till under

1000/l. Denna bild bekräftades av rådgivarnas iakttagelser att flera av dessa gårdar var välskötta.

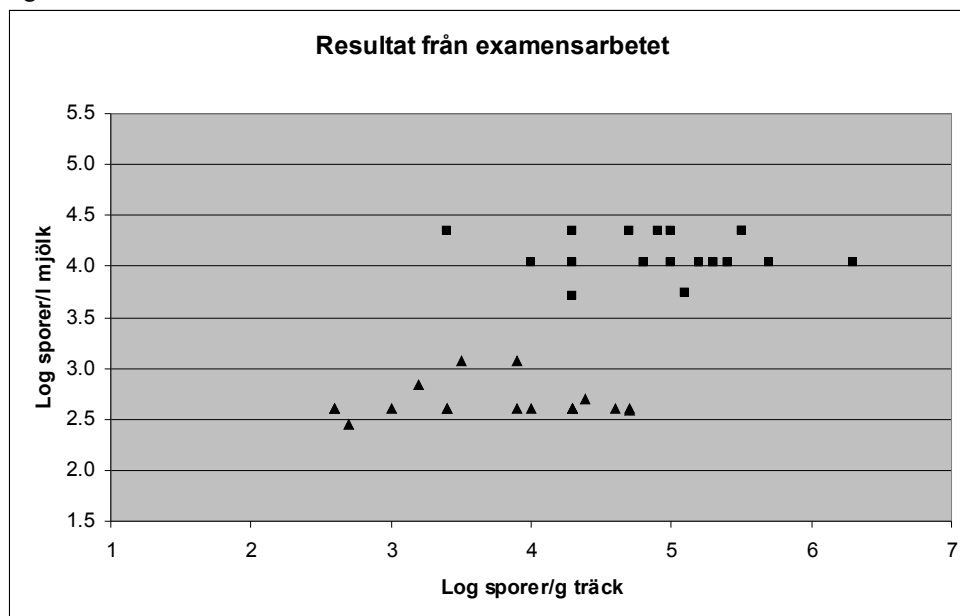
Ytterligare två faktorer kan påverka analysresultatet för mjölken. Den ena är analysmetodernas variation. Några leverantörer hade mera en 1000 sporer/l mjölk men mindre än log 4/g träck. Detta kan bero på analysmetodens osäkerhet. Ett ungefärligt 95-igt konfidensintervall för medelvärdet vid en upprepad analys är +/- 0,8 logenheter. Det betyder att det sanna värdet för dessa leverantörer skulle kunna vara lägre. Rådgivarna beskrev dock att på dessa tre gårdar fanns det många smutsiga kor, vilket också kan förklara en förhöjd sporhalt.

Förekomst av enstaka mycket smutsiga kor eller hög förekomst av många måttligt smutsade kor har också betydelse. Även med en bra och noggrann avtorkningsrutin avlägsnas endast en viss procent av gödseln. För en ko med smutsiga spenar avlägsnas procentuellt sett lika mycket smuts som från en ko med renare spenar vid samma behandling men mängden kvarvarande smuts blir större. En eller flera extremt smutsiga kor bidrar därför mycket mer till tankmjölkens sporhalt än de som är rena. Därför kan det finnas anledning att se över stallrutinerna i övrigt så att korna är så rena som möjligt när de kommer till mjölkning. Detta resonemang bekräftades av rådgivarnas kommentarer om gårdar med hög sporhalt i mjölken trots relativt måttlig sporhalt i träcken.

Resultat från kompletterande undersökningar

Figur 5 visar sporhalter från prov tagna i flytgödselbrunnen hos leverantörer som vid ett flertal tillfällen haft mycket höga sporhalter i mjölken (11000 eller 22000 sporer/l mjölk) jämfört med sporhalt i flytgödsel från leverantörer som inte hade någon sporanmärkning under säsongen. Resultaten kommer från ett examensarbete vid Lantbruksuniversitet, där man tillämpat de analysmetoder som tagits fram i vårt träckanalysprojekt. Siffrorna bekräftar tolkningen ovan: Vid <log 4 sporer/g förekommer i allmänhet inga problem med sporanmärkning för mjölken. Vid log 4-5 sporer/g träck är det möjligt att sänka sporhalten i mjölken med noggranna rutiner. Vid > log 5 sporer/g är det stor risk att avtorkning inte räcker för att nå godtagbar sporhalt i mjölken.

Figur 5



Sammanfattande diskussion

Det är tydligt att analysvärden för mjölk och träck skiljer sig åt mellan olika metoder och substrat. Det är därför nödvändigt att alla laboratorier som analyserar clostridiesporer i mjölk och träckprover använder sig av samma analysmetod. Eftersom mjölkbonden får signaler om hög sporhalt via mjölk kvalitetsanalyserna, som görs med BBB-rörmetoden, så är det nödvändigt att mjölkanalysprov som tas ut för jämförelse med träckprov också analyseras med samma metod. För bästa jämförelse med mjölk bör därför även träckprov analyseras med BBB-rörmetoden. Även om korrelationskoefficienten mellan träck och mjölk med BBB-rörmetoden kan synas låg så beror detta på faktiska förhållanden, d.v.s. faktorer på gården (smutsiga djur, avtorkningsmetod och noggrannhet i rutinerna). Träckanalys ska inte ses som en precisionsanalys. Om hänsyn tas till analysvariationen kan rådgivarens egna iakttagelser och bedömningar dock användas för att vägleda bonden om det är lämpligt/möjligt att förbättra stall- och mjölkningshygien eller om ett byte av foder är att föredra.

Publikationer och övrig resultatförmedling till näringen

Christiansson, A., Andersson, I., Flodin, J. & Tryggvason, L (2007). Utveckling och standardisering av metodik för analys av klostridiesporer i träck. Svensk Mjolk Forskning rapport 7070-P.

Christiansson, A. Fortbildningsdag för mejeri- och husdjursföreningarnas rådgivare 9 maj 2007, mejeriet i Jönköping. Aktuellt om sporer – träckanalys.

Christiansson, A. & Andersson, I. 2007. En kort sammanfattning av projekt träckanalys. Svensk Mjölks Rådgivarsajt.

Christiansson, A. & Andersson, I: 2007. Vägledning för användning av träckanalys vid problem med clostridiesporer i mjölk. Svensk Mjölks Rådgivarsajt

ATL 4 dec 2007: Lättare avslöja sporer i mjölk med träckprov

Forskning Special 2007. Träckanalys av sporer som verktyg i rådgivningen. (Utkommer under hösten 2007)

Christiansson, A. & Andersson, I. 2007. En sammanfattning av projektet och vägledningen har förmedlats till rådgivningsorganisationen inom Dansk Kvaeg, september 2007.

Rapport 7070-P har förmedlats till samtliga laboratorier som utför träckanalyser samt till alla Husdjursföreningar.

Ytterligare informationsaktiviteter kommer att genomföras.