

## Slutrapport för projektet: Är PCR-analys av heljuverprov en effektiv metod för bakteriologisk undersökning – V1130035

### Bakgrund

Kor med subklinisk (för ögat ej synlig) mastit (juverinflammation) utgör ett dolt hot för andra kor i besättningen och behöver identifieras så de kan separeras från friska kor. En celltalshöjning i mjölken indikerar att kon kan ha subklinisk mastit orsakad av bakterieinfektion men för att bekräfta eller dementera detta brukar man ta mjölkprover från misstänkt/a juverdel/ar för bakteriologisk undersökning. Prover för bakteriologisk undersökning analyseras idag framförallt med konventionell odling (KO) där man på laboratoriet stryker ut en liten mängd mjölk på en odlingsplatta, för att efter 1-2 dygn titta på plattan och notera vad som växer. Denna metod är den gyllene standarden för mastitdiagnostik, men är subjektiv (då tolkningen beror på den som tittar på odlingsplattan) och det kan dessutom vara svårt att finna bakterier om bakterieantalet i mjölkprovet är lågt. På senare år har man utvecklat diagnostik som med hjälp av PCR (Polymerase Chain Reaction) teknik kan identifiera DNA från de vanligast förekommande mastitbakterierna i mjölk (Koskinen et al., 2009). Denna diagnostik är objektiv, snabb (man får ett slutsvar inom 3 - 4 timmar) och förekomst av bakterie-DNA kan påvisas även i mjölkprover med mycket lågt bakterieantal. En svårighet i tolkningen av svar från PCR-analysen är att den påvisar DNA även från döda bakterier, t ex bakterier som immunförsvaret oskadliggjort, vilket kan misstolkas som en pågående infektion. En annan svårighet i tolkningen av svaret är att alla fynd (av bakterier som diagnostiken kan påvisa) rapporteras, men det är svårt att avgöra om fynden är ett resultat av kontaminering eller en sann infektion. Vid KO tolkas växt av flera olika bakteriearter på odlingsplattan som blandflora (dvs. förorening), men vid PCR-analys kan det vara svårt att avgöra om provet är förorenat eller inte. Ytterligare en nackdel med PCR-analysen är att vissa bakterier som kan påvisas med KO inte kan påvisas. Emellertid är tekniken fördelaktig om man vill effektivisera provtagningen av kor då den skulle kunna tillämpas på mjölkprover tagna rutinmässigt i samband med provmjölkning. Då skulle man kunna få ett bakteriologiskt svar i samband med de övriga parametrar som fås i rapporteringen från mjölkanalyserna. Heljuverprovtagning (som är det som tas vid provmjölkningen) ökar dock risken för att provet blir kontaminerat med t.ex. omgivningsbakterier. Dessutom finns risk att mjölkrester från en tidigare mjölkad ko kontaminerar mjölkprovet för efterföljande ko vilket kan ge en missvisande bild av juverinfektionsstatus. Efterfrågan av PCR-analys av mjölkprover är stor i Sverige (muntlig kommunikation med SVAs mastitlab), men då tekniken är ny inom mastitområdet är den inte helt utvärderad än och framförallt tolkning av resultaten från PCR-analysen behöver utredas mer.

Celltalet är den vanligaste markören för juverinflammation och används ofta som ett hjälpmedel för att avgöra om en ko ska provtas vid misstänkt mastit, men kan också användas i tolkningen av bakteriefynd. Det finns även andra inflammationsmarkörer, exempelvis N-acetyl- $\beta$ -D-glukosaminidas (NAGase), alkaliskt fosfat (AF) och laktatdehydrogenas (LDH), som bildas när celler skadas (vilket sker vid en inflammation), som skulle kunna vara

effektivare än celltalet i tolkningen av de bakteriologiska resultaten. Information om celltal, NAGase, AP och/eller LDH aktivitet i heljuverprovet kan vara till hjälp i tolkningen av det bakteriologiska resultatet och utvärderingen av PCR-analysen som hjälpmedel i besättningsarbetet mot mastit.

Vår huvudsakliga frågeställning i detta projekt var huruvida PCR-analys av heljuverprov är en effektiv metod för bakteriologisk undersökning av mjölkprov från kliniskt friska kor och vi ville undersöka:

- Hur väl bakterieförekomsten i ett heljuvermjölkprov analyserat med PCR-teknik överensstämmer med bakterieförekomsten i juverfjärdedelsprover, tagna vid samma tillfälle eller vid upprepade tillfällen, som analyserats med KO.

samt vilka samband det finns mellan celltal, LDH-, NAGase och AF-aktivitet på konivå och bakterieförekomst i heljuvermjölkprov (konivå) från samma tillfälle.

## Material och metoder

Mjölkprover (995st) från 976 kor i 25 besättningar som provtagits i samband med det SLF-finansierade projektet V0930006 användes i denna studie. Komaterialet representerade de två stora mjölkkoraserna i Sverige, kor i olika laktationsnummer och laktationsstadier.

Sterilt tagna fjärdedelsmjölkprover från dagen innan provmjölkningen, från provmjölkningsdagen samt dagen efter provmjölkningen analyserades på SVA med avseende på bakterieförekomst enligt vanlig rutin för KO. Heljuverprov som togs ut samtidigt som provmjölkningsprovet analyserades också på SVA med hjälp av PathoProof™ Mastitis Complete 12-kit (Thermo Fisher Scientific Inc.). PathoProof™ Mastitis Complete 12-kit kan påvisa *Staphylococcus (S.) aureus*, *Enterococcus* species (sp.), *Corynebacterium (C.) bovis*, *Escherichia (E.) coli*, *Streptococcus (Str.) dysgalactiae*, koagulasnegativa stafylokocker (KNS), *Str. agalactiae*, *Str. uberis*, *Klebsiella* sp., *Serratia (Ser.) marcescens* och *Arcanobacterium (A.) pyogenes* och/eller *Peptoniphilus (P.) indolicus*, samt genen för  $\beta$ -laktamas produktion hos stafylokocker. Mängd DNA som påvisas med PCR-analysen kvantifieras och för varje prov med fynd av DNA från en bakterie anges ett Ct-värde. Ju lägre Ct-värde desto större mängd DNA har påvisats. Celltalet analyserades som vanligt i samband med provmjölkning, medan LDH, NAGase och AF analyserades vid Aarhus universitet, Danmark.

## Statistiska beräkningar

Deskriptiv statistik användes för att beskriva fynden från respektive metod. Fann man ett eller flera fynd av ett bakterieagens i fjärdedelsproverna vid KO bedömdes kon vara KO-positiv för detta agens. Påvisades flera olika agens i fjärdedelsproverna vid KO bedömdes kon vara positiv för respektive agens vid jämförelse med PCR-resultaten. Parvis korrelationsanalys användes sedan för att få en uppskattning av överensstämmelsen mellan KO och PCR-analys. För att sedan undersöka vilken metod som hade högst sensitivitet (Se) och specificitet (Sp) gällande förmåga att hitta bakterier använde vi oss av Bayesiansk latent klassanalys där hänsyn tas till resultaten från båda metoderna utan att någon av analysmetoderna förutsägs ge mer eller mindre rätt svar. Latent klassanalys jämför två eller flera testers diagnostiska

förmåga i två eller flera populationer. Dessa populationer ska helst ha väldigt olika prevalens av den sjukdom de diagnostiska testerna ska påvisa och i vårt fall var den sjukdomen subklinisk mastit. Ett sätt att bedöma om kor har subklinisk mastit är om de har ett celltal  $\geq 100\ 000$  celler/ml mjölk. För att få två populationer med så olika prevalens av subklinisk mastit som möjligt valde vi att dela in vårt material i en population med kor med ett celltal  $<100\ 000$  celler/ml mjölk och en med kor med ett celltal på  $\geq 100\ 000$  celler/ml mjölk vid aktuell provmjölkning. Vi antog att de diagnostiska testerna (KO och PCR-analys) skulle ha samma diagnostiska förmåga i båda populationerna och att de var villkorligt oberoende (den ena metodens resultat påverkade inte den andras). I Bayesiansk analys använder man sig av kunskap från andra liknande studier för att få initialvärden och förvärden för modelleringen. De förvärden och initialvärden vid latent klassanalys som kan anges är de diagnostiska testernas (här KO och PCR-analys) sensitivitet (Se) och specificitet (Sp) enligt andra liknande studier, samt den förväntade prevalensen sjuklighet i de olika populationerna.

För att undersöka hur celltalet eller LDH-, NAGase- och AF-aktivitet på konivå skulle kunna hjälpa till vid tolkningen av svaren från PCR-analysen undersöktes samband mellan juverhälsomarkörerna och bakterieförekomst i heljuvermjölkprov (konivå) från samma tillfälle. Sambanden undersöktes med hjälp av univariabel linjär blandad regressionsanalys (där hänsyn tas till att kor inom samma besättning är mer lika varandra och utsätts för mer lik miljö och skötsel än kor mellan besättningar) samt med hjälp av deskriptiv statistik.

## Resultat

Generellt påvisades fler bakteriella fynd med hjälp av PCR-analys än med KO. Med PCR-analys av heljuverprov från ett provmjölkningstillfälle bedömdes 867 (av 985, 88 %) kor vara bakteriologiskt positiva. Som jämförelse bedömdes totalt 261 av korna (av 995, 26 %) vara bakteriologiskt positiva (fynd av endast blandflora räknades inte in), dvs. de hade ett eller flera fynd av bakterier, baserat på KO av juverdelsprov från provmjölkningdagen och 393 kor (av 995, 39 %) var bakteriologiskt positiva baserat på KO av juverdelsprov från alla tre provtagningarna. Både KO och PCR-analys kunde påvisa bakterier i prover där den andra metoden inte kunde påvisa något bakteriellt fynd (eller där KO-resultatet var blandflora; 106st (av 995, 14 %) från provmjölkningdagen). Störst skillnad mellan resultaten från KO och PCR-analys sågs för KNS (tabell 1 och 2). Resultaten överrensstämde mer när tre dagars prov, jämfört med en dags prov, analyserade med KO jämfördes med provet som analyserats med PCR.

**Tabell 1. Antal (%) kor där bakterier påvisats vid konventionell odling (KO) av fjärdedelsmjölkprover tagna vid ett tillfälle och/eller vid PCR-analys av heljuverprover tagna vid samma tillfälle (n=955 kor)**

Agens	KO pos <sup>a</sup> / PCR pos	KO pos / PCR neg <sup>b</sup>	KO neg / PCR pos	KO neg / PCR neg
<i>Enterococcus sp.</i>	9 (0,9)	3 (0,3)	420 (44)	525 (55)
<i>E. coli</i>	2 (0,2)	3 (0,3)	76 (8)	876 (91,5)
<i>Klebsiella sp.</i>	0	1 (0,1)	81 (8)	875 (91,5)
<b>KNS</b>	108 (11)	11 (1)	610 (64)	228 (24)
<i>Str. agalactiae</i>	1 (0,1)	2 (0,2)	10 (1)	944 (99)
<i>S. aureus</i>	54 (6)	20 (2)	47 (5)	836 (87)
<i>Str. dysgalactiae</i>	29 (3)	6 (0,6)	98 (10)	824 (86)
<i>Str. uberis</i>	18 (2)	15 (2)	37 (4)	887 (93)

<sup>a</sup>pos = prov där respektive bakterie har påvisats

<sup>b</sup>neg = prov där respektive bakterie inte har kunnat påvisas

**Tabell 2. Antal (%) kor där bakterier påvisats vid konventionell odling (KO) av fjärdedelsmjölkprover tagna tre dagar i rad och/eller vid PCR-analys av heljuverprover tagna på dag 2 (n=983)**

Agens	KO pos <sup>a</sup> / PCR pos	KO pos / PCR neg <sup>b</sup>	KO neg / PCR pos	KO neg / PCR neg
<i>Enterococcus sp.</i>	16 (2)	7 (0,7)	422 (43)	538 (55)
<i>E. coli</i>	2 (0,2)	5 (0,5)	76 (8)	900 (91,5)
<i>Klebsiella sp.</i>	0	3 (0,3)	84 (8,5)	896 (91)
KNS	180 (18)	23 (2)	561 (57)	219 (22)
<i>Str. agalactiae</i>	3 (0,3)	1 (0,1)	11 (1)	968 (98)
<i>S. aureus</i>	68 (7)	42 (4)	33 (3)	840 (85)
<i>Str. dysgalactiae</i>	42 (4)	7 (0,7)	86 (9)	848 (86)
<i>Str. uberis</i>	28 (3)	24 (2)	28 (3)	903 (92)

<sup>a</sup>pos = prov där respektive bakterie har påvisats

<sup>b</sup>neg = prov där respektive bakterie inte har kunnat påvisas

Med KO påvisades bakterier som inte ingick i PCR-analyspanelen hos 12 kor; *Pasteurella multocida*, *Streptococcus sp.* samt koagulaspositiva stafylokker. I PCR-analysen påvisades *A. pyogenes/P. indolicus* hos 94 kor och *C. bovis* hos 302 kor som inte rapporterats/påvisats vid KO.

Korrelationen mellan metoderna var generellt ganska låg (se tabell 3). Högst korrelation sågs för fynd av *S. aureus* där korrelationen låg runt 0,6. Korrelationen mellan metoderna ökade något när jämförelsen gjordes mellan PCR-analysen och tre dagars prover analyserade med KO (tabell 3).

**Tabell 3. Parvisa korrelationer mellan bakteriefynd vid PCR-analys av heljuverprover tagna vid provmjölkning och bakteriefynd vid konventionell odling av fjärdedelsmjölkprover tagna vid samma provmjölkning eller vid tre efterföljande dagar (dagen före, vid provmjölkningen samt dagen efter provmjölkningen) (n=955)**

Korrelation	1 vs. 1 provtagning	1 vs. 3 provtagningar
<i>Enterococcus sp.</i>	0,07	0,08
<i>E. coli</i>	0,08	0,09
<i>Klebsiella sp.</i>	-0,01	-0,02
KNS	0,14	0,13
<i>Str. agalactiae</i>	0,33	0,37
<i>S. aureus</i>	0,59	0,61
<i>Str. dysgalactiae</i>	0,40	0,44
<i>Str. uberis</i>	0,40	0,49

Resultaten av den latent klassanalysen redovisas i tabell 4. Generellt hade PCR-analysen högre Se, dvs. var bättre på att hitta ett visst agens när det verkligen fanns i provet, medan KO oftast hade en högre Sp (förutom för KNS), dvs. var bättre på att inte visa något fynd när provet troligen var negativt. Resultaten visar också att Se höjs för KO när resultaten från tre provtagningar jämfördes med resultatet från provet som analyserats med PCR och för *S. aureus* och *Str. uberis* fick då KO högre Se än PCR-analysen. Sensitiviteten och Sp påverkades mycket av hur många observationer som ingick i analysen så för *Enterococcus sp.*, *E. coli*, *Klebsiella sp.* och *Str. agalactiae* blev skattningarna väldigt osäkra vilket kan ses av ett stort PPI intervall.

**Tabell 4. Estimat och 95 % ”posterior probability interval” (PPI) av sensitivitet (Se) och specificitet (Sp) från latent klassanalys av resultaten från konventionell bakterieodling av fjärdedelsmjölkprover tagna från en respektive tre efterföljande dagar och PCR-analys av mjölk från heljuverprov från en dag (n=943 kor (en dags prover) och 970 kor (tre dagars prover)).**

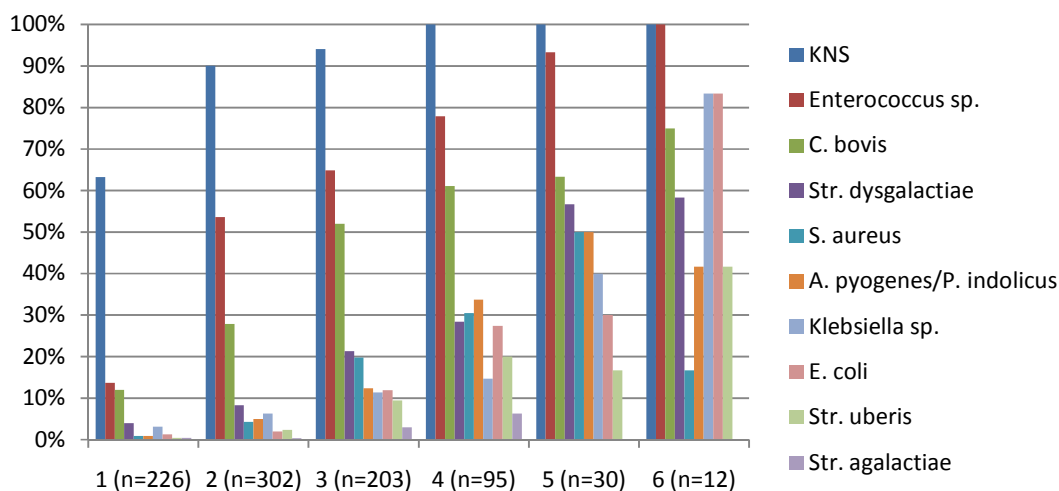
Agens	Antal provtagnings-tillfällen	Konventionell odling		PCR-analys	
		Se	Sp	Se	Sp
		95 % PPI	95% PPI	95 % PPI	95 % PPI
<i>Enterococcus sp.</i>	1	0,02	0,99	0,59	0,66
	3 vs. 1	0,00; 0,04	0,97; 1,00	0,02; 0,96	0,17; 0,97
<i>E. coli</i>	1	0,03	0,98	0,63	0,70
	3 vs. 1	0,00; 0,07	0,95; 1,00	0,02; 0,95	0,18; 0,97
<i>Klebsiella sp.</i>	1	0,13	1,00	0,64	0,96
	3 vs. 1	0,07; 0,23	0,99; 1,00	0,36; 0,88	0,93; 0,99
<i>KNS</i>	1	0,15	1,00	0,58	0,96
	3 vs. 1	0,08; 0,25	0,99; 1,00	0,31; 0,84	0,93; 0,99
<i>Str. agalactiae</i>	1	0,01	1,00	0,44	0,95
	3 vs. 1	0,00; 0,06	0,99; 1,00	0,03; 0,94	0,90; 0,99
<i>S. aureus</i>	1	0,02	1,00	0,38	0,94
	3 vs. 1	0,00; 0,08	0,99; 1,00	0,02; 0,91	0,90; 0,97
<i>Str. dysgalactiae</i>	1	0,33	0,87	0,96	0,71
	3 vs. 1	0,30; 0,37	0,85; 0,88	0,91; 1,00	0,57; 0,86
<i>Str. uberis</i>	1	0,40	0,86	0,96	0,72
	3 vs. 1	0,36; 0,43	0,84; 0,88	0,90; 1,00	0,58; 0,89
<i>S. aureus</i>	1	0,27	1,00	0,94	0,99
	3 vs. 1	0,18; 0,36	0,99; 1,00	0,85; 0,99	0,98; 1,00
<i>Str. dysgalactiae</i>	1	0,27	1,00	0,95	0,99
	3 vs. 1	0,19; 0,36	0,99; 1,00	0,86; 0,99	0,98; 1,00
<i>Str. uberis</i>	1	0,69	0,98	0,87	0,97
	3 vs. 1	0,58; 0,80	0,97; 0,99	0,77; 0,95	0,96; 0,99
<i>Str. agalactiae</i>	1	0,83	0,98	0,76	0,98
	3 vs. 1	0,73; 0,91	0,96; 0,99	0,67; 0,85	0,97; 0,99
<i>Str. dysgalactiae</i>	1	0,30	1,00	0,81	0,96
	3 vs. 1	0,21; 0,41	0,99; 1,00	0,66; 0,93	0,94; 0,99
<i>Str. uberis</i>	1	0,42	1,00	0,85	0,96
	3 vs. 1	0,31; 0,56	0,99; 1,00	0,72; 0,97	0,94; 0,99
<i>Str. agalactiae</i>	1	0,73	0,99	0,75	0,97
	3 vs. 1	0,62; 0,84	0,98; 1,00	0,58; 0,91	0,96; 0,99
<i>Str. uberis</i>	1	0,78	0,99	0,69	0,98
	3 vs. 1	0,68; 0,87	0,98; 1,00	0,55; 0,84	0,97; 0,99

För att få en uppfattning om relevansen av fynden från respektive metod för påvisande av smittsam subklinisk mastit redovisas i tabell 5 hur bakteriefynden från respektive metod fördelar sig över celltal. Det var generellt fler prover som var positiva vid KO än vid PCR-analys som kom från kor med ett celltal  $\geq 100\ 000$  celler/ml mjölk.

Med PCR-analyserna påvisades 0-6 agens per prov (se figur 1) och med KO påvisades 0-3 agens per ko i prov från provmjölkkningsdagen. Det var vanligast att påvisa 2 agens (31 %), 1 agens (23 %), 3 agens (20 %) resp. 0 agens (12 %) med PCR-analysen, medan det i KO var vanligast med 0 fynd (63 %), 1 agens (31 %). I PCR-analysen var KNS det vanligaste fyndet och påvisades i 63 % av proverna med fynd av ett agens och i  $\geq 90$  % av proven med fynd av mer än ett agens. *Enterococcus sp.* och *C. bovis* påvisades också ofta i prover med fynd av mer än ett agens. I KO var fynd av KNS det vanligaste fyndet vid fynd av 1 agens, påvisad i 45 % av proverna med fynd av 1 agens, och *S. aureus* var det vanligaste fyndet vid fynd av 2 agens, påvisad i 59 % av proverna med 2 agens. Endast ett prov hade fynd av 3 agens.

**Tabell 5. Fördelning av andel positiva prover analyserade med konventionell bakterieodling (KO) eller PCR-analys över kor med ett celltal på < 100 000 celler/ml mjölk respektive ≥ 100 000 celler/ml mjölk vid ett och samma provtagningsstillfälle.**

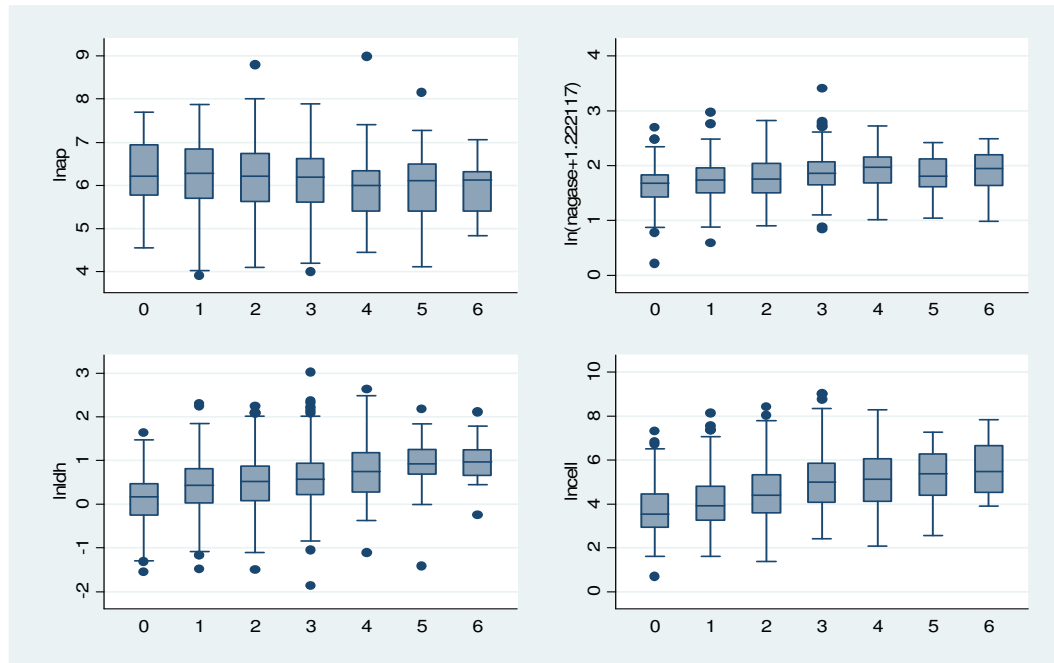
	Celltal < 100'		Celltal ≥ 100'	
	KO+	PCR+	KO+	PCR+
<i>Enterococcus sp.</i>	17 %	55 %	83 %	45 %
<i>E. coli</i>	20 %	52 %	80 %	48 %
<i>Klebsiella sp.</i>	0 %	47 %	100 %	53 %
<b>KNS</b>	30 %	49 %	70 %	51 %
<i>Str. agalactiae</i>	0 %	54 %	100 %	46 %
<i>S. aureus</i>	12 %	17 %	88 %	83 %
<i>Str. dysgalactiae</i>	0 %	29 %	100 %	71 %
<i>Str. uberis</i>	15 %	18 %	85 %	82 %



**Figur 1. Fördelning av agens över totalt antal påvisade agens per prov för heljuverprov analyserade med PCR (n=985).**

### Samband mellan juverhälsomått och resultaten från PCR-analysen

Celltal, LDH och NAGase var signifikant ( $P < 0,05$ ) högre i prover med fynd av minst ett agens jämfört med negativa prover (se figur 2). Celltalet och LDH var även signifikant högre i prover med fynd av  $\geq 2$  agens jämfört med prover med fynd av ett agens, samt i prover med fynd av  $\geq 3$  agens jämfört med prov med 2 agens. Det var ingen signifikant skillnad i varken celltal eller LDH nivåerna mellan prover med  $\geq 3$  fynd. NAGase var signifikant högre i prover med fynd av ett agens jämfört med fynd av  $\geq 3$  agens och i prover med fynd av 2 agens jämfört med fynd av 3 resp. 4 agens. AF var signifikant högre i negativa prover jämfört med fynd av 3 resp. 4 agens och högre i fynd av 1 resp. 2 agens mot fynd av 4 agens.



Figur 2. Celltal, LDH, NAGase och AF nivåer i mjölkprover där 0-6 agens påvisats med PCR-analys.

Celltal, LDH, och NAGase var signifikant högre hos kor med fynd av *S. aureus*, *Str. dysgalactiae*, *Str. uberis*, KNS och *C. bovis* jämfört med kor utan fynd av resp. bakterie (tabell 6). AF var signifikant lägre hos kor med fynd av *Str. uberis*, KNS (tabell 6) och *A. pyogenes/P. indolicus* jämfört med kor utan fynd av resp. bakterier. Celltalet hade även tendens ( $P=0,06$ ) till att vara högre hos kor med *Klebsiella sp.* och *A. pyogenes/P.indolicus* fynd jämfört med kor utan fynd av resp. bakterier. Inga signifikanta samband sågs mellan juverhälsomarkörerna och fynd av *Enterococcus spp.* respektive fynd av *E. coli*.

**Tabell 6. Mediannivåer (50 % centralintervall) för celltal, LDH NAGase och AF i heljuvermjölkprov från kor där PCR-analys ej påvisat (PCR-) eller påvisat (PCR+) fynd av *Staphylococcus (S.) aureus*, *Streptococcus (Str.) dysgalactiae*, *Str. uberis*, koagulasnegativa stafylokokker (KNS) och/eller *Corynebacterium (C.) bovis*, och där ett signifikant samband påvisats mellan fynd och juverhälsomarkör.**

Agens	Juverhäsoomått	PCR-	PCR+
<i>S. aureus</i>	Celltal, *1000, celler/ml mjölk	71 (33; 194)	267 (124; 570)
	LDH, U/l	1,6 (1,0; 2,4)	1,9 (1,3; 2,7)
	NAGase, U/l	4,6 (3,4; 6,2)	5,1 (3,8; 7,3)
<i>Str. dysgalactiae</i>	Celltal, *1000, celler/ml mjölk	71 (32; 191)	229 (79; 596)
	LDH, U/l	1,6 (1,0; 2,3)	2,3 (1,3; 3,4)
	NAGase, U/l	4,6 (3,4; 6,1)	5,0 (4,3; 7,9)
<i>Str. uberis</i>	Celltal, *1000, celler/ml mjölk	77 (33; 203)	469 (174; 845)
	LDH, U/l	1,6 (1,0; 2,4)	2,6 (2,0; 4,2)
	NAGase, U/l	4,6 (3,4; 6,2)	6,2 (4,4; 8,3)
	AF, U/l	496 (278; 837)	357 (224; 578)
KNS	Celltal, *1000, celler/ml mjölk	44 (22; 111)	103 (41; 270)
	LDH, U/l	1,3 (0,9; 2,0)	1,8 (1,2; 2,6)
	NAGase, U/l	4,2 (3,2; 5,6)	4,8 (3,6; 6,6)
	AF, U/l	541 (314; 1012)	480 (265; 781)
<i>C. bovis</i>	Celltal, *1000, celler/ml mjölk	137 (65; 324)	142 (86; 311)
	LDH, U/l	1,5 (1,0; 2,3)	1,9 (1,2; 2,7)
	NAGase, U/l	4,5 (3,3; 6,1)	5,2 (3,9; 6,8)

## Diskussion

Överrensstämningen mellan resultaten från KO av fjärdedelsmjölkprover tagna vid ett respektive tre provtagningstillfällen och PCR-analys av heljuvermjölkprov taget vid ett tillfälle var inte hög. Det kan finnas flera förklaringar till detta. Att färre bakterier påvisades med KO kan delvis bero på att de proverna togs sterilt vilket innebär att det är mindre risk för att provet kontaminerats av bakterier från närmiljön. Heljuverprovet togs däremot inte enligt steril provtagning och mjölkrester från tidigare kor kan ha funnits kvar i den provmjölkningssystem som användes vilket innebär en risk för överföring av bakterier och ett felaktigt analysresultat för aktuell ko. I en nyligen publicerad studie från Danmark visade man att sannolikheten för att få ett positivt prov (*S. aureus*) med PCR-analys minskade om heljuverprovet togs efter att juvret rengjorts enligt steril provtagningsrutin före mjölkning (Mahmoud et al., 2013). En annan skillnad mellan KO och PCR-analys är att fynden tolkas vid KO innan resultatet förmedlas (t ex blandflora eller växt av känd mastitörsakande bakterie i blandflora). I svaret från PCR-analysen rapporteras alla bakteriefynd (som metoden kan påvisa) och det kan vara svårt att avgöra vad som är av betydelse och vad som bara är kontamination (och skulle rapporteras som blandflora vid KO). Resultaten från KO gavs enligt ordinarie rutin, men hade alla bakteriefynd identifierats (dvs även alla agens som växte vid blandflora) hade överrensstämningen kanske varit högre.

Resultaten från den latent klassanalysen visade att PCR-analysen oftast hade större förmåga att påvisa bakterier i prov från kor som troligen var bakteriologiskt positiva, medan KO oftast hade högre förmåga att påvisa avsaknad av bakterier i prov från kor som troligen var bakteriologiskt negativa. Emellertid gav ingen av metoderna så väldigt hög Se vilket innebär att båda metoderna missar fynd av bakterier. Intervallen för flera av skattningarna var också stora vilket tyder på att skattningarna är osäkra. Latent klassanalys är den metod som finns i dag för att jämföra två eller flera tester när det inte finns något test som är en sann guldstandard. Emellertid påverkas resultaten av denna analys av vilka förvärden och initialvärden man använder så om någon annan gör om studien och använder andra värden och populationsindelning kan resultaten bli annorlunda. Det är därför viktigt att komma ihåg att resultaten från latent klassanalysen är skattningar och inte exakta sanningar. Den relativt höga Se (81 – 94 %) för PCR-analysen gällande KNS, *Str. agalactiae*, *Str. dysgalactiae* och *S. aureus* tyder dock på att metoden är bra på att finna dessa agens och att flera provtagningar och analyser behövs för att KO ska nå upp till liknande Se.

En svårighet med PCR-analysen är tolkningen av svaren. Då oftast fler än ett agens rapporteras och mängderna som anges inte direkt är jämförbara kan man inte avgöra vilket/vilka av fynden som egentligen är av intresse. Många av de bakterier som påvisas finns naturligt på huden och i kons närmiljö och det finns ingen möjlighet att avgöra om bakterierna kommer från omgivningen, huden eller juvret. Tas mjölkproverna enligt steril provtagning är sannolikheten att de flesta påvisade agens kommer från juvret, men en sådan provtagning är oftast inte praktiskt genomförbar vid provmjölkningen. Det är viktigt att inse att om PCR-analys ska tillämpas på prover från provmjölkningen kommer tolkningen av resultaten vara svåra. Av vad vi kunde se i denna studie visade PCR-analysen lika ofta positiva fynd hos kor utan tecken på mastit (celltal <100 000 celler/ml mjölk) som hos kor med misstänkt



subklinisk mastit (celltal  $\geq 100\ 000$  celler/ml mjölk) när *Enterococcus sp.*, *E. coli*, *Klebsiella sp.* och KNS påvisades. Detta tolkar vi som att fynd av dessa bakterier ofta kan bero på kontaminering och att man bör provta djuret igen enligt steril provtagning och använda KO för att få ett säkrare resultat. Samtidigt som KO missar en del bakteriepositiva prover tyder våra resultat på att de bakteriefynd som görs med KO oftast görs från kor med ett celltal  $\geq 100\ 000$  celler/ml mjölk vilket indikerar misstanke om subklinisk mastit. Prover som var PCR-positiva för *Str. agalactiae*, *S. aureus*, *Str. dysgalactiae* och *Str. uberis* kom till största delen från kor med celltal  $\geq 100\ 000$  celler/ml mjölk vilket vi tolkar som att dessa prover framförallt kom från kor med misstänkt smittsam subklinisk mastit. Emellertid påvisades endast ett fåtal av dessa fynd som enskilt fynd och provtagning på juverfjärdedelnivå och analys med KO rekommenderas för att säkerställa diagnosen.

I regressionsanalysen fann vi att celltal, LDH och NAGase var signifikant högre i koprov som med PCR-analys var positiva för *S. aureus*, *Str. dysgalactiae*, *Str. uberis*, KNS eller *C. bovis* och att AF var signifikant lägre i koprov med fynd av *Str. uberis*, KNS och *A. pyogenes/P. indolicus* jämfört med kor utan fynd av dessa agens. Dessa resultat indikerar att alla undersökta juverhälsomarkörer skulle kunna användas som hjälp för att tolka resultaten från PCR-analysen. En svårighet vid tolkningen är att vi oftast påvisade 2 eller fler agens samtidigt vilket gör det omöjligt att säga vilket/vilka agens som står för celltalshöjningen. Till exempel påvisades KNS i alla prover där även *S. aureus* påvisades och i dagsläget kan vi inte avgöra om båda eller endera är av betydelse för celltalet/LDH/NAGase då båda är vanliga hudbakterier och kan förekomma i juvret. Av resultaten ser vi också att spridningen i värdena för celltal, LDH, NAGase och AF till viss del överlappar mellan bakteriologiskt negativa och positiva kor (tabell 6). Gränsvärden för celltal (eller LDH, NAGase eller AF) som kan avgöra om en ko troligen har smittsam subklinisk mastit, dvs. där det bakteriella fyndet är av stort intresse för lantbrukaren och veterinären, måste undersökas vidare i andra studier.

## Konklusioner

Överrensstämningen mellan fynd av bakterier från KO och PCR-analys var låg. Fler bakteriefynd påvisades med PCR jämfört med KO, men många av PCR-fynden verkar vara orsakade av kontamination då många fynd gjordes i mjölkprov från kor utan tecken på juverinflammation. Alla undersökta juverhälsomarkörer (celltal, LDH, NAGase, AF) hade signifikanta samband med vissa bakteriefynd vid PCR-analysen, men fler studier behövs för att identifiera gränsvärden som kan underlätta tolkningen av resultaten från PCR-analysen.

## Publikationer

Nyman, A-K., Persson Waller, K., and U. Emanuelson. 2013. *Diagnostics of intra-mammary bacterial infections – comparison between a PCR assay and culturing*. NKvet. 13-14 maj, 2013. Reykjavik, Island. **Abstract:**

[http://www.nkvet.org/user\\_files/NKVet\\_29th\\_symposium.pdf](http://www.nkvet.org/user_files/NKVet_29th_symposium.pdf)

**Presentationen:** [http://www.nkvet.org/user\\_files/Nyman%20-%20PCR2.pdf](http://www.nkvet.org/user_files/Nyman%20-%20PCR2.pdf)

Presentation av projektet på SVAs hemsida: <http://www.sva.se/sv/Forskning-och-produkter/Aktuella-forskningsprojekt/Ar-PCR-analys-av-heljuverprov-en-effektiv-metod-for-bakteriologisk-undersokning/>

## Planerade

Preventive veterinary medicine  
Tidningen Husdjur  
Svensk veterinärtidning

## Övrig resultatförmedling till näringen

Presentation vid veterinärkongressen 8 nov 2013

## Referenser

- Koskinen, M.T., Holopainen, J., Pyörala, S., Bredbacka, P., Pitkälä, A., Barkema, H.W., Bexiga, R., Roberson, J., Solverod, L., Piccinini, R., Kelton, D., Lehmusto, H., Niskala, S., Salmikivi, L., 2009, *Analytical specificity and sensitivity of a real-time polymerase chain reaction assay for identification of bovine mastitis pathogens*. Journal of Dairy Science 92, 952-959.
- Mahmmod, Y.S., Klaas, I.C., Nielsen, S.S., Katholm, J., Toft, N., 2013, *Effect of presampling procedures on real-time PCR used for diagnosis of intramammary infections with Staphylococcus aureus in dairy cows at routine milk recordings*. Journal of Dairy Science 96, 2226-2233.