

# Slutrapport för projektet ”Revidering av korrikeringsfaktorer för celltal samt beräkning av juverhälsoklasser” – V0930006/V1030020

## Bakgrund

Juverinflammationer (mastiter) är kostsamma, påverkar kornas välfärd och försämrar mjölk kvaliteten. Kor med klinisk mastit är lätta att hitta då symptomen är synliga och kon kan behandlas och hanteras så att hon inte utgör en smittorisk för de andra korna i besättningen. Kor med subklinisk (inte för ögat synliga) mastiter utgör däremot ett dolt hot för andra kor i besättningen. Det finns olika sätt att försöka finna de kor som har subklinisk mastit där hittills celltalet används mest. I Sverige utvecklades det korrikerade celltalet och juverhälsoklasserna (JHKL) under 80-talet som ett effektivt verktyg för rådgivare och lantbrukare att finna kor i besättningen med subklinisk infektiös (smittsam) mastit. För att celltalet skulle kunna användas på ett mer effektivt sätt korrikerades det först efter kons mjölkavkastningsnivå, ras, laktationsstadium och laktationsnummer. För att sedan få fram kons JHKL gjordes en sammanvägning av de två till tre senaste provmjölkningarnas korrikerade och okorrigerade celltal och från det beräknades sannolikheten för att en ko ska ha en infektion i en eller flera juverdelar vid den givna provtagningen (Brolund, 1990). Det korrikerade celltalet och JHKL baserar sig på resultat från studier som genomfördes i slutet på 70-talet (Brolund, 1985) och sedan dess har de statistiska metoderna och verktygen utvecklats vilket har gett oss möjlighet att skapa en förbättrad modell för att finna kor med smittsam mastit med hjälp av ett nytt eventuellt korrikerat celltal och omräknade JHKL. Förutom att de statistiska metoderna har förbättrats så har även det svenska komaterialet förändrats vilket har uppmärksammats och diskuterats i tidningen Husdjur (Emanuelson and Ekman, 2007; Karlsson, 2007). Årsproduktionen har ökat med ca 3000 kg mjölk per ko och år och dygnsavkastningen har ökat med i snitt 50 %. Våra till antalet största svenska mjölkkoraser, SRB och SH, har utvecklats och förändrats. Inkorsningen av Holstein i SLB-rasen (som gjort att den numera kallas just SH) är kanske den största förändringen. Alla dessa förändringar kan medföra att den korrigering av celltalet och därmed även den uträkning av JHKL som har används sedan 1985 inte är korrekt längre. Förutom utveckling av statistiska metoder och förändringar i det svenska komaterialet så har även möjligheten att använda andra juverhälsomarkörer än celltalet utvecklats. Framförallt har de i mjölk uppmätbara enzymerna laktatdehydrogenas (LDH) och N-acetyl- $\beta$ -D-glukosaminidas (NAGase) visat sig användbara och kan användas i mätningar automatiskt i realtid i mjölkledningen. Då celltalet påverkas av så många andra faktorer än bara inflammationsstatus så har man förhoppning om att dessa enzymer skulle vara mindre påverkade av kofaktorer och då ge en bättre indikation på en sann inflammation.

Huvudsyftet med detta projekt var att undersöka om det korrikerade celltalet och beräkningen av JHKL behöver revideras för att därigenom förbättra och utveckla celltalets prognostiska förmåga att finna kor med smittsam mastit. Vi har undersökt följande hypoteser:

- Att celltalet även idag påverkas av olika kofaktorer oberoende av juvrets bakteriologiska status
- Att en kombination av upprepade mätningar av celltal är en bättre indikator på ett infekterat juver än en enskild mätning

Vi har även, i samarbete med projektgruppsmedlemmarna i Danmark, undersökt LDH's förmåga att prognostisera infektiös subklinisk mastit för att kunna jämföra detta med celltalets prognostiska förmåga. Hypoteserna var:

- Att LDH inte påverkas av olika kofaktorer i samma utsträckning som celltalet

Kostnader för analys av LDH i mjölk täcktes av medel som tilldelats våra danska projektgruppsmedlemmar. Förutom LDH analyserades även NAGase och alkalisk fosfatase (AF) av danskarna och vi fick tillgång till dessa resultat vilka vi har statistiskt analyserat utifrån samma hypotes som för LDH.

## Material och metoder

Tjugofem besättningar från husdjursföreningarna Svenska husdjur, Freja, Hansa husdjur och Växa rekryterades. Våra urvalskriterier för dessa besättningar var att de skulle ha en besättningsstorlek på 60-200 årskor, ha minst 30 % av korna i vardera rasen SRB och SH samt ha ett beräknat tankmjölkcelltal på 150 000 – 300 000 celler/ml mjölk. För att försäkra oss om att vi i studien skulle erhålla tillräckligt många kor från varje besättning av SRB- respektive SH-ras, kor i olika laktationsnummer, samt kor i olika laktationsstadier skapades provtagningslistor inför besöken med kor att provta baserade på uppgifter från senaste provmjölkningen. Varje besättning besöktes under stallsäsongen oktober 2009 – april 2010. Vid dessa besök deltog en husdjurstekniker vid mjölkningen (morgon eller kväll) dagen före provmjölkning, på provmjölkningsdagen, samt dagen efter provmjölkningen. Mjölksprov för bakteriologisk undersökning togs av teknikern från varje juverfjärdedel med Mastistrip vid alla tre mjölkningstillfällena, medan heljuvermjölkprov för analys av celltal togs ut och hanterades enligt vanlig rutin vid provmjölkning. För att få en så likvärdig provtagning som möjligt togs juverfjärdedelsprover först i mjölkror och sedan doppades Mastistrip-tungorna i rören. Mjölksprov för analys av LDH, NAGase och AP togs från provmjölkningsprovet.

Celltal på heljuvernivå, till vilket bakteriefynd från juverfjärdedelsproverna relaterades, hämtades från Kokontrollen från aktuellt provmjölkningstillfälle. Även data från 6 månader före försöksstart till och med 6 månader efter sista provmjölkningen gällande avkastning, celltal, ras etc. på både individ- och besättningsnivå hämtades in. Mastistrip-kassetterna skickades till SVA för analys, medan det uttagna heljuverprovet skickades till Aarhus universitet, Danmark, för analys av LDH, NAGase och AF.

## Statistiska analyser

För att undersöka vilka kofaktorer som eventuellt påverkar celltalet (och sedan också LDH, NAGase och AF) hos bakteriologiskt negativa kor undersöktes sambanden mellan beroende variabler (celltal, LDH, NAGase och AF) och förklarande variabler (laktationsnummer, ras, laktationsstadium, mjölkavkastning, procent fett och protein i mjölk, ureakoncentration i mjölk samt provtagningsperiod). Sambanden analyserades med hjälp av en sk. multivariabel linjär blandad regressionsmodell. En blandad modell (kallas så då både fixa och slumpmässiga faktorer kan ingå) kan ta hänsyn till och justera för att kor inom samma besättning är mer lika varandra (pga. bl.a. inhysning, utfodring och management) än kor i olika besättningar. I denna första del användes bara data från bakteriologiskt negativa kor. Definitionen av en bakteriologiskt negativ ko bestämdes till att vara en ko där alla 12 juverdelprover (4 spenar \* 3 dagar)

var bakteriologiskt negativa samt även kor med 11 bakteriologiskt negativa juverdelprover och ett prov med blandflora (om mängden blandflora var sparsam). Sparsam blandflora tolkas vanligtvis som en kontaminering vid provtagning och inte att bakterier funnits i juvret.

För alla regressionsmodeller undersöktes först om de beroende variablerna var normalfördelade eller inte. Om de inte var det transformerades de för att få dem så normalfördelade som möjligt. Celltalet logaritmerades med hjälp av den naturliga logaritmen eller Box-Cox transformerades medan LDH, NAGase och AF logaritmerades med hjälp av den naturliga logaritmen. Sedan undersöktes om sambandet mellan beroende och förklarande variabler var någorlunda linjärt. Var det inte det transformerades eller kategoriserades även de förklarande variablerna. I den multivariabla analysen tillämpades baklänges eliminering, dvs. man börjar med en modell där alla ingående förklarande variabler är med och sen tas variablerna bort en efter en beroende på  $P$ -värde för respektive variabel (den med högst  $P$ -värde tas bort först). Endast variabler med ett  $P$ -värde  $\leq 0,05$  behölls i den slutliga modellen. Modellvalidering utfördes enligt Dohoo et al. (2010) där residualernas normalfördelning utvärderades med hjälp av Q-Q diagram och residualdiagram.

För att undersöka hur väl ett nytt korrigerat celltal samt LDH, NAGase och AF kunde förutsäga vilka kor som hade en eller flera juverdelar med bakteriefynd användes en univariabel logistisk blandad regressionsmodell. I denna analys ingick alla kor, både bakteriologiskt negativa och positiva. Från denna analys erhöles ett prediktivt (förutsäggande) värde mellan 0-1 som visar hur väl den ingående förklarande variabeln kan förutsäga att en bakteriologiskt negativ ko är negativ och att en bakteriologiskt positiv ko är positiv. En perfekt modell skulle ge alla negativa kor en prediktion på 0 och alla positiva kor en prediktion på 1. För att med större sannolikhet kunna säga att en ko är bakteriologiskt positiv, och troligen även hade en infektion, klassades endast kor där samma bakteriefynd påvisats vid minst två provtagningar i en juverdel som sant bakteriologiskt positiva (ett fynd vid endast ett tillfälle kan vara en kontamination från omgivningen, provtagaren eller kohud).

## Resultat

### Bakteriologiska fynd

Totalt undersöktes 11 867 mjölkprover (från 976 kor) och 522 kor bedömdes vara bakteriologiskt negativa och 392 bakteriologiskt positiva (tabell 1).

### Heljuvermjölk – analysresultat

Medianvärdena (50 % centralintervall) för celltal, LDH, NAGase och AP var för hela komaterialet 86 000 (35 000 – 229 000) celler/ml, 1,65 (1,08 – 2,45) U/l, 4,66 (3,48 – 6,32) U/l resp. 486 (273 – 818) U/l.

### Samband mellan kofaktorer och celltal, LDH, NAGase respektive AF

Resultaten visar att det fanns samband mellan en eller flera av de undersökta kofaktorerna och en eller flera av de juverhälsomarkörer vi undersökte. Resultaten från slutmodellerna av de multivariabla analyserna presenteras i tabell 2 (där alla ingående variabler är signifikant ( $P \leq 0,05$ ) associerade med den beroende variabeln i respektive modell).

**Tabell 1. Bakteriologisk kategorisering av kor baserat på tre upprepade juverfjärdedelsprover från 976 kor (19 kor provtogs dubbelt) i 25 besättningar tagna under oktober 2009 tom april 2010.**

Bakteriefynd	Totalt
Ingen växt (Kor med 12 negativa juverfjärdedelsprover samt kor med 11 negativa juverfjärdedelsprover och ett prov med sparsam blandflora)	522
Osäkert fynd (<11 negativa prov i kombination med blandflora eller saknade prov)	81
Fynd av ”minor pathogens” <sup>a</sup> i en juverdel någon gång och inga fynd av ”major pathogens” <sup>b</sup> i några prover (varav upprepat fynd i en eller flera juverdelar och inga fynd av ”major pathogens” <sup>b</sup> i några prover)	168 (80)
Fynd av ”major pathogens” <sup>b</sup> i en juverdel någon gång (varav upprepat fynd i en eller flera juverdelar)	224 (142)
<b>Totalt</b>	<b>995</b>

<sup>a</sup>”minor pathogens” = koagulasnegativa stafylokokker

<sup>b</sup>”major pathogens” = *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus (Str.) dysgalactiae*, *Str. uberis*, *Str. agalcatiae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella species*, *Pasturella species*, *Enterococcus species*, *Staphylococcus species*, *Streptococcus species*

**Tabell 2. Resultat från fyra multivariabla blandade linjära regressionsmodeller för att undersöka samband mellan fyra juverhälsomarkörer och kofaktorer (n=484-513 beroende på modell).**

Oberoende variabel	Beroende variabel			
	bcSCC <sup>a</sup> Koefficient (95% KI <sup>b</sup> )	lnLDH Koefficient (95% KI)	lnNAGase Koefficient (95% KI)	lnAF Koefficient (95% KI)
<b>Laktationsnummer</b>				
1	Ref. <sup>c</sup>	Ref.	Ref.	Ref.
2	0,38 (0,24; 0,53)	0,18 (0,09; 0,28)	0,14 (0,07; 0,20)	-0,24 (-0,35; -0,13)
3	0,43 (0,25; 0,60)	0,12 (0,01; 0,24)	0,16 (0,08; 0,24)	-0,51 (-0,64; -0,38)
4	0,65 (0,44; 0,86)	0,28 (0,13; 0,42)	0,23 (0,13; 0,32)	-0,47 (-0,64; -0,30)
≥5	0,88 (0,64; 1,12)	0,52 (0,34; 0,69)	0,26 (0,15; 0,38)	-0,47 (-0,67; -0,27)
<b>Ras</b>				
SRB	Ref.	-	-	Ref.
SH	0,22 (0,11; 0,34)	-	-	0,25 (0,16; 0,35)
<b>Laktationsstadium<sup>d</sup></b>	-			0,06 (0,05; 0,06)
Ls1		0,04 (0,02; 0,06)	0,04 (0,03; 0,05)	-
Ls2		0,05 (0,04; 0,07)	0,004 (0,001; 0,007)	-
Mjölkkavkastning, kg mjölk <sup>e</sup>	-0,02 (-0,02; -0,01)	-	0,38 (0,16; 0,60)	-
Protein i mjölk, %		0,27 (0,13; 0,42)	-	0,24 (0,10; 0,39)
Fett i mjölk, %	0,13 (0,03; 0,22)	-	-	-
Urea	-0,02 (-0,08; 0,04) <sup>f</sup>	-0,09 (-0,13; -0,05)	-0,07 (-0,01; -0,05)	-
<b>Säsong</b>				
Okt-Nov	-	Ref.	Ref.	-
Dec-Feb	-	0,21 (0,09; 0,33)	0,17 (0,10; 0,25)	-
Mars-April	-	0,19 (0,08; 0,29)	0,13 (0,06; 0,20)	-
<b>Interaktioner</b>				
SH*urea	-0,08 (-0,17; -0,0004)	-	-	-

<sup>a</sup>Box-Cox transformerat celltal (((celltalet<sup>-0,1232737</sup>)-1)/-0,1232737)

<sup>b</sup>KI = konfidens intervall

<sup>c</sup>Ref. = referenskategori dvs. till vilken de andra kategorierna jämförs mot

<sup>d</sup>Laktationsstadium transformerades till polynom för att få ett linjärt samband med lnLDH resp. lnNAGase

<sup>e</sup>Mjölkkavkastning transformerades till ett polynom för att få ett linjärt samband med lnNAGase

<sup>f</sup>Koefficienten gäller endast för SRB då effekten av urea på bcSCC för SH är interaktionstermen ”SH\*urea”

### **Celltal**

Våra resultat visar att det fanns ett samband mellan ras och celltal där kor av SH-ras har ett högre celltal än kor av SRB-ras. Laktationsnummer påverkade också celltalet, där celltalet ökade med ökande laktationsnummer, men 2:a och 3:e kalvare skiljde sig inte signifikant åt vilket inte heller 3:e och 4:e kalvare respektive 4:e och  $\geq 5$ :e kalvare gjorde. Även mjölkavkastning, mjölkfett och mjölkurea påverkade celltalet. Celltalet sjönk med ökad mjölkavkastning och steg med ökande procent mjölkfett. Däremot sjönk celltalet med ökande mjölkurea-koncentration. För mjölkurea fanns också en rasskillnad, celltalet sjönk snabbare per mmol/l mjölkurea för kor av SH-ras än för kor av SRB-ras. Cirka 21 % av variationen i celltal i den studerade populationen kunde förklaras av skillnader i ras, laktationsnummer, mjölkavkastning, urea och procent mjölkfett.

### **LDH**

Laktationsnummer hade ett signifikant samband med LDH där LDH ökade med ökande laktationsnummer. Förstakalvare låg lägst och  $\geq 5$ :e kalvare låg högst, medan det inte var någon signifikant skillnad i LDH-värden mellan kor i laktationsnummer 2 – 4. LDH påverkades av laktationsstadium där LDH låg högt tidigt i laktation för att sedan sakta sjunka t.o.m. ca dag 50 för att sedan öka igen efter ca dag 100. Vidare ökade LDH med ökande halt av mjölkprotein (%) och minskade med ökande mjölkurea. Vi fann att LDH påverkades av säsong, där LDH låg lägst i okt-nov och högre i dec-feb respektive mars-april. Nivåerna i dec-feb och mars-april skilde sig inte signifikant åt. Cirka 35 % av variationen i LDH i den studerade populationen kunde förklaras av skillnader i laktationsnummer, laktationsstadium, urea, procent mjölkprotein och säsong.

### **NAGase**

Laktationsnummer hade även ett signifikant samband med NAGase. NAGase var signifikant lägre hos 1:a kalvare jämfört med äldre kor, medan 2:a kalvare och äldre inte skiljde sig åt. NAGase hade även samband med mjölkavkastningen där NAGase var högt vid låga mängder mjölk (<20 kg) för att sedan sjunka med ökande avkastning. Även laktationsstadium påverkade NAGase där NAGase låg högt i tidig laktation för att sedan sjunka snabbt fram till ca dag 40 för att sedan öka långsamt igen. Mjölkurea hade också samband med NAGase där NAGase värdena sjönk med ökande mjölkurea. Även NAGase påverkades av säsong. NAGase låg lägst i okt-nov och högre i dec-feb respektive mars-april. Nivåerna i dec-feb och mars-april skilde sig inte signifikant. Cirka 30 % av variationen i NAGase i den studerade populationen kunde förklaras av skillnader i laktationsnummer, laktationsstadium, mjölkavkastning, urea och säsong.

### **AF**

Laktationsnummer hade även ett signifikant samband med AF. AF var högre hos 1:a och 2:a kalvare jämfört med äldre kor, 1:a kalvarna låg även högre än 2:a kalvare, medan det inte var någon signifikant skillnad mellan 3:e, 4:e och  $\geq 5$ :e kalvare. Ras hade ett signifikant samband med AF där kor av SH-ras hade högre AF värden än kor av SRB-ras. Laktationsstadium visade sig även påverka AF där man generellt kan säga att AF-värdena ökade med ökande laktationsstadium. Mjölkprotein hade också samband med AF där AF ökade med ökande mjölkprotein

(%). Cirka 58 % av variationen i AF i den studerade populationen kunde förklaras av skillnader i laktationsnummer, laktationsstadium, ras, och procent mjölkprotein.

### Förutsägelse för att en ko ska ha en eller flera juverdelar med smittsam subklinisk mastit

Utifrån de faktorer som hade ett signifikant samband med celltalet konstruerades ett nytt korrigerat celltal. Det nya korrigerade celltalet, samt det gamla korrigerade celltalet, okorrigerat celltal (transformerat med hjälp av Box-Cox transformering resp. den naturliga logaritmen), LDH, NAGase och AF undersöktes var för sig för att se om och hur de hade samband med att en ko hade en eller flera juverdelar med upprepat bakteriefynd. Alla juverhälsomått förutom AF visade sig ha ett signifikant samband med kons bakteriologiska status. De prediktiva värdena för respektive juverhälsomått (förutom AF som inte var signifikant) presenteras i tabell 3. Bästa förmåga att förutsäga om en ko var bakteriologiskt negativ eller positiv var modellerna med det Box-Cox transformerade celltalet respektive det nya korrigerade celltalet.

**Tabell 3. Prediktiva värden (förutsägelse) för olika juverhälsomarkörer för att finna kor med eller utan bakteriologiska fynd i en eller flera juverdelar.**

Juverhälsomarkör	Prediktion för bakteriologiskt negativa kor, median (IKA <sup>a</sup> )	Prediktion för bakteriologiskt positiva kor, median (IKA <sup>a</sup> )	n
Logaritmerat celltal	12,8 (6,7; 25,9)	53,7 (34,3; 75,8)	705
Box-Cox transformerat celltal	12,3 (5,5; 27,0)	55,2 (35,9; 75,7)	705
Nya korrigerade celltalet	12,8 (6,3; 24,9)	57,1 (34,8; 74,1)	705
Gamla korrigerade celltalet	21,0 (12,0; 34,1)	42,4 (26,5; 59,8)	705
Logaritmerat LDH	22,8 (17,3; 33,7)	37,1 (27,1; 48,0)	710
Logaritmerat NAGase	26,8 (20,8; 33,4)	34,8 (26,3; 41,0)	710

<sup>a</sup>IKA = interkvartilavstånd, dvs. intervallet mellan det värde som 25 % av observationerna är mindre än eller lika med till det värde som 25 % av observationerna är större än eller lika med (25 resp. 75 percentilen).

Det prediktiva värdet undersöktes även för upprepade mätningar av juverhälsomåtten (tabell 4) och även här hade modellerna med det Box-Cox transformerade celltalet respektive det nya korrigerade celltalet bäst prediktioner.

**Tabell 4. Prediktiva värden för olika upprepade mätningar av celltal för att finna kor med eller utan bakteriologiska fynd i en eller flera juverdelar.**

Juverhälsomarkör	Prediktion för bakteriologiskt negativa kor, median (IKA <sup>a</sup> )	Prediktion för bakteriologiskt positiva kor, median (IKA <sup>a</sup> )	n
<b>Celltal från aktuell provmjölkning samt från provmjölkningen före</b>			
Logaritmerat celltal	13,1 (6,1; 28,1)	58,3 (36,2; 76,9)	592
Box-Cox transformerat celltal	13,3 (5,2; 29,6)	59,6 (37,4; 76,3)	592
Nya korrigerade celltalet	12,4 (5,3; 25,8)	58,4 (36,7; 77,6)	592
Gamla korrigerade celltalet	21,6 (11,4; 35,0)	44,1 (27,5; 60,9)	592
<b>Celltal från aktuell provmjölkning samt medelcelltalet från de två tidigare närmsta provmjölkningarna</b>			
Logaritmerat celltal	11,0 (3,1; 29,6)	67,1 (46,4; 81,7)	495
Box-Cox transformerat celltal	9,9 (3,7; 28,7)	67,9 (47,6; 83,5)	495
Nya korrigerade celltalet	11,2 (2,9; 25,0)	67,5 (47,4; 80,8)	495
Gamla korrigerade celltalet	20,2 (10,0; 37,0)	49,2 (28,6; 67,8)	495

<sup>a</sup>IKA = interkvartilavstånd, dvs. intervallet mellan det värde som 25 % av observationerna är mindre än eller lika med till det värde som 25 % av observationerna är större än eller lika med (25 resp. 75 percentilen).

Av de celltalsmått vi använt i studien är det enligt vår uppfattning det logaritmerade celltalet (Incell) som är enklast att förstå och räkna ut. Skillnaden i prediktion mellan Incell och de

andra celltalsmått med bäst prediktion var inte heller så stor. Således, efter mycket diskussion i projektgruppen, baserat på resultaten vi fått, enades vi om att vi i denna studie skulle fortsätta att utvärdera Incell som juverhålsomått.

### Utvärdering av det logaritmerade celltalets förmåga att finna bakteriologiskt negativa kor respektive kor med bakteriefynd i en eller flera juverdelar

Om vi tittar på hur bra Incell från aktuell provmjölkning, kombinerat med medelvärdet av Incell från de två tidigare provmjölkningarna, är på att skilja på kor som är bakteriologiskt negativa, har fynd av sk. ”minor pathogens” eller ”major pathogens” ser vi att majoriteten (ca 90 %) av korna med negativa juverdelar har ett prediktivt värde på  $<0,50$  (dvs. klassas av modellen som negativa kor). Av korna med ”minor pathogens” resp. ”major pathogens” hade ca 25 % resp. 66 % ett prediktivt värde  $\geq 0,50$ .

Räknar man ut sensitiviteten (Se), specificiteten (Sp), positivt prediktivt värde (PPV) och negativt prediktivt värde (NPV) för förmågan hos Incell från aktuell och de två tidigare provmjölkningarna att korrekt diagnostisera kor som bakteriologiskt negativa respektive positiva, när man klassar kor med ett prediktivt värde på  $<0,50$  som negativa och  $\geq 0,50$  som positiva, får man: Se = 0,69, Sp = 0,89, PPV = 0,75 och NPV = 0,85. Sensiviteten säger oss hur bra modellen är på att korrekt identifiera bakteriologiskt positiva kor medan det positiva prediktiva värdet säger oss att med hjälp av att titta på celltalet (Incell) kommer man i 75 % av fallen hitta kor som är bakteriologiskt positiva. Specificiteten säger oss hur bra modellen är på att korrekt identifiera kor som är bakteriologiskt negativa medan det negativa prediktiva värdet säger oss att med hjälp av att titta på celltalet (Incell) så kommer man i 85 % av fallen hitta kor som är bakteriologiskt negativa. Modellen lyckas totalt sett klassa 82 % av korna rätt. Jämför vi sedan hur bakteriologiskt negativa respektive positiva kor fördelar sig över prediktionen att kor ska vara bakteriologiskt negativ respektive positiv när vi använder oss av dagens JHKL, Incell vid aktuell provmjölkning kombinerat med medelvärdet av Incell från de två tidigare provmjölkningarna samt bara för Incell vid den aktuella provmjölkningen ser vi att det inte skiljer sig så mycket (tabell 5).

**Tabell 5. Tre olika juverhålsomåttens prediktion att en ko är bakteriologiskt positiv och sann bakteriologiskt status hos respektive ko (antal kor (%), n=495).**

Prediktion	Juverhålsoklasser		Incell över flera provmjölkningar		Incell aktuell provmjölkning	
	Negativ	Positiv	Negativ	Positiv	Negativ	Positiv
<b>0-9</b>	169 (97)	5 (3)	166 (96)	7 (4)	151 (96)	6 (4)
<b>10-19</b>	41 (77)	12 (23)	53 (85,5)	9 (14,5)	67 (90,5)	7 (9,5)
<b>20-29</b>	37 (86)	6 (14)	35 (83)	7 (17)	30 (70)	13 (30)
<b>30-39</b>	21 (66)	11 (34)	20 (67)	10 (33)	26 (70)	11 (30)
<b>40-49</b>	11 (39)	17 (61)	20 (54)	17 (46)	16 (55)	13 (45)
<b>50-59</b>	22 (48)	24 (52)	9 (45)	11 (55)	16 (36)	29 (64)
<b>60-69</b>	13 (54)	11 (46)	14 (33)	29 (67)	13 (30)	30 (70)
<b>70-79</b>	4 (10,5)	34 (89,5)	8 (23)	27 (77)	9 (22)	32 (78)
<b>80-89</b>	4 (18)	18 (82)	5 (13)	33 (86)	3 (11,5)	23 (88,5)
<b>90-100</b>	8 (23,5)	26 (76,5)	1 (7)	14 (93)	0	0

Sensitivitet, Sp, NPV och PPV för respektive mått att korrekt identifiera kor med låg sannolikhet att ha ett eller flera bakteriefynd i en eller flera juverdelar (de med prediktionen 0-29%) respektive hög sannolikhet (de med prediktionen 60-100%) presenteras i tabell 6. Sammantaget ger alla tre juverhälsomåtten ungefär samma resultat, men där Incell över flera provmjölkningar ger ett något bättre NPV och PPV, dvs. är bäst på att finna sant negativa resp. positiva kor.

**Tabell 6. Tre olika juverhälsomåtts diagnostiska förmåga att klassa kor som troligt bakteriologiskt negativa respektive positiva när en prediktion på  $\leq 0,29$  användes för att klassa kor som troligt negativa och en prediktion på  $\geq 0,60$  användes för att klassa kor som troligt positiva (n=495).**

	JHKL	Incell över flera provmjölkningar	Incell aktuell provmjölkning
<b>Se</b>	79	82	77
<b>Sp</b>	89	90	91
<b>NPV</b>	91	92	90,5
<b>PPV</b>	75	79	77

## Diskussion

Detta projekt har bekräftat hypotesen som ställdes i ansökan – kofaktorer påverkar fortfarande celltalet. Däremot kan vi förkasta hypotesen att LDH (samt NAGase och AF) skulle påverkas i mindre grad av kofaktorer jämfört med celltalet. Ser man till hur mycket av variationen i de olika juverhälsomarkörerna som de ingående variablerna i varje modell förklarar, förklarar kofaktorerna variationen i celltal endast till 22 %, medan variationen i LDH, NAGase och AF förklaras till 30 - 58 % av kofaktorerna. Den fördel de ”nya” juverhälsomarkörerna troddes ha, att inte påverkas till lika stor grad av kofaktorer och därmed bättre kunna påvisa kor med mastit, kan i den här studien avfärdas. Mycket av variationen i LDH, NAGase och AF förklarades av laktationsstadium.

I linje med Brolunds (1985) resultat visar även vår studie att det fortfarande finns en ras-skillnad gällande celltal. Kritiken mot det nuvarande systemet, som togs upp i tidningen Husdjur (Karlsson, 2007) var att SRB-kor fick en högre JHKL än SH-kor vid samma celltal och risken fanns då, enligt den intervjuade lantbrukaren, att SRB-korna skulle missgynnas vid utslagning i besättningen. Vår studie, liksom Brolunds (1985), visar dock fortfarande att juverhälsomässigt friska kor av SRB-ras har ett generellt lägre celltal än friska kor av SH-ras. Detta gör att ex. en 50 % höjning i celltal hos SRB-kor indikerar en juverhälsostörning, medan kor av SH-ras vid samma celltal fortfarande anses friska, eller kommer att ha en lägre JHKL. Andelen av variationen i celltal som förklarades av ras var dock väldigt liten och laktationsnummer förklarade den största delen av variationen (hos de bakteriologiskt negativa korna).

I den här redovisade studien såg vi att ett nytt korriberat celltal inte gav mycket bättre prediktiva värden i att påvisa bakteriologiskt positiva resp. negativa kor än det okorrigerade celltalet och att det gamla korrigerade celltalet gav väldigt dåliga prediktiva värden. Att det nya korrigerade celltalet inte gav så mycket bättre prediktiva värden än det okorrigerade celltalet beror på att de kofaktorer som användes för korrigering inte förklarade så mycket av variationen i celltal, dvs. kofaktorerna bidrog inte med så mycket mer information än själva celltalet i sig. Anledningen till att det gamla korrigerade celltalet hade så dålig prediktion i vårt material kan bero på flera saker. För det första är det helt olika komaterial som har använts, korna som provtogs då är troligen inte representativa för dagens kor på grund av ökad mjölkproduktion, minskat celltal och andra genetiska förändringar. För det andra var de äldre statistiska metoderna inte lika effektiva, ex. kunde de inte ta hänsyn till upprepade mätningar inom ko, så i de model-



ler Brolund (1985) använde sig av fick kofaktorerna större effekt, då de kom med flera gånger per ko. I vår studie var det bara en mätning per ko, då vi ville få med så många olika kor som möjligt. Intentionen med detta projekt var att få ett för Sveriges mjölkpopulation så representativt material som möjligt. Vi har dock inte med besättningar från hela landet, vilket kan påverka representativiteten. Vi har dock ingen anledning att tro att en ko i en del av landet skulle skilja sig från en ko av samma ras i en annan del av landet. Däremot kan besättningarna skilja sig åt mycket, men förhoppningsvis har vi genom att ta hänsyn till besättningseffekten i våra modeller fått bort en del av den oförklarade delen av variationen och därmed fått bättre skattningar. Detta gör att vi anser att materialet kan ses som representativt för våra svenska mjölkbesättningar. Skattningarna hade dock blivit än säkrare om vi hade haft ett större antal delta-gande besättningar. En ytterligare skillnad mellan vår och Brolunds studie (Brolund, 1985) är att vi provtog korna dagen före provmjölkningen, på provmjölkningsdagen och dagen efter provmjölkningen. I Brolunds studie (Brolund, 1985) provtogs korna endast en gång inom tre dagar från provmjölkningen fast vid upprepade provmjölkningar. En upprepade provtagning ökar förmågan något att ge en sann bedömning av om kon är bakteriologiskt positiv eller ej (Dohoo et al., 2011).

Vi kunde också konstatera att ett celltalsmått baserat på lncell är bra på att klassa bakteriologiskt negativa kor som negativa och kor med "major pathogens" (som bestod av framförallt *Staphylococcus aureus*) som positiva. Måttet har dock svårt att klassa "minor pathogens" (som i detta material endast utgjordes av koagulansnegativa stafylokocker) som positiva, men det är framförallt "major pathogens" som orsakar de största skadorna och som man verkligen vill finna.

Baserat på de resultat vi fått i denna studie samt på att det korrigerade celltalet har varit svårt för både lantbrukare och rådgivare att helt förstå, föreslår projektgruppen att det korrigerade celltalet kan tas bort från Kokontrollen såvida det inte ska fortsättas användas för JHKL beräkningen.

Vår sista hypotes i detta projekt, att en kombination av upprepade mätningar av celltal är bättre än en enskild, kan bekräftas av våra resultat, men förbättringen var inte så stor jämfört med en enskild celltalsmätning vid aktuell provmjölkning. Endast kor med mer än en provmjölkning får i dagens system en JHKL. Våra resultat tyder på att även en enskild mätning kan ge mycket information om juverhälsostatus så ett kombinerat system där kor om möjligt får en JHKL baserat på fler provmjölkningar, men även kan få en JHKL om det bara finns uppgifter från senaste provmjölkningen skulle vara önskvärt. Att använda lncell (från flera provmjölkningar) gav det högsta NPV och PPV. Genom att använda det juverhälsomåttet skulle 92 % av korna som sägs ha prediktionen 0-29 vara sant negativa och 79 % av de med prediktionen 60-100 vara sant positiva. Dagens JHKL ger inte en dålig prediktion av vilka kor som är bakteriologiskt negativa resp. positiva, men om JHKL skulle beräknas med hjälp av ett nytt korrigerat celltal eller bara lncell skulle prediktionen förbättras något.

## Konklusioner

Celltalet, LDH, NAGase och AF påverkas alla av kofaktorer, men celltalet påverkas till minst del. En korrigerad av celltalet baserat på kofaktorer ger en marginellt bättre förmåga att finna bakteriellt negativa resp. positiva kor jämfört med det okorrigerade celltalet. En upprepade

mätning av celltal ger en bättre möjlighet att finna bakteriologiskt negativa resp. positiva kor, men ett enskilt celltalsmätt ger också mycket information. JHKL beräknade med hjälp av Incell skulle ge en något bättre möjlighet att finna bakteriologiskt negativa resp. positiva kor jämfört med dagens JHKL.

## Publikationer

Nyman, A., Emanuelsson, U. och K. Persson Waller. 2012. *Revidering av korrikeringsfaktorer för celltal*. Forskning Special, nr 18.

[http://www.svenskmjolk.se/Global/Dokument/Dokumentarkiv/Forskning/Forskning%20Special/Forskning\\_Special\\_18\\_2012\\_Revidering\\_korr\\_faktor\\_celltal.pdf](http://www.svenskmjolk.se/Global/Dokument/Dokumentarkiv/Forskning/Forskning%20Special/Forskning_Special_18_2012_Revidering_korr_faktor_celltal.pdf)

Nyman, A. *Nya mastitmarkörer ersätter celltal?* 2011. Veterinärkongressen, 10-11 november, 2011, Uppsala, Sverige. s. 41-44

Nyman, A-K., Emanuelson, U. and K. Persson Waller. 2013. *Cow factors associated with udder health indicators in cows free from intra-mammary infection*. SVPM Annual conference, 20-22 mars, 2013, Madrid, Spain. (poster; <http://www.svepm.org.uk/posters/2013/Nyman.pdf>).

Nyman, A-K., Emanuelson, U. and K. Persson Waller. 2013. *Effect of cow factors and intra-mammary infections on udder health indicators*. ICPD, Uppsala, Sweden

Nyman, A-K., Persson Waller, K., and U. Emanuelson. 2013. *Associations between cow factors, intra-mammary infection and inflammatory indicators*. 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-%20celltal\\_1.pdf](http://www.nkvet.org/user_files/Nyman%20-%20celltal_1.pdf)

Presentation av projektet på SVAs hemsida: <http://www.sva.se/sv/Forskning-och-produkter/Aktuella-forskningsprojekt/Revidering-av-korrikeringsfaktorer-samt-omrakning-av-juverhalsoklasserna/>

## Planerade

Acta Vet. Scand.

Journal of Dairy Science

Tidningen Husdjur

## Övrig resultatförmedling till näringen

Resultatet kommer att presenteras på årets Djurhälso- & Utfodringskonferens (27-28 aug 2013),

<http://www.vxa.se/Global/Dokument/EPI-tr%c3%a4det/Om%20oss/Kurser/DU%202013%20program.pdf>

## Referenser

Brolund, L., 1985, *Cell counts in bovine milk. Causes of variation and applicability for diagnosis of subclinical mastitis*. Acta Vet Scand Suppl 80, 1-123.

Brolund, L. 1990. *Technical utilization of cell count in the milk-recording service (Cellhaltens tekniska utnyttjande i kokontrollen)* (Eskilstuna, Sweden, Swedish Association for Livestock Breeding and Production).

Dohoo, I., Andersen, S., Dingwell, R., Hand, K., Kelton, D., Leslie, K., Schukken, Y., Godden, S., 2011, *Diagnosing intramammary infections: comparison of multiple versus single quarter milk samples for the identification of intramammary infections in lactating dairy cows*. Journal of Dairy Science 94, 5515-5522.

Dohoo, I.R., Martin, W., Stryhn, H., 2010, *Veterinary epidemiologic research*, 2nd Edition. VER Inc, Charlottetown, Prince Edward Island, Canada.

Emanuelson, U., Ekman, T., 2007, *Juverhålsklass bör användas vid en jämförelse mellan olika raser!* Husdjur 10, 81-81.

Karlsson, L., 2007, *Jämför inte juverhålsklasser mellan raser*. Husdjur 9, 40-41.