

Slutrapport

Utvärdering av differentierade somatiska celler som verktyg för förbättrad juverhälsa

Projektnummer: R-18-26-1012

Projektperiod: 2018-06-01 – 2019-06-30

Huvudsökande:

Fredrik Westerberg, Eurofins Steins Laboratorium, fredrikwesterberg@eurofins.se

Medsökande:

Ann-Kristin Nyman, Växa Sverige, ann.nyman@vxa.se

Del 1: Utförlig sammanfattning

The aim of this project was to investigate whether the use of the differential somatic cell count (DSCC) alone, or in combination with somatic cell count (SCC), can be used to improve the identification of cows with intramammary infections and hence, improve recommendations given in order to prevent mastitis. Milk samples were collected according to routine once monthly from all lactating cows in 20 randomly selected dairy herds from the strata of herd with a herd size of 100 to 200 cows and a yearly average bulk tank milk SCC of $\geq 200\,000$ cells/ml milk. In addition to standard quality analyses of milk (yield, protein-, fat- and urea concentrations and SCC) all samples were analysed for DSCC and randomly every 10th sample were selected and analysed for content of bacterial DNA using PCR-analysis. Moreover, data about the cows; parity, breed and calving dates, was obtained from the Swedish Official Milk and Recording Scheme.

In total, 11 118 milk samples from 3 177 cows were analysed. Of these 11 085 had information about SCC, 10 975 about DSCC and 1 895 had information about bacterial DNA in milk. The individual SCC varied between 1 000 to 37 048 000 cells/ml, with an average of 294 000 cells/ml (SD=903 000 cells/ml) and a median of 93 000 cells/ml (Central range (CR):43 000 – 232 000 cells/ml). The DSCC varied between 0 to 97.8%, with an average of 49.3% (SD: 34.8%) and a median of 64.8% (CR:0–77.9%). There was a high correlation between SCC and DSCC of 0.87. The most common bacterial DNA finding was non-aureus staphylococci (66.3%), *Enterococcus* spp. (51.3%) and yeast (43.9%). However, there were few findings of large amounts of DNA, only 2.3% of the samples had very clear findings of DNA and 29.6% had clear findings of DNA. Findings of bacterial DNA from the pathogens consider causing more severe cases of mastitis were *E coli* (18.5 %), *Str dysgalactiae* (18.1%), *Str uberis* (18.5%), *S aureus* (9.3%) and *Str agalactiae* (0,4%).

In general, it was more common that milk samples with higher SCC cells had more findings of bacterial DNA, but that was not as clear considering DSCC levels. The diagnostic properties of SCC and DSCC considering sensitivity and specificity were similar and not so good, neither when SCC and DSCC were investigated separately nor when used in parallel or serially. However, when combined into four categories; low SCC-low DSCC, low SCC-high DSCC, high SCC-low DSCC and high SCC-high DSCC, using a SCC of 150 000 cells/ml and a DSCC of 67% as cut-offs, a significant difference in udder health was found. Cows with a low SCC and low DSCC had in general a higher milk production, both at the test-milking when the SCC-DSCC categories were set, and at the following test-milking within 40 days, compared to cows in the other SCC-DSCC categories. Moreover, cows in the low SCC-low DSCC category had a significantly lower SCC at the following test-milking compared to cows in the other SCC-DSCC categories. Cows in the high SCC-high DSCC category had a significantly higher SCC at the following test-milking than cows in the other SCC-DSCC categories. Using DSCC in combination with SCC gives more information about the udder health status of the cow than just using SCC alone, and could be of help in order to improve the udder health in a dairy herd.

Projekt har fått finansiering genom:

Inledning

Den vanligast förekommande djursjukdomen hos svenska mjölkkor är mastit (juverinflammation). Utöver det lidande som sjukdomen medför djuret, är det även en av de mest kostsamma sjukdomar för lantbrukarens verksamhet. Kostnaden består dels i direkta kostnader såsom analys av mjölkprover och behandlingskostnader, men även indirekta kostnader som för tidig utslagning (Schneider et al, 2007), sämre mjölkproduktion (Hagnestam et al., 2007), lägre kvalitet vid avräkning och kassering av mjölk. Mastit kan klassas som subklinisk då inflammationen endast kan upptäckas genom att i mjölken registrera en ökning av en inflammationsmarkör, till exempel celltal, eller som klinisk då förändringar i mjölken kan ses (t.ex. flockor) ofta i samband med ett ömt och svullet juver samt ibland försämrat allmäntillstånd och feber. Mjölakens celltal (antalet vita blodkroppar + epitelceller per ml) är det vanligaste måttet på juvrets inflammationsstatus. De flesta mjölkproducenter tar rutinmässigt månadsvis ut mjölkprover från alla mjölkande kor, för att få information om kornas celltal. Celltalet har framgångsrikt använts som ett utvärderingsverktyg för juverhälsa sedan 70-talet, vilket har bidragit till en minskning av tankmjölkscelltalet från 600 000 celler/ml till dagens nivå på runt 200 000 celler/ml (Sampimon et al., 2005). Celltalsnivån har emellertid inte förändrat sig nämnvärt de senaste 10 åren (Växa Sverige, 2019). För att få till en ytterligare förbättring krävs nya åtgärder och nya analysverktyg. I en nyligen publicerad svensk studie (Nyman et al., 2016) visade det sig att även om celltalet verkar vara den inflammationsmarkör som bäst kan hitta kor med intramammär infektion, (IMI, det vill säga kor som har bakterier i juvret som orsakar en inflammationsreaktion) hittar den bara ca 80 % av korna med IMI. Vetskapen om vilka individer som har bakterier i juvret är viktigt framförallt för det förebyggande juverhälsoarbetet. Om alla kor med bakterier i juvret kunde identifieras skulle smittspridning mellan kor effektivare kunna förebyggas.

I Sverige analyseras celltal framförallt med Fossomatic FC, ett analysinstrument som via flödescytometri uppmäter antalet celler i mjölken (User manual 6005 4828/Rev2). Denna analys är snabb och kostnadseffektiv. Uppskattningsvis utförs drygt 2 miljoner celltalsanalyser per år. Det företag som utvecklat Fossomatic, Foss Analytics, har nu tagit fram en analysmetod som inte bara räknar antalet celler (vita blodkroppar) utan också kan särskilja mellan olika sorters vita blodkroppar (Damm et al., 2017). Celltalet i mjölk består främst av tre olika sorters vita blodkroppar; lymfocyter, polymorfonukleära neutrofiler (PMN) samt makrofager. Vid en infektion startar ett inflammatoriskt svar. Förenklat kommer initialt stora mängder PMN till infektionsområdet för att bekämpa bakterierna. Sedan kommer makrofagerna för att städa bort resten. Lymfocyt-nivån ligger väldigt stabilt och påverkas inte nämnvärt av en infektion. I mjölk från ett friskt djur förekommer främst makrofager och lymfocyter. Informationen som den nya analystekniken tar fram möjliggör förutom att mäta det somatiska celltalet, även att karaktärisera cellkärnorna och få fram antalet makrofager (Damm et al., 2017). Andelen makrofager nyttjas sedan i en beräkningsmodell för att få fram ett värde på det så kallade differentierade celltalet (DSCC – differential somatic cell count). Den nya DSCC-parametern representerar den kombinerade andelen PMN och lymfocyter i procent. En hög halt PMN i kombination med högt somatiskt celltal indikerar en pågående inflammation. En hög makrofagnivå i kombination med högt somatiskt celltal indikerar att djuret haft en inflammation, men att den akuta inflammationen övergått i en läkningsfas. Tillgången till DSCC i kombination med det vanliga celltalet kan förhoppningsvis leda till ett förbättrat juverhälsoverktyg, som i sin tur kan förbättra rådgivningen och minska antalet mastiter.

En annan möjlighet som finns för att identifiera kor med subklinisk mastit är att påvisa själva infektionen. Traditionellt sett har detta skett med hjälp av odling. På senare tid har PCR (Polymerase Chain Reaction) teknik använts för att analysera DNA från de vanligast förekommande mastitbakterierna i mjölkprover. Detta kan även göras i de prover som tas vid provmjölkningen (Koskinen et al., 2009). En nackdel med PCR-analys är att den metoden är väldigt känslig och påvisar DNA även från döda bakterier, t ex bakterier som immunförsvaret oskadliggjort, vilket kan misstolkas som en pågående infektion. För att bättre kunna tolka de svar som fås från PCR-analysen skulle celltalet, och då framför allt det differentierade celltalet, kunna vara av stor hjälp. Om celltalet är lågt, men PCR-analysen påvisar bakteriellt DNA i mjölken, skulle ett differentierat celltal kunna visa om bakterieinfektionen är pågående, redan avläkt eller bara en kontaminering. Med denna vetskap kan rätt åtgärder sättas in.

Syftet med detta projekt var att utvärdera om användningen av ett differentierat celltal enskilt eller i kombination med det vanliga celltalet säkrare kan särskilja friska kor från kor med misstänkt subklinisk mastit och på så vis förbättra rådgivningen gällande det förebyggande juverhälsoarbetet. Som del i detta ville vi undersöka tre hypoteser, dessa hypoteser var:

- Endast en liten andel kor med lågt celltal och en låg DSCC nivå (det vill säga en låg proportion av polymorfonukleära neutrofiler (PMN)) har fynd av bakteriellt DNA i mjölken.
- Kor med ett högt celltal och en hög DSCC nivå (det vill säga en hög proportion av PMN) har ett tydligt fynd (höga så kallade Ct-nivåer) av bakteriellt DNA i mjölken.
- Kor med ett högt celltal och en låg DSCC nivå har ett tydligt fynd av bakteriellt DNA i mjölken.

Materiell och metoder

Stickprovsurval

Från Växa Sveriges Kodatabas beställdes en lista på besättningar med ett tankmjölkscelltal på >200 000 celler/ml mjölk (besättningar som mer troligt har kor med subklinisk mastit) och en besättningsstorlek på 100–200 kor (för att få tillräckligt antal kor totalt). Besättningar som motsvarade dessa inklusionskriterier kontaktades slumpmässigt med förfrågan om att delta i studien, till dess att 20 besättningar hade tackat ja.

Mjölkanalyser

Under fem månader, från september 2018 till och med januari 2019, analyserades mjölkprover från dessa besättningar i samband med provmjölkningen med avseende på DSCC och med hjälp av PCR-analys för att undersöka förekomst av bakteriellt DNA. Provmjölkningen genomfördes enligt besättningens rutiner en gång i månaden. Celltalet och det differentierade celltalet analyserades enligt Fossomatic™ 7 och Fossomatic™ 7 DC. Förekomst av bakteriellt DNA analyserades enligt Protocol Book Thermo Scientific PathoProof Mastitis Complete-16, Instruktions för use, PF1650/PF1600, December 29, 2015.

Datinsamling

Data från besättningarna gällande besättningarna (besättningsstorlek, avkastningsnivå m.m.), korna (ras, laktationsnummer och kalvningsdatum) och provmjölkningens resultat (mjölmängd, protein, fett, urea, celltal och DSCC) inhämtades från respektive organisation (Växa Sverige och Eurofins) för att användas i de statistiska deskriptiva och analytiska beräkningarna.

Statistiska analyser

Jämförande analyser av celltal och DSCC

I syfte att kunna svara på våra hypoteser användes olika univariabla och multivariabla regressionsmodeller för att undersöka samband mellan DSCC resultatet och bakterieförekomst (mätt med PCR-analysen). Korrelationen mellan celltal och DSCC undersöktes med hjälp av Spearman's rank korrelationskoefficient då varken celltal eller DSCC var normalfördelade.

I detta projekt bestämdes att prover med +++ och ++ fynd av bakterie, oavsett bakterietyp, betraktades som trolig IMI, medan prov med +/- fynd eller utan fynd betraktades som utan IMI. Utifrån denna definition var 1 298 (68,5 %) av proverna IMI negativa och 597 (31,5 %) IMI positiva. Gällande celltalet gjordes flera olika cut-offs för att undersöka bästa cut-off för att påvisa kor med IMI. De cut-offs som skapades var vid 50, 100, 150, 200, 250 och 300 000 celler/ml. DSCC kategoriserades till 0, 1–59, 60–69, 70–79, 80–89, ≥90. Sensitivitet (Se), specificitet (sp), positivt prediktivt värde (PPV) samt negativt prediktivt värde (NPV) räknades ut för celltals cut-offerna 100, 150 och 200 000 celler/ml samt för DSCC 65, 70 och 75 % var och en för sig samt i parallell och seriellt.

Analys där celltal och DSCC kombineras

Baserat på svenska förhållanden och på resultaten från ROC analys bestämdes att den optimala celltal-DSCC kategoriseringen för att bäst kategorisera kor med eller utan IMI skulle vara att använda en celltals cut-off på 150 000 celler och en DSCC cut-off på 67 procent. Denna celltals-DSCC kategorisering användes sedan för att undersöka sambandet mellan celltals-DSCC kategorier och mjölkproduktion, protein-, fett- och ureahalter vid samma provmjölkning, samt samband med ras, laktationsnummer och dagar från kalvning. Dessutom undersökte vi effekten av att befinna sig i en viss celltals-DSCC kategori och mjölkproduktion samt celltal vid nästföljande provmjölkning. Endast kor med mindre än 41 dagar mellan provmjölkningarna togs med i beräkningen. Multivariabla blandade regressionsmodeller användes för att analysera sambanden, där hänsyn tas till att kor inom samma besättning är mer lika varandra än kor mellan olika besättningar.

Resultat

Totalt analyserades 11 118 mjölkprover från 3 177 kor i 20 besättningar. Av dessa hade 11 085 ett analysresultat för celltal, 10 975 för andel PMN och 1 895 för bakterieförekomst (PCR-analys).

Celltal och differentierat celltal

Celltalet varierade mellan 1 000 och 37 048 000 celler/ml med ett medelvärde på 294 000 celler/ml (SD=903 000) och en median på 93 000 celler/ml (Kvartilavstånd/central range (CR):43 000 – 232 000). DSCC varierade mellan 0 och 97,8, med ett medelvärde på 49,3 (SD: 34,8) och en median på 64,8 (CR:0–77,9). Korrelationen mellan celltalet och det differentierade celltalet var 0,87.

Bakteriefynd

Resultaten från PCR-analysen av mjölkproverna visade att det var endast ett fåtal prover där en hög mängd bakteriellt DNA kunde påvisas. Totalt påvisades mycket tydliga (+++) fynd av DNA i 43 (2,3%) av mjölkproverna och i 561 (29,6 %) av proverna fanns det tydliga (++) fynd för en eller fler agens. Totalt hade 87,1 procent av proverna tydliga fynd av 1–8 av de i analysen ingående agens. Alla agens påvisades inte i alla mjölkprover och i 70 (3,7 %) av prover kunde inget bakteriellt DNA påvisas.

Det vanligaste fyndet var andra stafylokocker än *S aureus* (non-aureus staphylococci, NAS) som påvisades i 66,3% av proverna tätt följt av *Enterococcus* spp som påvisades i 51,3 % och jäst som påvisades i 43,9 % av proverna. Vanligaste fyndet bland de agens som anses som mer allvarliga var *E coli* (18,5 %), *Str dysgalactiae* (18,1 %) och *Str uberis* (18,5 %). *Staphylococcus aureus* påvisades endast i 9,3 % av proven och *Str agalactiae* i endast 0,4 % av proverna. *Mycoplasma bovis* påvisades inte i något av proverna.

Samband mellan celltal, DSCC och bakteriefynd

Det var väldigt få prover som hade mycket tydliga fynd av bakteriellt DNA, men procentuellt var det framförallt i mjölkprover med celltal $\geq 100\ 000$ celler och ett DSCC på $< 60\ %$ som bakteriellt DNA påvisades mycket tydligt (tabell 2). Resultaten av den statistiska analysen visade att prover med ett celltal på 200 000–299 000 och DSCC på 60–69 % hade ett signifikant högre odds för ett mycket tydligt fynd av DNA jämfört med prov med $< 100\ 000$ celler och DSCC $< 60\ %$ ($p=0,01$) eller DSCC 70–79 % ($p=0,02$), prov med 100 000–199 000 celler och DSCC 70–79 % ($p=0,03$) samt prov med $\geq 300\ 000$ celler och DSCC $\geq 80\ %$ ($p=0,02$). Inga andra signifikanta samband kunde ses mellan prov med ett mycket tydligt fynd av bakteriellt DNA och celltal och DSCC.

Tabell 2. Andel mjölkprover med fynd av bakteriellt DNA fördelat över celltalskategorier och det kategoriserade differentierade celltalet (DSCC).

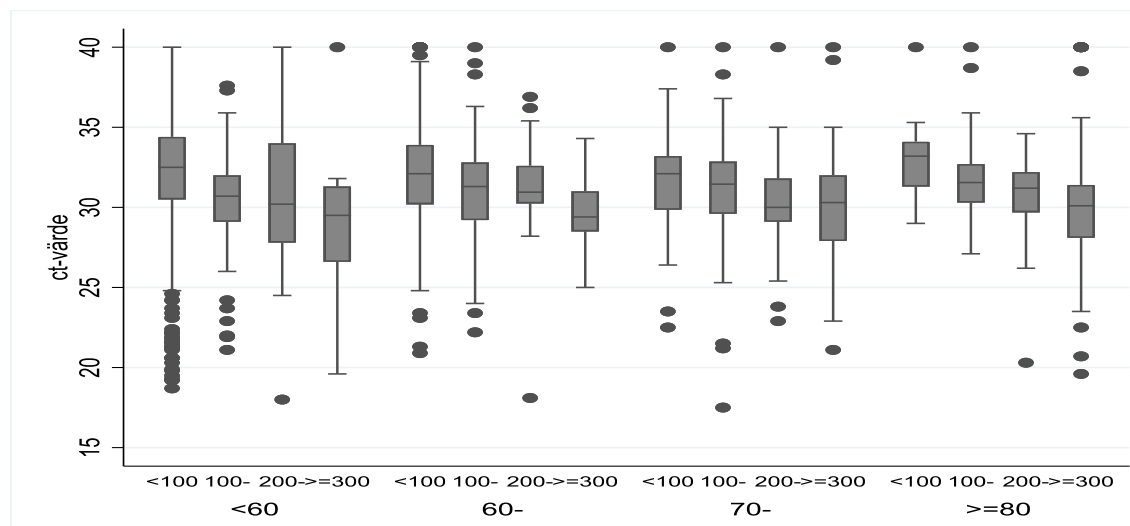
		Antal obs	Antal prov med minst ett +++ fynd	Antal prov med minst ett ++ fynd	Antal prov med minst ett + fynd	Antal prov med minst ett +/- fynd	Antal utan något fynd
SCC<100	DSCC<60	759 (41)	21 ¹ (2,8)	136 (17,9)	614 (80,9)	504 (66,4)	49 (6,5)
	DSCC60-69	129 (7)	3 (2,3)	26 (20,1)	108 (83,7)	81 (62,8)	6 (4,6)
	DSCC70-79	96 (5)	1 (1,0)	29 (30,2)	84 (87,5)	65 (67,7)	1 (1,0)
	DSCC ≥ 80	14 (1)	0 (0,0)	1 (7,1)	13 (92,9)	11 (78,6)	1 (7,1)
SCC100-199	DSCC<60	54 (3)	4 (7,4)	20 (37,0)	47 (87,0)	37 (68,5)	0 (0,0)
	DSCC60-69	88 (5)	0 (0,0)	30 (34,1)	84 (95,4)	65 (73,9)	1 (1,1)
	DSCC70-79	144 (8)	2 (1,4)	42 (29,2)	128 (88,9)	101 (70,1)	1 (0,7)
SCC200-299	DSCC<60	54 (3)	0 (0,0)	15 (27,8)	51 (94,4)	38 (70,4)	1 (1,8)
	DSCC60-69	12 (1)	1 (8,3)	4 (33,3)	9 (75,0)	6 (50,0)	2 (16,7)
	DSCC60-69	24 (1)	1 (4,2)	10 (41,7)	22 (91,7)	17 (70,8)	0 (0,0)
	DSCC70-79	82 (4)	2 (2,4)	39 (47,6)	76 (92,7)	52 (63,4)	1 (1,2)
SCC≥ 300	DSCC<60	53 (3)	1 (1,9)	20 (37,7)	52 (98,1)	36 (67,9)	5 (9,4)
	DSCC<60	11 (1)	1 (9,1)	6 (54,5)	10 (90,9)	6 (54,5)	1 (9,1)
	DSCC60-69	21 (1)	0 (0,0)	14 (66,7)	21 (100,0)	10 (47,6)	0 (0,0)
	DSCC70-79	67 (4)	1 (1,5)	30 (44,8)	63 (94,0)	44 (65,7)	1 (1,5)
	DSCC ≥ 80	255 (14)	4 (1,6)	136 (53,3)	241 (94,5)	151 (59,2)	5 (2,0)
Summa		1863					

¹20 av dessa kom från samma besättning och hade alla +++fynd av NAS, 1 prov från en annan besättning hade +++fynd av Klebsiella spp.

Det var betydligt fler prover som hade minst ett tydligt fynd av bakteriellt DNA och ju högre celltal desto högre andel prover med tydligt fynd av bakteriellt DNA. Det var dock inte lika tydligt att mjölkprover med ett högre DSCC alltid hade ett tydligt fynd av bakteriellt DNA. Resultaten av den statistiska analysen visade att prover med celltal $\geq 300\ 000$ och DSCC 60–69 % hade ett signifikant högre sannolikhet för ett tydligt fynd av bakteriellt DNA än prover med ett celltal under 200 000 oavsett DSCC kategori hos dessa prov ($p \leq 0,03$). Det var ingen signifikant skillnad mellan prover med celltal $\geq 300\ 000$ och DSCC 60–69 % och de prover som hade celltal

$\geq 200\ 000$ ($p > 0,08$) oavsett DSCC kategori. Prover med celltal $< 100\ 000$ och DSCC $< 60\ %$ hade en signifikant lägre sannolikhet för ett tydligt fynd av bakteriellt DNA jämfört med alla andra celltals-DSCC-kategorier ($p < 0,04$) förutom prover med $< 100\ 000$ celler och DSCC 70–79 % ($p = 0,77$), $< 100\ 000$ celler och DSCC $\geq 80\ %$ ($p = 0,56$), 200 000–299 000 celler och DSCC $< 60\ %$ ($p = 0,25$).

I figur 1 visas att det generellt är ett lägre ct-värde (det vill säga mer bakteriellt DNA) i mjölkprover med ökande celltal oavsett DSCC nivå (här är det de lägsta ct-värdet i mjölkprovet som presenteras). Det är svårare att se ett mönster för olika ct-värden och DSCC nivåer.



Figur 1. Låddiagram för ct-värden (antal cykler det tar för att påvisa bakteriellt DNA) över celltal och DSCC kategorier ($n = 10\ 814$). Mittstrecket i lådan visar medianvärdet, medan botten och taket på lådan visar värdet för de 25 procent lägsta (undre kvartilen) respektive högsta (övre kvartilen) värdena. De vågräta strecken ovan och under lådan visar på den övre respektive undre intilliggande värdet (övre kvartilen + $1,5 \cdot$ kvartilavståndet respektive undre kvartilen - $1,5 \cdot$ kvartilavståndet). Punkterna representerar extremvärden.

Den linjära regressionsanalysen (där besättning och ko tas med som slumpvariabler för att justera för likheter inom besättning respektive ko då det är upprepade mätningar inom besättning och ko) visade även att detta samband var statistiskt signifikant. Generellt var mängden bakteriellt DNA i mjölkprov signifikant ($p < 0,05$) lägre i mjölkprover med lägre celltal oavsett DSCC nivå. Den enda signifikanta skillnaden mellan DSCC kategorierna inom celltal var en signifikant lägre mängd bakteriellt DNA i mjölkprover med $< 100\ 000$ och DSCC $< 60\ %$ jämfört med mjölkprover med $< 100\ 000$ och DSCC 70–79 %.

Celltal och DSCC som diagnostiskt test för att påvisa kor med eller utan IMI

Undersöker vi hur säkert celltalet i sig korrekt kan diagnostisera en ko, med eller utan bakteriefynd vid olika cut-offs för celltalet får vi en sensitivitet (Se) mellan 44,9–64,0 % och en specificitet (Sp) mellan 61,7–79,6 %. Sensitiviteten säger hur många prover av de som är sant positiva/negativa (i vårt fall IMI+/IMI-) som det diagnostiska testet också säger är positiva/negativa. Högst Se får vi vid en cut-off på 100 000 celler/ml och högst Sp får vi vid en cut-off på 200 000 celler.

Undersöker vi hur säkert DSCC är på att korrekt diagnostisera en ko med eller utan bakteriefynd vid olika cut-offs för DSCC får vi en Se mellan 41,0–63,5 % och en Sp mellan 57,4–73,7 %. Högst Se får vi vid en cut-off på 65% och högst Sp vid en cut-off på 75%.

Totalt sett är Se och Sp för celltal respektive DSCC väldigt lika i att diagnostisera kor med eller utan bakteriefynd i mjölkprov och ingen är riktigt bra. Celltalet gav emellertid oftast en något högre Se och Sp, även om skillnaden var marginell.

Då inget av måtten gav så bra Se eller Sp undersöktes om användning av testen parallellt (dvs för att räknas som positiv behöver det ena eller det andra testet visa positivt (ex. $\geq 100\ 000$ celler eller ≥ 65) eller seriellt (för att räknas som positiv måste båda testen visa positivt (ex. $\geq 100\ 000$ celler och ≥ 65)) kunde göra att Se och Sp förbättrades. Högsta Se (72,5%) uppnåddes när ett positivt prov behövde vara $\geq 100\ 000$ celler eller ha ett DSCC ≥ 65 . Högsta Sp (83,6%) uppnåddes när ett positivt prov behövde ha ett celltal $\geq 200\ 000$ celler/ml och ha ett DSCC $\geq 75\ %$.

Celltal och DSCC i kombination

De grundläggande analyserna visade ingen direkt skillnad mellan celltal och DSCC, vilket troligen beror på att DSCC till stor del utgör celltalet. Vi ville dock undersöka om det förelåg några skillnader mellan kor med lågt celltal och lågt DSCC, lågt celltal och högt DSCC, högt celltal och låg DSCC samt med högt celltal och hög DSCC. Om en sådan kategorisering bättre kan särskilja kor i troligen friska, respektive infekterade, kan djurägaren lättare sätta in rätt åtgärder för rätt individ. I dessa analyser använde vi en celltals cut-off på 150 000 celler och en DSCC cut-off på 67 procent.

Samband mellan celltal-DSCC kategori och IMI

Det var ett signifikant samband mellan vilken celltals-DSCC kategori kon hade och hur troligt det var att hon hade IMI. Oddset för att vara IMI positiv var 4,8 (95% KI: 3,4 – 6,7) ggr så högt för kor med högt celltal och hög DSCC jämfört med kor med lågt celltal och låg DSCC ($p<0,001$), 2,8 (95% KI: 1,9 – 4,1) ggr så hög jämfört med kor med lågt celltal och låg DSCC ($p<0,001$), och 2,7 (95% KI: 1,5 – 4,8) ggr så högt jämfört med kor med högt celltal och låg DSCC ($p=0,001$).

Sannolikheten för att ha IMI var också signifikant högre för kor med lågt celltal och hög DSCC (OR=1,7 (95% KI: 1,2 – 2,5), $p=0,004$) och för kor med högt celltal och låg DCC (OR=1,8 (95% KI: 1,0 – 3,1), $p=0,045$) jämfört med kor med lågt celltal och låg DSCC.

Det var ingen signifikant skillnad mellan kor med lågt celltal och hög DCC och kor med högt celltal och låg DSCC ($p=0,93$). Dagar i mjölk, fett och ureahalt hade också ett signifikant samband med IMI.

Samband mellan celltal-DSCC kategori och mjölkproduktion, protein-, fett och ureahalt vid samma provmjölkningstillfälle

Det var ett signifikant samband mellan vilken celltal-DSCC kategori kon hade och vilken mjölkproduktion hon hade vid ett och samma provmjölkningstillfälle. Lägst mjölkproduktion hade, enligt regressionsmodellen, kor med högt celltal och låg DSCC, signifikant ($p<0,001$) lägre jämfört med kor med lågt celltal och låg DSCC, lågt celltal och hög DSCC samt kor med högt celltal och högt DSCC. Kor med högt celltal och hög DSCC hade signifikant ($p<0,001$) lägre mjölkproduktion än kor med lågt celltal och låg eller hög DSCC. Mjölkproduktionen skiljde sig inte mellan kor med lågt celltal och låg eller hög DSCC ($p=0,11$). Även om sambandet var signifikant så skiljde sig inte produktionen så mycket åt numerärt. Kor med högt celltal och låg DSCC producerade i snitt (predikerat av modellen) 28,4 kg, kor med högt celltal och hög DSCC producerade i snitt 30,0 kg, kor med lågt celltal och låg DSCC producerade i snitt 31,3 kg och kor med lågt celltal och hög DSCC producerade i snitt 31,1 kg. Dagar i mjölk, laktationsnummer, ras, fett-, protein och ureahalt hade alla ett signifikant samband med mjölkproduktionen.

Högst fetthalt vid första provmjölkningen efter kalvning hade kor med högt celltal och låg DSCC, signifikant högre jämfört med kor med lågt celltal och låg eller hög DSCC ($p<0,001$) eller kor med högt celltal och högt DSCC ($p=0,002$). Även kor med högt celltal och hög DSCC hade signifikant högre fetthalt i mjölk jämfört med kor med lågt celltal och låg eller hög DSCC ($p<0,001$). Det var ingen signifikant skillnad i fetthalt mellan kor med lågt celltal och låg eller hög DSCC ($p=0,93$). Fetthalten för kor med högt celltal och låg DSCC var 4,63 procent, för kor med högt celltal och hög DSCC 4,51 procent, för kor med lågt celltal och låg eller hög DSCC 4,41 procent. Dagar i mjölk, laktationsnummer, ras, fett-, protein och ureahalt hade alla ett signifikant samband med fetthalten i mjölk.

Högst proteinhalt hade kor med högt celltal och låg DSCC, signifikant högre jämfört med kor med lågt celltal och låg eller hög DSCC ($p<0,001$) och jämfört med högt celltal och högt DSCC ($p=0,001$). Lägst proteinhalt i mjölk hade kor med lågt celltal och låg DSCC, signifikant lägre än kor med högt celltal och låg ($p<0,001$) eller hög DSCC ($p<0,01$). Inga andra signifikanta skillnader sågs. Kor med högt celltal och låg DSCC hade en proteinhalt i mjölk på 3,87 procent, kor med lågt celltal och hög DSCC hade 3,68 procent, kor med högt celltal och hög DSCC hade 3,71 procent och kor med lågt celltal och låg DSCC hade 3,70 procent. Dagar i mjölk, laktationsnummer, ras, fett-, protein och ureahalt hade alla ett signifikant samband med proteinhalten i mjölk.

Högst ureahalt hade kor med lågt celltal och låg DSCC, signifikant högre än kor med lågt celltal och låg DSCC ($p=0,04$) och jämfört med kor med högt celltal och låg ($p=0,004$) eller hög ($p<0,001$) DSCC. Även kor med lågt celltal och hög DSCC hade högre ureahalt jämfört med kor med högt celltal och hög DSCC ($p=0,03$). Inga andra signifikanta skillnader sågs. Kor med lågt celltal och låg DSCC hade en ureahalt i mjölk på 5,19 mmol/l, kor med lågt celltal och hög DSCC hade 5,12 mmol/l, kor med högt celltal och låg DSCC hade 5,03 procent och kor med högt celltal och hög DSCC hade 5,05 procent. Dagar i mjölk, laktationsnummer, ras, fett-, protein och ureahalt hade alla ett signifikant samband med ureahalten i mjölk.

Samband mellan celltal-DSCC kategori vid aktuellt provmjölkningstillfället och celltal respektive mjölkproduktion vid nästa provmjölkningstillfälle

Kor som provningen innan hade lågt celltal och låg DSCC hade signifikant ($p < 0,001$) lägre celltal, medan kor med högt celltal och hög DSCC hade signifikant högre celltal ($p < 0,001$) jämfört med kor i de andra celltals-DSCC kategorier vid provmjölkningstillfället ≤ 41 dagar senare. Kor med lågt celltal och högt DSCC hade signifikant lägre celltal än kor med högt celltal och låg DSCC ($p < 0,02$). Kor med lågt celltal och låg DSCC provningen innan uppskattades av regressionsmodellen att ha ett celltal på 85 000 (95% KI: 78 000 – 94 000) celler vid nästa provmjölkning, medan kor med lågt celltal och hög DSCC hade ett celltal på 126 000 (95% KI: 114 000 – 140 000) celler, kor med högt celltal och låg DSCC 147 000 (95% KI: 128 000 – 169 000) celler och kor med högt celltal och hög DSCC 224 000 (95% KI: 203 000 – 246 000) celler vid nästa provmjölkning (Figur 2).

Kor som vid föregående provning hade lågt celltal och låg DSCC hade signifikant ($p = 0,006$ – $p < 0,001$) högre mjölkproduktion, medan kor med högt celltal och låg DSCC hade signifikant ($p = 0,046$ – $p < 0,001$) lägre mjölkproduktion jämfört med kor i andra celltals-DSCC kategorier. Inga andra signifikanta skillnader sågs. Skillnaden i mjölkavkastning var inte numerärt särskilt stor. En ko med lågt celltal och låg DSCC uppskattades av den statistiska modellen ha en oförändrad mjölkproduktion på 30,8 kg. Kor med lågt celltal och hög DSCC hade en mjölkproduktion på 30,3 kg. En ko med högt celltal och låg DSCC hade en mjölkproduktion på 29,6 kg. Individer med högt celltal och hög DSCC hade vid nästa provmjölkning en mjölkproduktion på 30,2 kg (figur 2).

Gällande fetthalt vid nästa provmjölkning sågs bara en signifikant skillnad, kor med lågt celltal och låg DSCC hade signifikant högre fetthalt än kor med lågt celltal och hög DSCC ($p = 0,004$). Kor med lågt celltal och låg DSCC hade en fetthalt på 4,51 procent, kor med lågt celltal och hög DSCC hade 4,44 procent, kor med högt celltal och låg DSCC hade 4,46 och kor med högt celltal och hög DSCC hade 4,47 procent (figur 2).

Kor med högt celltal och hög DSCC hade signifikant högre proteinhalter jämfört med kor med högt celltal och låg DSCC ($p = 0,006$). Proteinhalten hos kor med lågt celltal och låg DSCC var 3,73 procent, kor med lågt celltal och hög DSCC hade 3,72 procent, kor med högt celltal och låg DSCC hade 3,69 och kor med högt celltal och hög DSCC hade 3,74 procent (figur 2).

Gällande ureahalt vid nästa provmjölkning hade kor med lågt celltal och låg DSCC signifikant högre ureahalt än kor med högt celltal och låg DSCC ($p = 0,048$) och jämfört med kor med högt celltal och hög DSCC ($p = 0,006$). Kor med lågt celltal och låg DSCC hade en ureahalt på 5,38 mmol/l, kor med lågt celltal och hög DSCC hade 5,35 mmol/l, kor med högt celltal och låg DSCC hade 5,26 mmol/l och kor med högt celltal och hög DSCC hade 5,30 mmol/l (figur 2).

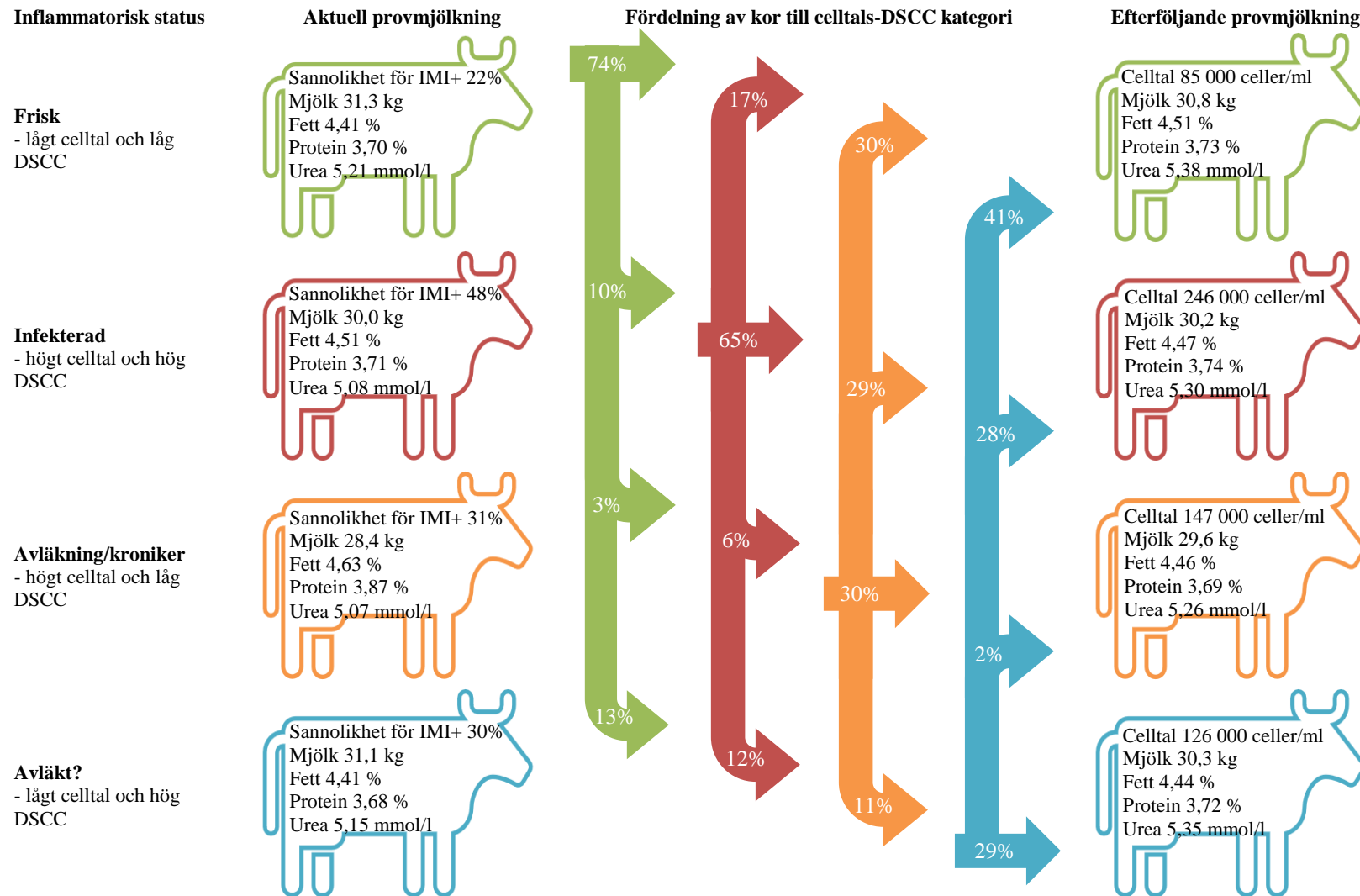
Celltal-DSCC kategori vid aktuellt provmjölkningstillfället och celltal-DSCC kategori vid efterföljande provmjölkningstillfälle

Av de kor som hade lågt celltal och låg DSCC var 74 procent kvar i denna kategori även vid efterföljande provmjölkningstillfälle, 13 procent gick till att ha lågt celltal och hög DSCC, 10 procent gick till att ha högt celltal och hög DSCC och 3 procent gick till att ha lågt celltal och hög DSCC (figur 2).

Av de kor som hade högt celltal och hög DSCC var 65 procent fortsatt kvar i samma kategori, medan 17 procent gick till att ha lågt celltal och låg DSCC, 12 procent gick till att ha lågt celltal och hög DSCC och 6 procent gick till att ha högt celltal och låg DSCC (figur 2).

De kor som hade högt celltal och låg DSCC fördelade sig relativt jämt över alla kategorier vid nästa provmjölkning; 30 procent var kvar i samma kategori, 30 procent gick till att ha låga celler och låg DSCC, 29 procent gick till att ha höga celler och högt DSCC och 11 procent gick till att ha låga celler och hög DSCC (figur 2).

Av de kor som hade låga celltal och hög DSCC var det 41 procent som gick till att ha låga celltal och låg DSCC vid nästföljande provmjölkning, 29 procent gick till att ha lågt celltal och hög DSCC, 28 procent till att ha högt celltal och hög DSCC och endast 2 procent låg kvar i samma kategori (figur 2).



Figur 2. Karakteristika för kor med olika celltals-differentierat celltal (DSCC) kategorier (lågt celltal (<150 000 celler/ml mjölk och låg DSCC (< 67 %), lågt celltal och hög DSCC (≥67 %), högt celltal (≥150 000 celler/ml mjölk) och hög DSCC, samt högt celltal och hög DSCC) vid aktuell provmjölkning (sannolikhet för intramammär infektion (IMI), mjölkavkastning, fett-, protein och ureahalter) och karakteristika (celltal, mjölkproduktion, fett-, protein och ureahalter) vid efterföljande provmjölkning inom 40 dagar (n=9970 vid aktuell provmjölkning och n=6994 vid efterföljande provmjölkning).

Diskussion

Ingen av våra hypoteser kunde förkastas utan vi kunde visa att det endast är en liten andel kor med lågt celltal (<100 000 celler) och ett lågt DSCC (<70%) som har tydligt fynd av bakteriellt DNA i mjölken, medan kor med ett högt celltal (≥200 000 celler) och ett lågt DSCC (≤70%) eller ett högt DSCC (≥70%) har ett tydligt fynd av bakteriellt DNA i mjölk. Detta resultat var förväntat då det är framförallt bakterieinfektioner som leder till ett inflammatoriskt svar i form av bland annat ett högt celltal (Nyman et al., 2016) och hög DSCC (Kirkeby et al., 2019). En förklaring till att kor med högt celltal och låg DSCC fortsatt har högre mängd bakteriellt DNA i mjölkprover kan bero på att det fortsatt finns bakteriellt DNA i mjölken från avdödade bakterier. Även om PCR analys av mjölkprover för att påvisa bakteriellt DNA är en väldigt känslig och snabb metod så är en nackdel att man inte får någon uppfattning om DNA kommer från levande eller avdödade bakterier. Tar man mjölkprover för bakterieodling så måste bakterierna vara levande för att kunna växa på odlingsplattan. En annan nackdel med PCR analys av mjölkprover när proverna kommer från provmjölkningsprover är att det är stor risk att få med bakterier som inte kommer från den provmjölkande kons juver. Vid provmjölkning rengörs juvret enligt rutin, men vid bakteriologisk provtagning tas oftast prov från varje juverdel och provuttaget sker med steril provtagningsteknik, allt för att minimera risken att få med bakterier från hud och omgivning. Vid provmjölkning finns också risk att få med sig bakterier från mjölk från tidigare kor med i provkoppen (Mahmmod et al., 2014). Att vi valde att använda PCR analys av mjölkprover tagna vid provmjölkning i denna studie var på grund av kostnadseffektiva skäl. För att verkligen kunna undersöka om DSCC kan ge en bättre diagnostik gällande att hitta kor med IMI behövs troligen mjölkprover tas sterilt och odlas ut. I en nyligen publicerad studie från Danmark, i vilken det togs både juverdelsprover för odling och heljuverprover för PCR analys sågs ett tydligare resultat när resultaten från den bakteriella odlingen användes för att undersöka sambandet mellan IMI och DSCC (Kirkeby et al., 2019). Det är troligt att flera av våra mjölkprover i denna studie var kontaminerade vilket kan förklara de låga värdena för Se och Sp, både vad gäller SCC och DSCC, – är inte referensanalysen bra, är det svårt för jämförelseanalysen att bli bra. Swartz et al. (2019) kunde emellertid inte heller visa någon tydlig skillnad i Se och Sp mellan SCC och DSCC för att påvisa IMI trots att de använde bakteriologisk odling för att få fram IMI status.

I de analyser där vi använde en kombination av celltalet och DSCC, i stället för att jämföra dem med varandra, såg vi tydligt att det var en skillnad mellan kor med olika celltals-DSCC kategorier och sannolikhet för IMI. Det framkom även att mjölkproduktion, både vid en och samma provmjölkning, samt vid efterföljande provmjölkning skiljde sig mellan kategorierna (figur 2). I dessa analyser sågs en signifikant skillnad inom celltals kategori mellan DSCC kategorier, det vill säga DSCC ger tillsammans med celltalet en extra information om juverhälsostatus. För kor med lågt celltal var sannolikheten 1,7 gånger så högt att vara IMI positiv om DSCC var högt jämfört med om det var lågt, medan för kor med högt celltal var sannolikheten 2,7 gånger så hög att vara IMI positiv om DSCC var högt jämfört med om det var lågt. Vi kunde också se att det var en skillnad i celltal provmjölkningen efter där de friska korna hade signifikant lägre celltal än de andra grupperna, drygt 40 000 i skillnad mot de som hade lågt celltal och hög DSCC. Den praktiska tillämpningen av detta kan vara att diagnostiken blir säkrare för vilka kor som mer troligt är friska (lågt celltal låg DSCC) eller som har juverinflammation (högt celltal och hög DSCC). De friska korna skyddar man då från de övriga om möjligt genom gruppering och de med tydlig indikation på juverinflammation mjölkar man sist. De flesta med lågt celltal och hög DSCC visade sig vara friska vid nästa provmjölkning, men nästan en tredjedel hade juverinflammation vid nästa provmjölkning, så denna grupp har en osäker juverhälsostatus och bör inte gå med de friska, men kanske inte heller med de sjuka. Den sista gruppen, de med högt celltal och lågt DSCC, har väldigt osäker status och verkar ha samma sannolikhet att bli friska som sjuka, men det var också samma sannolikhet att de var kvar i den gruppen. Denna grupp ska definitivt inte heller gå med de friska korna. Potentialen i att använda DSCC i kombination med SCC verkar efter denna studie vara att få en tydligare diagnos för de kor som verkligen är friska. Dessa kor behöver djurägaren visserligen skydda, men annars inte göra något extra med, vilket är en stor vinning både tidsmässigt och ekonomiskt.

Slutsatser

Vi fann i denna studie att det inte var någon större skillnad mellan att använda celltal eller DSCC gällande diagnostisk förmåga att finna kor med intramammär infektion, vi fann däremot att kombination av celltalet och DSCC ger en tydligare uppdelning i juverhälsostatus, det vill säga vilka kor som mer troligt är sant friska respektive sant infekterade, än om bara celltalet används. Innan implementeringen av DSCC i kokontrollen vore det dock bra att undersöka om användandet av celltals-DSCC kategorier kan ge den potentiella förbättringen i juverhälsa som vi tror.

Nytta för näringen och rekommendationer

Vi ser en klar nytta med att få en tydligare indelning i juverhälsostatus, att kunna förebygga att kor drabbas av mastit ger kor med mer mjölk, färre kor som drabbas av klinisk mastit och då också färre kor som behandlas med antibiotika och slutligen färre kor som riskerar att slås ut på grund av höga celltal.

Den faktiska vinningen i att använda DSCC i kombination med celltalet behöver emellertid undersökas vidare. En sådan undersökning kräver en fältstudie där större besättningar med höga celltal och med praktisk möjlighet att gruppera kor, kunde jämföra inom gården genom att bara dela in kor enligt dagens rekommendationer baserat på celltal, med att dela in kor enligt celltals-DSCC kategorier, enligt EVOP metoden (som utvärderats i ett tidigare SLF-projekt H1330107). Besättningens celltal skulle då följas kontinuerligt utifrån respektive grupp, utfall en signifikant skillnad under perioden respektive efter försökstiden påvisas går det med större säkerhet uttala sig om att DSCC i kombination med celltalet ger bättre information om juverhälsostatus än celltalet självt.

Referenser

Damm, M., Holm, C., Blaabjerg, M., Bro, M.N., and D. Schwarz. 2017. Differential somatic cell count-A novel method for routine mastitis screening in the frame of Dairy Herd Improvement testing programs. *J Dairy Sci.*, 100:4926-4940. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12409>

Foss Analytical A/S. 2013. User manual 6005 4828, Rev2.

Hagnestam, C., Emanuelson, U., and B. Berglund. 2007. Yield losses associated with clinical mastitis occurring in different weeks of lactation. *J. Dairy Sci.*, 90:2260-2270. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-583>

Kirkeby, C., Toft, N., Schwarts, D., Farre, M., Nielsen, S., Zervens, L., Hechinger, S. and T. Halasa. In Press. Differential somatic cell count as an additional indicator for intramammary infections in dairy cows. *J. Dairy Sci.* <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16523>

Koskinen, M T., Holopainen, J., Pyörälä, S., Bredbacka P., Pikälä, A., Barkema, W., Bexiga, R., Robertson, J., Solverod, L., Piccini, 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. *J. Dairy Sci.*, 92:952-959. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1549>

Nyman, A.-K., Emanuelsson, U., and K. Persson Waller. 2016. Diagnostic test performance of somatic cell count, lactate dehydrogenase, and N-acetyl- β -D-galactosaminidase for detecting dairy cows with intramammary infection. *J Dairy Sci.*, 99:1440-1448. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9808>

Sampimon, O., J. Sol, and P. Kock. 2005. Changes in bulk milk somatic cell count and distribution of mastitis pathogens over the past 50 years in the Netherlands. In: Proceedings of the 4th IDF international Mastitis Conference. Maastricht, The Netherlands. 963–968.

Schneider, M.P., Strandberg, E., Emanuelson, U., Grandinson, K., and A. Roth. 2007. The effect of veterinary-treated clinical mastitis and pregnancy status on culling in Swedish dairy cows. *Prev. Vet. Med.*, 80:179-192. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2007.02.006>

Schwarts, D., Lipkens, Z., Piepers, S., and S. De Vliegher. 2019. Investigation of differential somatic cell count as a potential new supplementary indicator to somatic cell count for identification of intramammary infection in dairy cows at the end of the lactation period. *Prev. Vet. Med.*, 172. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.104803>.

Växa Sverige. 2019. Redogörelse för husdjursorganisationens djurhälsovård. <https://www.vxa.se/globalassets/dokument/statistik/redogorelse-for-husdjursorganisationernas-djurhalsovard-2017-2018.pdf>

Del 3: Resultatförmedling

Ange resultatförmedling av projektet, inklusive titel, referens, datum, författare/talare, och länk till presentation eller publikation om tillämpligt. Planerade publiceringar (med preliminära titlar) ska ingå i tabellen. Ytterligare rader kan läggas till i tabellen.

Vetenskapliga publiceringar	Planerad – “Cow factors associated with DSCC”
	Planerad – “Comparison of the diagnostic properties of SCC and DSCC to correct identify cows with IMI”
	Planerad – “DSCC as a complementary tool to SCC to predict future udder health status and milk production”
Övriga publiceringar	Nyman A. och H. Landin. 2018. ”Nytt sätt att mäta celltal snart i kokontrollen?”. Husdjur, nr 6-7, s. 35.
	Planerad (om DSCC införs i kokontrollen) – ”Få en bättre koll på kornas juverhälsa med hjälp av det differentierade celltalet”
Muntlig kommunikation	Deltagande i möte i Köpenhamn, maj 2019, där företrädare för forskargrupper från Danmark, Tyskland och Kanada träffades för att diskutera respektives resultat och funderingar om DSCC
	Muntlig presentation på IDF Mastitis Conference, Köpenhamn, 14-16 maj 2019, med titeln ”Differential somatic cell count – a tool to improve diagnosis of cows with intramammary infections”
	Planerad (om DSCC införs i kokontrollen): Presentationer för veterinärer och rådgivare inom växa via Skype möten och fysiska träffar som sedan i sin tur kommer att informera mjölkproducenter om DSCC.
Studentarbete	
Övrigt	Presenterat projektet för veterinärer anslutna till HPM-nätverket (HPM=hälsopaket mjölk, en vidareutbildning för veterinärer).