



## Samlingsprov, PCR och tolkning av provsvar

# Bakteriologisk undersökning av mjölkprov vid mastit hos kor

Bakteriologisk undersökning av mjölkprov i samband med mastit är den vanligaste diagnostiska undersökningen hos mjölkkor. Att ta mjölkprov från enskilda juverdelar och odla dessa på blodagarplattor är sedan länge den rekommenderade metoden. Det kan dock ibland även vara aktuellt att ta samlingsprov från en ko, en grupp av kor eller tankmjölk. Numera är det också möjligt att undersöka mjölkprov med PCR-teknik. Denna artikel syftar i första hand till att sammanställa för- och nackdelar med samlingsprov och PCR jämfört med traditionella tekniker men berör även svårigheter vid tolkning av provsvar.

### INLEDNING

Mastit är fortfarande den sjukdom som är vanligast bland våra mjölkkor och också den sjukdom som är anledningen till de flesta antibiotikabehandlingarna av dessa djur. Eftersom någon typ av bakteriell juverinfektion är inblandad i de flesta mastitfall är bakteriologisk undersökning av mjölkprov en viktig del av undersökningen både vid individuella mastitfall och vid besättningsutredningar. Fördelningen av juverpatogener liksom andelen prov med blandflora eller ingen bakterieväxt skiljer mellan klinisk och subklinisk mastit enligt svenska nationella undersökningar (Tabell 1). *Staphylococcus aureus* är dock den vanligaste

juverpatogenen vid bägge mastittyperna. På grund av dess smittsamma förlopp är tillförlitlig diagnostik av *S aureus* mycket viktigt. En annan mycket smittsam juverpatogen är *Streptococcus agalactiae*. Denna patogen var ett ovanligt fynd i de nationella studierna men har under det senaste decenniet orsakat allvarliga juverhälsoproblem i ett antal besättningar.

Vid bakteriologisk undersökning i samband med mastit är provtagning av enskilda juverdelar och odling på blodagarplattor i dagsläget internationell guldstandard för identifiering av juverpatogener (3, 5, 8). I samband med besättningsutredningar på grund av *S agalactiae* tas dock ofta samlingsprov från alla fyra juverdelarna från en ko istället för juverdelprov. Samlingsprov anses i dessa fall vara tillräckligt tillförlitliga och mindre kostsamma (1). Nyligen har även PCR-teknik för identifiering av

juverpatogener introducerats. På grund av metodens höga känslighet har PCR-analys av samlingsprov från grupper av kor eller från tankmjölk börjat användas som en del i juverhälsoutredningar vid mastitproblem orsakade av *S agalactiae*. Användning av samlingsprov och PCR har dock både för- och nackdelar jämfört med juverdelprov respektive konventionell odlingsteknik. Detta är viktigt att känna till vid beslut om provtagnings- och analysmetod liksom vid tolkning av provsvar.

Bakteriologisk undersökning av mjölkprov ger vanligen ett av följande resultat: ingen växt, växt av en bakterieart i renkultur eller växt av flera bakteriearter/blandflora. Det är emellertid inte säkert att resultatet verkligen avspeglar provets och/eller juverdelens sanna infektionsstatus. Det är därför viktigt att resultatet tolkas med försiktighet. ➤

Tabell 1. FÖREKOMST (%) AV JUVERPATOGENER VID AKUT KLINISK MASTIT (2) OCH SUBKLINISK MASTIT (6).

Bakteriediagnos	Klinisk mastit (n=1 056)	Subklinisk mastit (n=590)
<i>Staphylococcus aureus</i>	21	19
Koagulasnegativa stafylokocker	6	16
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	16	9
<i>Streptococcus uberis</i>	11	8
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1	0,2
Övriga streptokocker	1	2
<i>Escherichia coli</i>	16	3
<i>Klebsiella</i> spp.	4	1
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	6	0,3
Övriga bakterier <sup>a</sup>	3	2
Blandflora	5	18
Ingen växt	11	22

<sup>a</sup> inkluderar enterokocker och övriga koliformer



FOTO: BENGT EKERG, SVA.

FIGUR 1. Provtagning av enskilda juverdelar ger det säkraste bakteriologiska resultatet.

som juverdelar med subklinisk mastit producerar mindre mängd mjölk än friska juverdelar är utspädningseffekten större än i ett manuellt taget samlingsprov.

### Samplingsprov på grupp- eller besättningsnivå

Samplingsprov kan tas från en grupp av kor genom att antingen poola samlingsprov från individuella kor eller genom att ta prov från tankmjölken efter att en grupp av kor mjölkats. Besättningsprov tas genom prov från tankmjölken efter avslutad mjölkning.

Vid poolning av manuellt tagna kosamlingsprov ökar risken för förorening och utspädning av bakteriekoncentrationen med antalet kor men bägge riskerna är lägre än då ett prov tas från tankmjölken. Ett tankmjölkprov är förorenat dels av bakterier från spen huden och dels av bakterier i mjölknings- och provtagningsutrustningen. Eftersom ett sådant samlingsprov är representativt för hela mjölmängden i gruppen/besättningen påverkas det också av skillnader i mjölmängd mellan kor. Kor med subklinisk mastit producerar mindre mängd mjölk än friska kor varför utspädningseffekten är större än vid poolning av manuellt tagna kosamlingsprov.

### FÖR- OCH NACKDELAR MED PCR

Som nämnts är konventionell odling den rekommenderade metoden vid bak-

### ► FÖR- OCH NACKDELAR MED SAMLINGSPROV

Det säkraste bakteriologiska resultatet fås alltid med enstaka juverfjärdedelsprov eftersom det är lättast att ta ett sådant prov sterilt (Figur 1). Vid vissa bakterieinfektioner, t ex *S aureus*, kan dock bakteriekoncentrationen i en infekterad juverdel variera från dag till dag. Om bakteriekoncentrationen i mjölkprovet är låg vid provtagningsstillfället finns risk att bakterierna inte detekteras. Risken för detta är lägre i juverfjärdedelsprov än i samlingsprov. Som nämnts kan det ibland vara aktuellt att ta samlingsprov från en ko, en grupp av kor eller en hel besättning. I dessa fall är det viktigt att känna till för- och nackdelar med sådan provtagning.

### Samplingsprov på konivå

Samplingsprov från en ko tas vanligen från alla lakterande juverdelar. Själva provtagningen görs antingen manuellt eller via provmjölkningsutrustning.

Vid manuell provtagning rekommenderas samma rutin för steril provtagning som när man tar prov från enskilda juverdelar (3, 5, 8). Risken att provet förorenas ökar dock jämfört med juverdelssprov eftersom provröret måste öppnas flera gånger. För bästa resultat bör man dessutom ta lika stor mängd mjölk från vardera juverdelen vilket ibland kan

vara svårt att göra rent praktiskt. I ett samlingsprov späds mjölken från en infekterad juverdel varför bakteriekoncentrationen minskar. Därmed kan det bli svårare att detektera bakterieförekomst i ett sådant prov.

Ett samlingsmjölkprov taget med provmjölkningsutrustning kan inte tas sterilt. Det förorenas dels av bakterier på spen huden och dels av bakterier i mjölknings- och provtagningsutrustningen. Ett sådant samlingsprov är också representativt för hela juvrets mjölmängd. Efter-



FOTO: BENGT EKERG, SVA.

FIGUR 2. Odling av mjölkprov på blodagar är fortfarande guldstandard.

teriologisk undersökning av mjölkprov (Figur 2). Numera är det också möjligt att undersöka mjölkprov med PCR (Figur 3). Det finns idag två kommersiella PCR-tester för undersökning av juverpatogener (Finnzymes Diagnostics, Espoo, Finland). Det ena testet (PathoProof™ Mastitis PCR Assay) detekterar elva vanliga juverpatogener/juverpatogenkomplex (*S aureus*, *Staphylococcus* spp (inkluderar både *S aureus* och koagulasnegativa stafylokocker (KNS)), *S agalactiae*, *S dysgalactiae*, *S uberis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp, *Klebsiella* spp, *Corynebacterium bovis*, *Serratia marcescens* och *Arcanobacterium pyogenes/Peptoniphilus indolicus*) samt genen för beta-laktamasproduktion, blaZ. Det andra PCR-testet (PathoProof™ Mastitis Major-3 Kit) detekterar *S aureus*, *S agalactiae* och *M bovis*.

PCR-testerna har både för- och nackdelar och lämpar sig mer eller mindre bra i olika sammanhang. Fördelar med PCR jämfört med odling är att analys-tiden är kortare (3–4 timmar), det är möjligt att detektera mindre mängd bakterier, det är möjligt att detektera avdödade bakterier samt bakterier med hämmad tillväxt och det är möjligt att detektera bakterier i bronopolkonserverad mjölk. Resultaten blir dessutom desamma oavsett vem som läser analysresultatet.

Nackdelar med PCR jämfört med odling är att den detekterar ett begränsat antal patogener, att den är dyrare per prov, att det inte går att spara isolat för genotypning med pulsfältgelelektrofores och att det inte går att undersöka andra typer av antibiotikaresistens än betalaktamasproduktion. Resultatet kan också vara svårtolkat, vilket har betydelse för val av behandling och åtgärder i fält. Exempel på faktorer som kan försvåra tolkningen av PCR-resultatet är kontamination med miljöbundna bakterier, samtidig förekomst av flera KNS-arter och detektion av DNA från avdödade bakterier när infektionen redan är avdödad. Det kan också vara svårt att tolka betalaktamasresultatet vid samtidig förekomst av både *S aureus* och KNS.

I publicerade studier som jämfört analys av mjölkprov med odling och PCR visar resultaten att PCR detekterar

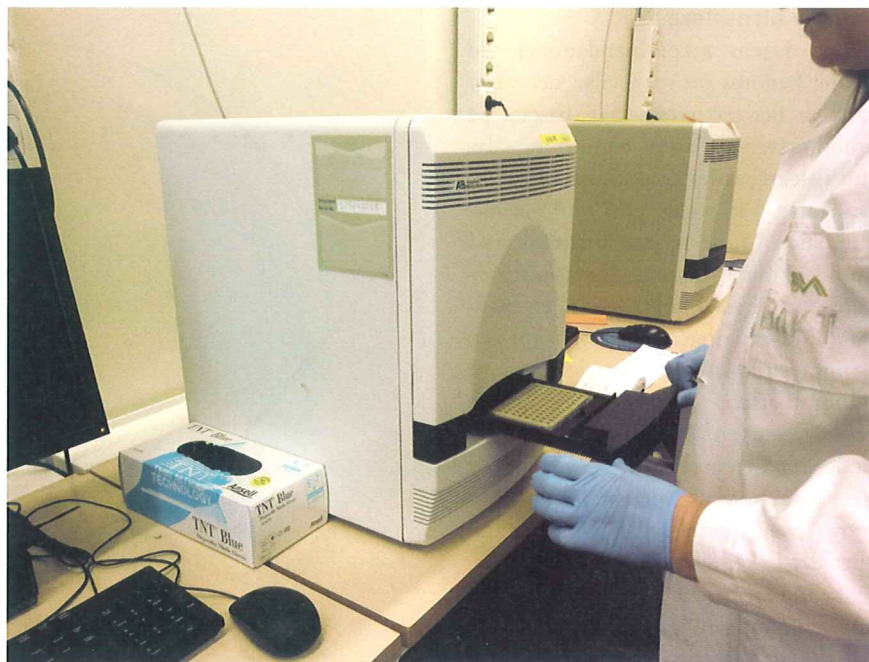


FOTO: KARIN PERSSON WALLER, SVA.

FIGUR 3. Mjölkprov kan numera också undersökas med PCR-teknik.

fler prov med bakterieväxt än odling (4, 9, 11). Enligt studierna behövs dock ytterligare undersökningar för att kunna bedöma den kliniska relevansen av ett positivt eller negativt PCR-resultat.

#### TOLKNING AV PROVSVAR

I svenska nationella studier gjorda under det senaste decenniet (2, 6) var andelen odlingsprov med växt av juverpatogen klart högre vid klinisk (84 %) jämfört med subklinisk (60 %) mastit (Tabell 1). Skillnaden förklaras av att både andelen prov med blandflora och andelen prov utan bakterieväxt är högre vid subklinisk mastit.

#### Växt av bakterier i renkultur

I de flesta av de mjölkprov där man hittar bakterieväxt i renkultur eller juverpatogen i blandflora är resultatet troligen sant positivt. Vid tolkningen av svaret är det dock viktigt att inse att det finns en risk att svaret är falskt positivt.

En möjlig orsak till ett falskt positivt resultat är om provet förorenats vid provtagningen eller inte förvarats och transporterats på ett optimalt sätt. I sådana fall är det möjligt att en bakterieart kan växa till mer än övriga och/eller att någon eller flera bakteriearter hämmas kraftigt i tillväxt eller avdödas.

Detta kan t ex hända om provet utsätts för hög eller låg (frysning) omgivningstemperatur. I en nyligen genomförd studie (10) sågs en betydligt större risk att provet felaktigt bedömdes som renkultur istället för blandflora om det inte kylades under simulerad transport oavsett omgivningstemperatur (ca -10°C, +8°C eller +22°C). Bakteriearter som framför allt kan dominera är snabbväxande arter som vissa koliformer och KNS. Till exempel kan KNS-arten *S xylosus* växa till kraftigt om provet inte transporteras tillräckligt kylt (7). Risken för felbedömning påverkas också av hur erfaren den person som bedömer provet är och av laboratoriets rutiner.

En annan orsak till ett falskt positivt resultat är att bakteriefyndet kan härröra från spenkanalskolonisation och inte från juverinfektion. Risken för detta är lägst om mjölkprovet tas direkt efter mjölkning.

Risken för falskt positivt resultat är högre vid subklinisk än vid klinisk mastit eftersom koncentrationen av juverpatogener vanligen är lägre vid subklinisk mastit. Mjölkprov från subklinisk mastit skickas dessutom oftare till laboratorium vilket innebär större risk för felaktig hantering och längre tid till odling. ➤

### ► Växt av blandflora

Enligt dagens rekommendationer vid odling bedöms prover i vilka det växer tre eller fler bakteriespecies (baserat på koloniutseende) som blandflora, dvs stor risk att provet kontaminerats (3, 5). Undantag från regeln görs om *S aureus* alternativt *S agalactiae* misstänks på grund av deras dignitet som smittspridare. Även i vissa andra fall då en misstänkt juverpatogen ansvarar för en dominerande del av bakterieväxten på odlingsplattan anges provsvaret som växt av patogen i blandflora. Vid PCR-undersökning är det inte ovanligt att flera bakteriespecies detekteras i samma prov. Även i dessa fall bör växt av tre eller fler bakteriespecies föranleda misstanke om att provet kontaminerats. Om kontaminering av provet misstänks finns det risk att varken odling eller PCR ger en rättvisande bild av bakterieförekomsten i provet. Därför rekommenderas i dessa fall alltid att ett nytt mjölkprov tas (Figur 4).

### Ingen bakterieväxt

Det finns ett antal orsaker till att ett mjölkprov är bakteriologiskt negativt och resultatet kan vara antingen sant eller falskt. Möjliga orsaker till att provet är sant negativt är att orsaken till mastiten är icke-infektiös, t ex trauma mot juvret, eller att patogenen redan avdödsats och eliminerats från juvret. Ett falskt negativt resultat kan orsakas av att juvret är infekterat av en bakterieart eller annan mikroorganism som inte växer på standardmedium eller som växer långsamt och kräver tillsats av tillväxtfaktorer (odling) eller som inte ingår i undersökningspanelen (PCR). Andra orsaker till ett falskt negativt resultat kan vara att bakteriekoncentrationen i mjölken är låg eller obefintlig på grund av intermittent bakterieutsöndring (odling/PCR), att kroppsegna bakteriehämmande substanser eller antibiotikarester från tidigare behandling i mjölken hämmat tillväxten (odling), att PCR-hämmande substanser finns i mjölken (PCR), att miljön under transport/lagring varit felaktig eller att desinfektionsmedel från spentvätt kontaminerat mjölkprovet (odling). Även när ett mjölkprov är bakteriologiskt negativt kan det därför vara

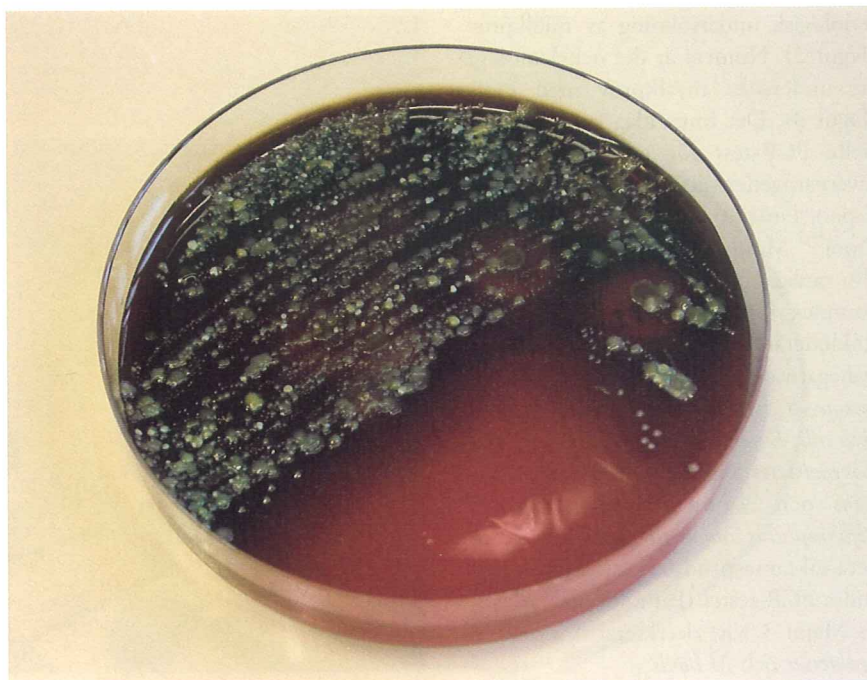


FOTO: KARIN PERSSON WALLER, SVA.

FIGUR 4. Vid växt av blandflora rekommenderas ofta omprov.

aktuellt att ta nytt prov för att säkerställa diagnosen.

### KONKLUSION

Samlingsprov innebär alltid en ökad risk för förorening av mikroorganismer från omgivningen och en ökad risk för utspädning av provet jämfört med juverdelssprov. Sådana prov rekommenderas därför främst då man letar efter en juverpatogen som inte är vanlig i normal hudflora eller omgivningsflora. Eftersom risken för utspädning är hög i grupsamlingsprov och tankmjölksprov rekommenderas PCR i dessa fall. Det är dock viktigt att komma ihåg att även ett prov som är negativt med PCR-undersökning kan vara falskt negativt. Baserat på dagens kunskap bör samlingsprov och PCR främst användas i samband med juverhälsoutredningar på grund av *S agalactiae*. Fler studier behövs dock för att undersöka hur känslig PCR är jämfört med odling för att detektera kor och besättningar infekterade med *S agalactiae*.

Oavsett bakteriologisk undersökningsmetod är det också viktigt att tolka provsvaret med försiktighet eftersom det alltid finns risk att svaret är falskt positivt eller falskt negativt. I dessa fall lik-

som vid blandflora eller förekomst av flera bakteriearter samtidigt rekommenderas därför omprov. Chansen för en korrekt bakteriologisk diagnos ökar betydligt om mjölkprovet tas sterilt och om mjölkprov tagna i rör förvaras och transporteras kyllda från provtagning till odling.

### Referenser

1. Dinsmore RP, English PB, Gonzalez RN, Sears PM & Schulte HF. Evaluation of methods for the diagnosis of *Streptococcus agalactiae* intramammary infections in dairy cattle. *J Dairy Sci*, 1991, 74, 1521–1526.
2. Ericsson Unnerstad H, Lindberg A, Persson Waller K, Ekman T, Artursson K, Nilsson-Öst M & Bengtsson B. Microbial aetiology of acute clinical mastitis and agent-specific risk factors. *Vet Microbiol*, 2009, 137, 90–97.
3. Hogan JS, González RN, Harmon RJ, Nickerson SC, Oliver SP, Pankey JW & Smith KL. Laboratory handbook on bovine mastitis. Madison, Wisconsin, USA, NMC, 1999.
4. Koskinen MT, Wellenberg GJ, Sampimon OC, Holopainen J, Rothkamp A, Salmikivi L, van Haeringen WA, Lam TJGM & Pyörälä S. Field comparison of real-time polymerase chain reaction and bacterial culture for identification of bovine mastitis bacteria. *J Dairy Sci*, 2010, 93, 5707–5715.

5. Oliver SP, González RN, Hogan JS, Jayarao BM & Owens WE. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality. Verona, Wisconsin, USA, NMC, 2004.
6. Persson Y, Nyman A-K & Grönlund Andersson U. Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden. Acta Vet Scand, 2011, in press.
7. Thorberg B-M, Danielsson-Tham M-L, Emanuelson U & Persson Waller K. Bovine subclinical mastitis caused by different types of coagulase-negative staphylococci. J Dairy Sci 2009, 92, 4962-4970.
8. Statens Veterinärmedicinska Anstalt, SVA. Mastitdiagnostik. www.sva.se, 2011-05-24.
9. Svensson A. För- och nackdelar med PCR vid bakteriologisk diagnostik av mastit hos mjölkkor. Examensarbete inom veterinärprogrammet 2009:48. Sveriges lantbruksuniversitet, Uppsala, 2009, 1-26.
10. Wallin K. Hantering och transport av mjölkprov från gård till laboratorium med tonvikt på förekomst av blandflora. Kandidatspeciale. Det Biovetenskapelige Fakultet, Köpenhamns Universitet, Köpenhamn, 2011, 1-61.
11. Wellenberg GJ, Sampimon OC, Rothkamp A, van Haeringen WA & Lam TJGM. Detection of mastitis pathogens by real-time PCR in clinical and subclinical mastitis samples. Proceedings of the 5th IDF Mastitis Conference, 21-24 March 2010. Christchurch, New Zealand, 2010, 539-544.

**\*KARIN PERSSON WALLER**, leg veterinär, docent, statsveterinär, Enhet för djurhälsa och antibiotikafrågor, SVA, 751 89 Uppsala samt adjungerad professor, Institutionen för kliniska vetenskaper, SLU, 750 07 Uppsala.



## Sveriges Veterinärförbund kungör lediga stipendier 2011

### Vivan Strandbergs minnesstiftelse

Totalt stipendiebelopp: 70 000 kronor

Stipendiet delas ut i form av ett eller flera resestipendier. Ändamålet med stiftelsen är "att främja utbildning av veterinär med svensk legitimation i ögonsjukdomar hos hund."

*Ansökan skall vara ställd till Nämnden för Vivan Strandbergs minnesstiftelse, Sveriges Veterinärmedicinska Sällskap, som verkställer prövning av inkomna ansökningar, (men skickas till Sveriges Veterinärförbund, adress se nedan).*

### Sveriges yngre veterinärers stipendium

Totalt stipendiebelopp: 50 000 kr

Stipendiet är avsett för studier av veterinärmedicinska problem inom Sverige eller utomlands. Företråde ges för projekt som gagnar veterinärkåren i allmänhet före personlig utveckling och utbildning. Företråde skall även ges åt yngre veterinär samt sökande som är sysselsatt

i praktiskt veterinärt arbete utan närmare anknytning till vetenskaplig institution. Stipendiet kan sökas av personer med rätt att utöva veterinäryrket i Sverige.

*Ansökan skall vara ställd till Sveriges yngre veterinärers stipendium (men skickas till Sveriges Veterinärförbund, adress se nedan). Ansökningshandlingar skall vara förbundskansliet tillhanda senast den 21 oktober 2011.*

### J. L. Tidholms donationsstiftelse

Totalt stipendiebelopp: 57 000 kronor

Stipendiet delas ut i form av ett eller flera resestipendier till "svensk legitimerad veterinär med goda betyg i veterinärexamen. Särskilt avseende skall fästas vid att sökande under något år, dock högst tio, utövat praktisk veterinärverksamhet och därvid visat framstående praktisk duglighet".

*Ansökan skickas till Sveriges Veterinärförbund, adress se nedan.*



Skriftlig ansökan avseende samtliga stiftelser, utom Sveriges yngre veterinärers stipendium (se ovan), skall ha inkommit senast fredagen den 30 september 2011 till Sveriges Veterinärförbund, Box 12 709, 112 94 Stockholm.

Till samtliga ansökningar skall bifogas meritförteckning samt en beskrivning av hur stipendiet avses användas med en specifikation av beräknade kostnader. Se i övrigt eventuella anvisningar vid varje stipendium. Den sökande är själv skyldig att förse sin ansökan med sådana uppgifter som behövs för bedömning av ansökan.

Ytterligare upplysningar kan lämnas av förbundskansliet, tel 08-545 558 20, e-post office@svf.se.

NYHET!

Smärtlindring för kort- och långtidsbehandling av hund

Förtroende



**Cimalgex**  
Cimicoxib 

**Vétoquinol**  
scandinavia  
 *a Sign of Passion*

Vetoquinol Scandinavia AB  
Box 9, 265 21 Åstorp  
Telefon 042-676 03  
[www.vetoquinol-scandinavia.com](http://www.vetoquinol-scandinavia.com)

Cimalgex (Cimicoxib) 8 mg, 30 mg, 80 mg smaksatt tuggtablett för hund, receptbelagt NSAID, ATCvet kod: QM01AH93.  
Indikationer: För behandling av smärta och inflammation i samband med osteoartrit, och behandling av perioperativ smärta på grund av ortopedisk eller mjukvävnadskirurgi hos hundar. Kontraindikationer: Skall inte användas på hundar yngre än 10 veckor. Skall inte användas till hundar som lider av gastrointestinala störningar eller blödningsrubbnings. Skall inte användas samtidigt med kortikosteroider eller andra icke-steroida antiinflammatoriska läkemedel (NSAID). Skall inte användas vid överkänslighet mot cimicoxib eller mot några hjälpämnen. Skall inte användas till betäckta, dräktiga eller digivande tikar. Biverkningar: Milda och övergående gastrointestinala besvär (kräkningar och/eller diarre) är mycket vanliga. I sällsynta fall har allvarliga gastrointestinala störningar, såsom blödning och sårbildning noterats. Andra biverkningar som anorexi eller letargi kan även förekomma vid sällsynta tillfällen. I mycket sällsynta fall har en ökning av biokemiska parametrar i njuren noterats.