

KARIN PERSSON WALLER, leg veterinär, VMD, docent, adj professor, statsveterinär,  
 SUSANNE ANDRÉ, BMA, sektionschef, KATARINA JÄRNEVI, BMA-student och  
 HELLE ERICSSON UNNERSTAD, leg veterinär, VMD, laboratorieveterinär\*

## Agglutinationstest för identifiering av *S aureus* vid mastit

Korrekt identifiering av *Staphylococcus aureus* är en viktig del av diagnostiken vid mastit hos mjölkkor. På laboratorium används vanligtvis hemolys på nötblodagar och/eller koagulastest som referensmetod. Den senare metoden lämpar sig dock inte för bruk på "fältlaboratoriet". Ibland används istället agglutinationstest, framtagna för humant bruk. Syftet med studien var att undersöka hur bra tre kommersiella agglutinationstest fungerar vid identifiering av svenska *S aureus*-stammar isolerade från bovin klinisk mastit.

### INLEDNING

*Staphylococcus aureus* är det vanligaste bakteriefyndet vid juverinflammation hos svenska mjölkkor (2). Bakterien är smittsam och kan orsaka stora problem i drabbade besättningar. För att hindra smittspridning inom och mellan besättningar är det viktigt att identifiera infekterade kor genom att ta mjölkprov för bakteriologisk undersökning.

På SVAs mastitlaboratorium identifieras *S aureus* i första hand genom att undersöka bakteriekoloniernas utseende och förekomst av hemolys runt kolonierna på nötblodagar (Figur 1). I typiska fall ses dubbla hemolyszoner (en inre klar zon (alfatoxinzon) och en yttre grumlig zon (betatoxinzon) men ibland ses enbart en klar hemolys eller ingen hemolys. I de senare fallen eller om hemolysen är svårbedömd görs koagulastest för

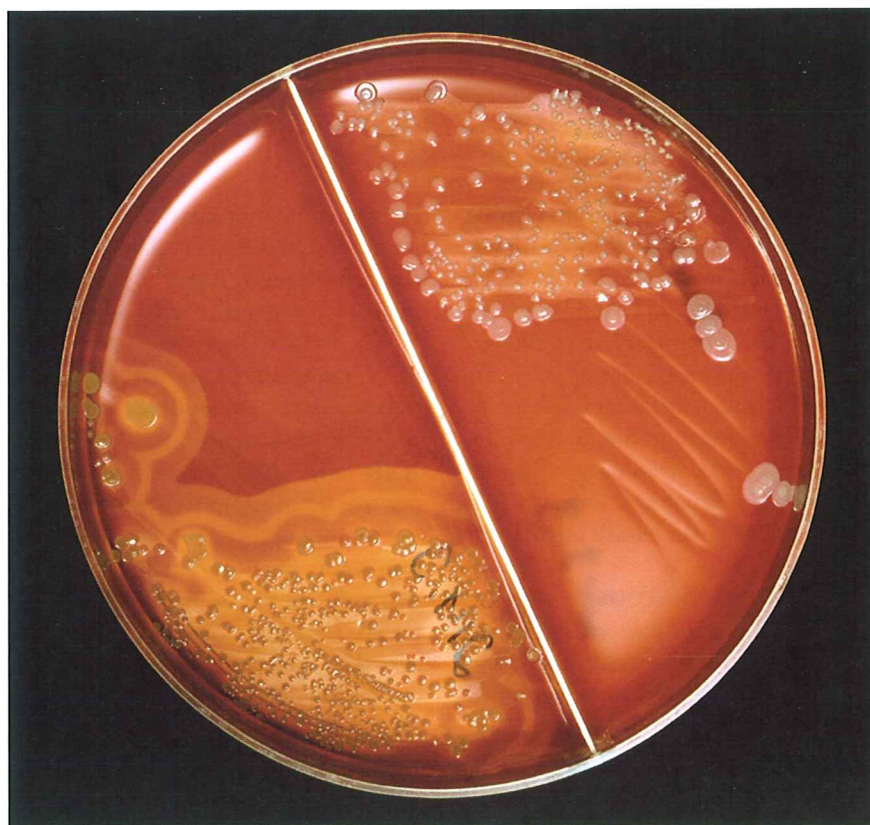


FOTO: BENGT EKBERG, SVA.

FIGUR 1. Växt av *Staphylococcus aureus* (till vänster) med typiska dubbla hemolyszoner samt växt av koagulasnegativ stafylokok (till höger) utan hemolys.

att undersöka om det rör sig om koagulaspositiva (*S aureus*) eller koagulasnegativa (KNS) stafylokocker (Figur 2). Ett sådant test tar 24 timmar att genomföra och lämpar sig inte för fältmässiga laboratorier som t ex på veterinärstationer.

På en del håll i landet används istället agglutinationstest för snabb (<1 minut) identifiering av *S aureus* i de fall kolonimorfologi och förekomst av hemolys inte ger tillräcklig information. Dessa

agglutinationstest innehåller färgade latexpartiklar täckta med antikroppar mot ytproteiner hos *S aureus*. När partiklarna kommer i kontakt med bakteriematerial sker en agglutination vilket leder till att latexpartiklarna bildar klumpar eller flockor som kan ses med blotta ögat. Dessa agglutinationstest är dock framtagna för undersökning av humana stafylokocker och har vid utländska undersökningar av isolat från ►



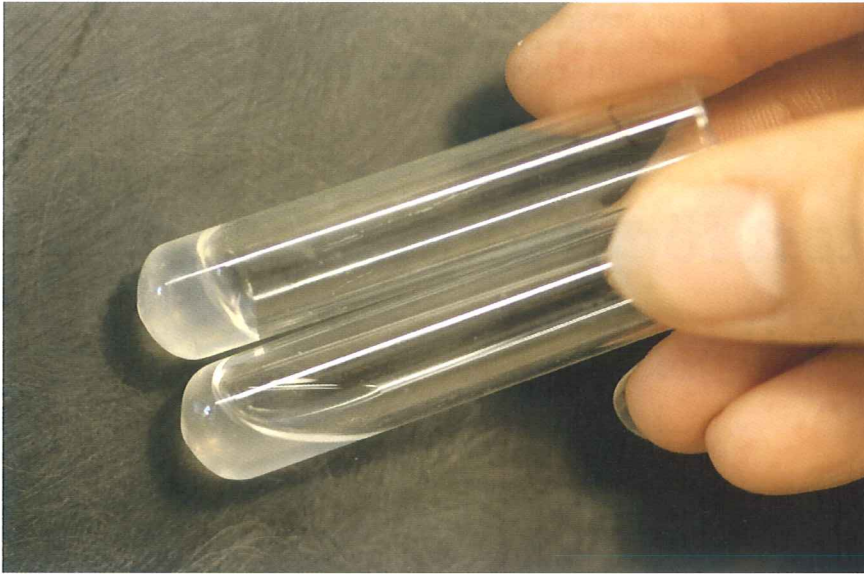


FOTO: ANDERS ALFJÖRDEN, SVA.

FIGUR 2. Positiv (övre röret) och negativ (nedre röret) koagulasreaktion.

► bovin mastit (1, 6) resulterat i sämre sensitivitet och specificitet än vid undersökning av humana isolat (3, 5) (Tabell 1). Motsvarande undersökningar av bovina isolat har inte gjorts i Sverige. Syftet med studien var därför att utvärdera tre i landet förekommande kommersiella agglutinationstest för identifiering av *S aureus*. Utvärderingen gjordes med stafylokockstammar isolerade från svenska fall av bovin klinisk mastit.

#### MATERIAL OCH METODER

Totalt ingick 248 bakterieisolat som karakteriserats som stafylokocker (189 *S aureus* och 59 KNS) i samband med en svensk nationell studie av mikrobiell

etiologi vid klinisk mastit hos mjölkkor utförd 2002/2003 (2). I det här presenterade materialet ingick maximalt ett isolat av *S aureus* eller KNS per gård.

Alla isolat odlades på nötblodagar (37°C under 16–24 timmar) och bakteriekolonierna undersöktes avseende hemolys och koagulasreaktion (rörtest). Isolat med dubbel hemolyszon eller positivt koagulastest bedömdes som *S aureus* medan övriga isolat bedömdes som KNS. Eftersom vissa *S aureus* kan vara negativa i koagulastestet undersöktes ett urval (n=128) av isolaten även avseende förekomst av koagulasgenen coa med en PCR-metod som är specifik för *S aureus* (4).

Alla isolat undersöktes också med tre agglutinationstest, Dryspot Staphylect Plus (Oxoid Ltd, Storbritannien), Slidex Staph Plus (bioMérieux, Frankrike) och Staphaurex Plus (Remel Europe Ltd, Storbritannien). Testerna användes enligt instruktion från tillverkarna.

Agglutinationstesterna jämfördes med resultaten från hemolys/koagulastest genom uträkning av testernas sensitivitet och specificitet. På samma sätt jämfördes resultaten från hemolys/koagulastest samt agglutinationstester med resultaten från undersökningen av coa-genen.

#### RESULTAT OCH DISKUSSION

Sensitivitet (dvs andelen av sant positiva prover som testet detekterar som positiva) och specificitet (dvs andelen av sant negativa prover som testet detekterar som negativa) för de tre agglutinationstesterna i jämförelse med referensmetoden när alla isolat inkluderades ges i Tabell 2. Resultaten visar att sensitiviteten var högst för Dryspot Staphylect Plus följt av Slidex Staph Plus och Staphaurex Plus, vilket innebär att andelen falskt negativa prov var lägst för Dryspot Staphylect Plus. Det motsatta var fallet då det gäller testernas specificitet dvs Dryspot Staphylect Plus hade en högre andel falskt positiva prov jämfört med de övriga.

Användning av agglutinationstest är dock främst aktuell i fall med endast klar hemolys eller ingen hemolys på blodagar. Totalt fanns 153 sådana isolat (94 *S aureus* och 59 KNS). Tabell 2 visar att agglutinationstesternas sensitivitet var högre och mer likartad mellan testerna för dessa isolat jämfört med när alla isolat inkluderades. Specificiteten var dock något sämre och återigen gav Dryspot Staphylect Plus högst andel falskt positiva prov.

Sensitiviteten och specificiteten för Dryspot Staphylect Plus och Slidex Staph Plus var högre respektive lägre än i tidigare studier av bovina isolat (1, 6, Tabell 1). Vi har inte kunnat hitta någon motsvarande studie för Staphaurex Plus. Vår studie visade på något lägre sensitivitet och klart lägre specificitet jämfört med undersökningar av humana isolat (3, 5, Tabell 1).

I denna studie användes förekomst av

Tabell 1. SENSITIVITET (Se, PROCENT) OCH SPECIFICITET (Sp, PROCENT) FÖR TRE AGGLUTINATIONSTEST FÖR IDENTIFIERING AV *S AUREUS* ENLIGT TIDIGARE STUDIER AV HUMANA OCH BOVINA STAFYLOKOCKISOLAT.

Referenser	Ursprung	Dryspot Staphylect Plus		Slidex Staph Plus		Staphaurex Plus	
		Se %	Sp %	Se %	Sp %	Se %	Sp %
van Griethuysen och medarbetare (3)	Humana	-	-	98,2	98,9	98,2	96,2
Weist och medarbetare (5)	Humana	100	91,3	95,6	99,1	95,6	98,0
Boerlin och medarbetare (1)	Bovin mastit	-	-	62,7	97,6	-	-
Zschöck och medarbetare (6)	Bovin mastit	75,6	83,0	77,8	84,4	-	-



dubbelhemolys eller positivt koagulas-test som referensmetod för identifiering av *S aureus*, vilket är i linje med gängse rekommendation. Alla stammar av *S aureus* bär på en koagulasgen, *coa*, men hos ca en till två procent av stammarna uttrycks inte genen vilket innebär en risk att dessa stammar felaktigt bedöms som KNS. När hemolys/koagulastest och agglutinationstester jämfördes mot resultatet för PCR-analys av *coa*-genen hade hemolys/koagulastestet högst sensitivitet och specificitet när alla isolat inkluderades (Tabell 3). Koagulastestet hade även det totalt bästa resultatet när enbart isolat med klar hemolys eller ingen hemolys ingick (Tabell 3).

### Sensitivitet och specificitet

Ju lägre sensitiviteten är för ett test desto fler prov bedöms som falskt negativa. I detta fall innebär det att kor infekterade med *S aureus* inte upptäcks, vilket ökar risken att *S aureus* sprids i besättningen. Enligt Zschöck och medarbetare (6) förklaras den lägre sensitiviteten för bovina jämfört med humana isolat av att agglu-

inationstesterna inte detekterar atypiska *S aureus*-stammar som är defekta avseende clumping factor, protein A eller vissa kapseltyper. Sådana stammar är inte ovanliga vid bovin mastit.

En låg specificitet innebär att fler prov bedöms som falskt positiva (Figur 3). Ett sådant resultat kan leda till att kor slås ut i onödan vilket innebär en extra kostnad för djurägaren utan att resultera i avsedd effekt. Enligt tillverkarna kan vissa KNS-species, t ex *S haemolyticus*, *S hyicus*, *S saprophyticus* och *S xylosus*, som alla har identifierats i Sverige, orsaka falskt positiv reaktion i agglutinationstest. I vårt material återfanns bland annat *S chromogenes*, *S haemolyticus*, *S hyicus*, *S lentus* och *S simulans* bland isolat som gav falskt positiva resultat. Även andra species än stafylokocker, t ex enterokocker och *Escherichia coli*, kan ge positiv reaktion men detta gäller framför allt om man agglutinerar längre än rekommenderad tid. Vid mastitlaboratoriet undersöktes 36 kontrollstammar från tolv andra species med Dryspot Staphytest Plus och alla var negativa om avläsningen

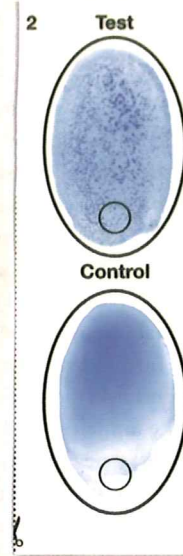


FOTO: ANDERS ALFJÖRDEN, SVA.

FIGUR 3. Positiv (övre ringen) och negativ (nedre ringen) agglutinationsreaktion. En låg specificitet innebär att fler prov bedöms som falskt positiva.

gjordes inom 20 sekunder enligt anvisning (opublicerade data). Bakteriekolonier som växt på salt-mannitolagar kan också leda till ospecifik agglutination. Även användning av gamla kolonier (>36 timmar) ökar risken för ospecifik agglutination.

### Undvik felaktiga resultat

För att undvika felaktigt resultat är det viktigt att endast bakteriekolonier med stafylokokmorfologi testas med agglutination. Ett observandum är att även enterokocker kan ge gult omslag på salt-mannitolagar. För att vara säker på att endast stafylokocker undersöks rekommenderas gramfärgning och katalastest innan eventuell agglutinationstest görs. Det är också viktigt att det finns tillräcklig mängd material i renkultur och att provet inte blir kontaminerat.

Som redan nämnts är agglutinationstesterna relativt lätta och snabba att genomföra men de skiljer sig något avseende hur lätta de är att bedöma. Enligt vår uppfattning är Dryspot Staphytest Plus lättast att avläsa på grund av att den blå färgen på partiklarna gör reaktionen tydligare. Zschöck och medarbetare (6) fann att Slidex Staph Plus var svårare att avläsa än Dryspot Staphytest Plus på grund av att den ofta gav svaga reaktioner. ▶

Tabell 2. SENSITIVITET (SE, PROCENT) OCH SPECIFICITET (SP, PROCENT) FÖR TRE AGGLUTINATIONSTEST FÖR IDENTIFIERING AV *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* VID UNDERSÖKNING AV STAFYLOKOCKISOLAT OAVSETT HEMOLYS (ALLA) ELLER STAFYLOKOCKISOLAT MED KLAR HEMOLYS ELLER INGEN HEMOLYS (KLAR/INGEN HEMOLYS) ISOLERADE I SAMBAND MED BOVIN KLINISK MASTIT. REFERENSMETOD = BEDÖMNING AV HEMOLYS OCH KOAGULAS.

Testmetod	Alla (n=248)		Klar/Ingen hemolys (n=153)	
	Se %	Sp %	Se %	Sp %
Dryspot Staphytest Plus	96,8	76,3	98,9	76,3
Slidex Staph Plus	94,7	86,4	98,9	86,4
Staphaurex Plus	91,5	89,8	96,8	89,8

Tabell 3. SENSITIVITET (SE, PROCENT) OCH SPECIFICITET (SP, PROCENT) FÖR HEMOLYS/KOAGULAS SAMT TRE AGGLUTINATIONSTEST FÖR IDENTIFIERING AV *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* VID UNDERSÖKNING AV STAFYLOKOCKISOLAT OAVSETT HEMOLYS (ALLA) ELLER STAFYLOKOCKISOLAT MED KLAR HEMOLYS ELLER INGEN HEMOLYS (KLAR/INGEN HEMOLYS) ISOLERADE I SAMBAND MED BOVIN KLINISK MASTIT. REFERENSMETOD = FÖREKOMST AV *COA*-GENEN.

Testmetod	Alla (n=129)		Klar/Ingen hemolys (n=81)	
	Se %	Sp %	Se %	Sp %
Hemolys/koagulas	98,6	98,2	96,1	100
Dryspot Staphytest Plus	97,3	80,3	100	80,0
Slidex Staph Plus	93,1	89,3	100	89,1
Staphaurex Plus	84,9	92,8	88,5	92,7



## ► KONKLUSION

Resultaten tyder på att de tre undersökta agglutinationstesterna ger en korrekt identifiering av *S aureus* isolerade från bovin mastit i de flesta fallen. Ingen av testerna var dock optimal på grund av en högre andel falskt negativa (3,2–8,5%) och falskt positiva (10,2–23,7%) resultat jämfört med referensmetoden hemolys/koagulas. Andelen falskt negativa prov var lägre (1,1–3,2%) om endast isolat med klar hemolys eller ingen hemolys på nötblodagar undersöktes medan andelen falskt positiva prov inte ändrades. Både andelen falskt positiva och andelen falskt negativa resultat bör vara så låg som möjligt för att undvika att kor slås ut i onödan respektive att kor infekterade med *S aureus* inte upptäcks. När de tre agglutinationstesterna jämfördes med varandra varierade resultaten. Dryspot Staphylect Plus gav fler falskt positiva resultat än Slidex Staph Plus som i sin tur gav något fler än Staphau-

rex Plus medan motsatsen var fallet då det gällde andelen falskt negativa prov.

## Referenser

1. Boerlin P, Kuhnert P, Hüssi D & Schaefflibaum M. Methods for identification of *Staphylococcus aureus* isolates in cases of bovine mastitis. J Clin Microbiol, 2003, 41, 767–771.
2. Ericsson Unnerstad H, Lindberg A, Persson Waller K, Ekman T, Artursson A, Nilsson-Öst M & Bengtsson B. Microbial aetiology of acute clinical mastitis and agent-specific risk factors. Vet Microbiol, 2009, 137, 90–97.
3. van Griethuysen A, Bes M, Etienne J, Zbinden R & Kluytmans J. International multicenter evaluation of latex agglutination tests for identification of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol, 2001, 39, 86–89.
4. Järnevi K. Use of agglutination kits for human strains for identification of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. Examensarbete, Institutionen för medicinsk biokemi och mikrobiologi, Uppsala Universitet, 2009.
5. Weist K, Cimal A-K, Lecke C, Kampf G,

Rüden H & Vonberg RP. Evaluation of six agglutination tests for *Staphylococcus aureus* identification depending upon local prevalence of methicillin-resistant *S aureus* (MRSA). J Med Microbiol, 2006, 55, 283–290.

6. Zschöck M, Nessler A & Sudarwanto I. Evaluation of six commercial identification kits for the identification of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. J Appl Microbiol, 2005, 98, 450–455.

\***KARIN PERSSON WALLER**, leg veterinär, VMD, docent, adj professor, statsveterinär, Enhet för djurhälsa och antibiotikafrågor, Statens Veterinärmedicinska Anstalt, 751 89 Uppsala.

**SUSANNE ANDRÉ**, BMA, sektionschef, Enhet för bakteriologi, Statens Veterinärmedicinska Anstalt, 751 89 Uppsala.

**KATARINA JÄRNEVI**, BMA-student, Enhet för bakteriologi, Statens Veterinärmedicinska Anstalt, 751 89 Uppsala.

**HELLE ERICSSON UNNERSTAD**, leg veterinär, VMD, laboratorieveterinär, Enhet för djurhälsa och antibiotikafrågor, Statens Veterinärmedicinska Anstalt, 751 89 Uppsala.

# STARTVAC<sup>®</sup>

## Nytt mastit-vaccin mot *Staphylococcus aureus*, koagulas negativa stafylokokker (KNS) och koliforma bakterier.



### STARTVAC<sup>®</sup> vaccinationsprogram

*I besättningen ger Startvac den bästa effekten, när varje enskild ko vaccineras på rätt tidspunkt i förhållande till kalvningsdatum. Startvac introduceras därför i besättningen över en period, och den totala effekten ses först, när alla kor har börjat en ny laktation.*



ATC VETKOD Q102AB.  
RECEPTBELAGT. GODKÄND SPC 11/02/09.



Tillverkare: LABORATORIOS HIPRA, S.A. Avda. La Selva, 135 - 17170 Amer (Girona) Spain. E-mail: hipra@hipra.com - www.hipra.com

NORDVACC AB.  
Box 112, 129 22 Hägersten.  
Tel: 08-449 46 50 Fax:  
08-449 46 56  
vet@nordvacc.se  
www.nordvacc.se

