



Kandidatspeciale

Karin Maria Elisabeth Wallin

Hantering och transport av mjölkprov från gård till laboratorium med tonvikt på förekomst av blandflora



Vejledere: John Elmerdahl Olsen, Københavns Universitet

Karin Persson Waller, Statens Veterinärmedicinska Anstalt, SVA

samt Sveriges Lantbruksuniversitet, SLU

Afleveret den: 27/04/11

Hantering och transport av mjölkprov från gård till laboratorium med tonvikt på förekomst av blandflora

**Handling and transportation of milk samples from the farm to the laboratory
with emphasis on presence of contamination**

Karin Maria Elisabeth Wallin

VMK08001

Examensarbete/Specialopgave 30 ECTS

Inlämnat den 27/04/11

Köpenhamn 2011

Handledare: John Elmerdahl Olsen, Institut for Veterinær Sygdomsbiologi/Mikrobiologi,
LIFE, Københavns Universitet

&

Karin Persson Waller, Enheten för djurhälsa och antibiotikafrågor,
Statens Veterinärmedicinska Anstalt, SVA, samt Institutionen för kliniska vetenskaper,
Sveriges Lantbruksuniversitet, SLU, Uppsala, Sverige

Examensarbete vid Institut for Veterinær Sygdomsbiologi/Mikrobiologi

Det Biovidenskabelige Fakultet

For Fødevarer, Veterinærmedicin og Naturressourcer.

Københavns Universitet

Utført på

Statens Veterinärmedicinska Anstalt, Uppsala, Sverige 2010/2011

Nyckelord: mastit, juverinflammation, mastitbakterier, bakteriologisk odling, mjölkprov, kyltransport,
blandflora, mjölkkor, kor

Abstract

Mastitis is generally regarded as the most common and costly disease in dairy cattle and the cause is usually of bacterial origin. The infection status of the mammary gland is therefore determined by microbiological culture, and proper diagnosis is essential to prevent the spreading of organisms in the herd. Factors that can affect the diagnostic outcome include sampling technique and handling of milk samples. Despite practice of aseptic sampling techniques, milk samples may be contaminated and improper handling may lead to further overgrowth of contaminants and/or killing of the infectious bacteria, leading to false results. Samples should therefore be kept cold from the sample collection until the laboratory. Today few milk samples are cooled when transported to the laboratory at the National Veterinary Institute in Sweden.

The main aim of the study was therefore to optimize recommendations in handling and transporting milk samples taken in tubes, in order to improve the possibility to get an accurate bacteriologic diagnosis. This study examined how well recommendations regarding cooled handling of milk samples are being applied and what practical restrictions there are in the field, by telephone interviews. Moreover the seasonal effect on the occurrence of contaminated samples was investigated by studying laboratory records from 2007 to 2009. Finally a study was performed in the laboratory to assess the impact that different parameters have on the growth of contaminants during cooling, such as ambient temperature, number of tubes and way of tube storage. Results revealed that most of the interviewees were well aware of the importance of aseptic sampling techniques, and that transportation time to the laboratory should be kept short in order to obtain highly reliable results. However, almost none had procedures for cooling their samples mainly because of practical issues and that it was considered less important. Results from the study revealed significantly less growth of contaminants when samples were transported cooled which support current recommendations. In addition the study showed that the proportion of contaminated samples seems to vary over the year and that the ambient temperature does not affect the growth of contaminants. Recommendations regarding cooling of samples should therefore be clarified on the importance of proper handling regardless of season to reduce the risk of incorrect diagnosis, for example by doing an informative campaign. Also suggestions for practical cooling systems should be developed which enables samplers to use mailbox to facilitate that the recommendations are being followed.

Sammanfattning

Mastit hos mjölkkor orsakar stora djurhälsomässiga problem och därmed betydliga ekonomiska förluster. Eftersom bakteriell juverinfektion är en viktig orsak till mastit är en korrekt bakteriologisk diagnos en förutsättning för att begränsa smittspridning på både individ- och besättningsnivå. Nuvarande bakteriologisk diagnostik sker ofta genom konventionell odling av mjölkprov tagna i rör där faktorer som provtagningsteknik, hantering och transport av proverna kan påverka utfallet. Även om aseptisk provtagningsteknik används finns dock risk för kontaminering av mjölkprov med bakterier som inte kommer från juvret vilket kan leda till växt av blandflora vilket gör att provsvaret blir svårbedömt. Olämplig provhantering kan leda till ytterligare växt av föroreningsbakterier och/eller avdödning av juverpatogener varför kyltransport av mjölkprov rekommenderas från fält till laboratorium. Få mjölkprov skickas dock kylda till Mastitlaboratoriet, SVA, idag.

Det övergripande syftet med studien var att optimera råden rörande hantering och transport av mjölkprov tagna i rör från fältet till laboratoriet för att förbättra möjligheterna till en korrekt bakteriologisk diagnos. I den första delstudien undersöktes hur mjölkprov hanteras och transporteras idag samt praktiska begränsningar för kylsystem i fält genom telefonintervjuer av provtagare. Vidare undersöktes årstidens effekt på förekomst av blandflora i mjölkprov genom att studera laborariejournaler från 2007-2009. Slutligen utfördes en laborarieundersökning där effekten av kyltransport av mjölkprover på tillväxt av blandflora undersöktes under olika simulerade transportbetingelser. Parametrar som utvärderades var omgivningstemperatur, antal och förvaringssätt av provrör i förpackningen. Resultaten visade att majoriteten av de intervjuade var väl medvetna om att aseptisk provtagningsteknik och snabb transport av mjölkprov till laboratoriet är av stor betydelse för möjlighet till korrekt bakteriologisk diagnos. Få personer hade dock rutiner för kylhantering av mjölkprov från fält till laboratorium eftersom det ansågs mindre viktigt och/eller på grund av praktiska skäl. Laboriestudien stödjer emellertid nuvarande råd då bakterieantalet var signifikant lägre vid kyltransport. Resultaten visade även att andelen prov med blandflora varierar över året och att växt av blandflora inte påverkades av ändringar i omgivningstemperatur. Det är därför viktigt att råden rörande kyltransport av mjölkprov förtydligas och att provtagare görs uppmärksamma på att kylning av proverna är befogat oavsett årstid för att minska risken för felaktig bakteriologisk diagnos till exempel genom en informationskampanj. Likaså bör

förslag på praktiskt användbara kylsystem som möjliggör postning i postlåda tas fram för att underlätta att råden följs.

Förord

Det här examensarbetet har genomförts i samarbete mellan institutionen för Veterinær Sygdomsbiologi/Mikrobiologi på Det Biovidenskablige Fakultet For Fødevarer, Veterinærmedicin og Naturressourcer, Københavns Universitet, Danmark och Enheten för djurhälsa och antibiotikafrågor på Statens Veterinärmedicinska Anstalt, SVA, Uppsala, Sverige.

Jag vill rikta ett stort tack till min handledare på SVA/SLU, Karin Persson Waller som inspirerat och engagerat sig fantastiskt mycket under arbetets gång samt till Susanne André som har samordnat och stöttat det praktiska arbetet på Mastitlaboratoriet, SVA. Jag vill även tacka min handledare på Københavns Universitet, John Elmerdahl Olsen som lagt ned mycket tid och givit konstruktiv kritik under projektets gång. Slutligen vill jag tacka alla husdjurstekniker och veterinärer som har ställt upp på intervjuerna och personalen på Mastitlaboratoriet, SVA, för all hjälp under det praktiska arbetet.

Karin Wallin, Köpenhamn, den 27 april 2011

Innehållsförteckning

Introduktion	6
Bakgrund	7
Allmänt om mastit.....	7
Bakteriologisk undersökning och diagnostik av mjölkprov på laboratorium	9
Bedömning av provsvar – möjliga felkällor.....	11
Syfte	17
Material och metoder	17
Del I Intervjuer rörande hantering och transport av mjölkprover	17
Del II Undersökning av förekomst av blandflora i mjölkprov.....	18
Del III Laboratorieundersökning av effekt av kylning under transport på växt av blandflora i mjölkprov	18
Resultat	23
Del I Intervjuer rörande hantering och transport av mjölkprover	23
Del II Undersökning av förekomst av blandflora i mjölkprov.....	34
Del III Laboratorieundersökning av effekt av kylning under transport på växt av blandflora i mjölkprov	38
Diskussion	41
Konkluderande råd rörande transport av mjölkprov	46
Referenslista	48
Bilaga 1	i
Bilaga 2	I

Introduktion

Mastit (juverinflammation) är idag den vanligaste sjukdomen hos mjölkkor och orsakar stora kostnader för mjölkproducenterna framförallt i form av nedsatt mjölkproduktion och för tidig utslagning av kor (Kossaibati & Esslemont, 1997).

De flesta mastiter orsakas av bakterieinfektion via spenkanalen. Ett stort antal olika bakteriearter kan leda till mastit men majoriteten av fallen orsakas av stafylokokker, streptokocker eller koliformer. Vid mastit är bakteriologisk undersökning av mjölkprov därför en viktig åtgärd. Bakteriologisk diagnostik görs idag vanligen med konventionell odling som inkluderar biokemiska och enzymatiska tester vid behov.

Rutiner för provtagning, hantering och transport av mjölkprov tagna i rör kan påverka resultatet av den bakteriologiska undersökningen. God aseptik vid provtagning såväl som omedelbar nedkylning av mjölkprovet efter provtagning och därefter kyltransport till laboratoriet rekommenderas för ett optimalt resultat. Problem som kan uppstå i samband med felaktiga rutiner är kontaminering av mjölkprovet och/eller överväxt eller avdödning av bakteriearter. Detta kan leda till växt av blandflora, som kan vara svårtolkat, eller falskt positiva eller falskt negativa resultat. Korrekt diagnostik är centralt för att minimera kostnader och risken för smittspridning av juverpatogener inom och mellan besättningar.

Mastitlaboratoriet vid Statens Veterinärmedicinska Anstalt (SVA) mottar årligen ett stort antal mjölkprov tagna i rör för bakteriologisk undersökning. Majoriteten av dessa prov har dock inte skickats med någon form av kylsystem trots att råd om detta finns. Orsaken till varför detta inte görs liksom hur hanteringen av mjölkprov från provtagning till postning faktiskt går till i fält är dåligt känt. Att risken för blandflora i mjölkprov påverkas av omgivningstemperaturen och att denna risk är högre under sommarmånaderna är en allmän uppfattning. Inga undersökningar har dock gjorts under svenska förhållanden för att undersöka om sådan säsongsvariation finns eller för att undersöka hur kylning av mjölkprov under transport till laboratoriet under olika betingelser påverkar möjligheten att ställa en korrekt bakteriologisk diagnos.

I detta arbete har en utvärdering gjorts av hur mjölkprover tagna i rör hanteras och transporteras idag baserat på intervjuer av vana provtagare. Dessutom har årstidens effekt på

förekomst av blandflora i mjölkprov utvärderats med hjälp av Mastitlaboratoriets journaler för 2007-2009. Slutligen har effekten av kyltransport på tillväxt av blandflora studerats i en laboratorieundersökning där olika transportbetingelser avseende yttertemperatur, förpackning av provrör och antal provrör per förpackning simulerats. Avsikten var att resultaten ska leda till förbättrade råd avseende transport av mjölkprov tagna i rör och därmed förbättra möjligheterna till korrekt bakteriologisk diagnos vid juverhälsoutredningar i svenska mjölkbesättningar.

Bakgrund

Allmänt om mastit

Mastit betyder juverinflammation och inflammation definieras som kroppens respons på ett främmande agens eller en vävnadsskada. Etiologin kan med andra ord vara infektiös eller inte infektiös. Den vanligaste orsaken är dock bakterier som invaderar juvret via spenkanalen och ger upphov till inflammation. Sjukdomen är dock multifaktoriell och därmed svår att kontrollera, faktorer som påverkar risken för mastit är bland annat kons ålder, ras, juverform och immunförsvar samt gårdens skötselrutiner till exempel avseende hygien och mjölkning (Sandholm *et al.* 1995; Radostits *et al.* 2007).

Sjukdomen kan yttra sig som klinisk eller subklinisk mastit. Vid klinisk mastit ses ofta tecken på ett eller flera av de fem kardinalsymptomen för inflammation (rodnad, svullnad, värme, smärta och förlorad funktion). Dessutom ses förändringar i utseendet av mjölken, nedsatt mjölkproduktion, höga celltal och ibland även påverkat allmäntillstånd. Vid subklinisk mastit ses däremot inga kliniska symptom utan enbart höga celltal i mjölken (Sandholm *et al.* 1995; Bradley, 2002; Radostits *et al.* 2007).

Mastit är den vanligaste sjukdomen bland mjölkkor och orsakar de största kostnaderna utav alla produktionssjukdomar (Kossabati & Esslemont, 1997; Radostits *et al.* 2007). Enligt Djurhälsovårdsdata från Svensk Mjolk för kontrollåret 2009/2010 ligger behandlingsincidensen för mastit i Sverige strax under 15 %. Detta värde har visat en sjunkande trend de senaste åren. Dock skall hänsyn tas till att endast veterinärbehandlade och rapporterade sjukdomsfall ingår i dessa siffror. Undersökningar visar att endast cirka 71-75 % av alla sjukdomsfall registreras i djursjukdata samtidigt som alla mastit-tillfällen inte veterinärbehandlas (Svensk Mjolk, Djurhälsovård 2009/2010). Internationellt sett är en

behandlingsincidens på 15 % låg. I England presenterade Bradley *et al.* (2007) att incidensen för klinisk mastit i 84 besättningar under 12 månader var 39 %. I Norden var incidensrisken för journalförda mastitbehandlingar under 305 dagars laktation under året 1997 i Danmark, Finland, Norge och Sverige 18 %, 14 %, 22 % respektive 13 % hos första kalvare och något högre, 23 %, 22 %, 36 % respektive 20 % för tredje kalvare och äldre kor (Valde *et al.* 2004). Enligt Redogörelsen för djurhälsovård kontrollåret 2009/2010 från Svensk Mjolk har dock medelvärdet för beräknat tankcelltal och tankcelltalet för mejerilevererad mjölk i Sverige ökat något de senaste åren vilket tyder på en långsam försämring av juverhälsan i landet. Studier har påvisat skillnader i beräknat tankcelltal mellan olika besättningstyper. Fler kor per besättning, gårdar med automatiskt mjölkningssystem (AMS) och gårdar med kor av rasen Holstein är faktorer som har ett statistiskt samband med högt beräknat tankcelltal (Jansson-Mörk & Hallén-Sandgren, 2010). Eftersom trenden går mot fler kor per besättning, högre andel kor av rasen Holstein och fler AMS-gårdar i Sverige bör profylaktiska åtgärder vidtas för att inte juverhälsan ska försämrats ytterligare (Svensk Mjolk, Djurhälsovård 2009/2010).

Vilka bakterier orsakar mastit?

Generellt orsakas mastit av ett relativt smalt spektrum av bakterier bestående av stafylokocker, streptokocker och koliformer. Varje land har sitt eget panorama av juverpatogener vilket kan bero på skillnader i skötsel- och behandlingsrutiner (Ericsson Unnerstad *et al.* 2009). Under det senaste decenniet har 2 nationella undersökningar gjorts rörande infektionsagens vid akut klinisk (Ericsson Unnerstad *et al.* 2009) och subklinisk (Persson *et al.* 2011) mastit och resultaten presenteras i Tabell 1. Vid klinisk mastit var *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Escheria coli* (*E. coli*), *Streptococcus* (*Str.*) *dysgalactiae* och *Str. uberis* de dominerande bakteriearterna medan de vanligaste bakteriefynd vid subklinisk mastit var *S. aureus* följt av koagulasnegativa stafylokocker (KNS), *Str. dysgalactiae* och *Str. uberis*.

Tabell 1. Förekomst (%) av juverpatogener vid klinisk mastit (Ericsson Unnerstad et al. 2009) och subklinisk mastit (Persson et al. 2011)

Patogener	Klinisk mastit (n=1056)	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 ^a	3	2
Kontaminerade	5	18
Ingen växt	11	22

^a inkluderar enterokocker och övriga koliformer

Juverpatogenerna delas ofta in i kobundna och miljöbundna patogener baserat på deras epidemiologi och patofysiologi. Reservoar för kobundna bakteriearter är primärt kons juver. Smitta från juver till juver sker typiskt under mjölkning via exempelvis kontaminerade juverdukar, mjölkningsutrustning och/eller händer. De juverbundna bakterierna är bättre anpassade att överleva i juvret och ger oftare upphov till subkliniska mastiter jämfört med miljöbundna bakterier. De vanligaste kobundna bakteriearterna är *S. aureus* och *Str. agalactiae*. Åtgärder för att minska smittspridning mellan kor kan bland annat bestå av korrekt mjölkningsordning, god hygien under mjölkning, användning av spendesinfektion efter mjölkning, sintidsbehandling och utslagning av kroniskt infekterade kor. De miljöbundna juverpatogenerna är opportunister som finns i miljön och som när tillfälle ges kan infektera juvret och kontrolleras bäst genom att hålla god hygien i kons närmiljö. De vanligaste miljöbundna juverpatogenerna är *E. coli*, *Klebsiella* spp. och *Str. uberis* (Bradley, 2002; Radostits et al. 2007).

Bakteriologisk undersökning och diagnostik av mjölkprov på laboratorium

Konventionell bakteriologisk odling av mjölkprov från enskilda juverdelar är den vanligaste och rekommenderade metoden för att isolera mastitpatogener (Hicks et al. 1994; Godden et al. 2002). Standardmetoden för bakteriologisk undersökning av mjölkprov (Hogan et al. 1999; Oliver et al. 2004) innebär att 10 µl mjölk stryks ut på en nötblodagarpatta med esculin. Plattan inkuberas sedan vid 37°C i totalt 48 timmar. Avläsning sker första gången efter

cirka 18-24 timmar och en andra gång 24 timmar senare. Specialförhållanden under inkubering, såsom temperatur och tid samt typ av substrat kan ändras vid misstanke om ovanliga juverpatogener. Exempelvis kräver *Mycoplasma* spp. specialsubstrat och inkubering under 3-5 dagar för tillväxt (Oliver *et al.* 2004). Diagnostik av bakterieväxt görs genom okulär bedömning av koloniutseende i kombination med biokemiska och/eller enzymatiska tester vid behov (Sandholm *et al.* 1995; Internet: SVA, 2011).

Odling av mjölkprov från juverdelar med klinisk eller subklinisk mastit resulterar i ett av de tre diagnostiska utfallen ingen växt, växt av en bakterieart i renkultur eller växt av blandflora, det vill säga samtidig växt av 3 eller flera bakteriearter (Hogan *et al.* 1999; Oliver *et al.* 2004). Om växt av en juverpatogen dominerar samtidigt som det finns ett fåtal kolonier av en eller flera andra bakteriearter bör dock provet svaras ut som patogen i blandflora.

Förekomsten av blandflora och ingen växt kan variera mellan klinisk och subklinisk mastit och mellan studier. I svenska studier rörande klinisk mastit respektive subklinisk mastit återfanns blandflora i 5 % och 18 % av samtliga prov (Ericsson Unnerstad *et al.* 2009; Persson *et al.* 2011). I en finsk studie (Koivula *et al.* 2007) var dock andelen blandflora ganska lika vid klinisk mastit (3,2 %) och subklinisk mastit (4,4 %). Bradley *et al.* (2007) fann i sina studier i England ingen blandflora vid klinisk mastit och endast i 0,2 % av tillfällena vid subklinisk mastit. Enligt ovan nämnda svenska studier är alltså problem med kontaminering av större betydelse vid subklinisk mastit än vid klinisk mastit. En trolig orsak till denna skillnad är att bakteriekoncentrationen vid infektiös klinisk mastit vanligtvis är högre än vid subklinisk mastit (Sandholm *et al.* 1995). Mjölkprov från kor med subklinisk mastit kan därför lättare påverkas av potentiella föroreningar eller olämplig hantering jämfört med prov från kor med klinisk mastit. Dessutom skickas prov från kor med subklinisk mastit oftare till laboratorium vilket innebär längre tid från provtagning till odling samtidigt som risken för olämplig hantering av provet ökar.

Flera studier har visat att andelen prov utan växt av bakterier är högre vid subklinisk mastit än vid klinisk mastit men andelen prov utan växt varierar mellan olika studier. I svenska studier återfanns ingen växt av bakterier i 11 % av samtliga prov från kor med klinisk mastit medan motsvarande siffra vid subklinisk mastit var 22 % (Ericsson Unnerstad *et al.* 2009; Persson *et al.* 2011). I England fann Bradley *et al.* (2007) ingen växt i 26,5 % av alla prov från klinisk mastit och i 38,6 % av proven från subklinisk mastit, medan Koivula *et al.* (2007) i Finland

fann negativ växt i 23,7 % av alla prov med klinisk mastit respektive 28,7 % av alla prov från kor med subklinisk mastit. Orsaker till negativa prov kan vara låg koncentration av bakterier i mjölken, infektion med mikroorganism med krav på specifika odlingsmedia, rests substanser i mjölkprovet som påverkar bakterierna (såsom antimikrobiella faktorer, alkohol och antibiotikarester), felaktig hantering och transport av mjölkprov som resulterat i att patogena bakterier dött ut eller att orsaken till mastit är av annan orsak än infektion. En annan möjlighet är att bakterieagens blivit eliminerat från den sjuka juverdelen innan provtagning medan inflammationsreaktionen kvarstår (Sears *et al.* 1990; Hogan *et al.* 1999; Taponen *et al.* 2009).

Bedömning av provsvar – möjliga felkällor

Det är inte helt säkert att det diagnostiska utfallet avspeglar provets och/eller juverdels sanna infektionsstatus eftersom det finns en risk att provet är falskt positivt eller falskt negativt. Vid växt av blandflora är tolkningen svår och därför rekommenderas ofta omprov i dessa fall.

Det finns ett antal faktorer som kan leda till att provsvaret blir felaktigt eller svårtolkat. Ett falskt negativt prov kan till exempel bero på alltför låg bakteriekoncentration i mjölken, att infektionsagens kräver andra odlingsbetingelser eller felaktig provtagning som leder till förorening av provet med desinfektionsmedel. Det är dock vanligare att felaktig provtagning leder till växt av blandflora på grund av förorening av mikroorganismer.

En annan faktor av betydelse är hanteringen av provet under transporten till laboratoriet. Viktiga faktorer i detta sammanhang är till exempel tid från provtagning till odling och omgivningstemperatur. Felaktig omgivningstemperatur kan leda till okontrollerad tillväxt eller avdödning av bakterier på ett sätt som gör att resultatet av den bakteriologiska undersökningen blir felaktigt eller svårtolkat.

Rekommendationer och felkällor i samband med provtagning

I dagsläget finns följande publicerade riktlinjer för provtagningsteknik (Hogan *et al.* 1999; Oliver *et al.* 2004). Endast sterila provrör används och dessa bör förvaras hygieniskt, förslagsvis i ett provrörsställ. Juver och spenar görs rena varefter några strålar mjölkas ut innan flera fuktiga bomullstussar (med 70 % alkohol) skrubbas mot spenspetsen tills inget mera smuts kan ses på den sista bomullstussen. Detta upprepas om kon sparkar eller på annat

sätt kontaminerar spenspetsen efter tvätt. Enskilda bomullstussar bör aldrig användas till mer än en spenspets, eftersom mikroorganismer kan föras mellan spenarna. Provtagningen utförs med provröret i horisontellt läge utan kontakt med spenspets samt rör och lock ska aldrig hållas med öppningen uppåt och locket får ej läggas ned. Det är tillräckligt att mjölka 1-3 strålar i provröret eftersom 2-3 ml mjölk är en tillräcklig volym för diagnostik samtidigt som risken för kontaminering av provet ökar med större volym. Kontamineringsrisken ökar även vid provtagning från flera juverdelar i samma provrör eftersom provröret måste hållas utan lock under längre tid. Vid provtagning av flera juverdelar bör tvätt och desinfektion ske först av de längst bort liggande spenspetsarna innan de närmsta spenspetsarna rengörs.

Provtagningen utförs sedan i motsatt följd. Dessutom rekommenderas spendopp före provtagning vilket torkas av efter 30 sekunder innan tvätt med fuktig bomullstuss i alkohol sker. Spendopp förespråkas även efter provtagningen om denna sker mellan eller efter mjölkning. Provtagning kan utföras både före, efter och i intervallet mellan mjölkning.

Mastitlaboratoriet, SVA, har liknande detaljerade råd rörande provtagning (Internet: SVA, 2010). Där preciseras att 10-15 ml mjölk bör mjölkas ut i kontrollkärl före provtagning och att cirka en halv minut bör fortlöpa mellan alkoholtvätt och provtagning för att alkoholen ska dunsta. Vidare bör mjölk från endast en stråle uppsamlas då ≥ 1 ml mjölk är en tillräcklig volym. Dessutom rekommenderas att enbart ta prov från en juverdel per provrör. Dessa skillnader i råd avser främst att ytterligare minska risken för att provet kontamineras.

Felkällor i samband med provtagning är framför allt risken att mjölkprovet kontamineras med mikroorganismer, vilket kan resultera i blandflora, eller kontaminering med desinfektionsmedel vilket kan ge falskt negativt resultat.

Vanliga orsaker till kontaminering av mjölkprov är smutsiga spenar, smutsiga händer vid provtagning, överdriven mängd alkohol på spenar och händer vid provtagning, kontaminerad behållare där bomull förvaras samt otätt lock till behållaren varvid alkoholen dunstat bort från bomullen. Övriga källor till föroreningar kan vara bakteriekolonisering av spenkanalen och övriga substanser som oavsiktligt kommit med i provet (Hogan *et al.* 1999; Oliver *et al.* 2004). Som redan nämnts kan förorening av provet med alkohol eller andra substanser med avdödande effekt på mikroorganismer (såsom antibiotikarester och antimikrobiella faktorer i mjölken) leda till falskt negativa prov, dock är det vanligare att provet förorenas av mikroorganismer som leder till växt av blandflora. Vanliga bakterier som kan kontaminera

prov är mikrokocker, *Corynebacterium bovis*, streptokocker, stafylokocker, *Bacillus* spp., enterobakter och *Pseudomonas* spp. (Sandholm *et al.* 1995; Oliver *et al.* 2004).

Alla juverpatogener som isoleras i ett mjölkprov kan vara resultatet av en kontaminering. Detta inkluderar även *Str. agalactiae* och *S. aureus* om de finns i besättningen sedan innan. Få kolonier av en bakterieart kan tyda på en sann intramammär infektion men kan också tyda på att provet är kontaminerat och falskt positivt. Frekvent isolering av flera olika bakteriearter i prov från individuella juverdelar tyder dock på dålig aseptik vid provtagningen. Det mest korrekta är som tidigare nämnts att inte ställa någon diagnos vid förekomst av blandflora utan istället göra ett omprov (Hogan *et al.* 1999, Oliver *et al.* 2004).

Vid spenkanalskolonisation kan både bakteriekvantitet och bakteriearter variera mycket (Oliver *et al.* 2004). I en studie gjord av Bexiga *et al.* (2011b) isolerades signifikant färre isolat av *Corynebacterium* spp. och fler prov utan växt när provtagning utfördes med en spenkanyl vilken förhindrade mjölken att komma i kontakt med spenkanalen. Enligt opublicerade data från Thorberg *et al.* (2009) isolerades ofta *S. xylosus* i renkultur i mjölkprov från juverdelar både med och utan några indikationer på mastit, speciellt när provtagning ej utförts direkt efter mjölkning och där kyltransporten av mjölkprov till laboratorium ej varit optimal. Bakteriens tillväxthastighet i rumstemperatur var dessutom lik den för *E. coli*. Resultaten tyder på att dessa bakterier vanligen koloniserar spenkanalen och har förmåga att snabbt växa till och kan således kontaminera mjölkprov och resultera i blandflora och/eller falskt positiva resultat. Resultaten tyder också på att val av tidpunkt för provtagning i förhållande till mjölkning kan ha betydelse speciellt vid frekvent isolering av bakterier som kan kolonisera spenkanalen.

Sammantaget är det viktigt att utföra provtagningen i en ren och stillsam miljö samt använda en aseptisk provtagningsteknik genom att följa de rekommendationer som finns för att undvika kontaminering av prov vilket kan leda till felaktig bedömning av provet. Eftersom risk för att få med föroreningsbakterier alltid existerar vid provtagning kan efterföljande hantering av provet från fält till laboratorium vara avgörande för det diagnostiska utfallet även vid användandet av aseptisk provtagningsteknik.

Rekommendationer och felkällor i samband med hantering och transport av mjölkprov från provtagning till laboratorium

Efter provtagning är rekommendationen (Hogan *et al.* 1999; Oliver *et al.* 2004) att mjölkproverna omedelbart kyls ner och förvaras i kylskåp eller motsvarande och att odling sker så snabbt som möjligt efter provtagning. Vid senare odling än 24-48 timmar efter provtagning rekommenderas att frysa proverna. Vidare förespråkas kyltransport av prover till laboratorium och att proverna bör förpackas så att de håller kylskåpstemperatur eller, om proverna skickas frysta, bibehålls frysta under hela transporten. Dessutom rekommenderas användning av en postservice som levererar prover senast dagen efter postning samt att undvika att posta prover över helgdagar.

Mastitlaboratoriet, SVA, har likaledes utarbetade råd rörande förvaring och transport av mjölkprov (Internet: SVA, 2010) som förespråkar att proverna kyls till +4-8°C direkt efter provtagning och förvaras kylda fram till odling. Till skillnad från ovan redovisade rekommendationer (Hogan *et al.* 1999; Oliver *et al.* 2004) rekommenderas dock inte frysning av proverna. I bilen bör proverna förvaras i kylåda med kylklampar eller motsvarande och proverna bör skickas till laboratoriet samma dag med kylklampar under transport.

Anledningen till att Mastitlaboratoriet, SVA, inte rekommenderar att proverna fryses är att gjorda undersökningar har gett varierande resultat avseende effekten av frysning på olika bakteriearter och att det finns en risk att vissa bakteriearter avdödas. I en del undersökningar fann man att de flesta bakterier som orsakar mastit vanligen överlever flera dagar i kylskåp och även nedfrysning i flera veckor (Murdough *et al.* 1996; Oliver *et al.* 2004). Hogan *et al.* (1999) och Oliver *et al.* (2004) menar dock att det finns juverpatogener som inte överlever längre perioder i kylskåp (+4°C) eller i frys. Dock påverkas i stort sett inte de flesta stafylokocker och streptokocker av förvaring i kylskåp i 1 vecka eller i frys i 6 veckor men däremot kan frysning reducera sensitiviteten för att isolera *E. coli*. Liknande resultat presenteras i en studie gjord av Schukken *et al.* (1989) där *Actinomyces pyogenes* (idag kallad *Arcanobacterium pyogenes*) och *E. coli* isolerades i mindre andel av proverna efter nedfrysning jämfört med efter direkt odling av prover från kor med klinisk och subklinisk mastit. Däremot sågs ingen effekt av frysning på *S. aureus* och en ökad frekvens prov med växt av KNS. Andra undersökningar har även påvisat ökad förekomst av prov med växt av *S. aureus* och *Str. agalactiae* efter nedfrysning jämfört med direkt utodling av prov från kor med både klinisk och subklinisk mastit (Villanueva *et al.* 1991, Sol *et al.* 2002). I en nyligen

genomförd svensk studie påverkade dock inte frysning växt av *S. aureus* i prov från subklinisk mastit (Artursson *et al.* 2010).

Enligt Quinn *et al.* (2002) tål yngre aktivt växande bakteriekulturer frysning bättre än äldre kulturer, varför effekten av frysning troligen kan påverkas av när under sjukdomsförloppet provtagning och frysning sker. I en nyligen sammanställd studie gjord av Bexiga *et al.* (2011a) noterades att frysning under 24 timmar resulterade i signifikant minskat antal Gram-positiva (G+) katalas-positiva kocker, Gram-negativa (G-) bacilli och G+ bacilli medan ingen signifikant effekt sågs på antalet G+ koagulas-negativa bakterier. Dessutom ökade andelen prov utan växt signifikant efter frysning jämfört med efter direkt odling.

Motsvarande studier på effekten av höga (>20°C) omgivningstemperaturer på tillväxt och sannolikhet att isolera olika juverpatogener har inte gjorts. Det är dock sannolikt att det finns risk för både falskt negativa och falskt positiva resultat om mjölkprov utsätts för höga temperaturer. Generellt är bakteriers tillväxtkurva i ett slutet medium logaritmisk över tid med en stationär fas och en avdödningsfas. De flesta patogena bakterier är mesofila vilket betyder att de har en optimal tillväxttemperatur vid 37°C men växt kan ske mellan 20-45°C. Bakteriers tillväxthastighet beror även på genupsättning och nutritionella faktorer samt miljöfaktorer såsom tillgång till fukt, rätt typ av atmosfär, pH och osmotiskt tryck. De flesta patogena bakterier har en delningshastighet på mellan 30 min till 20 timmar (Quinn *et al.* 2002). Risk för avdödning av mikroorganismer i mjölkprovet finns därför om provet utsätts för temperaturer som möjliggör bakteriell tillväxt. Om provet dessutom är kontaminerat kan okontrollerad tillväxt av föroreningsfloran ske som därutöver kan utkonkurrera eventuella infektionsbakterier och leda till svårtolkade prov med blandflora och risk för felaktig bedömning. Mikroorganismer avdödas generellt vid temperaturer som är förhöjda i förhållande till temperaturintervallet där tillväxt kan ske. Vid högre temperatur krävs kortare tid för avdödande effekt till exempel sker pastörisering av mjölk till konsumtion vid 72°C i 15 sekunder (Quinn *et al.* 2002). Möjligen kan avdödande effekt även uppnås på vissa bakteriearter då provet utsätts för relativt låga temperaturer under en längre tid, dock måste denna temperatur vara så hög att tillväxt ej sker. Prov från subklinisk mastit är dessutom känsligare för föroreningar och olämplig hantering jämfört med prov från klinisk mastit eftersom koncentrationen av infektionsbakterier vanligen är lägre (Sandholm *et al.* 1995). Dessutom skickas prov från subklinisk mastit oftare till laboratorium vilket innebär ökad risk

för olämplig hantering och längre tid från provtagning till odling varför korrekt provhantering kan anses vara särskilt viktig vid prov från subklinisk mastit.

Med anledning av ovan nämnda temperatureffekter är variation i yttertemperaturen en faktor som kan påverka mjölkprovet. Säsong och klimat bör därmed kunna påverka förekomst av blandflora eftersom yttertemperatur varierar mellan olika årstider och klimatzoner. I en studie gjord av Koivula *et al.* (2007) påvisades att prevalensen av miljöbunda juverpatogener såsom *E. coli* och *Str. uberis* var högst under sommar och höst medan prevalensen mastit orsakad av *S. aureus* och KNS var högst under vinter och vår. Antalet prov utan bakterieväxt var högst under vår och sommar medan sannolikheten för bakterieväxt var störst under vintern.

Resultaten stöds av en studie gjord av Makovec & Ruegg (2003) där liknande säsongsvariationer redovisas. I den senare studien var dessutom förekomsten av blandflora lägre under vinter och vår jämfört med under sommaren. Eftersom det finska klimatet och även vilka bakteriearter som dominerar i landet påminner om svenska förhållanden kan liknande variationer tänkas existera även här. En allmän uppfattning är att andelen prov med blandflora påverkas av omgivningstemperaturen och att andelen stiger under sommarmånaderna. Få studier har dock gjorts på om det förekommer säsongsbetonade variationer på förekomst av blandflora och inga under svenska förhållanden varför detta behöver utredas närmare.

I dagsläget skickas få kylda mjölkprov till Mastitlaboratoriet, SVA, trots att råd om kylning finns. Varför råd om kyltransport av prov till laboratorium inte följs samt hur väl övriga råd rörande provhantering efterföljs bör därför utredas närmare för att kunna förbättra rekommendationer rörande provhantering och för att underlätta att de efterföljs. I dagsläget finns inget specifikt framtaget kylsystem för transport av mjölkprov att rekommendera för provtagare som skickar prov till Mastitlaboratoriet, SVA, vilket dock vore önskvärt. Det är även intressant att ta del av provtagares attityder till kylning och deras synpunkter på förslag till system för kyltransport för att öka möjligheten att ta fram ett för provtagarna praktiskt och användbart kylsystem. Effekten av kylning under olika transportbetingelser på växt av blandflora är inte heller något som undersökts under svenska förhållanden varför en sådan studie är motiverad.

Syfte

Det övergripande syftet med studien var att optimera råden rörande transport av mjölkprov, tagna i samband med juverhälsoundersökning, från fältet till laboratoriet för att förbättra möjligheterna till en korrekt bakteriologisk diagnos. Studien bestod av tre delar varav den första avsåg att undersöka hur mjölkprov hanteras och transporteras idag inklusive praktiska begränsningar i fält. Syftet med den andra delen var att undersöka årstidens effekt på förekomst av blandflora i mjölkprov. Den tredje delen utgjorde en laboratorieundersökning där effekten av kyltransport av mjölkprover på tillväxt av blandflora utvärderades under olika transportbetingelser.

Material och metoder

Del I Intervjuer rörande hantering och transport av mjölkprover

Utformning av underlag för intervjuerna

Ett formulär med frågor togs fram inför telefonintervjuerna (Bilaga 2). Formuläret bestod av 10 huvudområden med ett antal delfrågor för varje område. Frågorna var utformade utifrån tänkbara svarsalternativ och händelseförlopp för att få med hela hanteringen från provtagning till postning av proverna. Deltagarna fick inledningsvis prata fritt utifrån frågan: ”*Vad händer vanligtvis med mjölkprov tagna i rör från det att du skruvat på korken till dess de levereras till posten?*” Om de i sitt fria svar inte svarat på alla delfrågor ställdes dessa i efterhand. Huvudfrågorna rörde hantering av mjölkprov på provtagningsplats, i bil och på arbetsplatsen, hur proverna förpackades samt var och när de levererades till posten. Dessutom undersöktes om det förekom variation i hanteringen beroende på årstid. Slutligen ställdes några attitydfrågor samt frågor rörande två framtagna förslag till kyltransport.

Urval av provtagare och genomförande av telefonintervjuer

Vid planeringen av arbetet bestämdes att ca 10 vana provtagare skulle intervjuas. Personerna valdes ut i samråd med handledarna. Med brev skickades en förfrågan till de utvalda personerna för att undersöka om de ville delta i intervjun samt med information om att de skulle bli kontaktade per telefon (Bilaga 1). Brevet innehöll också en beskrivning av projektets bakgrund och syfte.

Telefonintervjuerna genomfördes under perioden 5-22 november 2010. I de flesta fall tog varje intervju cirka 30 min. Samtliga intervjuer genomfördes av Karin Wallin och svaren noterades i formuläret i samband med intervjuerna. Resultaten sammanställdes deskriptivt.

Del II Undersökning av förekomst av blandflora i mjölkprov

Laboratoriejournaler 2007-2009

Som underlag användes laboratoriejournaler för 2007-2009 för mjölkprov som insänts till Mastitlaboratoriet, SVA, för bakteriologisk analys. Andelen prov med växt av sparsam, måttlig och riklig blandflora räknades ut per månad för varje år. Även andelen prov med diagnosen specifik infektion i blandflora räknades ut på samma sätt. Resultaten sammanställdes deskriptivt.

Kriterier för växt av blandflora i mjölkprov

På SVA bedöms prov med växt av ≥ 3 olika bakteriearter som blandflora förutom vid växt av ≥ 1 colony-forming unit (CFU) av *S. aureus* eller *Str. agalactiae* då provet bedöms som positivt i blandflora. Om en misstänkt juverpatogen, annan än *S. aureus* eller *Str. agalactiae*, dominerar ett prov med blandflora, analyseras provet vidare och svaras eventuellt ut som patogen i blandflora. Graden av blandflora delas in i sparsam (≤ 10 CFU), måttlig (10-50 CFU) samt riklig (≥ 50 CFU).

Del III Laboratorieundersökning av effekt av kylning under transport på växt av blandflora i mjölkprov

Förstudier och beredning av blandflora

Laboratorieundersökningen inleddes med förstudier av frysta (-20°C) mjölkprov med diagnos blandflora. Dessa mjölkprov hade inkommit under hösten 2010 till Mastitlaboratoriet, SVA. Representanter för fyra bakteriearter, med tydligt olika koloniutseende och som erfarenhetsmässigt är vanligt förekommande i blandflora, valdes ut från dessa mjölkprov. Dessa bakterier renodlades på nötblodagar med 5% esculin och typades till artnivå enligt ackrediterad rutin på Mastitlaboratoriet, SVA. De fyra bakterieisolaten och dess försöksnumrering (1-4) var *Enterobacter cloacae* (1), KNS med vita kolonier (2), KNS med gula kolonier (3) samt *Str. spp.* (4). Denna bakterieart var positiv vid jäsning av hippurat, esculin, salicin, sorbitol, mannitol, raffinosa, laktos, sackaros, inulin, trehalos, stärkelse och glycerin, och växte inte på Slanetz-Bartley agar (SlBa agar).

De fyra bakterieisolaten anrikades var för sig i buljong (Nutrient buljong med 10 % hästserum, SVA, Uppsala, Sverige) genom att överföra 1 CFU till 4 ml buljong, och inkubera röret under fyra timmar i 37°C. Bakterieranrikningarna späddes sedan med mjölk behandlad med ultrahög temperatur (UHT-mjölk), fetthalt 3% (Arla, Sverige) i flera steg. Avsikten var att den totala bakteriekoncentrationen skulle vara ca 50 CFU / 10 µl UHT-mjölk inför frysning. Bakteriemjölken frystes (-20°C) i flera sterila 10 ml plaströr med skruvkork (Fisher Scientific, Göteborg, Sverige) vardera innehållande ca 8 ml bakteriemjölk. Rören var nedfrusna i 9 dagar innan försöken påbörjades.

Försökets genomförande

Effekt av kylning under transport testades under olika betingelser avseende yttertemperatur (-8 till -10°C, +6 till +8°C samt +21 till +22°C), antal provrör per förpackning (6 eller 24 stycken) och placering av provrör i förpackning (löst eller fixerat). Tid (6 timmar) för exponering för yttertemperatur, antal prov per förpackning, och jämförelse mellan att ha rören löst eller fixerat baserades på uppgifter insamlade vid intervjuerna i del I. Övrig provhantering (tid för posthantering, temperatur vid postlagring, hantering av provrör på laboratoriet) efterliknade i möjligaste mån rutiner som vanligen används idag samt information inhämtad vid tidigare undersökningar.

Totalt genomfördes 12 försöksomgångar under 3 veckor (Tabell 2). Omgångar med samma försökstemperatur (1-4, 5-8 och 9-12) genomfördes under samma vecka. Av praktiska skäl påbörjades 2 omgångar per dag måndag och tisdag i vardera vecka.

Tabell 2. Översikt av försökets genomförande. Varje försöksomgång testades med och utan frysklamp (M/U)

Variabler	Försöksomgångar											
	1-4				5-8				9-12			
Omgivnings-temperatur	-10°C till -8°C				+6°C till +8°C				+21°C till +22°C			
Antal rör per påse	6		24		6		24		6		24	
Förvaring ^a	L	F	L	F	L	F	L	F	L	F	L	F
Frysklamp	M/U	M/U	M/U	M/U	M/U	M/U	M/U	M/U	M/U	M/U	M/U	M/U

^aL=Löst, F=Fixerat

Inför varje försöksomgång tinades bakteriemjölks 1-4 i kylskåp (ca +6 till +8°C) under ca 16 timmar. Därefter placerades rören i rumstemperatur (21-22°C) i ca 1 timme. Två "blandfloror" framställdes (A och B), i A ingick bakterie 1-4 medan enbart bakterie 2-4 ingick i B. Avsikten var att A och B skulle innehålla ca 5-10 CFU/10 µl av vardera bakterieart. Baserat på resultat från förstudier användes 0,5 ml från vardera bakteriemjölks (1-4) i omgång 1-2. Eftersom resultaten från dessa omgångar visade på en högre bakteriekoncentration än önskat modifierades volymerna till 0,5 ml av bakterie 1 samt 250 µl av bakterie 2-4 i omgång 3-4. Resultaten visade dock att ytterligare modifiering behövdes. I resterande omgångar (5-12) användes slutligen 0,5 ml av bakterie 1, 200 µl av bakterie 2, 50 µl av bakterie 3 samt 100 µl av bakterie 4. I samtliga omgångar tillsattes UHT-mjölks så att totalvolymen per rör var 4 ml för blandflora A och 3 ml för blandflora B. Som negativ kontroll (K) användes rör med 4 ml UHT-mjölks. I försöken ingick alltid duplikat av blandflora A och B samt av den negativa kontrollen.

I varje försöksomgång (1-12) odlades alla mjölk-rör på nötblodagar både före och efter "transport". För varje omgång packades mjölk-rör i 2 stora vadderade SVA-provpåsar (storlek 5; 260 mm x 400 mm, Papyrus, Mölndal, Sverige). I vardera provpåse placerades 2 rör av blandflora A, 2 rör av blandflora B och 2 K-rör. I den ena påsen (märkt MF) placerades en frysklamp (680 ml, Air Container, Nyköping, Sverige) omsluten av en "bubbelwrappåse" (255 mm x 315 mm, Papyrus, Mölndal, Sverige). I försöksomgångar med 24 rör adderades 18 rör med 4 ml vatten till vardera påse. I försöksomgångar där rören förvarades "löst" blandades mjölk-rören med dessa rör. I de omgångar där rören förvarades "fixerat" tejpades rören fast på utsidan av en bubbelwrappåse så att alla rör låg plant mot underlaget. I omgångar med 6 rör placerades rören i mitten av påsen fasttejpade på en mindre bubbelwrappåse (storlek 175 mm

x 275 mm) men i omgångar med 24 rör tejpadades rören fast enligt bestämt schema på en bubbelwrappåse (storlek 255 mm x 315 mm) så att identiska rör placerades antingen centralt eller perifert i förhållande till påsen.

Påsarna utsattes sedan för en av de tre omgivningstemperaturerna (-8 till -10°C, +6 till +8°C samt +21 till +22°C) under 6 timmar. Därefter flyttades påsarna till rumstemperatur där de förvarades i ca 16 timmar. Proverna packades sedan upp och placerades i kyl under 2 timmar efterföljt av 2 timmar i rumstemperatur innan odling på nötblodagar utfördes.

Efter noggrann blandning av röret odlades 10 µl mjölk på nötblodagar med 5 % esculin varpå plattorna inkuberades i 37°C över natten (ca 16 timmar). Avläsning gjordes ca 24 timmar efter odling för bakterie 4, samt ca 48 timmar efter odling för bakterie 1-3 då kolonierna var enklare att särskilja. Plattorna förvarades i rumstemperatur efter avläsningen 24 timmar efter odling.

Antalet olika bakteriearter, antalet CFU av vardera bakterieart (1-4) och totalantalet CFU per platta registrerades. Antalet CFU räknades manuellt. Tillförlitlig räkning av CFU var möjlig upp till 1200 CFU per platta. Om antalet CFU per platta var högre bedömdes mängden som ”många” eller ”matta”. Plattor med ≥ 1200 CFU där enskilda kolonier var urskiljbara men små och så tätt packade att det var osäkert att räkna dem bedömdes ha växt av ”många” CFU (Bild 1). Plattor med ≥ 1200 CFU där enskilda kolonier inte var urskiljbara utan hade smält samman definierades ha växt av en ”matta” av CFU (Bild 2).

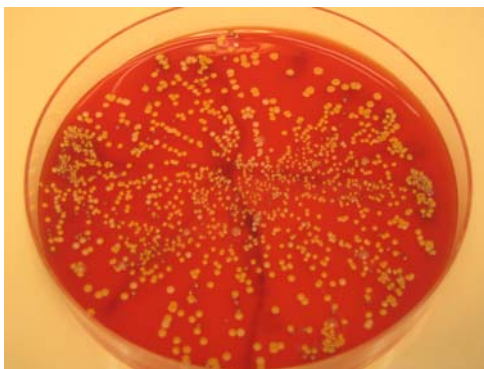


Bild 1. Gräns för tillförlitlig manuell räkning (1200 CFU), plattor med liknande utseende bedömdes ha växt av ”många” CFU.

Foto: Karin Wallin

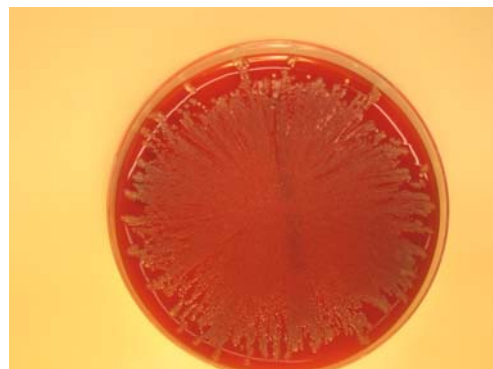


Bild 2. Platta med växt av en ”matta” av CFU.
Foto: Karin Wallin

Eftersom det inte var möjligt att räkna antalet CFU på alla plattor indelades resultaten för bakterieväxt efter ”transport” i 5 kategorier för att beskriva materialet. Kategori 1 motsvarade bakterieantalet före ”transport” och den övre gränsen för denna kategori bestämdes genom att ta medelvärdet + 2 SD för antalet CFU för alla prover före ”transport”. Kategorierna definierades enligt följande 1) 0-100 CFU, 2) 101-650 CFU, 3) 651-1199 CFU, 4) ≥ 1200 CFU plus bedömning ”många” och 5) ≥ 1200 CFU plus bedömning ”matta”.

Bakterieväxten (CFU) före ”transport” för med frysklamp vs utan frysklamp, löst vs fixerat, stort vs litet och temperatur +8°C vs temperatur +22°C jämfördes med hjälp av Student's t test (Statistica, StatSoft). Antalet prover efter ”transport” med < 1200 CFU och ≥ 1200 CFU jämfördes mellan MF och UF, löst och fixerat, stort och litet antal samt temperatur +8°C och temperatur +22°C med hjälp av Fischer exact test (Statistica, StatSoft). Vid ett p-värde $< 0,05$ bedömdes skillnaden som statistiskt signifikant.

Resultat

Del I Intervjuer rörande hantering och transport av mjölkprover

Totalt tillfrågades 12 personer, varav 11 personer blev intervjuade. Av dem var 7 veterinärer från husdjursföreningar, 2 distriktsveterinärer samt 2 tekniker från husdjursföreningar.

Samtliga personer är anonyma i rapporten. Den person som inte intervjuades var bortrest när intervjun genomfördes och kunde därför inte delta. Nedan följer en deskriptiv sammanställning av intervjuaren från angivna frågor.

Fråga 1

Frågor om antal gårdar per dag respektive vecka som prov tas, om prov tas alla veckodagar och om medelantalet mjölkprov per besök.

Vanligen togs mjölkprov från 1-5 gårdar per vecka (7 av 11 svar). Resterande personer tog prov från 6-10 gårdar per vecka (2 st.) eller mycket sällan (3-5 gårdar under den senaste månaden) (2 st.). Samtliga tog prov på 1-5 gårdar per provtagningsdag. Åtta av 11 undvek att ta prov på fredagar och en av dessa undvek även torsdagar, eftersom provtagning inte kunde bokas fredagar eller för att proverna skulle hinna fram till laboratoriet innan helgen. Övriga 3 tog prover alla veckodagar.

Antalet prov per besättningsbesök varierade mycket (8 av 11 svar), från 3-10 till 20-30 per besök. Övriga angav 1-5 prov (2 st.) eller 6-10 rör per besök (1 st.). En av de intervjuade angav att 21-30 prov tas vid första besöket, därefter tas 6-10 prover per besök.

Fråga 2

Frågor om förvaring och hantering av prov från provtagningsplats till bilen, besökstidens längd, om prov lämnas kvar på gården, om djurägare utför egen provtagning och om instruktioner för vidare provhantering lämnats vid egen provtagning.

I ladugården förvarades proverna i ett ställ för mjölkkrör (3 st.) eller i fickan eller inget uttänkt sätt (3st.). Övriga förvarade proverna i en låda (2 st.) eller i kylväska eller kylskåp (3st.). Två av de 3 sistnämnda förvarade proverna kylt endast om sommaren.

Besökstidens längd varierade mycket i de flesta fall (10 av 11 svar) varför dessa angav ett brett tidsspann för att täcka in variationer. Den kortaste angivna tiden varierade mellan 10-90

min medan den längsta varierade mellan 60-210 min. En person angav att besöket oftast tog < 30 min.

Majoriteten (10 st.) svarade att de alltid tar med sig proverna från gården, medan 1 lämnade kvar proverna vid enstaka tillfällen på grund av tidsbrist. Djurägaren postade då proverna samma dag.

Nio av 11 provtagare, alla veterinärer, angav att det finns besättningar som själva utför provtagningen och skickar in prover. I Tabell 3 anges antal besättningar som tar egna prover.

Tabell 3. Antal besättningar som intervjuade provtagare (n=9) angett tar prover själva

Antal besättningar	Antal intervjuade
1-3	5 ^a
4-6	2
7-10	1
>10	1

^a varav en höll på att introducerade egen provtagning på flera gårdar (7-10st.)

Anledningen till att besättningarna själva tog prover varierade. I besättningar med AMS (Automatic Milking System) (5 st.) samt i större lösdrifter (1 st.) upplevs egen provtagning enklare och mindre tidskrävande, då djurägare själv kan passa in lämplig provtagningstidpunkt, eller då rätt ko är i roboten vid AMS. Ett annat skäl var djurägarens önskan att minska kostnaderna (4 st). Två av dessa angav att detta var i AMS-besättningar med rutinprovtagning som t.ex. provtagning av alla nykalvare. Ytterligare skäl var att djurägaren vill kolla upp enstaka kor i besättningen och att de inte tycker det kräver ett veterinärbesök (3 st). Några personer har uppgivit flera skäl. Oftast fungerade det bra med djurägare som provtagare (8 av 9 svar). Två svarade dock att det beror på hur bra rutin besättningarna har. Angående huruvida det framgår av remissen att djurägaren eller annan person på gården själva utfört provtagningen svarade 3 att det inte framgår, 3 att det varierar samt 1 att det framgår. Vanligen hade besättningen fått instruktioner för hantering av mjölkproverna (8 av 9 svar). Sex av 9 visste inte hur proverna förvaras på gården, medan 3 angav kylskåp eller ”ej i värme”. En rekommenderade dock detta enbart när det är varmt ute eller på sommaren. Vanligen lämnas små SVA-påsar ut (6 svar av 9), 3 svarade att de lämnar ut både små och stora SVA-påsar. De flesta visste inte hur rören förpackades (6 av 9 svar),

3 svarade att de ligger löst i påsen med remissen. Samtliga 9 informerade djurägaren om att proverna bör levereras till posten samma dag. Två personer rekommenderade att frysa proverna om de inte postades samma dag. Samtliga 9 angav att proverna postas antingen på postlåda eller med lantbrevbärare.

Fråga 3

Frågor om hantering och förvaring av prover i bil till arbetsplats eller postlåda samt om hur lång tid prover är i bil eller på arbetsplats.

Det vanligaste var att växla mellan att ta med sig proverna tillbaka till arbetsplatsen och att posta proverna direkt (6 av 11 svar). En av dessa postade alltid från bilen om det inte var fredag då proverna togs till arbetsplatsen eller hemmet och istället lades i frysen. Tre av dessa 6 postade från bilen i 51-75 % av gångerna medan övriga gjorde detta vid >75 % (2 svar) eller <25 % (1 svar) av gångerna. Resterande (5 av 11) svarade att de alltid körde tillbaka till arbetsplatsen med proverna.

Under bilresan från provtagningsplats till arbetsplats förvarades proverna oftast i kylväska (6 av 11 svar). Fem av dessa gjorde detta enbart när det är varmt ute, annars förvarades proverna i en väska (4 st.) eller i SVA-påse (1 st.). Två av dessa 5 förvarade proverna i utrymme som håller yttemperatur. Resterande 5 av 11 svarade att de förvarade proverna i rektalhandske, provställ, trälåda, SVA-påse i utrymme som håller yttemperatur eller varierande mellan plastpåse i praktikväskan vid svalt väder och isolerad utrustningslåda.

Förvaringstid av mjölkprov i bil innan de packas om på arbetsplatsen varierade mycket varför de flesta angav ett tidsintervall (9 av 11 svar). Minimal tidsåtgång varierade mellan 30-90 min medan maximal tidsåtgång varierade mellan 120-360min. Resterande svarade 30-60min (1st.) samt 90-120 min (1st.).

På arbetsplatsen förvarade 7 av 11 personer proverna i rumstemperatur. Tre av dem förvarade proverna i kylskåp om tid till postning var "lång" eller överskred 30 min (2 st.) och under sommarmånaderna (1 st.). Två av 11 personer förvarade alltid proverna i kylskåp på arbetsplatsen medan 1 person förvarade proverna i SVA-påse med frysklamp vid varmt väder. En av de intervjuade tog endast med sig fredagsprover till arbetsplatsen och förvarade dessa prov i frys över helgen.

Av de 6 personer som ibland postade proverna direkt från bilen angav 2 att de förvarar proverna i kylväska i bilen. En av dessa gjorde detta endast när det är varmt ute, annars förvaras proverna i SVA-påse. SVA-påse används i bilarna av resterande 4 personer. En av dessa 4 skiftar mellan SVA-påse och trälåda som förvaring. Tre av 6 skickar sina prover direkt efter varje gårdsbesök eftersom de maximalt har ett gårdsbesök per dag (2 st.) eller kör förbi postlåda (1 st.). Tiden för hur länge mjölkproverna befinner sig i bilen, tills de postas, varierade för samtliga. Den minsta tidsåtgången varierade mellan 30-60 min och den längsta varierade mellan 120-360 min.

Fråga 4

Frågor om hur proverna är förpackade, vad som styr valet av förpackning samt hur rören är placerade vid postning.

Det vanligaste var att använda antingen liten eller stor SVA-påse som ytterförpackning (10 av 11 svar). En person använde endast stor SVA-påse. Sex personer använde den lilla SVA-påsen i >75 % av tillfällena, 2 personer använde den stora påsen i >75 % av tillfällena medan 3 använde den lilla och den stora lika ofta.

Tio personer angav att antalet prov styr valet av förpackning. En person angav att valet av förpackning styrs av att rören inte bör ligga klämda och att påsen skulle vara platt. Rören placerades oftast löst i påsen (7 av 11 svar), en av dessa 7 använder ibland cellstoff som vadding. Resterande 4 personer lade rören i en plastpåse innan denna placerades i SVA-påsen. Två av 11 har postat prover med kylklamp enstaka gånger under sommarmånaderna.

Fråga 5

Frågor om var, när och varför proverna postas i postlåda eller på postens ombud/företagscenter.

Nio av 11 personer postar proverna enbart i postlåda. Resterande 2 personer använder postlåda i 26-50 % av tillfällena, annars använder de postens ombud/företagscenter. Fyra av 11 personer använder alltid samma postlåda, medan övriga 7 använder olika postlådor. Samtliga 11 var medvetna om postlådornas tömningstider (mellan klockan 16-19) och tog hänsyn till det när de postade sina prov. Nio av 11 personer upplever ibland problem med att förpackningen inte går in i postlådan, 7 av dessa löser problemet med att göra förpackningen tunnare genom att inte packa för tjockt, platta ut påsen eller byta till en stor SVA-påse. De

övriga 2 valde att posta proverna på en låda med bredare inkast eller att posta proverna hos ett ombud/företagscenter. I Tabell 4 anges de intervjuades skäl för att använda postlåda.

Tabell 4. Provtagarnas (n=11) skäl för att använda postlåda

Anledning	Antal personer
Tidseffektivt, hinner posta innan tömning	6
Nära, bekvämt, enkelt & bra tillgänglighet	5
Posten går in i inkastet	2
Annat (svårt i postlådan, pålitligt, billigt)	3

Observera att flera personer har uppgivit mer än ett skäl

Nio av 11 visste var postens närmaste ombud/företagscenter ligger i förhållande till deras arbetsplats, men övriga 2 visste inte detta. Sju av 11 använder sig inte alls av postens ombud/företagscenter, anledningar till detta framgår av Tabell 5.

Tabell 5. Provtagarnas (n=9) skäl för varför postens ombud/företagscenter inte används

Anledning	Antal personer
Opraktiskt, tar tid att köra dit och stå i kö	6
Sämre öppettider, hinner inte dit	4
Annat/föredrar postlåda	4

Observera att flera personer har uppgivit mer än ett skäl

Två av 11 personer växlade mellan att använda postlåda och ombud/företagscenter, de använder samma ombud/företagscenter och de visste inte när paketen skickas iväg från ombudet/företagscentret. De menade ändå att de tar hänsyn till detta när de lämnar in mjölkprov på ombudet/företagscentret. Större mängd post, billigare och för stor förpackning för postlåda var argument till varför de valde att använda ombud/företagscenter framför postlåda.

Fråga 6.

Frågor angående när proverna levereras till posten i förhållande till provtagningen, vad som påverkar när leverans till posten sker, vilka veckodagar detta sker och hur förvaring över helgen ser ut.

Samtliga 11 intervjuade levererar proverna till posten samma dag som provtagning skett, 2 uppgav dock att detta oftast sker samma dag. I Tabell 6 anges vad som styr tidpunkten för leverans av mjölkprov till posten i förhållande till provtagningen.

Tabell 6. Provtagarnas (n=11) uppgifter om vad som påverkar tidpunkt för leverans av mjölkprov till posten

Argument	Antal personer
Postlådans/ombud/företagscenter tömnings/hämtningstider	5
Övrigt arbete, upplägg av dagen	5
Tid på dagen (fast klockslag/slutet av dagen)	4
Yttertemperatur	3
Närhet till posten	2

Observera att flera personer har uppgivit mer än ett skäl

Tio levererar prov alla dagar utom fredagar till posten och en levererar inte på torsdagar och fredagar. En uppgav dock att vid enstaka prov har det hänt att proverna skickats på fredagen förpackade med en kylklamp.

Sju av 11 uppgav att de ibland tagit mjölkprov på fredagar, dock försöker de oftast använda Mastistrip-kassetter om det är fredag. Vid provtagning en fredag uppgav 5 av dessa 7 att proverna förvaras i kyl antingen i hemmet eller på arbetsplatsen över helgen. Sedan postas proverna på en låda som töms samma dag. Detta sker tidigast på söndagen. Två av de 5 uppgav att det hänt att de förvarat proverna i frys över helgen, varav 1 person uppgav att vissa djurägare förvarar enstaka prov i frys för att samla ihop flera prov innan de skickas iväg. En av de 7 som ibland tar prov på fredagar odlar själv ut provet vid provtagning på en fredag.

Fråga 7

Frågor om hur årstiden påverkar hanteringen av mjölkprover.

Tio av 11 intervjuade angav att säsong eller årstid påverkar deras hantering av mjölkprov. Alla 11 ändrar rutiner på grund av yttertemperatur eftersom de vill undvika att proverna utsätts för höga temperaturer. Nio personer ändrar sina rutiner vid varmt väder eller under sommaren, varav en av dessa personer även ändrar rutin vid frysgrader. En av de intervjuade arbetar inte alls under sommaren, och uppgav därför att ändringar i rutin endast sker vid frysgrader, samtidigt uppgav personen att åtgärder nog hade vidtagits även under sommaren, t.ex. i form av kylväska vid transport av prover. Angående vilka rutiner som ändras nämnde 8 personer att de ändrar sina rutiner i bilen, till exempel förpackning och förvaring av prover, antingen på väg till arbetsplatsen eller till posten (Tabell 7). Två personer angav att de försöker minimera tiden i postlådan om det är vinter och frysgrader ute för att undvika att proverna hinner frysa och postar därför proverna precis innan tömning. En person postar hellre sina prover via postens ombud/företagscenter än i en postlåda när det är varmt ute för att undvika att proverna utsätts för höga temperaturer.

Tabell 7. Sammanfattning av antal personer som utför olika rutiner när det gäller kyltransport av mjölkprover och om rutinerna ändras under sommaren/vid varmt väder

Rutiner	Kyler alltid	Kyler endast på sommaren/vid varmt väder	Kyler av annan orsak	Kyler ej	Totalt antal personer
1. Kylning av prover i bilen till arbetsplatsen	1	5	0	5	11
2. Kylning av prover i bilen till posten	1	1	0	4	6 ^a
3. Kylning av prover på Arbetsplatsen	2	2	2 ^b	5	11
4. Kylning av prover från gård till laboratoriet i SVA-påse med kylklamp	0	2 ^c	0	9	11

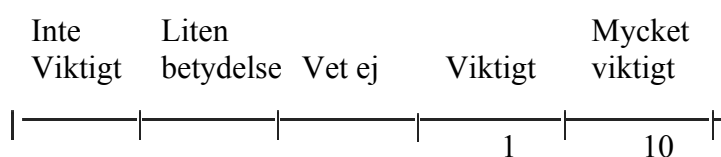
^aSex personer postade ibland prov från bilen

^bVarav 2 st. förvarade proverna i kylskåp om tid till postning var lång eller >30min

^cVarav en person använder kylklamp endast vid temperatur över 20°C

Fråga 8

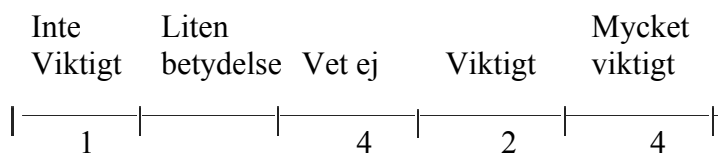
Frågor om attityder rörande betydelsen av god hygien vid provtagning, kyltransport till laboratoriet och snabb provtransport till laboratoriet för en korrekt bakteriologisk diagnos. Samtliga 11 ansåg att god hygien vid provtagning är viktigt eller mycket viktigt (Figur 1). Alla motiverade detta med att de inte vill få med någon förorening som kan växa till och maskera eventuella juverpatogener och att blandflora som svar inte är önskvärt eftersom det då ofta krävs omprov för en bakteriologisk diagnos. Två personer motiverade även sin attityd med egen erfarenhet då prover från lortiga spenar eller spenskador oftare gett blandflora.



Figur 1. Fördelning av antal provtagare med olika attityd till betydelsen av god hygien vid provtagning

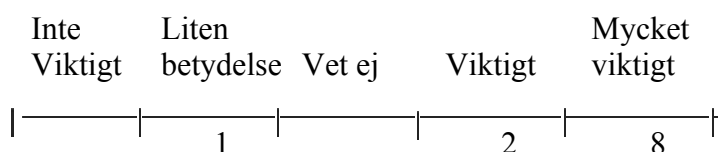
Drygt hälften (6 av 11) av provtagarna ansåg att kylning av proverna under transport till laboratoriet är viktigt eller mycket viktigt (Figur 2). Om det inte är varmt ute eller om proverna kommer fram till laboratoriet i tid, det vill säga dagen efter provtagning, ansåg 7 personer (4 vet ej, 1 inte viktigt, 2 viktigt/mycket viktigt) att kylning inte har någon avsevärd betydelse. Tre ansåg att kylning vore att föredra men inte fungerar av praktiska skäl i nuläget.

Av de övriga 4 som tyckte det var viktigt eller mycket viktigt med kyltransport till laboratoriet ansåg 2 att bakterieförekomsten i provet kan ändras vid höga temperaturer under transport och att det därför är viktigt med kyltransport. En ville kyltransportera sina prov om lämplig engångsförpackning fanns medan en ansåg att om provet inte är kontaminerat är kylning under transport mindre viktigt.



Figur 2. Fördelningen av antal provtagare med olika attityd till betydelsen av kylning av prover under transport till laboratoriet

Nästan samtliga ansåg att det är viktigt eller mycket viktigt att proverna kommer så snabbt som möjligt till laboratoriet (Figur 3). Sju av dessa personer motiverade sin attityd med att risken att bakterieförekomsten förändras genom att eventuella föroreningar växer till eller att patogena juverbakterier dör ökar med transporttiden. En person tillade att ett snabbt svar ger en snabb återkoppling till djurägare vilket är önskvärt och bidrar till vikten av att snabbt få iväg proverna efter provtagning. En person menade att "fördröjda prover" alltid har en högre blandflorafrekvens medan 2 personer ansåg att tidsaspekten kan kompensera slarv med kylning av prov under vägen till laboratoriet och därmed ansåg de att det är mycket viktig att proverna kommer fram så snabbt som möjligt. En person angav att snabb transport är av liten betydelse om posten fungerar normalt eftersom tid för postgång inte går att påverka. Blir det däremot fördröjning ansågs tiden mycket viktig.



Figur 3. Fördelning av antal provtagare med olika attityd till betydelsen av snabb transport av prover till laboratoriet

Fråga 9

Extrafrågor till de som kyler/kyltransporterar sina prov någon gång angående förvaring, problem och förpackning vid nyttjande av frysklamp/annat kylsystem.

Sex av de intervjuade personerna kyler sina prover någon gång och fick extrafrågor rörande kylningen. Fem kyler sina mjölkprover med hjälp av frysklampor, vilka förvarades i frys på arbetsplatsen eller i kylväska. En person använder elkylskåp i bilen. Två personer angav att de ibland skickar prover med frysklamp till laboratoriet. Endast en person upplevde problem med kyltransport i form av platsbrist vid många rör. De använder maximalt en tunn frysklamp per SVA-påse eftersom förpackningen annars blir för tung och skrymmande och därmed inte går att lägga på postlåda och att förpackningen annars blir för dyr att posta.

Fråga 10

Frågor om två förslag till kyltransport och praktiska begränsningar vid hantering av frysklampor och transportlådor.

I Tabell 8 presenteras de intervjuades åsikter rörande möjligheter till förvaring av frysklampor och förpackning för transport av mjölkprov till laboratoriet. Två personer svarade ”vet ej” till möjlighet att förvara frysklampor i bilen på grund av platsbrist i bilen och begränsad möjlighet att hämta upp frysklampor vid dagens början. Praktiska problem med att förvara/ta med frysklampor i bilen var att de är tunga, dyra att skicka, skrymmande (ej går i postlåda), avger kondens (vilket kan förstöra remissen), innebär en extra kostnad, tar plats, hinner smälta och att det kan vara besvärligt att organisera daglig upphämtning och tillgång av frysklampor. Två personer som svarade vet ej rörande förvaringsmöjlighet för påsar/lådor i bilen angav att de inte har plats för flera lådor i bilen men gärna har med sig flera SVA-påsar. Tre personer ansåg inte att postning via ombud/företagscenter är ett problem om företagscentret i närheten finns kvar och man vinner något i resultatet, exempelvis färre prov med blandflora eller om proverna kommer iväg samma dag. Resterande 8 som svarat ”ja” eller ”vet ej” fick följdfrågan vad de skulle göra om de ändå måste posta proverna hos ett ombud/företagscenter. Fyra ansåg att de skulle få problem med att få iväg proverna samma dag som provtagning eftersom ombud/företagscenter skickar iväg sin post tidigare på dagen och inte ligger lika nära till hands som postlåda. Tre personer skulle försöka platta till påsarna, genom att ha färre prov per förpackning eller strunta i kylklampen. En person skulle börja odla själv istället för att skicka proverna till laboratoriet.

Tabell 8. Fördelning av intervjusvar (n=11) på frågor om möjlighet till förvaring av frysklampor och förpackningar

Frågor	Ja	Nej	Vet ej
1. Finns det möjlighet att förvara prover kylda över natt?	11	0	0
2. Finns det möjlighet att förvara frysklampor på arbetsplatsen?	11	0	0
3. Finns det möjlighet att förvara frysklampor i en kylväska eller liknande i bilen?	9	0	2
4. Finns praktiska problem med frysklampor?	7	4	0
5. Finns förvaringsmöjlighet för flera SVA-påsar/lådor i bilen?	9	0	2
6. Finns förvaringsmöjlighet för flera SVA-påsar/lådor på arbetsplatsen?	11	0	0
7. Upplevs det som ett problem om kylklamp i SVA-påse skulle medföra att proverna ej kan postat på låda utan bara på postens o/f?	7	3	1

o/f= ombud/företagscenter

I Tabell 9 presenteras de intervjuades åsikter om förslag rörande kyld transportlåda med löstagbart frigoliteställ. Fyra av de personer som svarade nej på den första frågan ansåg dock att det kan vara mer praktiskt att skicka flera prov i en större förpackning. Två av dessa ansåg att det endast är aktuellt vid heldags besök eller vid tillfällen då många prov tas. En person ansåg att det är bra om valmöjlighet till låda finns. Fyra av dem som svarade ja ansåg det vara ett problem att lådan måste postas på postombud/företagscenter eftersom det är tidskrävande och otillgängligt, vilket gör det dyrt och opraktiskt. Fem av dem som svarade ja på frågan rörande användbarheten av ett löstagbart frigoliteställ angav att det bör vara ett engångsställ eller vara lätt att göra ren för att säkerställa god hygien. Tre skulle inte ta med stället in i ladugården utan förvara det på en ren plats, t.ex. i mjölkrummet. De 3 som svarade vet ej ansåg det svårt att ha med sig ett ställ i en lösdrift (1 st.), att ställ är aktuellt endast vid provtagning av en hel besättning (1 st.) och att det är problem med förvaring i vissa kylskåp (1 st.). Anledningar till att 10 personer ansåg det ogenomförbart att samla prov gemensamt på arbetsplatsen var att det endast är de som utför provtagning på arbetsplatsen eller att det är opraktiskt, tidskrävande samt kommunikationskrävande. Som skäl till varför lådan kommer att undvikas om den måste postas på ett ombud/företagscenter angavs att det är för tidskrävande och dyrt eller otympligt och att postlåda är att föredra. De flesta ansåg att användbarheten av lådan kommer att påverkas negativt om den innebär en extra kostnad, dessutom ansåg 2 av de intervjuade att risken för hemodlingar kan öka om enbart låda finns

och att bra argument för att använda låda i dagsläget saknas för att motivera djurägare att betala mera för en sådan.

Tabell 9. Fördelningen av intervjusvar (n=11) på frågor om förslag på låda med uttagbart frigolitställ

Frågor	Ja	Nej	Vet ej
1. Kunde det vara praktiskt att skicka flera prov i en större förpackning, i exempelvis en låda, i förhållande till antal prov/dag?	4	6	1
- Om ja: även om det innebär att proverna måste postas hos ett o/f?	0	4	0
2. Skulle ett löstagbart frigolitställ vara användbart i ladugården samt som förvaring i bilen?	7	1	3
3. Kan ni samla prover gemensamt på arbetsplatsen och skicka iväg en hel låda istället för flera små påsar?	1	10	0
4. Lådan måste postas på ett o/f, uppleves detta som ett problem?	8	2	1
-Om ja/vet ej: skulle användbarheten av lådan påverkas negativt om den måste levereras på postens o/f?	8	0	1
5. Påverkas användbarheten av lådan negativt om den innebär en extra kostnad jämfört med SVA-påsarna?	6	1	4

o/f= ombud/företagscenter

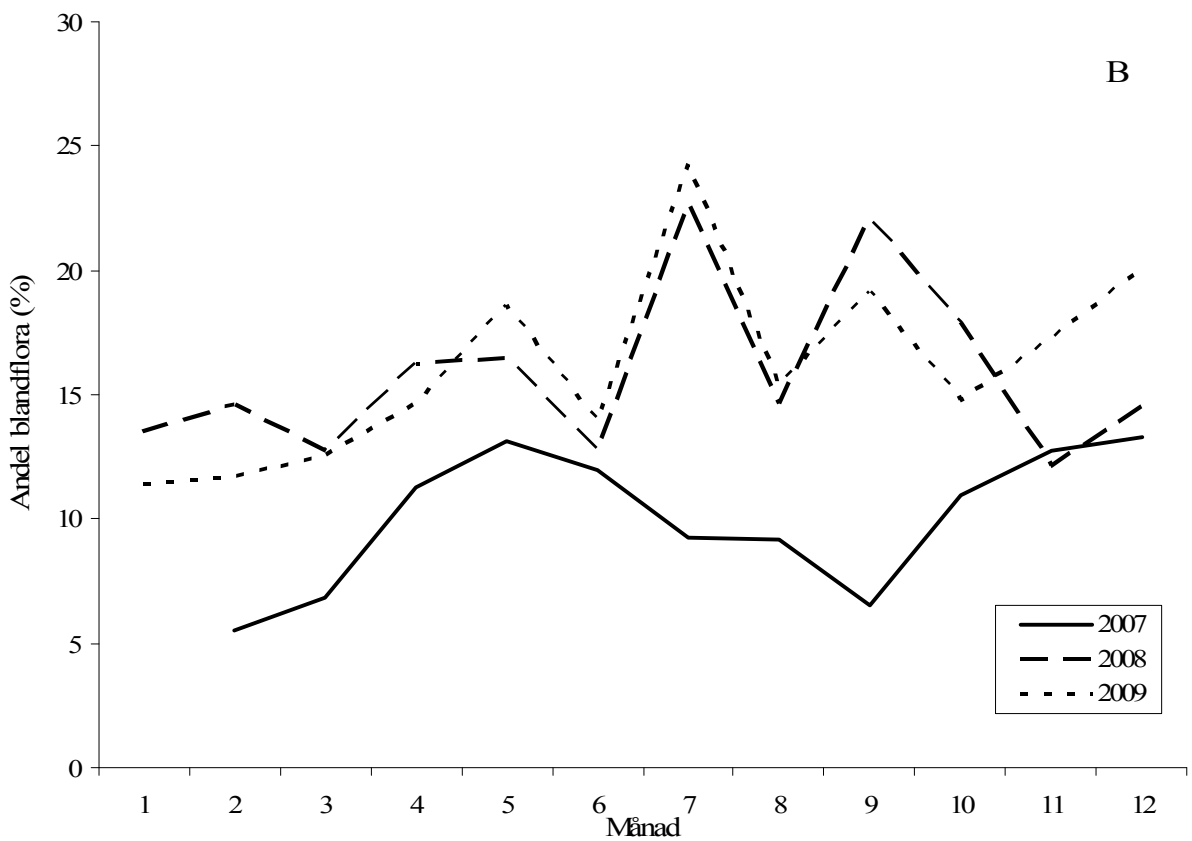
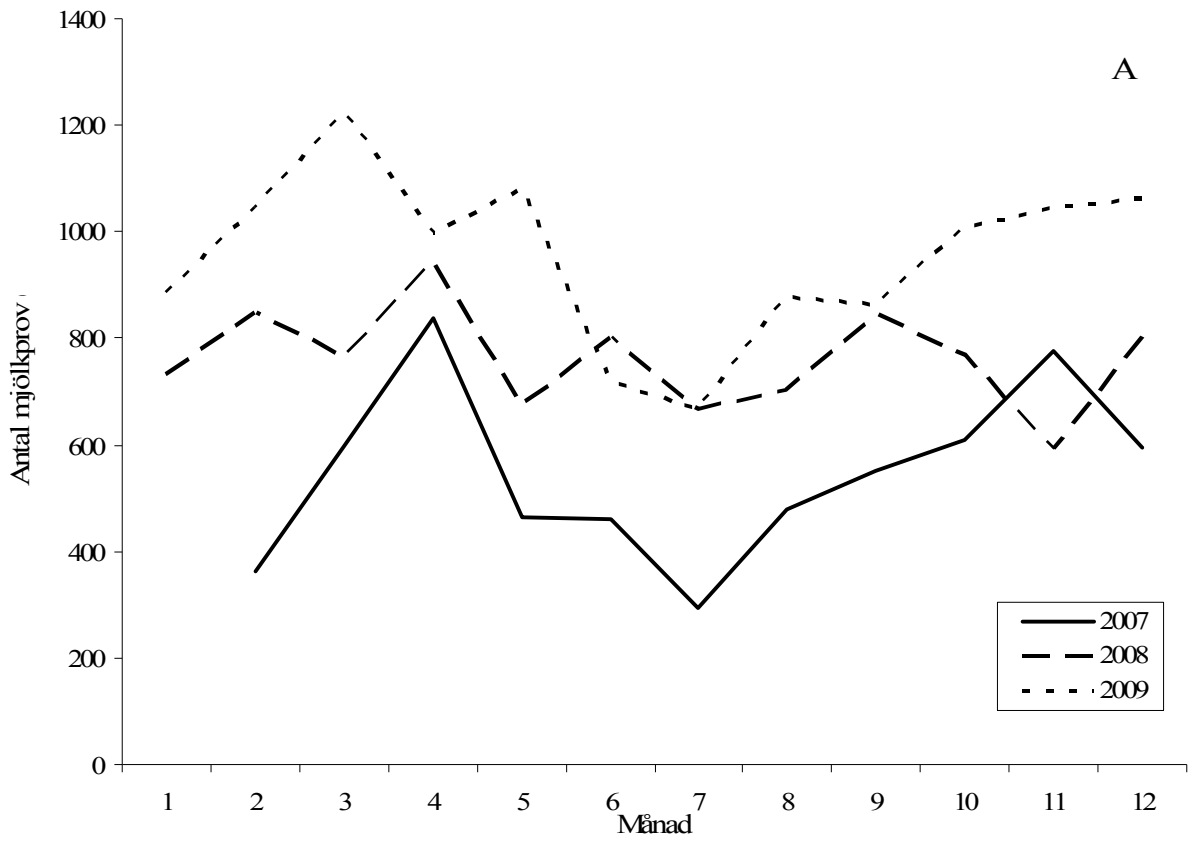
Del II Undersökning av förekomst av blandflora i mjölkprov

I Tabell 10 redovisas fördelningen av totalt antal inskickade mjölkprov 2007-2009 samt andel prov med blandflora, fördelat på prov med enbart blandflora, prov med specifik infektion i blandflora och alla prov med blandflora, av inskickade mjölkprov under samma period. Data från januari 2007 saknades dock i laboratoriejournalerna. Andelen blandflora var lägst 2007 men ungefär lika under 2008 och 2009. De flesta av rören med någon typ av blandflora tillhörde kategorin ”enbart blandflora” varför detaljerade resultat endast presenteras för denna kategori.

Tabell 10. Totalt antal inskickade mjölkprov tagna i rör under 2007-2009 samt antal och andel (%) rör med enbart blandflora (B), med specifik infektion i blandflora (SpB) samt totalt antal prov med någon typ av blandflora (B + SpB)

År	Totalt antal rör	B	SpB	B+SpB
2007	6024	623 (10)	93 (2)	716 (12)
2008	9145	1454 (16)	360 (4)	1814 (20)
2009	11475	1827 (16)	348 (3)	2175 (19)
Totalt	26644	3904 (15)	801 (3)	4705 (18)

Den månadsvisa fördelningen av antal inskickade prov samt andel prov med enbart blandflora för vardera år presenteras i Figur 4. Antalet inskickade rör (Figur 4A) varierade relativt mycket mellan månaderna under alla 3 åren men var ofta relativt lågt under sommarmånaderna. Även andelen prov med enbart blandflora (Figur 4B) varierade mellan månaderna. Variationen var likartad under 2008 och 2009 med toppar i juli och september medan fördelningen var jämnare över året under 2007.

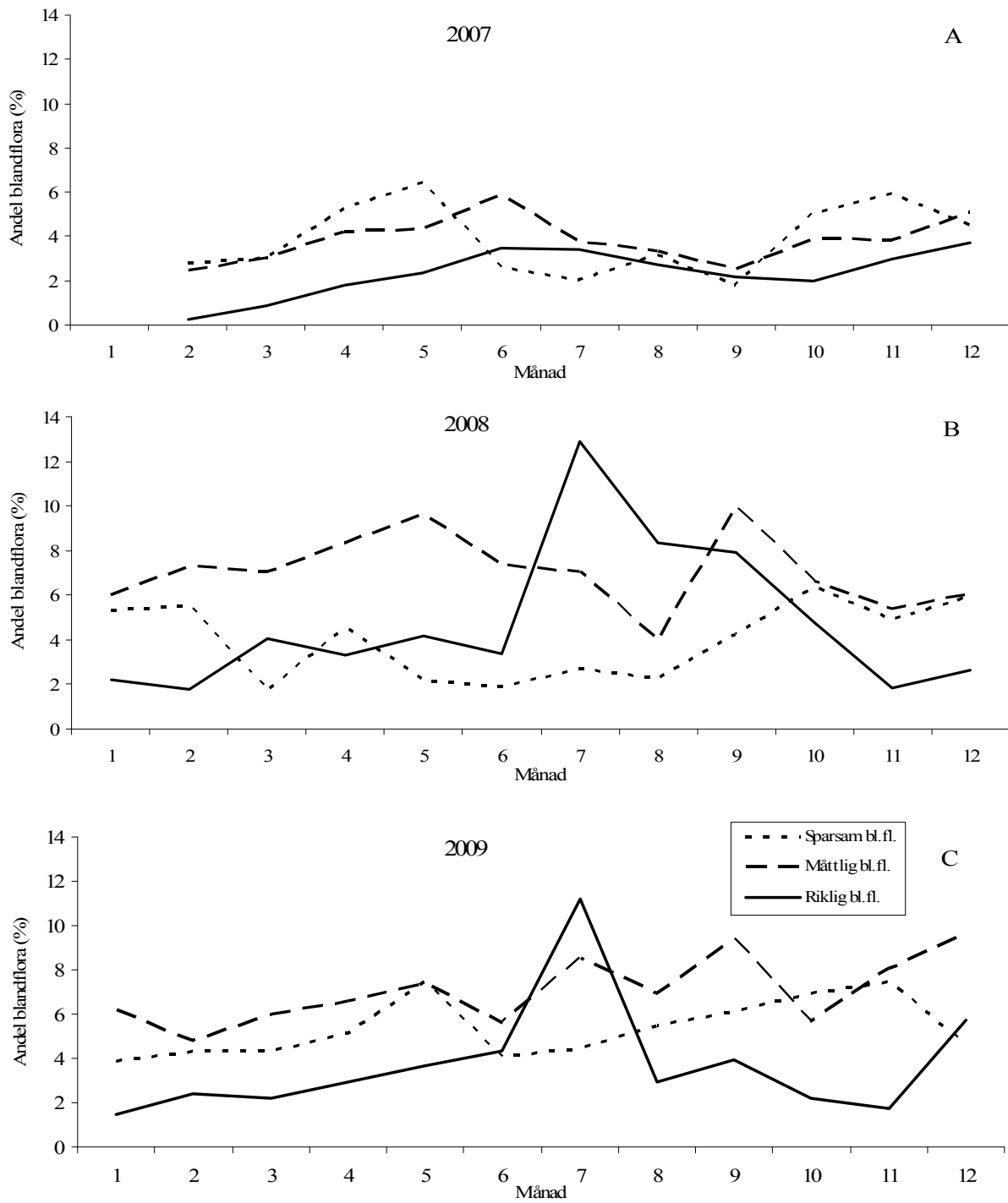


Figur 4. Antal inskickade mjölkprover i rör under 2007-2009 (A) och andel rör med enbart blandflora av alla mjölkprover under samma period (B)

I Tabell 11 redovisas antal och andel prov med sparsam, måttlig och riklig växt av enbart blandflora av alla inskickade mjölkprov för 2007-2009. Sett över hela åren var fördelningen mellan de 3 kategorierna relativt lika. Den månadsvisa fördelningen av andelen sparsam, måttlig och riklig blandflora för de 3 åren presenteras i Figur 5. Under både 2008 och 2009 visade andelen riklig växt av blandflora en tydlig topp under juli månad. I övrigt sågs relativt små variationer mellan månaderna.

Tabell 11. Antal och andel (%) prov med sparsam, måttlig och riklig växt av enbart blandflora av alla inskickade mjölkprov under 2007-2009

År	Sparsam	Måttlig	Riklig	Totalt
2007	249 (4)	234 (4)	140 (2)	623 (10)
2008	368 (4)	654 (7)	429 (5)	1454 (16)
2009	621 (5)	806 (7)	401 (4)	1827 (16)
Totalt	1238 (5)	1694 (6)	970 (4)	3902 (15)



Figur 5. Andel sparsam, måttlig och riklig växt av enbart blandflora under 2007-2009 (A-C)

Del III Laboratorieundersökning av effekt av kylning under transport på växt av blandflora i mjölkprov

Totalt genomfördes 12 försöksomgångar men omgång 1-4 exkluderades från de statistiska beräkningarna eftersom bakteriekoncentrationen före ”transport” varierade och var högre jämfört med övriga omgångar. Resultaten presenteras därför separat för omgång 1-4 respektive 5-12.

Försöksomgång 1-4 – omgivningstemperatur -10°C till -8°C

Medelvärdet (SD) för antalet bakterier före ”transport” för alla prov i försöksomgång 1-4 var 255 (82) CFU. Bakterieförekomsten efter ”transport” tenderade att vara högre i prov utan frysklamp (UF) jämfört med prov med frysklamp (MF) (Bild 3).

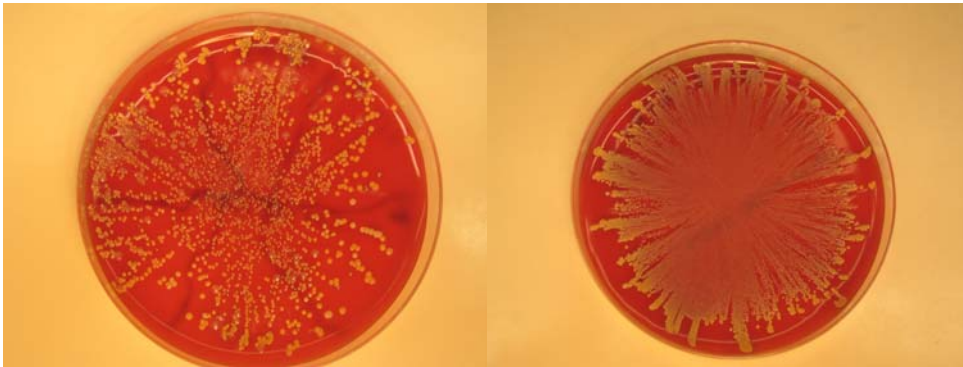


Bild 3. Exempel på bakterieförekomst (antal CFU) efter ”transport” ur försöksomgång 1-4 med frysklamp (plattan till vänster i figur) respektive utan frysklamp (plattan till höger i figur) Foto: Karin Wallin

Försöksomgång 5-12 – omgivningstemperatur +6°C till 8°C och +21°C till 22°C

Det fanns inga signifikanta skillnader i bakterieväxt före ”transport” mellan MF och UF, stort och litet antal, löst och fixerat eller mellan temperatur +6-8° och +21-22°C. Medelvärdet (SD) för alla prov före ”transport” var 55,5 (22) CFU.

I Tabell 12 redovisas bakterieförekomst efter ”transport” för alla prov med och utan frysklamp för omgivningstemperatur +6-8°C samt +21-22°C. Bakterieantalet var signifikant ($p < 0,001$) lägre i gruppen MF jämfört med UF.

Tabell 12. Bakterieförekomst (median samt min-max för antal colony-forming units (CFU) samt bakteriekategori 1-5) efter simulerad transport med (MF) och utan (UF) frysklamp under två olika omgivningstemperaturer

Temperatur	MF (n=16/temperatur)		UF(n=16/temperatur)		Totalt	
	CFU	Kategori	CFU	Kategori	CFU	Kategori
+6-8°C	536 (71;>1200)	2,5 (1-4)	>1200 (>1200;>1200)	5 (5-5)	>1200 (71;>1200)	4,5 (1-5)
+21-22°C	646/>1200* (197;>1200)	3 (2-4)	>1200 (>1200;>1200)	5 (5-5)	>1200 (646;>1200)	4,5 (2-5)
Totalt	678 (71;>1200)	2,5 (1-4)	>1200 (>1200;>1200)	5 (5-5)	-	-

*Ej möjligt att beräkna exakt median

Eftersom samtliga prov efter ”transport” UF hade samma bakterieväxt (≥ 1200 CFU, matta) gjordes jämförelser av bakterieväxt under övriga betingelser endast för prov MF.

Bakterieförekomsten efter ”transport” för olika antal prov per förpackning och olika förvaringssätt i förpackningen under olika temperatur presenteras i Tabell 13 respektive Tabell 14. Bakterieantalet var signifikant ($p=0,029$) högre vid stort antal rör i förpackningen jämfört med litet antal rör samt signifikant högre ($p=0,029$) om provrören låg löst i förpackningen jämfört med om provrören fixerats. Det fanns dock ingen signifikant skillnad ($p=0,472$) i bakterieförekomst mellan temperaturerna +6-8°C och +21-22°C (data ej presenterat).

Tabell 13. Bakterieförekomst (median samt min-max för antal colony-forming units (CFU) samt bakteriekategori 1-5) efter simulerad transport med frysklamp under två olika omgivningstemperaturer (n=16/temperatur) med litet respektive stort antal provrör per förpackning (n=16/grupp)

Temperatur	Stort		Litet		Totalt	
	CFU	Kategori	CFU	Kategori	CFU	Kategori
+6-8°C	996/>1200* (289;>1200)	3,5 (2-4)	206 (71;>1200)	2 (1-4)	536 (71;>1200)	2,5 (1-4)
+21-22°C	>1200 (449;>1200)	4 (2-4)	443 (197;>1200)	2 (2-4)	646/>1200* (197;>1200)	3,5 (2-4)
Totalt	>1200 (289;>1200)	4 (2-4)	306 (71;>1200)	2 (1-4)	-	-

*Ej möjligt att beräkna exakt median

Tabell 14. Bakterieförekomst (median samt min-max för antal colony-forming units(CFU) samt bakteriekategori 1-5) efter simulerad transport med frysklamp under två olika omgivningstemperaturer (n=16/temperatur) med provförvaring löst respektive fixerat i förpackningen (n=16/grupp)

Temperatur	Löst		Fixerat		Totalt	
	CFU	Kategori	CFU	Kategori	CFU	Kategori
+6-8°C	996/>1200* (204;>1200)	3,5 (2-4)	270 (71;>1200)	2 (1-4)	536 (71;>1200)	2,5 (1-4)
+21-22°C	>1200 (378;>1200)	4 (2-4)	472 (197;>1200)	2 (2-4)	646/>1200* (197;>1200)	3,5 (2-4)
Totalt	>1200 (204;>1200)	4 (2-4)	363 (71;>1200)	2 (1-4)	-	-

*Ej möjligt att beräkna exakt median

Bakterieförekomsten efter ”transport” var likartad för prov med blandflora A och prov med blandflora B oavsett betingelser och omgång.

Diskussion

Attityder och rutiner rörande provhantering bland intervjuade provtagare

Samtliga provtagare var väl medvetna om att god hygien vid provtagning är ytterst viktigt för korrekt bakteriologisk diagnos vilket i huvudsak motiverades med att eventuella föroreningar i provet kan växa till och maskera juverpatogener och att omprov ofta krävs vid växt av blandflora. Sammantaget ansåg provtagarna också att det är viktigt att proverna postas samma dag som provtagning då nästan samtliga var väl medvetna om att snabb transport av prover till laboratoriet är viktigt för att undgå tillväxt av eventuella föroreningar eller avdödning av bakterier under transport vilket är i enlighet med nuvarande rekommendationer (Hogan *et al.* 1999; Oliver *et al.* (2004); Internet: SVA, 2010).

Däremot hade nästan ingen av de intervjuade några fasta rutiner för kylning av prover efter provtagning, utan deras rutiner påverkades i hög grad av årstid och yttertemperatur se Tabell 7 sidan 29. Samtliga angav att de ändrade rutiner vid varmt väder för att undvika att proven utsätts för höga temperaturer.

Drygt hälften av de intervjuade kyler sina prover någon gång under hanteringen varav majoriteten då använder sig av frysklapp. Drygt hälften ansåg att kyltransport av prover till laboratoriet är lika viktigt som aseptisk provtagningsteknik, dock ansåg majoriteten av personerna att detta endast var fallet vid varmt väder eller när proverna inte kommer fram till laboratoriet inom normal tid (det vill säga dagen efter postning) vilket förklarar varför kylning oftast utförs endast under sommaren. Dessutom angav drygt en tredjedel att kylning hela vägen från fält till laboratoriet inte fungerar i dagsläget av praktiska skäl.

Yttertemperatur/årstid verkar därmed vara en faktor av stor betydelse för hur mjölkprov hanteras och transporteras. Detta är inte i enlighet med rekommendationer (Hogan *et al.* 1999; Oliver *et al.* 2004; Internet: SVA, 2010) som förespråkar konsekvent och snabb nedkylning omedelbart efter provtagning fram till laboratoriet oavsett yttertemperatur eller årstid.

Få av de intervjuade frös prover eller rekommenderade detta till besättningar och i så fall enbart vid tillfällen då prov inte kunde skickas till laboratoriet samma dag som provtagningen. Mastitlaboratoriet, SVA, (Internet: SVA, 2010) rekommenderar inte frysning av mjölkprov innan odling eftersom oenighet finns mellan studier om vilken effekt frysning har på olika

bakteriearter i mjölkprov (Schukken *et al.* 1989; Villanueva *et al.* 1991; Murdough *et al.* 1996; Oliver *et al.* 1999; Sol *et al.* 2002, Bexiga *et al.* 2011a.).

Några av de intervjuade angav även att yttertemperatur till viss del styr tidpunkt för postning så att tiden på postlåda minimeras vid varmt väder men få angav detta även vid frysgrader.

Samtliga av de intervjuade utförde själva provtagningen men många angav att det dessutom fanns besättningar som själva utförde provtagningen och att de ansåg att detta överlag fungerar bra. Majoriteten av de intervjuade kände dock inte till hur gården hanterade eller förpackade proverna. Detta tyder på att det kanske inte är tillräckligt att enbart rikta sig till veterinärer och tekniker med förbättrade instruktioner och råd utan även direkt till sådana besättningar för att på det viset öka förståelse och kunskap om vikten av optimal hantering och transport av prov för möjlighet till korrekt bedömning på laboratoriet.

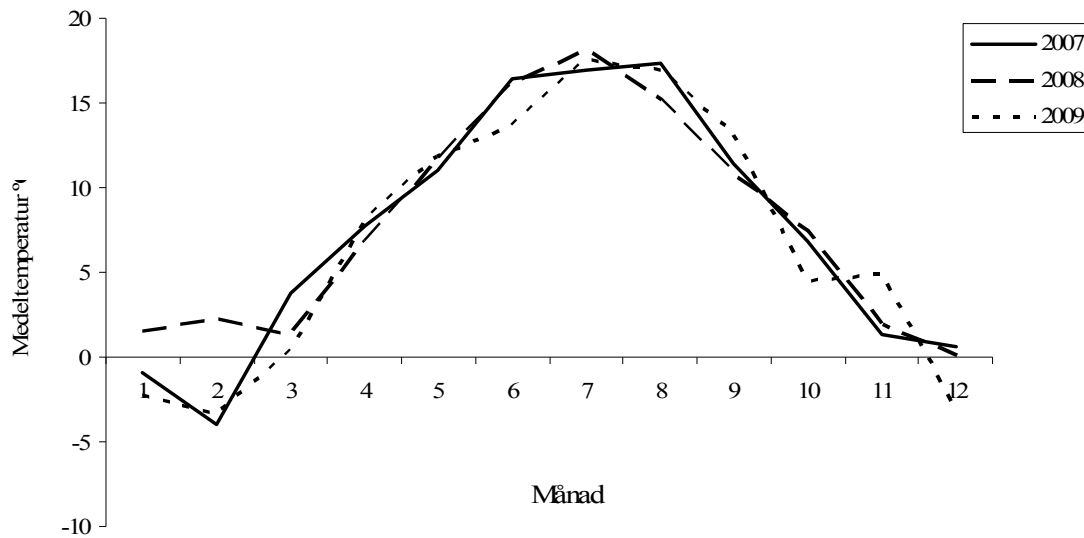
Betydelse av årstid på förekomst av blandflora

Resultaten från denna studie tyder på att andelen blandflora varierar över året oavsett årstid. Möjligen finns dock en antydning till att förekomst av riklig blandflora är något vanligare under juli månad. Detta stämmer delvis med en studie gjord i Wisconsin, USA där förekomst av blandflora var högre under sommaren jämfört med under vinter och vår (Makovec & Ruegg, 2003).

Att fördelningen av blandflora över året är något jämnare under 2007 jämfört med 2008 och 2009 kan ha många anledningar. Det skulle till exempel kunna bero på skillnader i yttertemperatur mellan åren men så verkar inte ha varit fallet om man utgår från den månadsvisa medeltemperaturen i Uppsala mellan 2007-2009 (Figur 6). Eftersom de flesta prover kommer från mellersta Sverige bör medeltemperaturen i Uppsala vara någorlunda representativ för vilken temperatur proverna utsatts för.

Sammantaget talar årsvariationen i förekomst av blandflora för att årstid eller yttertemperatur inte har någon stor betydelse. Den viktigaste anledningen till förekomst av blandflora är troligen icke-aseptisk provtagning och därefter en olämplig hantering som tillåter föroreningsfloran att växa till. Möjligen har provtagning och hantering av mjölkprov varit bättre under 2007 jämfört med 2008 och 2009 men andelen prov som skickats in kylda var låg

under hela perioden. Det har heller inte gjorts någon ändring i laboratoriets rutiner som kan ha påverkat fördelningen av blandflora mellan åren.



Figur 6. Medeltemperaturen (°C) i Uppsala under 2007-2009, data sammanställt från Sveriges Meteorologiska och Hydrologiska Institut, SMHI, i samarbete med Naturvårdsverket (2011)

Effekt av kyltransport på mjölkprov

Resultaten från laboratorieundersökningen visade att bakterieantalet efter ”transport” var signifikant lägre med frysklamp jämfört med utan frysklamp oavsett simulerad omgivningstemperatur. Dessutom verkade ungefär samma grad av tillväxt ske utan frysklamp oavsett simulerad omgivningstemperatur. Detta stödjer ovan nämnda konklusion att förekomst av blandflora inte påverkas betydligt av yttertemperatur och visar att kylning behövs hela vägen från fält till laboratoriet oavsett årstid för att reducera tillväxt av blandflora.

Prover med blandflora är mycket svårtolkade och det finns även risk att provet felaktigt bedöms som renkultur eller patogen i blandflora eftersom vissa bakteriearter tenderar att växa till fortare än andra. I laboriestudien var detta tydligare ju högre bakteriekoncentrationen före ”transport” var. Efter simulerad transport utan frysklamp dominerade *Enterobacter cloacae* kraftigt i blandflora A. Ett liknande mönster sågs i prover med blandflora B men där dominerades växt av endera av de två KNS-arterna (*Enterobacter cloacae* ingick inte i denna

blandflora). Vid högre startkoncentration av bakterierna (försöksomgång 1-4) tenderade den gula KNS-arten att dominera medan bägge förekom som dominant species vid lägre startkoncentration (försöksomgång 5-12). Resultaten är i linje med opublicerade data från Thorberg *et al.* (2009) som visade att vissa KNS-arter har förmåga att växa till snabbt och oftare isolerades i renkultur från prov där kyltransporten till laboratoriet ej varit optimal. I Tabell 15 framgår det tydligt att risk för felbedömning av en ursprunglig blandflora som en potentiell renkultur eller patogen i blandflora ökar betydligt om provet transporteras utan frysklamp. Risken för felbedömning påverkas dock av hur erfaren den person som bedömer provet är och av laboratoriets rutiner. Om personalen är erfaren är det troligt att växt av flera olika bakteriearter skulle upptäckas varför risken för felbedömning minskar.

Tabell 15. Möjlig risk för felbedömning av ursprunglig blandflora som renkultur eller patogen i blandflora efter "transport" med (MF) och utan (UF) frysklamp (försöksomgång 1-12). Risk för felbedömning definieras som växt av ≤ 3 bakteriearter varav en tydligt dominerar

Risk för felbedömning	MF	UF	Totalt
Ja	0	32	32
Nej	48	16	64
Totalt	48	48	96

Sammanfattningsvis visar resultaten att kylning krävs under hela vägen från provtagning till laboratoriet för att hämma tillväxt av blandflora oavsett yttertemperatur och typ av blandflora. Detta är i enlighet med nuvarande rekommendationer om kylning av prov (Hogan *et al.* 1999; Oliver *et al.* 2004; Internet: SVA, 2010).

Praktiska begränsningar för kylning i fält

För att kylning av mjölkprover ska fungera hela vägen från gård till laboratorium krävs system som är praktiskt möjliga att använda i fält. Eftersom det enligt intervjuundersökningen var vanligt att en provtagare växlar mellan att posta proverna direkt från bilen eller att ta med sig proverna tillbaka till arbetsplatsen innan postning måste kylhanteringen av proverna fungera både i bilen och på arbetsplatsen.

De intervjuade provtagarna var eniga om att det måste vara möjligt att posta förpackning med kylsystem på postlåda då nästan samtliga enbart använder postlåda vid postning av prover. De

viktigaste skälen till detta var att användning av postlåda är betydligt smidigare, mer tillgängligt, mer tidseffektivt och att provtagarna hinner posta proverna innan tömning jämfört med postens ombud/företagscenter. Detta är därför en viktig aspekt att tänka på vid utformandet av praktiskt fungerande kylsystem. Förslaget att använda kyld transportlåda med uttagbart frigolitställ fallerade i huvudsak på att den, på grund av sin storlek, inte kan postas i postlåda utan måste postas via ett ombud/företagscenter. Hade detta inte varit fallet angav dock majoriteten att kyllåda kunde vara mer praktisk vid tillfällen då många prov tas.

De intervjuade ansåg att förslaget att lägga i en frysklapp i de nuvarande SVA-påsarna för att kyltransportera proverna till laboratoriet har både för- och nackdelar. De flesta angav att de hade möjlighet att förvara flera SVA-påsar och frysklappar på arbetsplatsen och i en kylväska eller liknande i bilen men drygt hälften såg problem med hantering av frysklappar bland annat på grund av att de är tunga, skrymmande, innebär en extra kostnad samt att det kan finnas svårigheter med att organisera daglig upphämtning och att hålla dem frysta i bilen under dagen. Om användandet av frysklapp dessutom skulle innebära att proverna måste postas via ett ombud/företagscenter upplevde majoriteten detta som ett problem där konsekvensen skulle kunna bli att proverna ej kan postas samma dag som provtagning eller att frysklapp ej skulle användas.

Att förpackningen blir tillräckligt liten och tunn för att kunna postas i postlåda liksom att den är smidig att använda och ha med sig i bilen och att den även kan kyla effektivt direkt efter provtagning är därför viktiga aspekter som bör beaktas vid utformandet av ett praktiskt gångbart kylsystem med frysklapp. Dessutom visade resultaten från laboratorieundersökningen att proverna bör placeras fixerade hellre än löst i förpackningen samt att kyleffekten blir bättre om man har färre rör i förpackningen för att få bästa resultat varför man även bör ta hänsyn till dessa aspekter vid utformning av nya system för transport av mjölkprov.

För och nackdelar med använda undersökningsmetoder

För intervjuundersökningen valdes de intervjuade ut på bakgrund av att de skickar in flest mjölkprov tagna i rör till Mastitlaboratoriet, SVA, och att deras rutiner därför var mest intressant att undersöka. Dessa personer får därför anses vara representativa för provtagare som skickar in många prov till laboratoriet men kanske inte för alla provtagare som skickar prov till laboratoriet. De kan inte heller anses vara ett representativt urval av alla provtagare i

landet som skickar prov till laboratorier. På grund av begränsningar i arbetets omfattning genomfördes dock inte fler intervjuer vilket annars skulle ha gett en säkrare bild av hur hantering och transport av mjölkprov går till i landet. Valet av intervjumetod, det vill säga telefonintervju, gjordes baserat på att telefonintervju brukar ge hög svarsfrekvens, det går relativt snabbt att samla ihop mycket information samt att sannolikheten är stor att de som intervjuas förstår frågan som ställs. Risken att en del frågor kan ha tolkats fel eller olika kvarstår dock liksom det faktum att det inte finns något sätt att kontrollera att det som personerna angett faktiskt stämmer med verkligheten. Dessutom kan de intervjuade ha olika definition på samma uttryck, till exempel kan definitionen för vad ”varmt väder” innebära skilja mellan de intervjuade. Dessa osäkerhetsfaktorer kan till viss del ha inverkat på resultatet av intervjun.

Laboratoriestudien hade också en del begränsningar och möjliga avvikelser från den verkliga situationen. Till exempel är det möjligt att bakteriekoncentrationen före ”transport” var något för hög jämfört med i verkligheten. Dessutom simulerades transporten endast under ett fåtal ”yttertemperaturer” under en bestämd tid och med endast två olika typer av blandfloror. Det hade varit mer optimalt om effekten av lägre bakteriekoncentration från start, fler ”yttertemperaturer”, tidsaspekter och typer av blandfloror kunde ha studerats. Effekten av fler ”postlagringstemperaturer” än rumstemperatur under olika tidsaspekter kunde också ha studerats. Det hade även varit önskvärt att antalet CFU efter ”transport” kunde bestämts mer exakt för alla prov genom att göra spädningsserier av provet när bakterieantalet var högt. Tidsmässiga och ekonomiska aspekter satte dock begränsningar för omfattningen av studien varför det inte var möjligt att göra mer detaljerade studier.

Konkluderande råd rörande transport av mjölkprov

Det övergripande syftet var att optimera råden rörande transport av mjölkprov från fältet till laboratoriet för att förbättra möjligheterna till korrekt bakteriologisk diagnos. Genom intervjuundersökningen framgick det att nuvarande råd om kyltransport vid hantering och transport av mjölkprov efterföljs dåligt då kyltransport av prover endast anses viktigt vid varmt väder/under sommaren samt i övrigt undviks av praktiska skäl. Uppfattningen om att risken för tillväxt av blandflora enbart är hög under sommaren stöds dock inte av resultaten i den här studien. Resultaten visade att andelen blandflora tenderar att variera över året och växten av blandflora påverkades inte av ändringar i simulerad yttertemperatur. Dessutom var

bakterieantalen efter simulerad transport signifikant lägre med frysklamp jämfört med utan frysklamp vilket stödjer nuvarande råd rörande kyltransport från fält till laboratorium.

Nuvarande råd rörande transport av mjölkprov kan dock förtydligas genom att provtagare bör göras mer uppmärksamma på att adekvat kylning efter provtagning fram till laboratoriet är viktig för korrekt bakteriologisk diagnostik oavsett årstid och yttertemperatur eftersom risk för att föroreningsbakterier kontaminerat prov alltid finns trots aseptisk provtagningsteknik. Dessutom bör de informeras om att olämplig provhantering kan leda till avdödning av bakterier och/eller okontrollerad tillväxt av potentiella föroreningsbakterier vilket kan leda till falskt negativa/positiva prov eller blandflora. Detta kunde till exempel genomföras med hjälp av en informationskampanj där alla typer av provtagare, veterinärer såväl som djurägare är målgruppen.

Likaså bör förslag på praktiskt användbara kylsystem som möjliggör postning i postlåda tas fram för att underlätta att råden följs. Ett optimalt kylsystem ska kunna användas hela vägen från provtagning till laboratoriet. De nuvarande SVA-påsarna tillsammans med en relativt tunn och effektiv frysklamp är en möjlig lösning. Det är också viktigt att hitta praktiska lösningar för hur frysklampor enkelt kan förvaras i bilen. Resultaten från studien visade också att risken för tillväxt av blandflora är lägre om provantalet inte är så stort och om proven fixeras i förpackningen. Därför bör råd även utarbetas rörande maximalt antal provrör per förpackning samt hur proverna kan fixeras i förpackningen så att frysklampen får bästa effekt utan att proverna riskerar att frysas så att den ursprungliga sammansättningen av bakterier i provet bevaras hela vägen till laboratoriet.

Referenslista

Artursson, K., Nilsson-Öst, M. & Persson Waller, K.(2010): An improved method to culture *Staphylococcus aureus* from bovine milk. *Journal of Dairy Science*. Vol.93, Nr.4, pp.1534-1538.

Bexiga, R., Koskinen, M. T., Holopainen, J., Carneiro, C., Pereira, H., Ellis, K. A. & Vilela, C. L. (2011a): Diagnosis of intramammary infection in samples yielding negative results or minor pathogens in conventional bacterial culturing. *Journal of Dairy Research*. Vol 78, pp. 49-55.

Bexiga, R., Pereira, H., Pereira, O., Leitão, A., Carneiro, C., Ellis, K. A. & Vilela, C. L. (2011b): Observed reduction in recovery of *Corynebacterium* spp. from bovine milk samples by use of teat cannula. *Journal of Dairy Research*. Vol 78, pp. 9-14.

Bradley, A. J. (2002): Bovine Mastitis: An Evolving Disease. *Veterinary Journal*. Vol.164, pp. 116-128.

Bradley, A. J., Leach K. A., Breen, J. E., Green, L. E. & Green, M. J. (2007): Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. *The Veterinary Record*. Vol.160, pp. 253-258.

Ericsson Unnerstad, H., Lindberg, A., Persson Waller, K., Ekman, T., Artursson, K., Nilsson-Öst, M. & Bengtsson, B. (2009): Microbial aetiology of acute clinical mastitis and agent-specific risk factors. *Veterinary Microbiology*. Vol. 137, pp. 90-97.

Godden, S., Jansen, J.T., Lesile, K.E., Smart, N.L.& Kelton, D.F. (2002): The effect of sampling time and sample handling on the detection of *Staphylococcus aureus* in milk from quarters with subclinical mastitis. *Canadian Veterinary Journal*. Vol.43, pp. 38-42.

Hicks, C.R., Eberhart R.J. & Sischo, W.M. (1994): Comparison of microbiologic culture, an enzyme-linked immunosorbent assay, and determination of somatic cell count for diagnosing *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cows. *Journal of American Veterinary Medical Association*. Vol. 204, No.2, pp.255-260.

Hogan, J. S., González, R. N., Harmon, R. J., Nickerson, S. C., Oliver, S. P., Pankey, J. W. & Smith K. L. (1999): *Laboratory Handbook on Bovine Mastitis*. Reviderad utgåva. NMC, Madison, Wisconsin, USA.

Jansson-Mörk, M. & Hallén-Sandgren, C. (2010): Celltal i olika besättningstyper. *Veterinärkongressen 2010*.

Koivula, M., Pitkälä, A., Pyörälä, S. & Mäntysaari, E. A. (2007): Distribution of bacteria and seasonal and regional effects in a new database for mastitis in Finland. *Acta Agriculturae Scandinavica. Section A*. Vol.57, pp. 89-96.

Kossaibati, M.A. & Esslemont, R.J. (1997): The cost of production diseases in dairy herds in England. *The Veterinary Journal*. Vol. 154, pp. 41-51.

Makovec, J. A. & Ruegg P. L. (2003): Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001. *Journal of Dairy Science*. Vol.86, pp. 3466-3472.

Murdough, P. A., Deitz, K. E. & Pankey J.W. (1996): Effects of freezing on the viability of nine pathogens from quarters with subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science*. Vol.79, pp. 334-336.

Oliver, S.P., González, R.N., Hogan, J.S., Jayarao, B.M. & Owens, W.E. (2004): *Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infection and Determination of Milk Quality*. NMC, Verona, Wisconsin, USA.

Persson, Y., Nyman, A.-K. & Grönlund Andersson, U (2011): Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden. *Acta Veterinaria Scandinavica*, submitted.

Quinn, P.J., Markey, B. K., Carter, M E., Donnelly, W. J. & Leonard, F. C. (2002): *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Blackwell Science, Oxford, UK.

Radostits, O. M., Gay C. C., Hinchcliff, K. W. & Constable P. D. (2007): *Veterinary Medicine*. Utgåva 10. Saunders Elsevier, Edinburgh, UK.

Sandholm, M., Honkanen-Buzalski, T., Kaartinen & L., Pyörälä, S. (1995): *The Bovine Udder and Mastitis*. University of Helsinki, Faculty of Veterinary Medicine, Helsinki, Finland.

Schukken, Y. H., Smit, J. A. H., Grommers, F. J., Vandegeer, D. & Brand, A. (1989): Effect of freezing on bacteriologic culturing of mastitis milk samples. *Journal of Dairy Science*. Vol. 72, pp. 1900-1906.

Sears, P. M., Smith, P. B., English, P. B., Herer, P. S. & Gonzalez R. N. (1990): Shedding pattern of *Staphylococcus aureus* from Bovine Intramammary Infections. *Journal of Dairy Science*. Vol. 73, pp. 2785-2789.

Sol, J., Sampimon, O.C., Hartman, E. & Barkema H.W. (2002): Effect of preculture freezing and incubation on bacteriological isolation from subclinical mastitis samples. *Veterinary Microbiology*. Vol. 85, pp. 241-249.

Taponen, S., Salmikivi, L., Simojoki, H., Koskinen, M. T. & Pylörälä, S. (2009): Real-time polymerase chain reaction of bacteria in milk samples from bovine clinical mastitis with no growth in conventional culturing. *Journal of Dairy Science*. Vol. 92, No. 6, pp. 2610-2617.

Thorberg, B.-M., Danielsson-Tham, M-L., Emanuelson, U. & Persson Waller, K. (2009): Bovine subclinical mastitis caused by different types of coagulase-negative staphylococci. *Journal of Dairy Science*. Vol. 92, pp. 4962-4970.

Valde, J. P., Lawson, L. G., Lindberg, A., Agger, J. F., Saloniemi, H. & Österås, O. (2004): Cumulative risk of bovine mastitis treatments in Denmark, Finland, Norway and Sweden. *Acta Veterinaria Scandinavia*. Vol. 45 No. 3/4, pp. 201-210.

Villanueva, M. R., Tyler, J. W., & Thurmond, M. C. (1991): Recovery of *Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus* from fresh and frozen bovine milk. *Journal of the American Veterinary Medicine Association*. Vol. 198, No.8, pp. 1398-1400.

Internet:

Statens Veterinärmedicinska Anstalt, SVA (2010): Undersökningar och produkter: Bakteriologi: Mastitdiagnostik. Provtagning mjölkkrör. Hemsida (2010-05-20): *Instruktion för provtagning vid klinisk mastit*, [online]. Tillgänglig http://www.sva.se/sv/navigera/tjanster_produkter/Bakteriologi/Mastit/Provtagning-mjolkror/ [2011-03-17]

Statens Veterinärmedicinska Anstalt, SVA (2011): Undersökningar och produkter: Bakteriologi: Mastitdiagnostik. Hemsida (2011-01-25): *Mastitdiagnostik*, [online] Tillgänglig http://www.sva.se/sv/navigera/tjanster_produkter/Bakteriologi/Mastit/ [2011-03-18]

Svensk Mjolk. Mjölkgården. Djurhälsovård 2009/2010. Hemsida. (2011): *Redogörelse för husdjursorganisationens Djurhälsovård 2009/2010*. [online] Tillgänglig: http://www.svenskmjolk.se/Global/Dokument/Dokumentarkiv/Statistik/Redogorelse%20for%20husdjursorganisationens%20djurhalsovard%202009_2010.pdf [2011-02-18]

Sveriges meteorologiska och hydrologiska institut, SMHI, (2011). [online] Tillgänglig: <http://www.smhi.se/klimatdata/meteorologi/ars-och-manadsstatistik-1.7378> [2010-03-10]
På Internetsidan har sedan dokument från varje månad för åren 2007-2009 valts ut och månadsmedeltemperatur- och min- resp. maximummedeltemperaturvärden för Uppsala noterades. Exempelvis dokument för december 2009 [online] Tillgänglig: http://data.smhi.se/met/climate/time_series/month/vov_pdf/SMHI_vov_temperature_wind_dec09.pdf [2010-03-10]

Uppsala 2/11 2010

Hej!

Jag heter Karin Wallin och är en veterinärstudent som gör mitt examensarbete på SVA där mina handledare är Karin Persson Waller och Susanne André. Examensarbetet går ut på att förbättra rådgivningen rörande insändning av mjölkprov i rör från fältet till laboratoriet.

För att kunna förbättra rådgivningen behöver vi intervjua vana provtagare angående deras rutiner vid praktisk hantering av mjölkprov. Du är utvald på bakgrund av att du skickar in många mjölkprov till SVA:s mastitlab.

Vår förhoppning är att du är beredd att ställa upp på en telefonintervju om cirka 20-30 min under mitten av november. Ersättning i form av befintlig timersättning utlovas vid deltagande i intervjun. Jag hör av mig per telefon under nästa vecka (v.45-46) för att om möjligt bestämma tid för intervjun. Om du vet att du endast kan nå vissa tider under nästa vecka, är du välkommen att höra av dig angående vilka tider vi kan nå dig.

Om annan personal än du själv utför provtagningen på er station, vore vi mycket tacksamma om du ville vidarebefordra brevet till en av provtagarna och meddela oss detta.

Alla personer som intervjuas kommer att vara anonyma i den skriftliga framställningen av examensarbetet.

Vi tackar på förhand för att ni ger er tid åt undersökningen, det betyder mycket för examensarbetet och för den vidare utvecklingen av råd rörande transport av mjölkprover.

Med Vänliga Hälsningar



.....
Karin Wallin
Veterinärstudent åk 6
E-post: kwallin@dsv.life.ku.dk
Tfn: 073-927 00 23

Vid behov kan du även kontakta:
Karin Persson Waller, statsveterinär
SVA, Enheten för djurhälsa och
antibiotikafrågor
E-post: karin.persson-waller@sva.se
018-674000

Susanne André, BMA, sektionschef
mastitlab
SVA, Enheten för bakteriologi
E-post: susanne.andre@sva.se
Tfn: 018-674000

Intervjufrågor

Central fråga, som den intervjuade pratar fritt ifrån;

– **Vad händer vanligtvis med mjölkprover tagna i rör, från det att du skruvat på korken, tills dess de levereras till posten? –**

1. Hur många gårdar per vecka tar du mjölkprov från i medeltal? (1-5, 6-10, 11-15, 16-20, varierar; lägst/högst)

1.1 Hur många gårdar på en dag tar du mjölkprov från i medeltal? (1-5, 6-10, 11-15, 16-20, varierar; lägst/högst)

1.2 Tar mjölkprover alla veckodagar? (ja, nej, må, ti, ons, to, fre)

Om NEJ: **Vilka veckodagar tar du prov och varför?**

1.3 Hur många prover vid ett besättningsbesök tar du i medeltal? (1 tillfälle = en gård) (1-5, 6-10, 11-15, 16-20, 21-30 varierar; lägst/högst)

2. Från provtagningsplats till bilen

2.1 Hur förvaras mjölkproven i ladugården, dvs. mellan ko och bil? (ställ för mjölkkrör, väska, påse, låda, ingen uttänkt förvaring/i fickan, annat)

Om kylväska/box - Beskriv; (isolerad kylväska/box i hårdplast med en eller flera frysklampor i, eldriven kylväska/box i hårdplast)

2.2 Hur lång tid brukar det ta från det att du börjar ta prov till dess du kör från gården? (<30min, 31-60min, 61-90 min, 91-120min, annan tid, varierar: lägst/högst)

2.3 Tar du alltid med dig proverna från gården? (ja (gå direkt till punkt 3), nej, varierar)

Om nej/varierar: **Vet du om, och iså fall vad, gården har för rutiner för hantering av mjölkproverna du lämnat?** (nej, vet ej, ja)

Om JA; **Hur ser rutinerna ut;**

Hur förvaras de på gården (kylskåp, rumstemperatur, vet ej, annat)?

2.3.1 Hur är proverna förpackade när de ska skickas? (Stor SVA påse, liten SVA påse, låda/kartong, annat).

Samt hur är mjölkkrören placerade i ytterförpackningen? (Ingen speciell förpackning av proverna innan ner i SVA påse, i en plastpåse, med frysklamp, annat.)

2.3.2 När levereras proverna till posten, i förhållande till provtagningen? (samma dag som de togs, efter varje provtagningsplats, beror på/olika)

2.3.3 Var postat proverna? (postlåda, postens ombud/företagscenter, antingen postlåda eller ombud, annat)

2.3.4 Vet du att proverna går iväg samma dag som de levereras? Jämför tömningstider för låda/tid för hämtning av paket hos postens ombud eller företagscenter. (ja, nej, vet ej)

** Fråga 2.4 och 2.41. ställdes i efterhand, då frågan uppkom efter att de flesta blivit intervjuade:*

2.4 Tar djurägarna själva prover och skickar in, och i så fall, hur många gårdar gör detta, vad är anledningen, fungerar det bra eller dåligt, samt framgår det av remissen att besättningen tagit och skickat proverna själva?

2.4.1 Har du givit instruktioner i hur de bör hantera mjölkkrören efter provtagningen, dvs. när det gäller förvaring, förpackning och när leverans till posten bör ske? efterföljt av desamma underfrågor som 2.3 (från och med "Hur förvaras de på gården?") fram till och med fråga 2.3.4.

3. *Hantering i bilen, tar du med dig proverna till stationen eller postas de direkt "från bilen", eller skiftar det (3.1 – Tar med dem till stationen, 3.2 – Tar med dem till posten/skickar från bilen, 3.3 – Extrafråga till de som varierar/ skiftar mellan 3.1 och 3.2)?*

3.1 Hantering i bilen till stationen

3.1 Var och hur förvaras proverna i bilen? (förslutbar kylbox, (samma som tog med sig in i ladugården, ja/nej), om nej: isolerad i hårdplast med frysklamp i, eldriven kylväska/box i hårdplast (med eluttag i bil), annan typ)? ej kyld väska/box, plastpåse, vadderad SVA påse, annat)

Hantering på stationen

3.1.1 Hur lång tid befinner sig mjölkproven i bilen, innan de tas in/packas om, på stationen? (<30min, 31-60min, 61-90 min, 91-120min, annan tid, varierar: lägst/högst)

3.1.2 Då proverna transporterats i bilen till stationen, hur förvaras de på stationen tills de skickas? (kylskåp, rumstemperatur, i bilen som innan, annat sätt)

3.2 Hantering i bilen till posten

3.2.1 Var/hur förvaras proverna i bilen? (förslutbar kylbox, (samma som tog med sig in i ladugården, ja/nej), om nej: isolerad i hårdplast med frysklamp i, eldriven kylväska/box i hårdplast (med eluttag i bil), annan typ)? ej kyld väska/box, plastpåse, vadderad SVA påse, annat)

3.2.2 Skickar du proverna direkt efter varje gårdsbesök? (ja, nej)

Om nej; **när och varför?** (slutet på dagen/vill skicka alla dagens prover samtidigt, när kör förbi en låda/inlämningsställe, annat)

Om ja, **varför?** (kör förbi postlåda/inlämningsställe, Vill att de ska skickas samma dag, annat)

3.2.3 Hur lång tid befinner sig mjölkproven i bilen, innan de skickas med posten?

(<30min, 31-60min, 61-90 min, 91-120min, annan tid, varierar: lägst/högst)

3.3

3.3.1 Hur ofta skickar du proverna direkt från bilen? (<25%, 26-50%, 51-75%, >76%, varierande: lägsta/högsta)

4. Förpackning av prover;

4.1 Hur är proverna förpackade när de ska skickas med posten? (stor SVA påse, liten SVA påse, låda/kartong, annat, varierar)

4.2 Om varierar: vad använder du oftast? (stor SVA påse, liten SVA påse, låda/kartong, annat)

Och i hur stor andel av tillfällena? (<25%, 26-50%, 51-75%, >76%)

Vad styr vilken förpackning du använder? (antal prover, bekvämlighet, kostnad, annat)

4.3 Hur är mjölkkrören placerade i ytterförpackningen? (ingen speciell förpackning av proverna/löst, i en plastpåse, med frysklamp, i en plastpåse med frysklamp, hopbuntade, annat)

5. Var postas proverna (5.1 på postlåda, 5.2 på postens ombud/företagscenter, 5.3 på antingen postlåda eller postens ombud/företagscenter -extra fråga)?

(skickar/postar/levererar=lägger på lådan/lämnar in paket hos postens ombud /företagscenter)

5.1 Proverna postas på postlåda

5.1.1 Använder samma eller olika postlåda/lådor? (samma, olika)

5.1.2 Vet när postlådan/lådorna tömmes? (ja (kl:.....), nej)

5.1.3 Tar du hänsyn till postlådans/lådornas tömningstider när du postar dina mjölkprover, så att du lägger på proverna innan lådans tömningstid samma dag? (ja, nej)

5.1.4 Problem någon gång med att förpackningen inte går in i lådan? (ja, nej)

Om ja; hur löses problemet?

5.1.5 Varför använder du (endast) postlåda? (nära, bekvämt, antal mjölkprov/storlek på förpackningen, annat)

5.1.6 Vet du var postens närmaste ombud/företagscenter ligger från er station/närområde? (ja, nej)

5.1.7 Varför använder du inte postens ombud/företagscenter? (långt att köra, hinner inte dit samma dag innan de stänger, hinner inte dit samma dag som paketen hämtas, vet inte var det finns, annat)

5.2 Proverna postas på postens ombud/företagscenter

5.2.1 Använder du dig av samma eller olika ombud/företagscenter? (samma, olika)

5.2.2 Vet du när paketen skickas från ombudet/företagscentret? (ja (kl:.....), nej)

5.2.3 Tar du hänsyn till när paketen skickas från ombudet/företagscentret när du lämnar in dina mjölkprover, så att du lämnar in proverna innan de hämtas samma dag? (ja, nej)

5.2.4 Varför använder du postens ombud/företagscenter? (nära, bekvämt, antal mjölkprov/storlek på förpackningen, annat)

5.2.5 Varför använder du inte postlåda? (långt att köra, förpackningen av mjölkprover är för stor, hinner inte dit samma dag som den tömms, vet inte var det finns, annat)

5.3 Proverna postas på antingen postlåda ellet inlämningsställe

5.3.1 Hur stor andel av gångerna använder du postlåda? (<25%, 26-50%, 51-75%, >76%)

6. När levereras proverna till posten?

6.1 När levereras proverna till posten i förhållande till provtagningen? (samma dag som de togs, efter varje provtagningsplats, annat, beror på/olika)

6.2 Vad påverkar när du levererar proverna till posten? (antal prov tagna under dagen, veckodag (arbetschema/plats för sista provtagningen), tid på dagen, närhet till postlåda eller postens inlämningsställe, postlådans tömningstider, ombudet/företagscentrets öppettider, samt när paketen hämtas för dagen, yttertemperatur, beror på hur mycket det är att göra på jobbet/övrigt arbete, annat)

6.3 Levererar du mjölkprover till posten under alla veckodagar? (även fredagar/dag innan helgdag) (ja, nej, endast vissa dagar i veckan; må, ti, ons, to, fre)

Om NEJ: **När skickas dessa prover i så fall?** (kommande vardag, annan tidpunkt)

6.4 Var och hur förvaras proverna om de inte levereras till posten samma dag som de togs? (på stationen, annan plats, kylväska/box (beskriv; isolerad kylväska/box i hårdplast med frysklamp i, eldriven kylväska/box i hårdplast), kylskåp rumstemperatur, annat sätt)

7. Variation

7.1 Spelar årstiden/säsongen in för hur du hanterar mjölkproverna, enligt ovan? (ja, nej)

Om ja; **När i hanteringen?** (ladugård till bil, bil till station, bil till post, station till post, annat tillfälle)

Härunder när proverna levereras till posten? (Samma dag, tid under dagen, annat)

Och isåfall varför?

8. Attityder

8.1 Hur viktigt tror du, på en skala från 1-5, att god hygien vid provtagning är, för att laboratoriet ska kunna ge en korrekt bakteriologisk diagnos? Motivera.

8.2 Hur viktigt tror du, på en skala från 1-5, att det är att proverna transporteras kylda till laboratoriet, för att laboratoriet ska kunna ge en korrekt bakteriologisk diagnos? Motivera.

8.3 Hur viktigt tror du, på en skala från 1-5, att det är att proverna transporteras så snabbt som möjligt till laboratoriet, för att laboratoriet ska kunna ge en korrekt bakteriologisk diagnos? Motivera.

(Gradering: 1-5: 1=inte viktigt, 2=av liten betydelse, 3=vet ej, 4=viktigt, 5=mycket viktigt)

9. Extrafrågor till dem som kyltransporterar prover

Transport

9.1. Hur förvarar du frysklamparna/kylsystem, på arbetsplatsen samt i bilen?

9.2. Upplever du några problem med att använda kylning under transport? (ja, nej)

Om ja; **Vilka problem?**

Förpackning

9.3. Har du någon idé om antal prover per frysklamp el kylsystem i förpackningen du använder? (nej, ja; om ja; 1-5, 6-10, 11-15, 16-20, annat, variation: lägsta/högsta)

9.4. Upplever du några begränsningar eller svårigheter med att skicka proverna med kylsystem/frysklamp i förpackningen? (ja, nej)

Om ja; **Vilka?**

10. Synpunkter på förslag till hantering

(Förklarar för den intervjuade vad examensarbetet går ut på mera utförligt.)

Förvaring av frysklampor och förpackningar

10.1 Finns det möjlighet på stationen/föreningen att förvara proverna i kyl/kylda över natten? (ja, nej, vet ej, annat)

10.2 Finns det möjlighet för förvaring av frysklamparna i frysbox på, stationen, samt i en kylväska eller liknande i bilen? (ja, nej, vet ej, annat)

Om nej; **Skulle det gå lätt att ordna?** (ja, nej, vet ej, annat)

10.3 Ser ni några praktiska problem med hantering av frysklampor? (ja, nej)

Om ja, **vilka och varför?**

10.4 Finns det utrymme att förvara flera SVA påsar och en/flera lådor, i bilen, samt på stationen? (ja, nej, vet ej)

10.5 Skulle du uppleva det som ett problem om kylklampar i SVA påsar medför att påsarna blir för stora/tunga/tjocka för att kunna läggas på lådan? Och följaktligen bara kan lämnas in på postens ombud eller företagscenter. (ja, nej, vet ej, annat)

Om ja; **Vad skulle du göra?** (försöka göra påsen mindre, genom att; ha färre mjölkprover per förpackning, ej använda kylklamp, inget/acceptera läget, annat)

Förslaget rörande låda med uttagbart frigolitställ

10.6 I förhållande till antal prov/dag; tror ni att det kunde vara mera praktiskt att skicka flera prov i en och samma förpackning, t.ex. i en större låda? (ja, nej, vet ej, annat)

Om ja; **Även om detta innebär att proverna måste lämnas in på något av postens ombud eller företagscenter?** (ja, nej, vet ej)

10.7 Skulle ett uttagbart ställ i lådan, förslagsvis i frigolit, kunna vara användbart vid provtagningen i ladugården och som förvaring i bilen? (ja, nej, vet ej, annat)

10.8 Vid färre prov; kan du tänka dig att ni på stationen samlar era prover gemensamt, så att ni fyller en hel låda med prover och skickar in gemensamt istället för att ni var och en använder flera SVA påsar? (ja, nej, vet ej, annat)

10.9 Vid transport av mjölkprover i en låda skulle du behöva skicka lådan via postens ombud eller företagscenter. Upplever du detta som något problem? (ja, nej, vet ej, annat)

10.9.1-Om ja, vad skulle följderna av detta bli för användbarheten av lådan vid transport av mjölkproverna? (undvika att använda låda/hellre använda SVA påsar, spelar ingen roll/inga följder, använda låda mera, annat)

10.10 Hur ställer du dig till att använda lådan om detta innebär en extra kostnad jämfört med att använda SVA påsarna? (undvika att använda lådan, spelar ingen roll, annat)