

Mastitdiagnostik – när, var, hur?

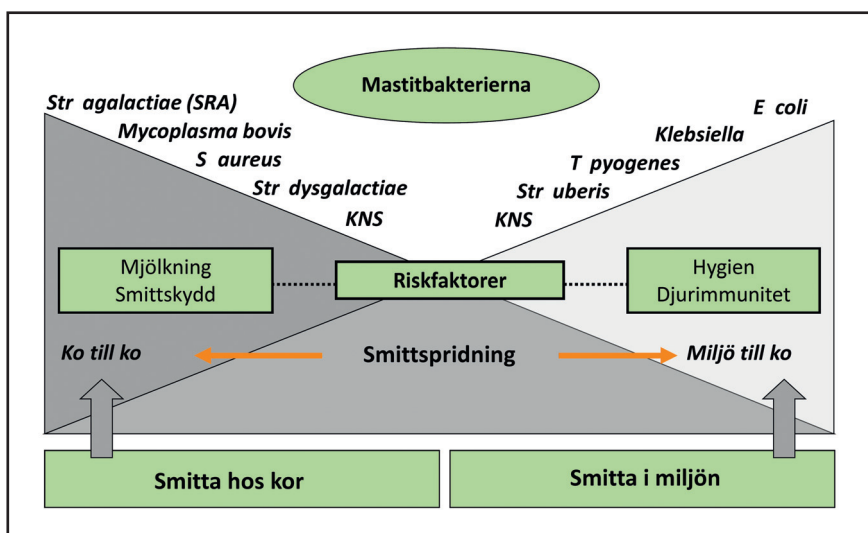
Idag används olika metoder i landet vid analys av mjölkprov från kor. Artikeln beskriver kort metoderna och föreslår riktlinjer för när respektive metod bör användas.

INLEDNING

Mastit är den vanligaste och mest förlustbringande sjukdomen hos Sveriges mjölkkor (12). Bakteriologisk analys av mjölkprov är en viktig del av undersökningen för att fortlöpande följa vilka smittämnen som förekommer i ko-besättningen men också för att stödja läkemedelsvalet vid behandling av akut klinisk mastit. Både Nordiska Mejeriernas Samarbetsorganisation för Mjölkkvalitet och Djurhälsa (NMSM) och Sveriges Veterinärmedicinska Sällskap (SVS) har publicerat antibiotikariktlinjer som föreskriver att bakteriologisk analys regelmässigt bör ske såväl vid klinisk som vid subklinisk mastit hos nötkreatur (5, 6). I denna artikel kommer vi att beröra grundläggande mastitepidemiologi på gårdsnivå, i Sverige tillgänglig mastitdiagnostik och lämna förslag på val av diagnostik vid olika frågeställningar i juverhälsoarbetet.

OLIKA MASTITBAKTERIER SPRIDS PÅ OLIKA SÄTT

För att kunna arbeta förebyggande behöver veterinären kunskap om vilka bakterier som finns i besättningen. I Figur 1 återfinns typiska kobundna bakterier långt ut till vänster och typiska miljöbundna bakterier långt ut till höger. De kobundna bakterierna sprids oftast i nära anslutning till mjölkning från ko till ko. De miljöbundna sprids istället främst i tidsperioden mellan mjölkningarna från miljö till ko. De kobundna bakterierna leder inte sällan till kroniska infektioner och ständigt förhöjt celltal hos drabbade kor. De miljöbundna infektionerna är oftast mer kortvariga och drabbar olika kor vid

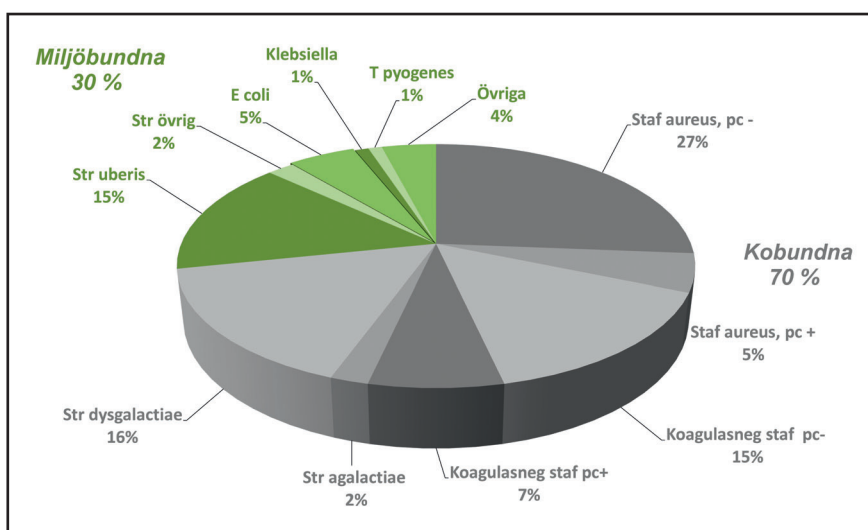


FIGUR 1. De vanligaste mastitbakterierna, deras smittreservoarer och spridningsmönster (2). Typiska kobundna bakterier återfinns långt ut till vänster och typiska miljöbundna bakterier långt ut till höger.

varje tillfälle. Smittreservoaren för de kobundna bakterierna kan således minskas genom att slå ut kroniska smittbärare, något som inte är en framkomlig väg när det gäller miljöbundna smittämnen.

I Sverige dominerar sedan mer än 30

år tillbaka de kobundna bakterierna som orsak till både klinisk mastit och subklinisk mastit (3, 9). Figur 2 visar fördelningen mellan kobundna och miljöbundna mastitbakterier för mastitodlingar utförda vid SVA 2012.



FIGUR 2. Bakteriologiska prover i procent av juverdelsprover med påvisad växt analyserade vid mastitlab, SVA. Alla insända prover under kontrollåret 2012/13. Fördelning mellan kobundna och miljöbundna smittämnen framgår av grå respektive grön färgnyans.

► MASTITDIAGNOSTIK I DAGENS SVERIGE

Det finns flera former av mastitdiagnostik tillgänglig idag. Vanlig mastitodling utförs dessutom både av allmänpraktiserande veterinärer och av specialutbildad laboratoriepersonal. I det följande beskrivs de olika diagnostiska metoderna samt några av deras för- och nackdelar översiktligt.

Bakteriologisk odling i fältlaboratorium

Traditionellt har bakteriologisk odling av aseptiskt uttagna juverdelprover varit praxis i svenska fältveterinärers arbetsmetoder sedan 1970-talet. Tekniken innebär att man med en steril ögla ytsprider 10 µl av mjölkprovet på en blodagarplatta med eller utan eskulintillsats. Efter inkubering i värmeskåp i 24–36 timmar avläses plattan och på grundval av bakteriekoloniernas utseende ställs en preliminär diagnos som kan bekräftas med enkla biokemiska tester eller via odling även på selektiva substrat. Ofta sker odlingen på selektiva substrat parallellt redan från början för att spara tid (t ex SELMA och BS3).

Fördelar med metoden är att den är snabb och tillräckligt känslig när det gäller akut klinisk mastit eftersom mycket stora mängder av samma bakterie då förekommer i renkultur i provet. Efter en upplärningsperiod kan fältveterinären inom ett till två dygn vanligen skilja på fyra till fem olika etiologiska agens: (*Staphylococcus aureus*, koagulasnegativa stafylokocker (KNS), streptokocker, kolibakterier och *Trueperella pyogenes*) (personligt meddelande Charlotta Fasth, 2014).

Nackdelar med fältlabbet är att det har betydligt lägre sensitivitet och specificitet än ett ackrediterat laboratorium. Metoden är därför direkt olämplig för all odling av subklinisk mastit. I allmänhet innefattas heller ingen säker differentiering av de olika streptokockerna eller en korrekt värdering av eventuell penicillinresistens, vilket kan ha stor betydelse vid val av förebyggande åtgärder i besättningen. Laboranten kan också förmodas ha svårt att identifiera ovanliga smittämnen.

Ackrediterat mastitlaboratorium

Ackreditering är en kvalitetssäkring

enligt europeiska och internationella standarder. Veterinärmedicinska laboratorier är ackrediterade enligt SS-EN ISO/IEC 17025: 2005. Syftet med ackreditering är att säkerställa att laboratoriets verksamhet bedrivs med hög kvalitet under iakttagande av stor hänsyn till såväl miljö som folkhälsa (11). Ett ackrediterat laboratorium använder sig av standardiserade metoder, deltar i internationella ringtester samt använder standardiserade och kontrollerade substrat, utrustning och kontrollstammar. Oberoende granskningar av kvalitetsystemen görs regelbundet.

Fördelar med ackrediterade analyser är säkerheten i metodiken och kompetensen bakom diagnosen samt att dokumentationen av varje steg i analysprocessen ger hög spårbarhet vid vidare tolkning av provtagningsresultaten. Den löpande övervakningen är också en garant för att kvalitetsnivån bibehålls oförändrat hög.

Nackdelar är fördröjningen i preliminär diagnos och det faktum att hög kvalitet oftast också betingar ett högre pris.

Ackrediterat mastitlaboratorium med maldi-tof

”Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of flight” (maldi-tof) är en automatiserad masspektrometri ursprungligen utvecklad för att snabbt kunna artbestämma bakterier vid problem med multiresistens inom humanvården. Provet odlas som vanligt tills kolonier bildats. Kolonierna beskuts sedan med laser i ett matrix, joniseras och passerar genom ett elektriskt fält för att slutligen analyseras av en kollektor (Figur 3). Olika bakterier uppvisar egna unika mönster som jämförs mot en databas innehållande tusentals olika bakteriearter som förekommer hos både djur och människa. I skrivande stund erbjuds metoden rutinmässigt bara av SVA i Uppsala.

Fördelar med maldi-tof är möjligheten att snabbt och säkert artbe-

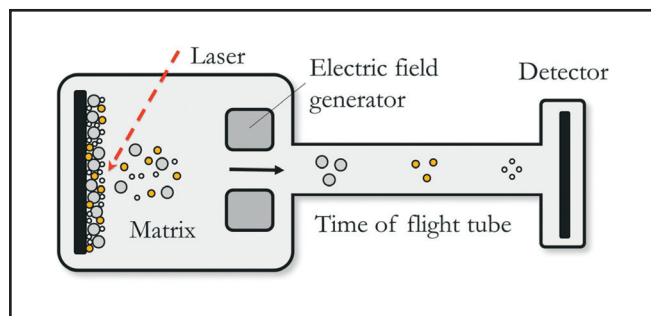
stämma flertalet bakterier, även om dessa tidigare inte isolerats på laboratoriet ifråga. Det blir även möjligt att typa betydligt fler bakterier till artnivå. Detta kan ha stor betydelse för t ex de koagulasnegativa stafylokockerna hos mjölkkor som innefattar minst ett tiotal olika arter med stora skillnader när det gäller smittspridning och kronicitet. Eftersom maldi-tof i mindre omfattning använder olika reagenser är metoden också mer miljövänlig.

Nackdelar med metoden är svåra att finna, förutom den höga kostnaden för inköp av utrustningen.

PCR-analys

Sedan 2010 är det i Sverige möjligt att med hjälp av ”Polymerase Chain Reaction” (PCR) identifiera de vanligaste mastitbakterierna i komjölk. Metoden detekterar förekomsten av för bakterietyperna unikt DNA i mjölkprovet. Eftersom metoden replikerar DNA i provet nås en mycket hög känslighet så att analys kan ske på juverdel-, ko- eller tanknivå. Man räknar med att PCR oftast hittar en enda smittförande ko i en besättning med 100 djur i ett tankmjölkprov. Sedan starten har PCR använts främst vid smittsaneringar av gårdar som drabbats av *Streptococcus agalactiae* (SRA) och inom projektet Säker Livdjurshandel för att övervaka samma bakterie.

Viktigt vid tolkning av PCR-resultat är att svaret i första hand bör tolkas som förekomst men inte mängd av bakterien ifråga. Endast typiskt kobundna bakterier kan kopplas till individ om det är ett ko- prov – för de miljöbundna bakterierna rör det sig lika ofta om en förorening i samband med provtagningen (4, 7, 8, 10).



FIGUR 3. Schematisk skiss över maldi-tof-principen. Bakteriekolonier beskuts med laser i ett matrix, joniseras och passerar genom ett elektriskt fält för att slutligen analyseras av en kollektor.

Fördelarna med PCR är att den inte kräver en odling vilket förkortar analys-tiden till mellan fyra och fem timmar totalt. Den är också så känslig att den kan göras på tanknivå och den kräver heller inte levande bakterier i provet utan kan och bör utföras på prover med konserveringsmedlet bronopol.

Nackdelarna är att den höga känsligheten gör att kontaminering lätt kan leda till falskt positivt utslag. Det är också risk för att man vid analys på kokontrollprover får falskt positivt utslag till följd av spill från föregående ko som provmjölkats. Andra nackdelar är att man bara hittar de bakterier som ingår i testet och att det inte finns levande bakterier kvar för att t ex kunna utföra resistensbestämning. Det faktum att även döda bakterier detekteras kan vara en nackdel som vid kontroll av utläkning av en inflammation.

DISKUSSION

Som framgår av denna kortfattade beskrivning har olika former av mastitdiagnostik både för- och nackdelar. Det finns inte en metod som alltid är bäst och orsaken till undersökningen bör därför styra valet av diagnostik. Här listas punktvis förstahands- och eventuellt andrahandsval för nio förekommande undersökningsorsaker.

Akut klinisk mastit

Vid akut mastit är det ibland viktigt med ett snabbt svar för att kunna stödja läkemedelsvalet. Det är dock lämpligt att regelmässigt parallellt skicka prover även till ett ackrediterat laboratorium för att konfirmera den löpande fältdiagnostikens kvalitet. PCR bör inte användas eftersom antalet diagnoser är begränsat och resistensbestämning inte är möjlig.

Förstahandsval: Fältdodling.

Andrahandsval: Ackrediterat mastitlaboratorium med maldi-tof.

Subklinisk mastit (celltalskor)

Dessa prover är svårare både att provta och att bedöma eftersom så få bakterier finns i mjölken och risken för blandflora är högre. Subklinisk mastit kan orsakas av minst ett 50-tal olika bakterier och varken PCR eller fältlaboratoriet bör därför användas på grund av den be-



FOTO: KARL MUMM

FIGUR 4. PCR på konivå kan nyttjas vid låg misstanke om att bakteriell resistens förekommer.

gränsning av diagnoser som dessa metoder för med sig.

Förstahandsval: Odling på ackrediterat mastitlaboratorium med maldi-tof.

Andrahandsval: Odling på ackrediterat mastitlaboratorium.

Uppföljning av behandling

Uppföljning av behandling borde göras oftare. Lämplig tidpunkt är cirka fyra veckor efter att insatt behandling avslutats. Samma resonemang som vid subklinisk mastit gäller. Om en vanligt förekommande kobunden bakterie förändrade behandlingen är även PCR på konivå ett möjligt alternativ.

Förstahandsval: Odling på ackrediterat mastitlaboratorium med eller utan maldi-tof.

Andrahandsval: PCR-analys.

Inför sinläggning

Syftet inför sinläggning är främst att detektera förekomst av kobundna streptokocker och stafylokocker. PCR på konivå kan nyttjas vid låg misstanke om att bakteriell resistens förekommer.

Förstahandsval: Odling på ackrediterat mastitlaboratorium med eller utan maldi-tof.

Andrahandsval: PCR-analys.

Kontroll av nykalvade

Syftet med kontroll av nykalvade kor är även här främst att detektera förekomst av kobundna streptokocker och stafylokocker. PCR på konivå kan nyttjas vid

låg misstanke om att bakteriell resistens förekommer (Figur 4). Vid misstanke om SRA eller *Mycoplasma bovis* (*M bovis*) bör PCR-analys användas i första hand.

Förstahandsval: Odling på ackrediterat mastitlaboratorium med maldi-tof alternativt PCR-analys.

Screening vid sanering

För att identifiera alla bärare av en kobunden smitta undersöks alla mjölkande kor i besättningen vid ett och samma tillfälle. Resultatet utgör underlag för en kommande smittskyddsgruppering och utslaktning av kroniker. Provtagningen sker inledningsvis oftast i samband med provmjölkning. Manuell aseptisk provtagning bör väljas under det fortsatta utredningsarbetet för att minska andelen falskt positiva eller osäkra provtagningsresultat. I vissa försäkringsformer som innefattar mjölkavbrott ersätts delar av livvärdet vid utslaktning av kor infekterade med SRA, *S aureus* pc+ och *M bovis*. För att kunna fastställa penicillinresistensen hos *S aureus* krävs odling på ett ackrediterat mastitlaboratorium (1).

Förstahandsval: PCR-analys på kokontrollprover (SRA och *M bovis*) och ackrediterat mastitlaboratorium med eller utan maldi-tof (*S aureus*).

Övervakning efter smittsanering

PCR på tankmjölk är ett kostnadseffektivt sätt att övervaka besättningen när alla kända smittbärare har avlägsnats ➤

Tabell 1. VAL AV MASTITDIAGNOSTIK I JUVERHÄLSOARBETET UPPDELAT PÅ HUVUDSAKLIG ORSAK TILL ANALYSEN. +++ = FÖRSTAHANDSVAL, ++ OCH + = GRAD AV ANDRAHANDSVAL.

Analysorsak	Veterinär odling	Akrediterat laboratorium*	PCR- analys*
Akuta mastiter	+++	+	
Kroniska mastiter	+	+++	
Celltalskor		+++	
Uppföljning behandling		+++	+
Inför sinläggning		+++	++
Kontroll nykalvade		+++	++
Juvehälsodeklaration		+++	++
Screening vid sanering		++**	+++
Övervakning besättning			+++
Odling på juverdukar, strömedel		+++	

* Resultat från SVA och Eurofins stansas automatiskt i kokontrollen.

** Gäller för *Staphylococcus aureus*.

► eller behandlats framgångsrikt. Vid sanering av SRA klassas besättningen som fri från smitta ett år efter det sista positiva tankmjölksprovet när minst fyra provtagningar jämnt fördelade under tidsperioden genomförts och uppvisat negativt resultat.

Förstahandsval: PCR-analys på tankmjölk.

Övrig provtagning (på juverdukar, strömedel m m)

Vid dessa typer av udda provtagningar krävs förutsättningslös diagnostik och högsta möjliga säkerhet.

Förstahandsval: Odling på akrediterat mastitlaboratorium med maldi-tof.

SAMMANFATTNING

För att kunna tillämpa effektiva förebyggande åtgärder mot mastit hos mjölkkor behövs god kunskap om spridningsmönster och smittreservoar för de mastitbakterier som ligger bakom klinisk och subklinisk mastit i respektive kobesättning. I detta sammanhang är en kvalitetssäkrad mastitdiagnostik en nödvändig grundförutsättning. Veterinären bör därför alltid komplettera, eller i vissa fall helt ersätta, egna fältodlingar med diagnostik på akrediterade mastitlaboratorier. PCR-analys är ett i sammanhanget viktigt komplement till traditionell bakterieodling och används med fördel framför allt vid screening vid sanering och övervakning efter smittsanering av besättningar med SRA och *M. bovis*. Tabell 1 kan tjäna som vägledning i

veterinärens val av mastitdiagnostik i juverhälsöarbetet.

SUMMARY

Mastitis diagnostics – when, where and how?

In order to determine the most effective preventive actions against mastitis among dairy cows, the veterinary advisor has to be familiar with basic epidemiology for the bacteria causing clinical as well as subclinical mastitis in the herd. High quality mastitis diagnostics is a key issue concerning this matter. The veterinarian should always compare the clinical diagnosis and on farm culturing with analysis on a certified mastitis laboratory. PCR analysis is a new tool, merely to be used for screening and eradication of *Streptococcus agalactiae* and *Mycoplasma bovis*. It is crucial for the veterinarian to choose the most informative and reliable diagnostic method for different kind of purposes.

Referenser

1. Agria Djurförsäkring. Försäkringsvillkor Agria Mjolk. Villkor gällande från 1 oktober, 2013.
2. Cook NB. Mastitis and lameness monitoring in dairy herds. Proc, Symposium on Cow Comfort. Kolding, Danmark, 2005.
3. Ericsson Unnerstad HE, Lindberg A, Persson Waller KP et al. Microbial aetiology of acute clinical mastitis and agent-specific risk factors. Vet Microbiol, 2009, 137, 1–2, 90–97.
4. Kelton DF & Godkin MA. Frequently asked questions about the pathoproof mastitis 3 PCR assay. Proc, 53rd National

Mastitis Council Annual Meeting. Fort Worth, Texas, USA, 2014.

5. Landin H et al. Nordic guide lines for mastitis therapy. Poster session, 49th National Mastitis Council Annual Meeting. St Louis, USA, 2010.
6. Landin H, Persson Y & Persson Waller K. Prudent mastitis therapy – a winner in Sweden. Proc, XXVII World Buiatrics Congress. Lisbon, 2012, 147.
7. Nyman A-K. PCR-analys eller bakterieodling? Kompendium Veterinärkongressen. Uppsala, 2013, 293–296.
8. Nyman A-K, Persson Waller K & Emanuelson U. Diagnostics of intramammary bacterial infections – comparison between a PCR assay and culturing. Proc, NKVet Mastitis Symposium. Reykjavik, Island, 2013.
9. Persson Y, Nyman A-K & Grönlund-Andersson U. Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden. Acta Vet Scand, 2011, 53:36.
10. Pyörälä S & Katholm J. Use of a PCR mastitis test for Quarter based, cow based and herd based mastitis diagnostics. Proc, 53rd National Mastitis Council Annual meeting, Fort Worth, Texas, USA, 2014.
11. Swedac. Vad är ackreditering? Läst den 17 maj 2015 på www.swedac.se/sv/Det-handlar-om-fortroende/Vad-ar-ackreditering
12. Växa Sverige. Översikt hälsostatistik. I: Redogörelse för husdjursorganisationens djurhälsovård 2012/2013. Årsberättelse för Växa Sveriges djurhälsovård, 2013.

*HÅKAN LANDIN, leg veterinär, specialist i nötkreaturens sjukdomar, Växa Sverige Djurhälsa, Franzégatan 6, 112 51 Stockholm.

SUSANNE ANDRÉ, biomedicinsk analytiker, sektionschef, Avdelningen för bakteriologi, SVA, 751 89 Uppsala.

MARIA NILSSON-ÖST, leg veterinär, laboratorie-veterinär, Avdelningen för bakteriologi, SVA, 751 89 Uppsala.

SVFs och Agrias understödsfonder

Medel ur förbundets understödsfond och Agrias understödsfond för veterinärer utdelas i form av understöd till hjälpbehövande veterinärer och deras efterlevande.

Ansökningsblankett och närmare upplysningar kan erhållas av förbundskansliet, tel 08-545 558 20, e-post office@svf.se.

Skriftlig ansökan skickas till Sveriges Veterinärförbund, Box 12 709, 112 94 Stockholm.