

## Anvendelse af ydelseskontrolprøver til PCR-baseret mastitidsdiagnostik

Risiko for overslæb af mastitisbakterier fra prøve til prøve i DeLaval malke robot.



Den Europæiske Union ved Den Europæiske Fond for Udvikling af Landdistrikter og Ministeriet for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri har deltaget i finansieringen af projektet.

I forbindelse med et forskningsprojekt vedr. anvendelse af hyppige in-line målinger og præcis diagnostik til forbedring af resistens mod mastitis hos malkekøer, blev der i løbet af foråret 2011 med støtte fra Mælkeafgiftsfonden gennemført forsøg på Kvægbrugets Forsøgscenter (KFC). Formålet med forsøget var at undersøge, hvorvidt mælkeprøver der tages fra prøveudtageren i det automatiske malkningsanlæg er egnede til anvendelse i mastitidsdiagnostik ved hjælp af polymerase chain reaction (PCR, Eurofins/Steins laboratoriet). Der blev stillet skarpt på problematikken om et eventuelt overslæb af mastitisbakterier fra prøve til prøve udtaget fra en DeLaval malke robot med en standard DeLaval milk sampler udlånt fra ydelseskontrollen (RYK).

Undersøgelsen blev gennemført ved hjælp af "fantomkøer" dvs. malkning fra spande med 8 kg mælk med 4 malkekopper (Figur 1). Mælken var malket frisk fra nogle af besætningens egne køer, som blev udvalgt på basis af lave celletal i mælken. Mælken blev tilsat 3 forskellige bakteriestammer, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* og *E. coli*, som forudgående var blevet isoleret fra besætningen på KFC. De respektive bakteriestammer blev tilsat mælken i koncentrationer på  $10^5$  bakterier/ml. Ved hver sekvens blev der malket 8 kg mælk i DeLaval malke robotten.

Der blev skiftevis malket med inficeret mælk efterfulgt af ren mælk. Efter hver malkning blev der som normalt foretaget mellemskyl af pattekopper. Der blev udtaget mælkeprøver før forsøgsstart fra milk samplern der var sat op helt som i praksis. Kvantificering af bakterier i prøverne blev gennemført ved hjælp af PCR (Eurofins/Steins laboratoriet). Derudover blev overslæbet af et fluorescerende sporestof undersøgt, hvilket gør det muligt at beregne en carry over procent. Forsøgsdesignet fremgår i detaljer fra Tabel 1.

PCR-analysens følsomhed blev undersøgt ved at tilsætte de pågældende tre bakterier i koncentrationer på  $10^5$  til mælk, som gradvis fortyndes og efterfølgende analyseres ved PCR.



Figur 1. "Fantomko" anvendt i forsøget, dvs. en spand med mælk, der suges op ved hjælp af slanger monteret på de 4 pattekopper. Til højre ses spand med mælk tilsat fluorescerende sporestof

Tabel 1. Forsøgsdesign - Rækkefølge af malkning og prøvetagning ved anvendelse af "fantomko" med henholdsvis ren mælk eller tilsat en bakteriestamme eller et fluorescerende stof.

Mælk	Tilsætning	Standard sampler
Ren mælk		PCR
Inficeret mælk	<i>Staphylococcus aureus</i>	PCR
Ren mælk		PCR
Inficeret mælk	<i>Streptococcus faecalis</i>	PCR
Ren mælk		PCR
Inficeret mælk	<i>Escherichia. coli</i>	PCR
Ren mælk		PCR
Mælk	Fluorescerende sporestof	PCR
Ren mælk		
Mælk	Fluorescerende sporestof	
Ren mælk		
Ren mælk		

### Resultater

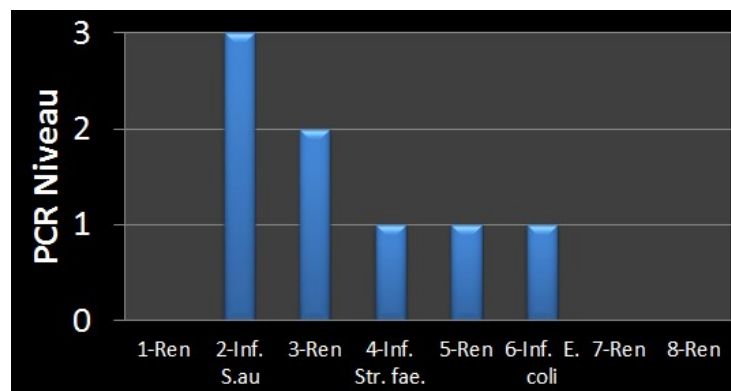
Resultaterne vedrørende PCR analysens følsomhed viser, at mælk med et indhold på 2500 bakterier/ml vurderes som klart positiv for den pågældende mikroorganisme, hvilket indikerer en meget høj sensitivitet af analysemetoden.

Resultaterne af PCR analysen i mælkeprøver taget fra standard samplern i DeLaval AMS efter malkning af mælk podet med *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* og *E. coli* er vist i henholdsvis Figur 2, 3 og 4. Det fremgår af figur 2, at den første mælkeprøve taget efter malkning af inficeret mælk bliver analyseret som positiv (niveau 2) for *Staphylococcus aureus* ved PCR analysen, mens de følgende 3 prøver stadig er svag positive (niveau 1). Ved malkning af mælk inficeret med *Streptococcus faecalis* (Figur 3) og *E. coli* (Figur 4) blev de to efterfølgende mælkeprøver fundet positive på mindst niveau 2 for de respektive bakterier. Som det fremgår af figur 3 og 4, kunne der desværre påvises *Streptococcus faecalis* og *E. coli* i mælken før podningen med den pågældende bakterie, hvilket tyder på en forudgående forurening af mælken fra staldmiljøet. Ved anvendelse af PCR bliver disse prøver fundet svag positive (niveau 1), hvilket understrejer den høje følsomhed af analysen. Der er dog ikke tvivl om, at der efter podning af mælken kan konstateres et betydeligt overslæb af bakterier til de efterfølgende mælkeprøver.

Ved anvendelse af fluorescerende sporestoff, blev overslæbet til den næste mælkeprøve estimeret til at ligge på 7,3 % og til den næstfølgende prøve på 0.4%.

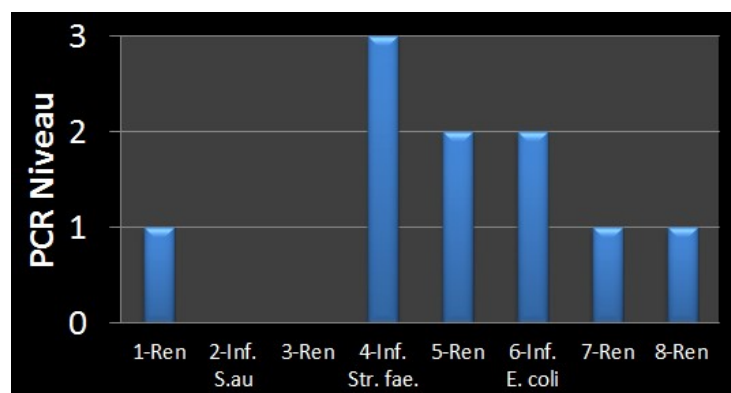
På baggrund af de ind til nu foreliggende resultater kan det konkluderes, at mælkeprøver taget i en DeLaval AMS ikke umiddelbar er egnede til anvendelse i mastitidsdiagnostik ved hjælp af PCR, da der på grund af overslæb af bakterier er risiko for fejldiagnosticering af op til fire raske køer, der bliver malket efter en ko med yverbetændelse. Gentagne prøvetagninger fra samme ko synes derfor at være afgørende vigtig før den endelige mastitidsdiagnose kan stilles. En forbedring af prøveudtagning ved AMS med henblik på at minimere bakterieoverslæb fra prøve til prøve er stærkt

påkrævet.

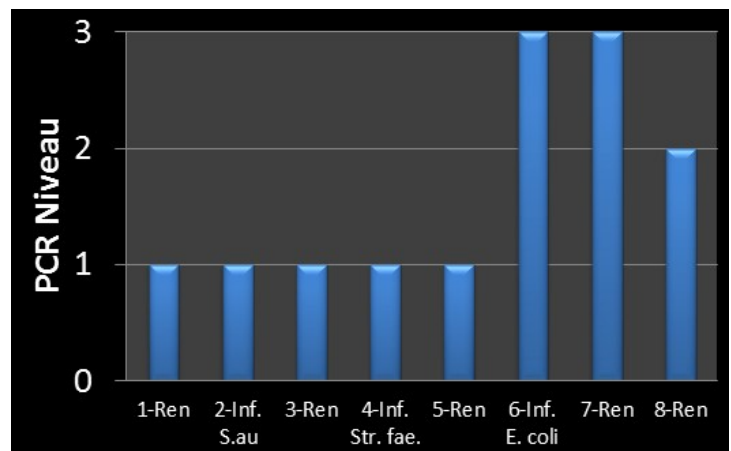


Figur 2. Resultater fra PCR analysen i mælkeprøver taget fra standard prøveudtager efter malkning af mælk podet med *Staphylococcus aureus*.

PCR-niveauer: 0: Negativ, 1: Lav positiv, 2: Positiv, 3: Stærk positiv



Figur 3. Resultater fra PCR analysen i mælkeprøver taget fra standard prøveudtager efter malkning af mælk podet med *Streptococcus faecalis*. PCR-niveauer: 0: Negativ, 1: Lav positiv, 2: Positiv, 3: Stærk positiv



Figur 4. Resultater fra PCR analysen i mælkeprøver taget fra standard prøveudtager efter malkning af mælk podet med *E. coli*. PCR-niveauer: 0: Negativ, 1: Lav positiv, 2: Positiv, 3: Stærk positiv