

## Bedre yversundhed med PCR

Jørgen Katholm, Videncentret for Landbrug, Kvæg, og Torben Bennedsgaard, Aarhus Universitet

### Konklusion – Bedre yversundhed med PCR

PCR-mastitistesten er meget bedre til at finde B-streptokokker end traditionel dyrkning.

6,2 % af danske malkebesætninger var positive for B-streptokokker ved årsprøven i 2011, og 6,6 % var i B-registeret.

Usikkerhed omkring PCR mastitis testen:

- Ingen positive resultater er forkerte.
- Årsprøveresultater fra 16 gen er kørt om med 12 gen test.
- Siden august 2011 er følsomheden for *strep. uberis* ca. 3 Ct-enheder mindre (højere Ct-værdi).
- Vi undersøger fortsat årsag til, at testen visse dage giver for mange negative resultater.

69 besætninger var positive for *M. bovis* ved årsprøveundersøgelsen.

*M. bovis* positive besætninger er formodentlig positive i 2-3 måneder.

Tankcelletallet er forhøjet i besætninger med Ct-værdier under 30 for *Staf. aureus*, *Strep. uberis*, *B-streptokokker* og *Strep. dysgalactiae*.

Tankkimtallet er forhøjet i besætninger med Ct-værdier under 30 for *Strep uberis*, Enterokokker og B-streptokokker.

Variationen på PCR mastitis resultat i tankmælksprøver er i løbet af en måned ca. 6 enheder for de fleste gener, ca. 4 for *Staf spp*, ca. 2 for *Klebsiella*.

For med 75 % sikkerhed at sige, at en forskel på 5 Ct-værdier i tankmælksprøver er reel, kræver det 4 prøver.

Der er i 2011 undersøgt 40.722 enkeltkøer med PCR mastitistesten - en meget stor stigning i forhold til 2010.

3,0 % af goldkoprøverne i 2011 er positive for B-streptokokker i besætninger, der ved årsprøven i 2010 og 2011 er negative for B-streptokokker.

### Indledning

Kampagnen for bedre mælkekvalitet, Vores Mælk – En Ren Fornøjelse, fokuserer blandt andet på et lavere tankcelletal og færre mastitisbehandlinger med antibiotika i laktationen.

I 2011 faldt det geometriske tankcelletal i Danmark til 224.800 celler/ml og antallet af mastitisbehandlinger i laktationen faldt med 10 % til 194.500 startede behandlinger. Disse tal er en rigtig positiv udvikling, til gengæld steg antallet af antibiotika goldkobehandlinger med 26 %. Det er anbefalet i kampagnen, at antallet af goldkobehandlinger øges noget, men det bør bestemte ske på baggrund af et forhåbentligt højere fald i antal mastitisbehandlinger i laktationen.

Siden 2000 er andelen af de danske malkekvægsbesætninger, der er registreret som B-positive, steget fra omkring 2 % til 6,6 % i 2011.

Den vigtigste måde at reducere tankcelletallet og antal mastitisbehandlinger er gennem forebyggelse. For at gennemføre forebyggelse af yverinfektioner mest fornuftigt er det nødvendigt at vide, hvilke infektioner der forekommer i besætningen og derigennem målrette forebyggelsen.

Ofte vil besætningsdiagnosen for mastitisbehandling være simpelt penicillin. Disse behandlinger kan ifølge lovgivningen udføres uden undersøgelse af mælkeprøver. I mange besætninger kan der derfor være et begrænset antal dyrkninger på mælkeprøver. I disse besætninger kan det derfor være svært at udtale sig om, hvilke bakterietyper der er årsag til mastitis, og dermed hvilke forebyggende tiltag der bør gøres.

De fleste mælkeproducenter får nu tankcelletal ved hver afhentning og svingninger i yverinfektioner vil kunne aflæses på tankcelletallet. Derudover vil kocelletal fra ydelseskontrollen også kunne give oplysninger om de inficerede køer. Som hovedregel vil en besætning med mange køer, der har en lille procentdel af det totale celletal være udtryk for *Stafylokok aureus* infektioner, hvorimod få køer med en høj procentdel af cellerne ofte er udtryk for *Streptokok uberis* infektioner i besætningen.

Det kan således være en udfordring at udpege de væsentligste mastitisårsager. Det har i udlandet i mange år været praktiseret ved at benytte dyrkning på tankmælksprøver og på den måde få indtryk af de dominerende bakterier. Med muligheden for PCR-prøver for flere mastitispotogener med PathoProof™ testen blev der mulighed for at undersøge forekomsten af genmateriale fra de væsentligste mastitisbakterier i tankmælksprøver.

### **B-streptokok overvågning**

Vi har siden 2009 foretaget måling med PCR for mastitisbakterier gener i forbindelse med årsprøven for B-streptokokker. Vi er sikre på, at den anvendte PCR mastitistest er meget bedre end traditionel dyrkning, når det gælder udpegnings af besætninger som B-positive.

Sikkerheden for på en dyrkningsprøve at bestemme, om en besætning har B-streptokokker, har vi beregnet til 68 %, hvorimod den for PCR-prøven er 95,2 % (sensitivitet) (Marshal et al 2011).

Vi har på den baggrund pr. 1. september 2011 omlagt B-streptokok-overvågningen til udelukkende at benytte PCR mastitis tankmælksundersøgelsen til årsprøveundersøgelsen og som baggrund for statusberegningen.

Andelen af B-positive prøver i årsprøven ved PCR-analysen var i 2009, 2010 og 2011 henholdsvis 7,3%, 6,6% og 6,2%. Altså et fortsat lille men glædeligt fald.

Antallet af besætninger i B-registeret er derimod som følge af ændringen i testen til udpegnings steget. Stigningen er fra 6,1 % af besætningerne i B-registeret i 2010 til 6,6 % i 2011.

Omlægningen af testen betyder, at flere besætninger er korrekt udpeget som B-positive, og det skulle gerne være med til at reducere smittespredningen mellem besætninger. Samtidigt vil flere besætninger få information om en begyndende B-streptokokker infektion tidligere.

### **Problemer omkring 2011 tankmælksovervågningen**

Tankmælkstesten med PCR har desværre ikke været problemfri i 2011. Da vi ønskede at vurdere PCR-testens mulighed for også at udpege besætninger med *Mycoplasma bovis* valgte vi at benytte en nyudviklet test med 16 forskellige grupper af gener modsat den tidligere 12 gen test. Ved de første udsendelser af disse prøvesvar var der en række henvendelser fra både dyrlæger og landmænd omkring for mange negative resultater i testen. Ved den første validering af resultaterne viste der sig også alt for mange negative prøver især for *Strep. uberis*. Vi valgte derfor i tæt samarbejde med Eurofins den 22. december 2011 kun at beholde resultaterne for de 4 nye gener og samtidig slette alle resultater for de 12 oprindelige gener. Samtlige prøver blev derefter testet med den 12 gen test vi også bruger til alle enkeltko undersøgelserne. Vi har løbende været i diskussion med producenten af testen Thermo Fisher Scientific fra Finland. De har nu oplyst at problemerne skyldtes en opformering af alge gen i den indledende test der bevirkede reduceret reaktion for *Stafylokok spp*, B-streptokokker og *Strep. uberis*. Da vores overvågning især er en B-streptokok overvågning, er vi således taknemmelige for at Eurofins hurtigt var medvirkende til at vi fik omtestet alle resultater. De resultater der nu vises af årsprøven er således sammensat af de 4 fra første test og de 12 fra omtesten.

Alle prøver er undersøgt på det samme genmateriale fra den oprindelige prøvedato, derfor var nogle af resultaterne desværre noget gamle da de blev udsendt.

Denne fejl er rettet i den nye 16 gen test oplyser Eurofins og producenten.

Gennemgangen af de nye årsprøveresultater og også en validering af alle 40.722 enkeltkø undersøgelser fra 2011 viste at der var ændret følsomhed med flere negative prøver efter august 2011 i den 12 gen test vi benytter. Konfronteret med dette oplyser firmaet nu at der er ændret på gen-opformeringen for *Strep. uberis*. Thermo Fisher oplyser at reaktionen for *Strep. uberis* er mindsket ca. 3 Ct-værdier (ny Ct-værdi på 35 svarer altså til 32 før august 2011). Thermo Fisher havde fået mistanke om at den gamle test opformerede *Streptococcus canis* gener derfor havde de lavet ændringer for at imødegå dette.

Vi tror ikke vi har så meget *Strep. canis* i Danmark. Det undrer os derfor at der er en så forholdsvis stor ændring i testfølsomheden. Eurofins har derfor været meget behjælpelig med at fremskaffe ca. 400 danske prøver med *Strep. uberis* fra de tidligere undersøgelser. Disse stammer vil blive typebestemt og gensekventeret for at få afklaring på om følsomheden er nedsat, eller der var en del *Strep. canis* i vores tidligere resultater.

Endelig er vi fortsat af den opfattelse af vi har specielle dage eller dele af dage hvor alt for mange tankmælkeprøver er negative for næsten alle bakterie gen. Vi havde denne mistanke til især den 26. oktober i 2010 men trods omprøvning af ca. 600 resultater dengang fandt vi ingen forklaring. Der pågår i disse dage et opklaringsarbejde for at finde en mulig forklaring på disse testresultater.

#### Delkonklusion

Der er ikke udsendt forkert positive resultater

Der var for mange negative resultater for 3 af bakterierne i den oprindelige 16 kit test de er slettet og rettet.

Nye prøveresultater med 16 kit er pålidelige. *Strep. uberis* følsomheden er ændret så der nu er ca 3 Ct værdier mindre udslag i alle test. Ved negative resultater for bakterier der tidligere har haft en tydelig reaktion bør det vurderes grundigt om resultatet er forventeligt, ellers bør tankmælken testes om.

#### **Mycoplasma bovis overvågning**

Som det første land har vi i Danmark testet tankmælksprøver fra alle landets besætninger for *M. bovis*. Vi testede 3921 prøver og i alt 69 prøver var positive 1,8 %.

Af de 44 besætninger der i løbet af sommer og efteråret 2011 havde indberettet kliniske symptomer på *M. bovis* var 4 positive ved årsprøven (heraf 41 med Ct. værdi under 37 hvilket er sikker positiv, og 8 under 30 hvilket er kraftig positiv).

Der blev fundet tegn på Mycoplasma fra flere stammer i 468 tankmælksprøver (heraf 122 med Ct. værdi under 37 og 15 under 30).

Af disse 468 havde i alt 404 ingen reaktion over for *M. bovis*, og af disse havde 73 en Ct. værdi under 37 og 5 en Ct. værdi under 30.

Af de første 44 besætninger, der i løbet af sommer og efterår 2011 indrapporterede symptomer, der kunne minde om de beskrevne Mycoplasma-symptomer, var 4 besætninger blandt de 69 positive for *M. bovis* i årsprøven. Ct. værdierne for prøverne var henholdsvis 26, 32, 35 og 38. Yderligere 2 besætninger havde ved årsprøven Ct. værdi over for "Mycoplasma flere arter".

I forbindelse med afklaringsarbejdet omkring *M. bovis* har vi i ni mælkeleverende besætninger efter årsprøveresultatet fulgt Ct. værdien for *M. bovis* i tankmælksprøver i perioden fra december 2011 til februar 2012. Tre af de ni havde ingen positiv reaktion på tankmælksprøver. Tendensen er at besætninger med positive reaktioner kun har denne reaktion i kort tid, nemlig 2-3 måneder. Som overvågningsværktøj vil én årlig tankmælksprøve baseret på PCR således kun i begrænset omfang udpege besætninger med mulige symptomer på *M. bovis* infektion. Derfor er det i højere grad anbefalelsesværdigt at teste løbende før en eventuel handel, som i Sikker livdyrshandel i Sverige. Der er endvidere ikke nødvendigvis en sammenhæng mellem Mycoplasma i led eller lunger og Mycoplasma i yveret, hvorfor der ikke nødvendigvis behøver at være tankmælksreaktion i en inficeret besætning. Mycoplasma dyrkning fra tankmælk benyttes dog meget i USA som deklARATION på, at besætningen er fri for Mycoplasma, og vi tror også at PCR-undersøgelsen er mere følsom for Mycoplasma end dyrkning. PCR-testen er meget hurtigere.

## PCR for mastitispatogener og generel mastitisrådgivning

Som omtalt i indledningen kan det i mange besætninger være svært at udtale sig om de egentlige årsagsforhold omkring mastitisforekomst i en besætning. Dyrkning fra kliniske mastitter kan være et godt arbejdsredskab, men hvis der ikke allerede er prøveresultater, kan det tage tid, inden der er tilstrækkeligt mange resultater til en sikker vurdering. Prøver alene for klinisk mastitis giver heller ikke nødvendigvis det samme resultat som prøver fra køer med forhøjet celletal.

### PCR for mastitispatogener i tankmælk

Dyrkninger fra tankmælk benyttes i udlandet som rådgivningsværktøj til mastitis forebyggelse. Vi har ud fra PCR-resultaterne i 2009-overvågningen belyst, i hvor stor udstrækning Ct- værdier for de enkelte mastitispatogener har sammenhæng med tankcelletal og tankkimaltal.

For *Staf. aureus*, *Strep. uberis* *Strep. dysgalactiae* og B-streptokokker er der ved Ct-værdier under 30 en lineær sammenhæng. Lavere Ct-værdier i besætningen er ensbetydende med stigende tankcelletal. Sammenhængen er tydeligst for *Staf. aureus* og *Strep. uberis*.

For *Strep. uberis*, B-streptokokker, Enterococcer, *Strep. dysgalactiae* og *E.coli* er der ved Ct-værdier under 30 et lineært sammenhæng, så lavere Ct-værdier i besætningen er ensbetydende med højere tank kimaltal. Sammenhængen er mest udtalt for *Strep. Uberis* og B-streptokokker.

I mastitisprojektet for 2011 har vi i 34 besætninger udtaget tankmælksprøver hver måned. Frem mod ydelseskontrollen i april maj måned har vi i en måned forud for ydelseskontrollen udtaget tankmælksprøver ved hver afhentning, og endelig har vi ved den pågældende ydelseskontrol undersøgt samtlige malkende køer med enkeltko PCR-analyse.

Det har således været muligt at beskrive variationen fra dag til dag inden for hver af de 12 bakteriegen.

For de vigtigste mastitisbakterier er standardafvigelsen på 2,5 – 3 Ct-værdier i positive besætninger. Dette betyder, at hvis smitteniveauet i besætningen er rimeligt konstant vil 95 % af prøverne give en Ct- reaktion der svinger op til 6 enheder op eller ned i forhold til besætningens gennemsnit.

Denne variation virker umiddelbart alt for stor hvis et enkelt prøveresultat skal være vejledende for en mulig rådgivning omkring yversundhed i besætningen. Selve testvariationen på samme prøve er på kun på 1 Ct. værdi. Men udskillelsen af bakterier af de enkelte køer varierer konstant og resulterer i den største del af variationen

Denne variation kan omskrives til følgende vejledning

For med 75 % sikkerhed at sige at en forskel på 5 Ct værdier i tankmælken er reel kræver det 4 prøver. Hvis man ønsker at erklære besætningen fri for en bestemt bakterie skal man desuden være opmærksom på at der kan være smittede goldkøer i besætningen, som derfor ikke afsløres af en tankprøve.

### Besætnings rådgivning ud fra PCR-mastitistest på tankmælk

Yver-bakterier: *Staf. aureus* og B-streptokokker.

Ved Ct-værdier under 30 for bakterietyper, der er knyttet til yveret, tyder det på, at du kan forbedre yversundheden ved at få undersøgt malkeprocedure og malkeanlæg. Samtidig vil det være fornuftigt at begrænse smittespredning ved at bruge pattedesinfektion og goldbehandling.

Miljø-bakterier: *Strep. uberis*, *E. coli*, *Klebsiella*.

Ved Ct-værdier under 30 for bakterietyper, der er knyttet til staldmiljøet, tyder det på, at du kan forbedre yversundheden ved at fokusere på renere køer, renere båse og bedre yveraftørring med skum før aftørring.

Sår-bakterier: *Strep. dysgalactiae*, *Coryne bovis* og *A. pyogenes*.

Ved Ct-værdier omkring 30 for enkelte eller ofte alle disse bakterier der er tilknyttet sår vil det være en rigtig god idé at tænke på bedre pattekanal og pattehud kvalitet. Undgå overmalkning, vurder påvirkning af pattehud eks. solskoldning og frostpåvirkning, eller måske er der virusinfektioner der giver sår på patterne. Forebygges ved god pattedesinfektion og pattesalver.

Læs mere om de enkelte bakterier på [www.maelkekvalitet.dk](http://www.maelkekvalitet.dk) - se under Fagområder og PCR-test for mastitisbakterier.

#### *PCR for mastitis patogener på enkeltkøer*

Der er i 2011 undersøgt i alt 40.722 enkeltkøer med PCR for mastitispogener på Eurofins. Det er en stigning på 445%

Der undersøges især køer før goldning. I alt 31.210 af de køer der er undersøgt i 2011 er mere end 250 dage fra kælvning og er indsendt via ydelseskontrollen. I besætninger der er B-frie ved årsprøven i både 2010 og 2011 er der 767 positive køer (3,0 %) hvorimod der i de B-positive besætninger blev fundet 1462 positive køer (26 %)

Det kan ikke udelukkes, at en del af de B-frie besætninger har været PCR-positive på en tankmælksprøve eller en enkeltko og derfor er begyndt at undersøge goldkøer for at kontrollere infektionen.

Der er dog også en del nyopstået infektion blandt køer i frie besætninger. Blandt de 34 projektbesætninger var 19 B-frie besætninger. I 11 af disse besætninger forekom der fra 1 til 4 B-positive køer ved enkeltko undersøgelserne. Ud af i alt 2242 køer var 20 køer positive (0,9 %) af disse køer var 14 negative ved omprøve. De øvrige blev slagtet eller behandlet. Ingen af disse køer blev altså bekræftet inficeret.

#### **Brug af enkeltko undersøgelser til at vurdere mastitis forekomst og forebyggende indsats**

Både ved traditionel dyrkning af mælkeprøver og ved PCR-mastitisundersøgelse er det vigtigt at vide, hvilke køer der er undersøgt før resultaterne vurderes.

Køer der er undersøgt før goldning, køer der er undersøgt efter forhøjet CMT ved nykælverundersøgelser eller køer der blot er udvalgt til undersøgelse i laktationen på grund af forhøjet kocelletal, mastitis indeks (AMS) eller CMT udgør en selekteret gruppe af køer. De infektioner der især optræder ved disse subkliniske eller milde kliniske mastitter er oftest de smitsomme mastitis former *Staf. aureus* eller B-streptokokker. Forekomsten af disse to infektioner kan selvfølgelig vurderes ved at se på procent positive med disse infektioner. Miljøbetingede infektioner som *Strep uberis* eller *E.coli* vil kun i meget begrænset omfang optræde i disse undersøgelser. Så hvis mastitisforekomst kun vurderes ud fra disse enkeltko-undersøgelser, vil der ofte blive lavet fejlskøn.

For at vurdere mastitis forekomsten ud fra enkeltko undersøgelser er det vigtigt også at undersøge de akut opstået mastitis tilfælde og kende bakterieforekomsten blandt disse mastitis tilfælde. Dette er meget vigtigt at huske.