

# **Tre metoder för diagnos av mastit i fält**

**Ylva Nelson**

**Handledare: Torkel Ekman**

**Institutionen för obstetrik och gynekologi**

Examensarbete 2004:50

Veterinärprogrammet

Veterinärmedicinska fakulteten

SLU

ISSN 1650-7045

# Innehållsförteckning

<b>Inledning</b>	<b>2</b>
Celltal som mått på juverhälsan	2
Variationer i celltalet	2
Variationer i mjölksammansättningen	3
Laktos som indikator på mastit	3
Syfte med studien	3
Beskrivning av analysmetoderna	4
<i>California Mastitis Test</i>	4
<i>DeLaval cellräknare DCC</i>	4
<i>FMA2001 Farm Milk Analyser</i>	4
<i>Fossomatic</i>	5
<b>Material och metoder</b>	<b>5</b>
Material	5
Urval	5
Klinisk undersökning	6
Provtagning och provhantering	6
<b>Resultat</b>	<b>7</b>
Avvikelser från Fossomatic	7
DCC-instrumentets spridning av analysvärden	9
Jämförelse av CMT och DCC	9
Celltal relaterat till kliniska fynd	10
FMA2001 jämfört med CMT, DCC och kliniska fynd	10
Odling av bakterier från mjölkprov	11
<b>Diskussion</b>	<b>11</b>
Tillförlitlighet av metoderna	11
Överensstämmelse mellan fältmetoderna	12
Metodernas användbarhet i fältarbete	13
Celltalsnivå för klinisk mastit	13
Bakterieförekomst i mjölk	14
Slutsatser	14
<b>Litteraturförteckning</b>	<b>15</b>
Opublicerade källor	16
<b>Tackord</b>	<b>17</b>
<b>Abstract</b>	<b>18</b>

## Inledning

Mastit är kroppens försvar mot skada på juvervävnaden, i allmänhet orsakad av bakterieangrepp, men också av mekaniska skador. Symptomen varierar från mycket tydliga till knappt registrerbara. Vid subklinisk mastit föreligger inga kliniska symptom. Inflammationsprocessen vid mastit ger bland annat upphov till förändringar i mjölkens sammansättning och förhöjda celltal i mjölken, vilket har stor betydelse för mjölk kvalitén och mjölmängden. Att undvika mastit och dess konsekvenser ligger således i mjölkproducenternas, mejeriernas och konsumenternas intresse.

### Celltal som mått på juverhälsan

Det vanligaste sättet att mäta juverhälsan är att räkna antalet celler i mjölken. Gränsen mellan normal och förändrad mjölk är flytande. Hälften av de svenska korna har ett celltal under 70 000/ml och den bästa kvartilen ligger under 30 000 celler/ml (Ekman & Emanuelson, 2000). Ett tyskt arbete visade att inflammationsindikatorer i en enskild juverdel börjar avvika från ett basvärde vid så låga celltal som 50 000/ml (Hamann, 2001). Allmänt anses att om celltalet i ett samlingsprov från en ko (koprov) ligger under 100 000/ml och inga juverpatogener påvisas kan juvret betraktas som friskt och om värdet är över 200 000 celler/ml har kon sannolikt mastit (även utan ett positivt bakteriologiskt prov) (Dohoo & Meek, 1982; Harmon, 1994; Saloniemi, 1995; Hamann, 2001; Smith, 2001). Om celltalet i en enskild juverdel överstiger 200 000/ml och i övriga ligger under 100 000/ml är det en klar indikation på inflammation. Juverdelen är då med stor sannolikhet infekterad eller i reparationsfasen efter en skada. Mjölken har försämrade funktionella egenskaper, såsom minskad hållbarhet och försämrade ystningsegenskaper (Dohoo & Meek, 1982; Politis & Ng-Kwai-Hang, 1988; Smith, 2001).

### Variationer i celltalet

Cellerna i mjölken är huvudsakligen leukocyter. En mindre del är epitelceller. Mastit är det som i högst grad påverkar celltalet i mjölk, men även faktorer som ras, laktationsstadium, laktationsnummer och säsong har betydelse (Brolund, 1985). Celltalet varierar dessutom med tidpunkten på dygnet i förhållande till mjölkningarna och i de olika mjölkfraktionerna (för-, bulk, efter- och residualmjölk). Betydelsen av fysiologiska och miljöbetingade faktorer för celltalet är mindre på icke infekterade (bakteriologiskt negativa) juverdelar än på infekterade juverdelar (Dohoo & Meek, 1982; Eberhart, Hutchinson & Spencer, 1982; Harmon, 1994; Laevens *et al*, 1997).

## Variationer i mjölksammansättningen

Mjölksammansättningen varierar mellan olika raser och mellan individer av samma ras (Jeness, 1985) och den påverkas liksom celltalet av faktorer som laktationsstadium, mjölmängd och typ av foder (Collier, 1985). Det finns också en koppling mellan koncentrationen av olika mjölkkomponenter och en viss celltalsnivå (Hamann, 2001). Hamann (2001) visade att förändring i mjölksammansättningen började vid ca 50 000 celler/ml och att halterna av olika mjölkkomponenter var utanför normala fysiologiska nivåer vid ca 100 000 – 120 000 celler/ml. Vid mastit sker en ökning av mjölkkomponenter som har en negativ effekt på mjölk kvalitén, t ex protolytiska enzymer, natrium- och kloridjoner, medan nutritionellt viktiga komponenter, som fett, kasein och laktos minskar.

## Laktos som indikator på mastit

Laktos är en disackarid bestående av glukos och galaktos. Det syntetiseras i mjölkörtelns celler och utgör den största delen av kolhydraterna i mjölken. Laktos är den viktigaste osmotiskt aktiva delen i mjölk (Kaartinen, 1995; Korhonen & Kartinen, 1995). Mjölk och blodplasma är iso-osmotiska. Vid förhöjda celltal ökar natrium- och kloridkoncentrationerna till följd av skador på de sekretoriska cellerna. Genom ett osmotiskt feedbacksystem minskar då laktosyntesen, laktoshalten sjunker och den osmotiska balansen i mjölken kan på så sätt upprätthållas (Korhonen & Kartinen, 1995). Cellskadorna leder även direkt till en minskad kapacitet att syntetisera laktos (Giesecke & Van der Heever, 1974). Vissa juverpatogener bidrar också till en minskning av laktoshalten genom förmågan att fermentera laktos (Auld *et al.*, 1995).

Laktosinnehållet i mjölk varierar normalt mellan 3,5 och 5,5 % (Mantere-Alhonen, 1995). I mjölken från en inflammerad juverdel sjunker laktoshalten med ungefär 10 % (Korhonen & Kaartinen, 1995). Sambandet mellan laktoshalten och celltalet är negativt signifikant (Miller *et al.*, 1983; Korhonen & Kartinen, 1995; Berglund, 2003). Vid användning av laktos som indikator på mastit görs bedömningen säkrast mellan juverdelarna på samma ko (Lederer & Kramer, 1980; Berglund, 2003; Åkerstedt 2003).

## Syfte med studien

Syftet med studien var för det första att jämföra tre olika fältmetoder för detektion av mastit hos ko, California Mastitis Test (CMT), DeLaval cellräknare DCC (direct cell counting)<sup>1</sup> (DCC) och FMA2001 Farm Milk Analyzer<sup>2</sup> (FMA2001). För det andra att undersöka vid vilken celltalsnivå som kliniska symptom på mastit uppträder. För det tredje att se om de kliniska fynden och celltalen gick att relatera till bakterieförekomst i mjölken.

---

<sup>1</sup> DeLaval cellräknare DCC, DeLaval International AB, Tumba, Sverige

<sup>2</sup> FMA2001 Farm Milk Analyzer, Miris AB, Uppsala, Sverige.

Arbetet baseras på fyra frågeställningar: 1, Stämmer de tre fältmetoderna överens – är de tillförlitliga; 2, är de användbara i fältarbete; 3, Uppträder kliniska symptom vid en viss celltalsnivå; 4, Om kon har kliniska symptom på mastit och/eller höga celltal, kan man då förvänta sig att hitta bakterier i mjölken?

## Beskrivning av analysmetoderna

Analysmetoderna som användes var CMT och DeLavals cellräknare DCC, vilka ger ett mått på mängden celler i mjölken, samt FMA2001 för analys av laktos. Dessutom utnyttjades Fossomatic (modell FT120)<sup>3</sup> som en referensmetod för celltal och laktos.

### *California Mastitis Test*

California Mastitis Test (CMT) utvecklades 1957 som en snabb, ”cow-side” fältindikator för mastit hos ko. CMT mäter DNA-innehållet i mjölken, vilket återspeglar mängden celler. Reagenten i CMT löser upp cell- och kärnmembran och bildar gel med cellulärt DNA. Reaktionen graderas i en femgradig skala, där varje grad motsvarar ett celltalsintervall enligt tabell 1 (Schalm *et al*, 1971). CMT har begränsad sensitivitet och specificitet för uppskattning av celltal och skall bara användas som en fältindikator för mastit.

Tabell 1. Gradering av CMT och motsvarighet i celltal (Schalm *et al*, 1971)

CMT-grad	reaktion/gelbildning	celltal x10 <sup>3</sup> /ml
1	Negativ	0 - 200
2	Spår	150 - 500
3	svagt positiv	400 - 1 500
4	tydligt positiv	800 - 5 000
5	starkt positiv	> 5 000

### *DeLaval cellräknare DCC*

DeLaval cellräknare DCC (DCC) är en bärbar optisk cellräknare. Celltalet bestäms automatiskt i ett flourescensmikroskop. 20 µl mjölk dras upp i en kassett innehållande en liten mängd reagent, som färgar cellkärnorna. När komplexet mellan cellkärnor och reagens belyses med ljus, ger det upphov till flourescerande signaler. Genom linser och filter registreras dessa till en bild, som används för att bestämma antalet celler (DeLaval, 2003). Instrumentet, som var en av de första prototyperna, är i skrivande stund (december 2003) ännu inte lanserat i Sverige (Lind, 2003).

### *FMA2001 Farm Milk Analyzer*

FMA2001 analyserar fett, protein, laktos, torrsbstans och energi i mjölken genom infraröd spektroskopi och är framtagen för att kunna användas på gårdsnivå. Den har funnits cirka ett år på marknaden och den officiella försäljningen började den 1

<sup>3</sup> Fossomatic, Foss Electric, Hillerød, Danmark.

februari 2003. Strålar från infrarött ljus går igenom en transparent kuvett innehållande, i det här fallet, mjölkprovet. Halterna beräknas baserat på de ljusvågor som gått igenom mjölkammaren (MirisAB, 2003; Sjögren, 2003). I aktuell studie analyserades endast laktos.

Laktoshalterna måste jämföras inom ko för att få en sannolikhetsdiagnos om kon har mastit eller inte. Jämförelserna görs med det mjölkprov inom ko som har det högsta värdet. Om skillnaden är 0,15 procentenheter eller mer indikerar det en måttlig inflammation. Skillnader större än 0,3 procentenheter tyder på kraftig inflammation (men inte nödvändigtvis klinisk). En programmodul finns som visar om laktoshalterna tyder på mastit (Sjaunja, 2003).

### *Fossomatic*

Fossomatic-instrumentet har funnits på marknaden sedan 1974. Det är en automatiserad metod för celltalsräkning, s.k. flouero-optic-electronic-cell-counting, vilken idag är allmänt vedertagen för rutinanalys av celltal (Holtorp, 1989). Fossomatic färgar cellerna med en fluorescensfärgning och räknar sedan antalet färgade partiklar (Holtorp, 1989). Den analyserar bland annat även laktos. Den maskin som använts i det här arbetet är den som används i rutin och forskning vid Kungsängens gård, SLU.

## **Material och metoder**

### **Material**

SRB-kor från Kungsängens gård, SLU, undersöktes och provtogs vid fem olika tillfällen i september och oktober 2003. Totalt gjordes klinisk undersökning, CMT- och DCC-analys på fjärdedelsnivå på 31 olika kor. Åtta stycken av dessa var med två gånger, fem stycken var med tre gånger och en ko var med fyra gånger. På 27 olika kor gjordes analys av laktos på fjärdedelsnivå. Fyra stycken av dessa var med vid två tillfällen, fyra stycken vid tre och en ko vid fyra tillfällen. Således gjordes 52 kliniska undersökningar, 208 mjölkprov analyserades med CMT och DCC, och i 168 mjölkprover analyserades laktos med FMA2001. Bakteriologisk undersökning gjordes på 38 av mjölkproverna. För de kor som ingick i studien mer en gång förflöt minst en vecka mellan gångerna.

En jämförelse gjordes på femtio stycken heljuverprover (mjölk poolat från alla juverfjärdedelarna - koprov) mellan celltalsberäkningar från Fossomatic och DCC, och på fyrtio stycken heljuverprover mellan laktosanalyser från Fossomatic och FMA2001.

### **Urval**

Korna var i tre olika system; uppbundna i kortbås, automatiskt mjölkningssystem (AMS) och lösdrift. Urvalskriteriet för kor som skulle provtas på fjärdedelsnivå var ett celltal >200 000 celler/ml vid senaste provmjölkning. Korna som var i

robotstallet provmjölkades en gång i veckan. För övriga skedde provmjölkning en gång i månaden. Av de totalt 52 kor som valdes ut för provtagning var 28 bland dem som provmjölkades en gång i veckan. För de övriga förflöt mellan två och tre veckor från att korna valdes ut till dess att de provtogs. Undantaget var en ko med lindriga kliniska symptom på mastit, som provtogs samma dag som symptomen setts. Korna var i olika åldrar och laktationsstadier. För analys av koprov togs ungefär hälften av proverna från kor med celltal >200 000 celler/ml vid senaste provmjölkning (en vecka tidigare) och ungefär hälften blev slumpmässigt utvalda.

### **Klinisk undersökning**

Vid den kliniska undersökningen noterades allmäntillstånd, rektaltemperatur, juvrets konsistens, eventuell asymmetri mellan juverhalvorna, spenhudens kondition och spenspetsarnas utseende. Vidare undersöktes mjölken med avseende på avvikelser i färg och konsistens.

Kor klassades ha kliniska fynd vid inflammationstecken i juvret och/eller förändringar i mjölken, tillsammans med eventuellt påverkat allmäntillstånd och feber. De kliniska symptomen graderades som lindriga, måttliga eller kraftiga.

### **Provtagning och provhantering**

Provtagningen på fjärdedelsnivå gjordes på förmjölken. Minst sex timmar hade förflutit sedan senaste mjölkning. Från varje juverdel drogs först mellan 20 och 40 ml (strikt förmjolk). Därefter mjölkades korna i CMT-paddel för undersökning av mjölken. Slutligen mjölkades fem till tio ml från varje juverfjärdedel i varsitt mjölkrör för DCC- och FMA2001-analyser. Proven, som i vissa fall användes för bakteriologisk odling, togs aseptiskt enligt nordiska riktlinjer. För analys av heljuverproverna användes de koprov som togs vid ordinarie provmjölkningstillfällen.

CMT graderades på en skala från 1 till 5 enligt Schalm *et al*, (1971), tabell 1. Mjolk med CMT 4 och 5 odlades ut på en selektiv odlingsplatta för bakteriologisk diagnostik (SELMA PLUS<sup>4</sup>). Plattorna odlades i  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  och lästes av efter ett och två dygn. Mjolkproverna analyserades inom två dygn från provtagningen. Mellan provtagning och analys förvarades de i kylskåp. Innan analyserna värmdes de i vattenbad till en temperatur mellan 20 och  $40^\circ\text{C}$  och mjölken blandades väl. Två mätningar gjordes av varje prov med DCC och en mätning av varje prov med FMA2001. Analyserna med Fossomatic utfördes av personalen på mjölklaboratoriet på Kungsängens gård inom ramen för deras ordinarie arbete.

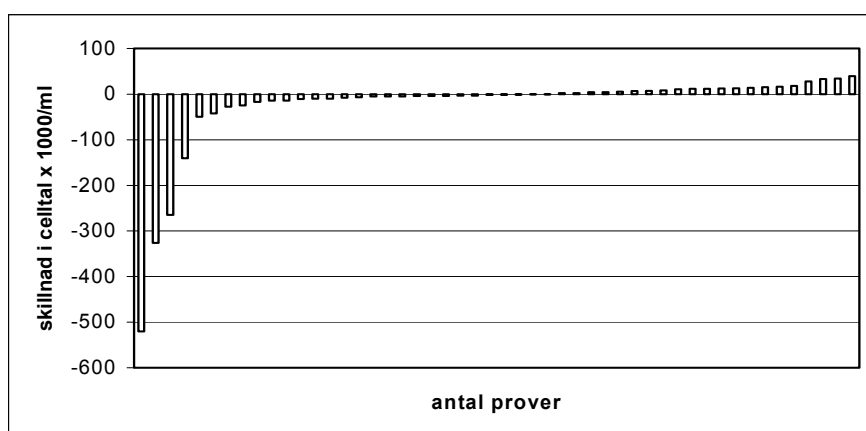
---

<sup>4</sup> SELMA-PLUS, SVA & BI-vet, Uppsala, Sverige

## Resultat

### Avvikelser från Fossomatic

De femtio koprov som analyserades med DCC var i medeltal (aritmetiskt medelvärde) 25 000 celler/ml (13 %) lägre än värdena från Fossomatic och hade en standardavvikelse på 188 000 celler/ml. Högsta negativa avvikelse var 520 000 celler/ml och högsta positiva avvikelse var 39 000 celler/ml (se figur 1). Om den största avvikelsen tas bort blir värdena från DCC i medeltal 14 000 celler/ml (7%) lägre än värdena från Fossomatic.



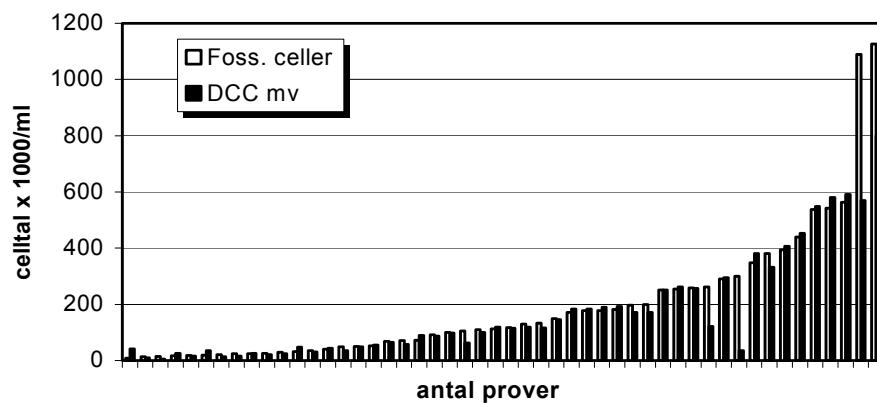
Figur 1. Skillnad i celltal  $\times 10^3/\text{ml}$  vid en jämförelse mellan Fossomatic och DeLaval cellräknare DCC av femtio koprov. Fossomatic är satt som nollvärde.

Aritmetiskt medelvärde, standardavvikelse, första, andra (median) och tredje kvartilen för Fossomatic, DCC och skillnaden mellan metoderna visas i tabell 3 i 1000-tal celler/ml. Fyra av proverna avvek markant från de övriga. Två av dem hade över en miljon celler/ml och de andra två över 250 000 celler/ml beräknat med Fossomatic (figur 2).

Tabell 3. Jämförelse av celltal i koprov mellan Fossomatic och DeLaval cellräknare DCC ( $n = 50$ )

	Fossomatic, celltal $\times 10^3/\text{ml}$	DeLaval cellräknare DCC, celltal $\times 10^3/\text{ml}$	Differens, celltal $\times 10^3/\text{ml}$
Medelvärde	198	173	-25
Std avv	240	188	96
1:a kvartil	36	37	-10
Median	115	108	-2
3:e kvartil	257	236	10

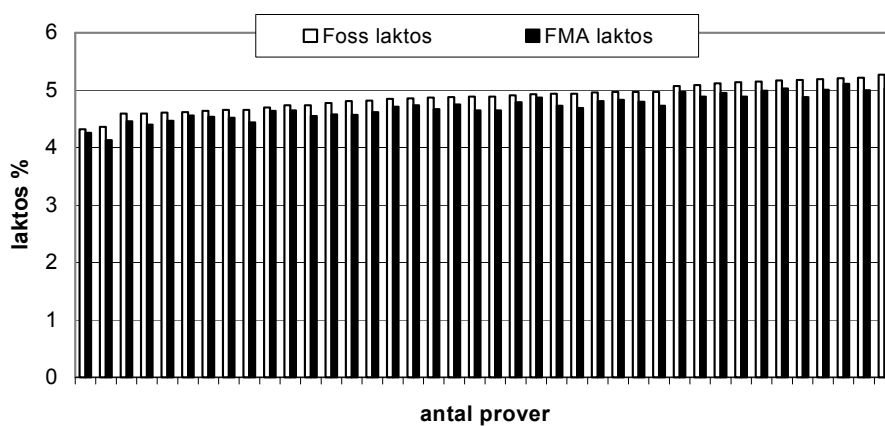




Figur 2. Jämförelse av celltal från koprov mellan Fossomatic (Foss.) och DeLaval cellräknare DCC (n = 50). Varje prov motsvaras av en stapel för Fossomatic och en för DCC.

Med en celltalsgräns >100 000 celler/ml för mastit klassades ett fall (2 %) fel av DCC enligt Fossomatic. Med en gräns på >150 000 eller >200 000 celler/ml klassades två fall (4 %) fel.

Värdena från de fyrtio koprov som analyserades med FMA2001 var samtliga lägre än de från Fossomatic (figur 3). I genomsnitt var skillnaden 0,15 procentenheter. Den högsta avvikelser var 0,30 procentenheter (ett prov) och den lägsta 0,06 procentenheter. Aritmetiskt medelvärde, median och standardavvikelse av laktoshalten visas i tabell 4 för Fossomatic, FMA2001 och skillnaden mellan metoderna.



Figur 3. Jämförelse av laktosvärden från koprov mellan Fossomatic (Foss) och FMA2001 (n = 40). Varje prov motsvaras av en stapel för Fossomatic och en för FMA2001.

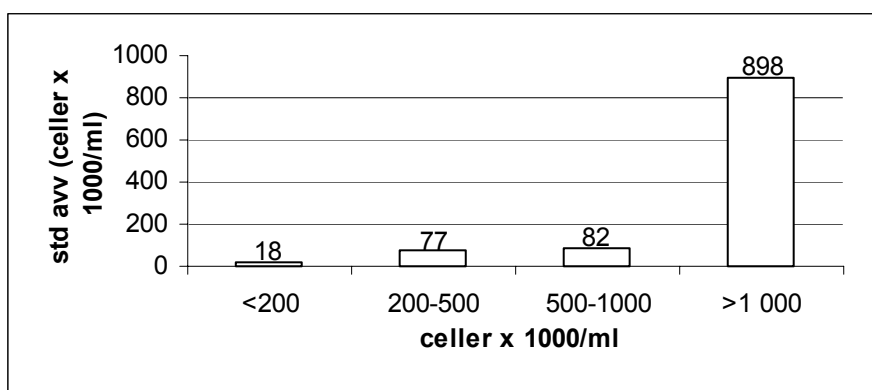
Tabell 4. Jämförelse av laktosvärden från koprov mellan Fossomatic och FMA2001 (n = 40)

	Fossomatic, laktos (%)	FMA2001, laktos (%)	Differens (procentenheter)
Medelvärde	4,88	4,71	-0,15
Median	4,89	4,72	-0,17
std avv	0,23	0,22	0,09

I 22 av proverna (55 %) översteg celltalet analyserat med Fossomatic 100 000 celler/ml, i 15 av proverna (38 %) översteg celltalet 150 000/ml och i 9 av proverna (23 %) översteg celltalet 200 000/ml. Laktoshalten, enligt FMA2001, låg i genomsnitt på 4,64; 4,62 och 4,60 % för respektive celltalsgrupp enligt ovan. Lägsta uppmätta laktoshalt var i samtliga tre grupperingar 4,13 % och högsta uppmätta laktoshalt var 4,95 %. Laktoshalterna i övriga prover var mellan 4,26 och 5,11 % med en median på 4,86 %.

### DCC-instrumentets spridning av analysvärden

Medianen av skillnaden mellan de två mätningar som gjordes på varje mjölkprov med DCC var 12 000 celler/ml och standardavvikelsen 349 000 celler/ml. I figur 4 visas spridningen (standardavvikelsen) mellan de två mätningarna för celltalsnivåer <200 000, 200 000 – 500 000, 500 000 – 1 000 000 och >1 000 000 celler/ml grupperat efter det högsta erhållna värdet.



Figur 4. Standardavvikelsen (std avv) på skillnaden mellan mätningarna med DCC angivet i 1000 celler/ml för resultat <200 000, 200 000 – 500 000, 500 000 – 1 000 000 och >1 000 000 celler/ml, grupperat efter det högsta värdet av de två mätningarna (n = 208).

### Jämförelse av CMT och DCC på juverdelsnivå

Antalet prover per uppskattad CMT-grad samt spridningen och celltalsmedelvärdet i 1000-tal/ml erhållna från DCC redovisas i tabell 3.

Tabell 5. Antal prov (%) per uppskattad CMT-grad samt spridning och medelvärde av celltal från DCC av 208 mjölkprover från ko

CMT-grad	Antal (%)	Spridning DCC, celltal x10 <sup>3</sup> /ml	Medelvärde DCC, celltal x10 <sup>3</sup> /ml
1	51 (24,5)	1 – 95	18
2	56 (26,9)	1 – 514	60
3	62 (29,8)	6 – 3 060	300
4	27 (13,0)	40 – 5 024	1 307
5	12 (5,8)	2 588 – 6 342	4 367

I jämförelse med de celltalsintervall som satts upp för varje CMT-grad enligt Schalm (1971) (tabell 1) låg alla prover för CMT 1, fem av proverna (9 %) med CMT 2, elva av proverna (18 %) med CMT 3, elva av proverna (41 %) med CMT 4 och fyra av proverna (33 %) med CMT 5 inom detta intervall. De prover som låg utanför intervallet låg under den nedre gränsen i samtliga fall utom ett, där ett celltal >3 000 000/ml bedömdes som CMT 3.

### Celltal relaterat till kliniska fynd

Av de 208 mjölkprov som analyserades med DCC översteg 56 stycken (27 %) 200 000 celler/ml. Femtio stycken (89 %) av dessa var från kor utan kliniska symptom. Av de övriga sex mjölkproverna kom fem av proverna från kor med lindriga kliniska symptom, såsom svullet juver, flockbildning och färgförändring av mjölken och ett prov från en ko med måttlig svullnad av aktuell juverdel. Celltalet på dessa varierade mellan 2 358 000 och 6 342 000 celler/ml.

I ytterligare fyra prover var det en konsistens- och färgförändring på mjölken (tjockare och gulare än normalt). De kom från samma ko och celltalen var mellan 71 000 och 196 000 celler/ml. Kon var i tionde laktationsmånaden med en dygnsavkastning på cirka 15 l. Celltalet hos kor utan kliniska symptom låg mellan 1000 (lägsta detektionsnivå) och 5 148 000 celler/ml.

### FMA2001 jämfört med DCC, CMT och kliniska fynd

Sjutton (10 %) av de 168 mjölkprover som analyserades med FMA2001 visade på måttlig mastit (minst 0,15 procentenheter lägre än det högsta värdet från samma ko) och 34 (20 %) av proverna kom från juverdelar med kraftig inflammation (mer än 0,3 procentenheter lägre än det högsta värdet från samma ko).

Celltalen från de totalt 51 prover, som visade på måttlig till kraftig mastit, varierade mellan 1000 och 6 342 000 celler/ml med ett aritmetiskt medelvärde på 1 629 000 och en median på 514 000 celler/ml. Nio av juverfjärdedelarna (18 %), som enligt FMA2001 klassades ha mastit, hade ett celltal under 100 000/ml, 13 stycken (25 %) hade ett celltal under 150 000/ml och 15 stycken (29 %) hade ett celltal under 200 000/ml. I de juverfjärdedelar där celltalet översteg 100 000/ml var det 27 stycken (39 %) som ej klassades ha mastit. För celltal över 150 000 och 200 000/ml var motsvarande antal 24 (39 %) respektive 20 (36 %). Vid celltalsnivån 400 000 celler/ml klassades 31 stycken (80 %) ha mastit enligt

FMA2001. Antalet prover, som klassades ha mastit, med celltal under denna nivå var då 20 stycken (39 %).

CMT-graderna på de prov som klassades ha mastit enligt FMA2001 varierade mellan 1 och 5. Av de prov som uppskattats till CMT 5 klassades alla som mastit. Sextiofem procent av proverna med CMT 4; 35 % av proverna med CMT 3; 6,5 % av proverna med CMT 2 och 8,3 % av proverna med CMT 1 klassades ha mastit. Alla kor med klinisk mastit klassades ha mastit samt tre av fyra prover från en ko vars mjölk var tjockare och gulare än normalt (se ovan). Laktoshalten varierade mellan 2,14 % och 5,06 % med en median på 4 %. En laktoshalt under 3,5 % motsvarades av celltal >400 000 celler/ml och CMT 3 till 5.

### **Odling av bakterier från mjölkprov**

Bakterieodlingarna var positiva från 24 av de 38 proverna som odlades för bakteriologisk diagnostik. Celltalet från DCC på de prover där bakterier växte var mellan 265 000 och 5 148 000 celler/ml, med ett genomsnitt på 2 459 600 celler/ml. Proverna som gav negativa odlingsresultat (14 stycken) hade ett celltal mellan 40 000 och 6 342 000/ml, med ett genomsnitt på 1 926 400 celler/ml. Från hälften av korna med kliniska symptom och CMT 4 eller 5 var bakterieodlingarna positiva. Bakteriearterna som isolerades var till övervägande del *Streptococcus spp* och koagulasnegativa stafylokocker. I något eller några fall isolerades *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella spp* och *Escherichia coli*. I fyra av proverna växte blandflora.

## **Diskussion**

### **Tillförlitligheten av metoderna**

Som beskrivits i inledningen är gränsen för celltalet mellan frisk och förändrad/inflammerad mjölk flytande. Mellan 100 000 och 200 000 celler/ml råder en gråzon. I resultatredovisningen gavs därför siffror för antal ”feldiagnostiserade” fall (med Fossomatic satt som ”standard”) med gräns för mastit vid 100 000, 150 000 och 200 000 celler/ml. Enligt det här försöket skulle DCCn vid en jämförelse med Fossomatic ge en låg frekvens feldiagnostiserade fall oavsett vilket av ovan angivna gränsvärden för mastit som använts. Problematiken med celltalsberäkning är att det är svårt att fastställa ett sant värde. En variation kommer alltid att finnas oavsett mätmetod, bl a till följd av olika kalibreringssystem (Sjögren, 2003).

Överensstämmelsen mellan Fossomatic och DCC var relativt god för celltal <200 000 celler/ml. Däröver avvek fyra av de femtio proverna, varav två översteg en miljon celler/ml med Fossomatic och >500 000 celler/ml med DCC. Trots en stor värdeskillnad handlar det i båda fallen om höga celltal både analyserat med Fossomatic och med DCC, där båda värdena hade lett till diagnosen trolig mastit och uttag av mjölkprov för bakteriologisk odling. De övriga två proverna beräknades med Fossomatic till 300 000 och 262 000 celler/ml och med DCC till

35 000 respektive 122 000 celler/ml. Det finns några olika möjliga orsaker till differensen: 1, förväxling av prover; 2, spridning i analysvärden från DCC (prototyp); 3, spridning i analysvärden från Fossomatic. De båda förstnämnda är de två mest troliga, även om en variation på +/- 7 % brukar anges som normalt för Fossomatic.

Upprepade mätningar på samma prov med DCC-instrumentet gav något varierande resultat. Spridningen mellan mätningarna var i genomsnitt större ju högre celltalen var. I mindre än 1 % av fallen skulle skillnaderna mellan mätningarna göra att mjölken klassades fel, enligt celltalsgränserna ovan. I praktiskt kliniskt fältarbete får den felprocenten anses som acceptabel.

Jämförelsen av heljuverprover mellan Fossomatic och FMA2001 visade en konstant skillnad där FMA2001 låg något lägre än Fossomatic på samtliga prover, vilket skulle kunna bero på kalibreringen av instrumenten. Eftersom inget prov avvek i någon högre grad (största tolererbara avvikelse är 0,3 procentenheter (Sjaunja, 2003) och inget prov avvek med mer än detta värde) var överensstämmelsen ändå god. Rent praktiskt saknar en systematisk skillnad betydelse då jämförelsen av laktoshalterna görs mellan juverdelarna inom ko.

Även om laktoshalten i genomsnitt sjönk med stigande celltal, sågs en stor överlappning av värdena mellan olika celltalsintervall. Resultaten i den här undersökningen visar att laktos i heljuverprov är en relativt sett mer osäker analysmetod för detektion av mastit.

## **Överensstämmelse mellan fältmetoderna**

För den mjölk som klassades som CMT 1 och 4 var medelvärdena från DCC inom de celltalsintervall som anges för de olika CMT-graderna i tabell 1. För CMT 2, 3 och 5 låg celltalen i genomsnitt under den nedre gränsen. I en stor andel av proverna var celltalen under celltalsintervallet för respektive CMT-grad. Bidragande till utgången var sannolikt avläsarens övertolkning av svaga CMT-reaktioner.

Resultaten visar att det var svårt att uppskatta celltal med hjälp av CMT p.g.a. testets låga specificitet, men att det - vilket är väl känt - gick att använda som fältindikator för mastit. Med ledning av resultaten skulle man också kunna föreslå en justering av celltalsintervallen för de olika CMT-graderna. Med en gräns för CMT 5 på >3 000 000 celler/ml skulle alla utom ett (92 %) av proverna som uppskattades till CMT 5 i den aktuella studien klassas rätt. CMT 5 innebär en tydlig CMT-reaktion som borde vara svår att felklassificera. En justering av celltalsgränsen mellan CMT 4 och 5 innebär ingen skillnad för klassificering av diagnosen mastit.

FMA2001 överensstämde till viss del väl med de övriga två fältmetoderna, men resultaten visade också en stor spridning i diagnosen av mastit enligt ovan. FMA2001 gav utslag på alla prover med CMT 5 och närmare två tredjedelar med CMT 4, men även på de övriga CMT-graderna. Likaså varierade celltalen från lägsta detektionsnivå (1000 celler/ml) till det högsta uppmätta värdet (6 342 000

celler/ml) på de prover som klassades ha mastit. Medelvärdet var dock högt och medianen låg på >500 000 celler/ml.

Andelen falskt positiva, dvs där FMA2001 visade att det fanns en mastit fast det inte var så (enligt DCC) varierade mellan 18-25 % beroende på vald celltalsgräns. Andelen falskt negativa, dvs där instrumentet visade att det inte var mastit fast det var det (enligt DCC), varierade mellan 36 och 39 % beroende på vald celltalsgräns. Över ett celltal på 400 000/ml enligt DCC indikerade FMA2001 mastit i 80 % av fallen. För att FMA2001 inte skall missa mastitdiagnoser eller orsaka ökade kostnader i provtagning på kor där det inte behövs, bör precisionen ffa vid lägre celltalsnivåer förbättras, under förutsättning att värdena erhållna med DCC är rimligt korrekta. Resonemanget bygger också på att celltalet är att föredra som mastitindikator framför andra förändringar i mjölken.

### **Metodernas användbarhet i fältarbete**

DeLaval cellräknare DCC var mycket lättanvänd. En ny kassett, i vilken mjölken sögs upp, togs för varje prov. Det gjorde att instrumentet hölls rent, men också att det blev mycket avfall. Provet bearbetades snabbt och analysvärdet visades på en display. Om fel uppstod, t ex om mjölken fördelades ojämnt inuti kassetten visades en felkod på displayen, vilket hände några gånger under försöket.

Användandet av FMA2001 gick också lätt, men krävde fler moment för varje analys och tog därmed något längre tid. Mjölken sprutades in i instrumentet och rengöring skulle utföras mellan var åttonde till tionde prov. Förutom laktos gick det också att samtidigt analysera mjölkens innehåll av fett, protein och energi, samt mjölkens torrs substans. Resultaten visades på instrumentets display, men instrumentet kunde också kopplas till en PC för resultatredovisning.

Fördelen med CMT är att det är en mycket enkel och väl beprövad metod. Nackdelen är att det är svårt att sätta upp bedömningskriterier, eftersom CMT-reaktionen bedöms subjektivt. Negativa (CMT 1) och tydligt till starkt positiva reaktioner (CMT 4-5) förefaller ge den säkraste bedömningen för diagnosen mastit eller icke mastit.

### **Celltalsnivå för klinisk mastit**

Endast sex fjärdedelsprover kom från juverdelar med kliniska symptom på mastit. Lägsta uppmätta celltalet för dessa var 2 358 000 celler/ml. Detta är ett för litet antal prover för att kunna bedöma vid vilken celltalsnivå som kliniska symptom uppträder. Studien visade i alla fall att det inte finns någon tydlig gräns mellan celltalen för subklinisk och klinisk mastit, då celltal på upp till 5 148 000 celler/ml uppmättes i mjölken från juverdelar utan kliniska symptom.

På kor i slutet av laktationen som inte mjölkar så mycket är det inte onormalt med en konsistensökning och eventuellt också en svag färgförändring av mjölken, vilket också sågs hos en av de undersökta korna.

## **Bakterieförekomst i mjölk**

Bakterier hittades i mjölk med celltal från 265 000 celler/ml, men celltalen kunde också vara högre än så (upp till 6 342 000 celler/ml i den aktuella studien) med en negativ bakterieodling. Odlingsresultaten från kor med klinisk mastit var positiva i hälften av fallen. Resultatet från bakterieodlingarna var väntat. Trots att mastit vanligen är bakterieorsakad, är det inte sällan som bakterieodling av mastitmjölk blir negativ. Detta kan t ex bero på att mängden bakterier i mjölken är för låg för detektion eller att infektionen redan är eliminerad. I de flesta fall elimineras bakterierna snabbt men inflammationen kvarstår längre.

## **Slutsatser**

Resultaten från DCC visade god överensstämmelse med resultaten från Fossomatic. DCC-instrumentets spridning av analysvärden var acceptabel, då den ledde till en osäkerhet i diagnostiken i mindre än 1 % av fallen.

FMA2001 gav bra värden jämfört med Fossomatic, men laktos fungerade sämre som mastitindikator både på heljuverprov och vid jämförelse inom ko.

Överensstämmelsen mellan CMT och DCC var rimligt god för en fältmetod med syfte att klassificera mastit och för att ge en vägledning för mjölkprovtagning av kor. Resultaten visar att CMT inte skall användas för att uppskatta celltal, p.g.a. testets låga sensitivitet och specificitet. Negativa (CMT 1) och tydligt positiva reaktioner (CMT 4-5) gav den säkraste bedömningen av om mastit förelåg eller inte.

Det fanns inte någon tydlig gräns mellan celltalen för subklinisk och klinisk mastit. Materialet var för litet för att kunna ange en nedre gräns för celltalet hos kor med klinisk mastit, men kliniska symtom kan förekomma vid celltal på drygt två miljoner per ml. Å andra sidan kan celltalet vara så högt som > 6 000 000/ml utan kliniska symtom.

Höga celltal och kliniska fynd gick inte att relatera till bakterieförekomst i mjölken.

## Litteraturförteckning

- Auldust, M.J., Coats, S., Rogers, G.I. & McDowell, G.H. 1995. Changes in the composition of milk from healthy and mastitic dairy cows during the lactation cycle. *Australian journal of experimental agriculture* 35, 427-436.
- Berglund, I. 2003. Milking dairy cows at udder quarter level. Possibilities and applications. *Swedish University of Agricultural Sciences*, Report 255. 1-44. ISSN 0347-9838.
- Brolund, L. 1985. Cell counts in bovine milk. Causes of variation and applicability for diagnosis of subclinical mastitis. *Acta Veterinaria Scandinavica, Supplementum 80*, 1-123.
- Collier, R.J. 1985. Nutritional, metabolic and environmental aspects of lactation. In: Larson, B.L. (ed). *Lactation*. 1<sup>st</sup> edition. The Iowa state university press. Ames, Iowa. 80-128.
- DeLaval. 2003. *Preliminary instruction book. DeLaval cell counter DCC*. DeLaval International AB. Tumba, Sweden. 30 pp.
- Dohoo, I.R. & Meek, A.H. 1982. Somatic cell counts in bovine milk. *Canadian veterinary journal* 23, 119-125.
- Eberhart, R.J., Hutchinson, L.J. & Spencer, S.B. 1982. Relationships of bulk tank somatic cell counts to prevalence of intramammary infection and to indices of herd production. *Journal of food protection* 45, 1125-1128.
- Ekman, T. & Emanuelson, U. 2000. No indications of immune incompetence in Swedish low cell count cows. *Pacific congress on milk quality and mastitis control, November 2000, Nangano, Japan*.
- Giesecke, W.H. & Van der Heever, L.W. 1974. The diagnosis of bovine mastitis with particular reference to subclinical mastitis – a critical review of relevant literature. *Journal of veterinary research* 41, 169-212.
- Hamann, J. 2001. Relationships between somatic cell count and milk composition. *Conference proceeding IDF, World dairy summit 2001, New Zealand*.
- Harmon, R.J. 1994. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *Journal of dairy science* 77, 2103-2112.
- Holtorp, C. 1989. Mastitis, milk quality and new EEC-regulations. *Scandinavian dairy industry* 4, 46-49.
- Jenness, R. 1985. Biochemical and nutritional aspects of milk and colostrum. In: Larson, B.L. (ed). *Lactation*. 1<sup>st</sup> edition. The Iowa state university press. Ames, Iowa. 164-197.
- Kaartinen, L. 1995. Physiology of the bovine udder. In: Sandholm, M., Honkanen-Buzalski, T., Kaartinen, L. & Pyörälä, S. (eds.). *The bovine udder and mastitis*. 1<sup>st</sup> edition. University of Helsinki, Faculty of Veterinary Medicine, Helsinki. 14-23.
- Korhonen, H. & Kaartien, L. 1995. Changes in the composition of milk induced by mastitis. In: Sandholm, M., Honkanen-Buzalski, T., Kaartinen, L. & Pyörälä, S.



- (eds.). *The bovine udder and mastitis*. 1<sup>st</sup> edition. University of Helsinki, Faculty of Veterinary Medicine, Helsinki. 76-82.
- Laevens, H., Deluyker, H., Schukken, Y.H., De Meulemeester, L., Vandermeersch, R., De Muëlenaere, E. & De Kruif, A. 1997. Influence of parity and stage of lactation on the somatic cell count in bacteriologically negative dairy cows. *Journal of dairy science* 80, 3219-3226.
- Lederer, J. & Kramer, R. 1980. Ausgewert des Laktosgehaltes der Milch als Indikator für subklinische Mastitis. *Der Tierzüchter* 3, 96-98.
- MirisAB. 2003. *FMA2001 user manual*. MirisAB. Uppsala, Sweden.
- Mantere-Alhonen, S. 1995. Composition of milk. In: Sandholm, M., Honkanen-Buzalski, T., Kaartinen, L. & Pyörälä, S. (eds.). *The bovine udder and mastitis*. 1<sup>st</sup> edition. University of Helsinki, Faculty of Veterinary Medicine, Helsinki. 24-30.
- Miller, R.H., Emanuelsson, U., Persson, E., Brolund, L., Philipsson, J. & Funke, H. 1983. Relationships of milk somatic cell counts to daily milk yield and composition. *Acta Agriculturae Scandinavica* 33, 209-223.
- Politis, I. & Ng-Kwai-Hang, K.R. 1988. Effects of somatic cell counts of milk and cheese yielding capacity. *Journal of dairy science* 71, 1711-1719.
- Saloniemi, H. 1995. Use of somatic cell count in udder health work. In: Sandholm, M., Honkanen-Buzalski, T., Kaartinen, L. & Pyörälä, S. (eds.). *The bovine udder and mastitis*. 1<sup>st</sup> edition. University of Helsinki, Faculty of Veterinary Medicine, Helsinki. 105-110.
- Schalm, O.W., Carroll, B.S. & Jain, N.C. 1971. Bovine Mastitis. School of Veterinary Medicine, University of California. Davis, California. 360 pp.
- Smith, K.L. 2001. A discussion of normal and abnormal milk based on somatic cell count and clinical mastitis. *Conference proceeding IDF, World dairy summit 2001, New Zealand*.
- Åkerstedt, M. 2003. Förändras mjölkens proteinsammansättning i separata juverdelar i samband med höga celltal (SCC)? *Sveriges Lantbruksuniversitet, institutionen för husdjurens utfodring och vård*, Examensarbete 181. 1-36.

## **Opublicerade källor**

- Lind, O. 2003. Personligt meddelande. *DeLaval International AB*, Tumba.
- Sjaunja, L.O. 2003. Personligt meddelande. *MIRIS AB*, Uppsala.
- Sjögren, M. 2003. Mjölkanalyser – en jämförelse mellan ett enkelt IR-instrument för gårdsbruk och befintliga IR-metoder. *Sveriges Lantbruksuniversitet, institutionen för husdjurens utfodring och vård*, Examensarbete (under tryckning).

## **Tackord**

Tack till personalen på Kungsängens gård. Speciellt tack till Märta Blomqvist, Gunnar Pettersson och Gunilla Helmersson, som bland annat försett mig med information från provmjölkningarna, samt Börje Eriksson och Anne Odelström på mjölklaboratoriet, som lånat ut utrustning och ställt ytor till förfogande.

Tack till Lars-Ove Sjaunja, Miris AB och Ole Lind, DeLaval, som ställt apparatur till förfogande och kommit med värdefulla synpunkter.

## Abstract

The objective of this work was to evaluate and compare three field methods for detection of mastitis, California Mastitis Test (CMT), DeLaval cell counter DCC (DCC) and FMA2001 Farm Milk Analyzer (FMA2001). Furthermore, to investigate at what cell count level clinical symptoms of mastitis are seen, and finally to check if the clinical findings and cell counts could be related to bacteriological findings.

DCC and FMA2001 are new analytic instruments to be used on dairy farms for detection of mastitis. CMT has been a widely used cow-side-test of milk quality in mastitis control efforts, but it cannot be used for estimating cell counts in scientific studies or investigations.

Two hundred and eight quarter milk samples from 52 cows were analysed with DCC and CMT, and 168 of these samples with FMA2001. Microbiological examination was done on 38 milk samples with CMT scores of 4 and 5. Whole udder milk samples were analysed from 40 and 50 cows with FMA2001 and DCC, respectively, and compared with a fluoro-opto-electronic-cell-counting method (Fossomatic).

The results from DCC and FMA2001 had good correlation with the results from the Fossomatic. The DCC made a misdiagnosis of mastitis at the 200 000-cells/ml level in 4% of the cases compared with the Fossomatic. The lactose content of the milk, which was analysed with the FMA2001, did not work satisfactorily as indicator for mastitis compared to cell count, which were analysed with DCC.

The agreement of CMT with DCC was good enough for a field method to be used for the classification of mastitis and to give guidance in milk sampling for bacteriological examination. The results show clearly that CMT should not be used as a method for estimating cell count, because of the limited sensitivity and specificity.

There was no cut-off level in cell count between sub-clinical and clinical mastitis. The number of samples was too small to determine a lower limit of cell count in clinical mastitis, but clinical symptoms were seen at a cell count level of approximately two million cells/ml. On the other hand, the cell count level could be as high as six million cells/ml without any clinical signs.

High cell counts and clinical findings could not be related to bacteriological findings.