



Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Institutionen för kliniska vetenskaper

Mastit hos tacka

- Celltalet som markör för detektion av juverinfektion

Tilda Börjesson

Uppsala

2011

Examensarbete inom veterinärprogrammet

ISSN 1652-8697

Examensarbete 2011:60

Mastit hos tacka
- Celltalet som markör för detektion av juverinfektion

Tilda Börjesson

*Handledare: Karin Persson Waller, Institutionen för kliniska vetenskaper, SLU,
samt Enheten för djurhälsa och antibiotikafrågor, SVA*

Biträdande handledare: Ylva Persson, Enheten för djurhälsa och antibiotikafrågor, SVA/Svensk Mjolk

Examinator: Bernt Jones, Institutionen för kliniska vetenskaper

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2011
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskapen
Kurskod: EX0239, Nivå:X, 30hp*

Nyckelord: Får, mastit, subklinisk, juverinfektion, celltal, CMT, DCC

*Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>
ISSN 1652-8697
Examensarbete 2011:60*

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

SAMMANFATTNING	1
SUMMARY	2
INLEDNING	3
LITTERATURGENOMGÅNG.....	4
Etiologi.....	4
Juverinfektion och smittspridning	4
Klinik	5
Förekomst och riskfaktorer	6
Behandling och kontroll.....	6
Konsekvenser av subklinisk mastit.....	7
Förändringar i mjölkkompositionen vid mastit	8
Kemiska analyser av inflammationsmarkörer	8
Direkta och indirekta metoder för att uppskatta celltalet i mjölk	9
SYFTE	10
MATERIAL OCH METODER.....	11
Djur och gårdar	11
Provtagning	11
Analys av prover	12
Bearbetning av data	13
RESULTAT	14
Deskriptiv statistik	14
Samband mellan CMT och DCC	16
CMT som markör för att förutsäga bakteriologiskt status i juvret	17
DCC-celltal som markör för att förutsäga bakteriologiskt status i juvret.....	18
Skillnader mellan provtagningstillfällen.....	18
DISKUSSION.....	19
Förekomst av juverinfektion.....	19
Samband mellan CMT och DCC-celltal.....	19
CMT som markör för att förutsäga bakteriologiskt status i juvret	19
DCC-celltalet som markör för att förutsäga bakteriologiskt status i juvret.....	20
Skillnader mellan provtagningstillfällen.....	21
Framtida studier och praktisk hänsyn	21

KONKLUSION	22
RÅD TILL FÅRÄGARE.....	23
TACK TILL.....	24
LITTERATURFÖRTECKNING.....	25

SAMMANFATTNING

Subklinisk mastit är en betydelsefull sjukdom hos tacka. Subklinisk mastit påverkar ekonomin och djurhälsan i päls- och köttproducerande fårbesättningar eftersom sjukdomen kan leda till minskad mjölkproduktion, minskad avvänjningsvikt hos lammen och dessutom kan utvecklas till klinisk mastit. Den vanligaste orsaken till subklinisk mastit hos tacka är bakteriell juverinfektion. För att minska smittspridning mellan tackor är det viktigt att identifiera tackor med juverinfektion, men kunskapen om hur man lämpligast gör detta är bristfällig. Behovet av att hitta bra och pålitliga metoder som går att använda i besättningarna är stort.

Syftet med studien var att utvärdera indirekt analys av celltalet med California Mastitis Test (CMT) och direkt analys av celltalet med DeLaval's portabla celltalsräknare (DCC) som markörer för identifiering av juverinfektion hos tackor utan kliniska symtom på mastit.

Mjölksprover från tackor (n=80) i fyra svenska päls- och köttproducerande fårbesättningar togs vid sammanlagt sex tillfällen mellan januari och augusti 2011. Alla tackor provtogs i anslutning till lamning och i två av besättningarna provtogs tackorna även i sen laktation (n=35). Samtliga mjölksprover analyserades med CMT, DCC och bakteriologisk odling.

Juverinfektion detekterades i 23 (10 %) prover medan 11 (5 %) prover innehöll blandflora och 195 (86 %) prover var bakteriologiskt negativa. Koagulasnegativa stafylokocker (KNS) var den vanligast förekommande bakteriearten då den isolerades i 12 (52 %) av proverna med juverinfektion. Det fanns ett signifikant samband mellan celltalet analyserat med CMT och DCC. Det fanns också ett starkt samband mellan celltalet uppmätt med CMT eller DCC och förekomst av bakteriell växt. Juverdelar med CMT ≥ 3 hade en signifikant större risk att vara infekterade jämfört med juverdelar med CMT 1 och gränsvärden på 500 000 celler/ml eller CMT ≥ 3 bedömdes vara lämpliga för att identifiera tackor med juverinfektion utan kliniska symtom på mastit. Celltalet var högre hos tackor i sen laktation jämfört med tackor i tidig laktation. Det är dock möjligt att använda celltalet som markör för att detektera tackor med juverinfektion både i tidig och sen laktation eftersom celltalet påverkades mer av juverinfektion än av laktationsstadium.

Resultatet tyder på att celltalet analyserat med CMT eller DCC kan användas som markör för att detektera juverinfektion hos tackor utan kliniska symtom på mastit både vid provtagning i tidig och sen laktation.

SUMMARY

Subclinical mastitis is a common disease in ewes. Subclinical mastitis affects economy and animal health in wool- and meat producing sheep farms as it leads to a reduced milk production, reduced lamb weaning weight and may develop into clinical mastitis. The most common cause of subclinical mastitis in ewes is intramammary infection (IMI). To reduce spread of bacteria between ewes it is important to identify ewes with IMI, but the knowledge of the most appropriate way to do this is insufficient. There is a large need to find good and reliable methods that can be used on the farm.

The aim of this study was to evaluate indirect measurement of somatic cell count (SCC) with California Mastitis Test (CMT) and direct measurement of SCC with DeLaval portable cell counter (DCC) as markers for detection of IMI in ewes without clinical signs of mastitis.

Milk samples from ewes (n=80) in four Swedish wool- and meat producing sheep farms were collected at six occasions between January and August 2011. All ewes were sampled close to lambing, and in two of the farms (n=35) the ewes were also sampled in late lactation. All milk samples were analyzed for CMT, DCC and for bacterial growth.

IMI was detected in 23 (10%) of the samples while 11 (5%) of the samples were contaminated and 195 (86 %) of the samples had no bacterial growth. Coagulase-negative staphylococci (CNS) were the most frequent bacterial species as they were isolated from 12 (52%) of the samples with IMI. There was a significant correlation between SCC measured by CMT and DCC. There was also a strong association between SCC measured by CMT or DCC, and bacterial growth. Udder halves with CMT ≥ 3 had a significantly higher risk to be infected compared to udder halves with CMT 1, and the cut-off values 500 000 cells/ml or CMT ≥ 3 were considered suitable for detection of IMI in ewes without clinical signs of mastitis. The SCC was higher in ewes in late lactation compared to ewes in early lactation. However, it is possible to use SCC as a marker to detect ewes with IMI both in early and late lactation since the SCC were affected by IMI to further extent than by stage of lactation.

The results indicate that SCC measured with CMT or DCC can be used as a marker to identify IMI in ewes without clinical signs of mastitis through sampling in both early and late lactation.

Nyckelord (Keywords): tacka, subklinisk, mastit, juverinfektion, celltal, CMT, DCC, ewe, subclinical, mastitis, udder infection, somatic cellcount, CMT, DCC

INLEDNING

Fårnäringen blir allt större i Sverige. De senaste femton åren har antalet tackor och baggar i Sverige ökat med 40 %. I juni 2011 var antalet registrerade tackor och baggar 297 000 och antalet företag med får 9 400 (Statens jordbruksverk, 2011). Fårnäringen i Sverige innefattar både får som hålls för päls- och köttproduktion samt får som används för mjölkproduktion. En majoritet av fårbesättningarna i Sverige har dock endast får för päls- och köttproduktion.

Mastit (juverinflammation) är en betydelsefull sjukdom hos tacka och sjukdomen förekommer hos både mjölk-, päls- och köttfår (Bergonier *et al.*, 2003; Clements *et al.*, 2003). Beroende på symtom kan mastit vara klinisk eller subklinisk och beroende på varaktighet kan sjukdomen vara akut eller kronisk. Tackor med akut klinisk mastit har ofta tydliga symtom i form av förändringar i mjölk och juver samt allmänpåverkan (Mørk *et al.*, 2007). Klinisk mastit innebär stora ekonomiska förluster framförallt i form av ökad mortalitet och ökat behov av utslaktning av de drabbade tackorna men även på grund av minskad mjölkproduktion och minskad avvänjningsvikt på lammen (Heras *et al.*, 1999; Larsgard & Vaabenoe, 1993; Arsenault *et al.*, 2008). Mastit är ofta ett allvarligt och mycket smärtsamt tillstånd hos tacka vilket även medför ett ökat djurlidande (Mørk *et al.*, 2007). Dessutom leder klinisk mastit till ökad antibiotikaanvändning samt en ökad arbetsbelastning för personalen.

Till skillnad från klinisk mastit ger inte subklinisk mastit några kliniska symtom hos djuret och inte heller några synliga förändringar i mjölken. Studier från andra länder tyder på att subklinisk mastit är vanligt förekommande hos får (Bergonier *et al.*, 2003). Subkliniska mastiter är betydelsefulla för den allmänna juverhälsan i fårbesättningar eftersom de leder till minskad mjölkproduktion, försämrad mjölkkvalitet och minskad avvänjningsvikt hos lammen samt kan utvecklas till klinisk mastit (Watkins *et al.*, 1991; Gonzalo *et al.*, 2002; Leitner *et al.*, 2004; Arsenault *et al.*, 2008). Det saknas dock kunskap om de ekonomiska konsekvenserna av subklinisk mastit i päls- och köttproducerande fårbesättningar eftersom fårindustrin i stora delar av världen domineras av mjölkproducerande får (Watkins *et al.*, 1991; Waage & Vatn, 2008).

Den vanligaste orsaken till mastit är bakteriell juverinfektion (Andersson *et al.*, 2011). Tackor med juverinfektion utan kliniska symtom är svåra att upptäcka och hos dessa måste man förlita sig på analys av mjölk för att ställa rätt diagnos. För mjölkkor är CMT (California Mastitis Test) en väl utprövad fältmässig metod för att detektera juverinfektion (Radostits *et al.*, 2007). I dagsläget saknas det dock bra generella rutiner för att upptäcka juverinfektion på får (Clements *et al.*, 2003). Behovet av att hitta enkla och pålitliga markörer som går att använda ute i besättningen är stort och ingen svensk studie har hittills gjorts inom detta område.

LITTERATURGENOMGÅNG

Etiologi

Mastit (juverinflammation) är en multifaktoriell sjukdom som beroende på etiologi delas in i infektiös mastit och ickeinfektiös mastit. Ickeinfektiös mastit kan bero på yttre trauma, kemisk irritation eller allergi och inflammationen är ett resultat av yttre irritation och vävnadsskada. Infektiös mastit orsakas av mikroorganismer som tar sig in i juvret, oftast via spenkanalen, och ger upphov till inflammation (Andersson *et al.*, 2011). Eftersom den vanligaste orsaken till mastit är infektion med bakterier kommer det här arbetet endast inriktas på mastiter av bakteriellt ursprung.

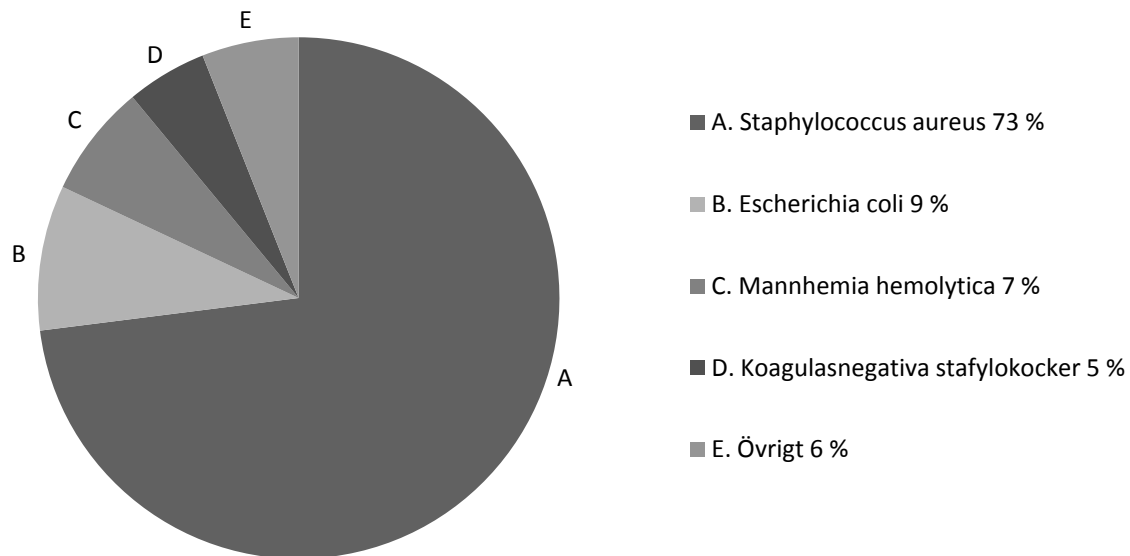
Juverinfektion och smittspridning

På Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA) har man under 2007 och 2008 analyserat mjölkprover från tackor med klinisk mastit som en del i SVARMPat (Svensk veterinär antibiotikaresistensmonitorering patogena bakterier). SVARMPat är ett samarbete mellan Svenska Djurhälsovården och SVA som syftar till att övervaka antibiotikaresistens för patogener förekommande hos lantbrukets djur. Totalt analyserades 72 mjölkprover från 54 besättningar och sjukdomsframkallande bakterier kunde detekteras i 55 av proverna. Undersökningen visade att *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) är den vanligast isolerade bakterien vid klinisk mastit hos tacka under svenska förhållanden då den återfanns i hela 40 av 55 mjölkprover (för mer detaljerad information se Figur 1) (Gustavsson & Andersson, 2009). Flera studier från andra länder tyder på att den vanligaste förekommande bakterien vid klinisk mastit hos tacka är *S. aureus* (Bergonier *et al.*, 2003; Mørk *et al.*, 2007). *S. aureus* är vanligt förekommande både vid akuta och kroniska fall av klinisk mastit och bakterien kan även ge upphov till subklinisk mastit (Saratis *et al.*, 1998; Mørk *et al.*, 2007; Marogna *et al.*, 2010).

Andra bakterier som kan orsaka klinisk mastit är koagulasnegativa stafylokocker (KNS), *Streptococcus* spp., *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mannhemia haemolytica* och *Corynebacterium* spp. (Contreras *et al.*, 2007). Enligt flera utländska studier är KNS de vanligast förekommande bakterierna hos tackor med subklinisk mastit (Fthenakis, 1994; Heras *et al.*, 1999; McDougall *et al.*, 2002). KNS har enligt vissa författare ansetts vara relativt harmlösa bakterier eftersom de kan förekomma i mjölkprover från kliniskt friska juver utan ett förhöjt celltal i mjölken (Watkins *et al.*, 1991; Al.Majali & Jawabreh, 2003). Experimentell inokulation av KNS i friska juver har dock gett upphov till subklinisk mastit och bakterien är relativt vanligt förekommande vid både akut och kronisk klinisk mastit (Fthenakis & Jones, 1990b; Saratsis *et al.*, 1998; Mørk *et al.*, 2007). I det svenska övervakningsprogrammet (SVARMPat) om agens vid klinisk mastit kunde KNS isoleras från 5 % av proverna (Gustavsson & Andersson, 2009). Den varierande patogeniciteten mellan olika species av KNS gör att bakterierna kan förekomma både som kontaminanter, bifynd och sjukdomsframkallande agens vid mastit hos tacka (Gonzalo *et al.*, 2002).

Juverinfektioner hos tacka kan spridas på ett flertal olika sätt; direkt via infekterade tackor, via tjuvdiande lamm som härbärgerar smitta i munnen och indirekt via ströbäddar, personal och mjölkmaskiner (Bergonier *et al.*, 2003). Den vanligaste infektionskällan för *S. aureus* hos får är infekterade juverdelar (Vautor *et al.*, 2003). Både *S. aureus* och KNS kan dock även isoleras från andra ställen på kroppen och från intakt spenhud (Bergonier *et al.*, 2003). *Mannhemia hemolytica* kan överföras från lammens saliv till tackornas spenhud vid digivning och därigenom orsaka mastit (Scott & Jones, 1998). Andra agens, exempelvis bakterier ur gruppen *Enterobacteriaceae*, smittar framförallt via miljön (Bergonier *et al.* 2003). Mer

forskning om smittspridning av olika bakteriella agens i päl- och köttproducerande fårbesättningar krävs för att korrekta/förebyggande åtgärder mot mastit ska kunna vidtas.



Figur 1: Sjukdomsframkallande agens vid klinisk mastit hos tacka. Resultatet bygger på 72 mjölkprover från 54 svenska fårbesättningar (Gustavsson & Andersson, 2009).

Klinik

Akut klinisk mastit är en allvarlig sjukdom hos tacka. Symtom som kan uppstå vid akut klinisk mastit är ökad värme, svullnad och ömhet i juvret, missfärgningar av mjölken, nedsatt allmäntillstånd, hälsa och stelhet samt hög feber (Mørk *et al.*, 2007; Jones & Watkins, 2000). Tillståndet är också mycket smärtsamt och kan i vissa fall leda till döden. I en norsk studie fann man att så många som 85 % av tackorna med klinisk mastit hade allmänna symtom och gangrän (kallbrand) utvecklades i nästan en tiondel av fallen (Mørk *et al.*, 2007).

Tackor med subklinisk mastit saknar synliga förändringar i mjölk och juver och för att ställa diagnosen måste man förlita sig på analys av mjölk. Syftet med att diagnostisera subkliniska mastiter är att detektera bakteriella juverinfektioner så att åtgärder kan vidtas för att minska spridningen av smittsamma bakterier. Om man endast använder sig av inflammationsmarkörer för att diagnostisera subklinisk mastit kan man inte med säkerhet uttala sig om inflammationen är infektionsorsakad eller har en annan etiologi. Fynd av endast juverpatogen i ett mjölkprov utan en samtidig inflammationsreaktion är inte heller tillräckligt för att ställa diagnosen infektiös subklinisk mastit eftersom det då kan röra sig om en latent infektion. För att kunna ställa diagnosen infektiös subklinisk mastit måste man använda sig både av inflammationsmarkörer och bakteriologiskt odling (Clements *et al.*, 2003).

Mastit kan också beskrivas utifrån tidsförloppet. Kronisk mastit utvecklas från den akuta formen av sjukdomen och tillståndet kännetecknas av en persisterande inflammation i juvret (Jones & Watkins, 2000). Den kliniska formen av kronisk mastit karaktäriseras av symtom

som förhårdnader i spenen och defekter i juvret i form av knölar och abscesser (Saratis *et al.*, 1998; Marogna *et al.* 2008). Kroniska defekter i juvret upptäckts enklast under sintiden efter involutionen av juvret (Jones & Watkins, 2000). Få studier har gjorts i syfte att undersöka frekvensen av akuta kliniska mastiter som ger upphov till kroniska förändringar i juvret under sintiden men det är antagligen relativt vanligt (Saratis *et al.*, 1998).

Förekomst och riskfaktorer

Det finns i dagsläget inga studier som undersökt incidensen av klinisk eller subklinisk mastit i svenska fårbesättningar. De flesta internationella studier inom ämnet undersöker dessutom endast incidensen i mjölkproducerande fårbesättningar. I utländska mjölkproducerande fårbesättningar är den årliga incidensen klinisk mastit vanligtvis lägre än 5 % och i köttproducerande fårbesättningar i andra länder varierar den årliga incidensen klinisk mastit mellan 0 % och 8,8 % (Bergonier *et al.*, 2003; Larsgard & Vaabenoe 1993; Arsenault *et al.*, 2008). Incidensen subklinisk mastit hos tackor varierar mycket mellan olika studier och mellan olika länder vilket till viss del kan bero på att det saknas en universellt accepterad definition av sjukdomen (Fthenakis, 1994). Incidensen subklinisk mastit har uppskattats ligga mellan 5 och 30 % och ibland ännu högre (Watkins *et al.* 1991; Keisler *et al.*, 1992; Heras *et al.*, 1999; Arsenault *et al.*, 2008; Bergonier *et al.*, 2003; Contreras *et al.*, 2003).

Det saknas studier som under svenska förhållanden studerat faktorer som ökar risken att drabbas av klinisk eller subklinisk mastit. Enligt utländska studier är dock akut klinisk mastit vanligast i samband med lamning och de första fem veckorna efter lamning innebär en ökad risk att drabbas av sjukdomen (Mørk *et al.*, 2007; Waage & Vatn, 2008; Arsenault *et al.*, 2008). Två norska studier har visat att risken att drabbas av klinisk mastit skiljer sig mellan olika norska fårraser (Larsgard & Vaabenoe 1993; Waage & Vatn, 2008). Ingen studie har dock undersökt om risken att drabbas av mastit skiljer sig mellan svenska fårraser. Tackor med dålig juverkonformation löper ökad risk att drabbas av klinisk mastit (Larsgard & Vaabenoe, 1993). Gemensamma riskfaktorer för klinisk och subklinisk mastit är tidigare episoder av klinisk mastit, ökad ålder och ett ökat antal lamm (Arsenault *et al.*, 2008; Waage & Vatn, 2008). Risken att drabbas av subklinisk mastit är dessutom högre hos tackor med låg kroppsvikt och i besättningar med hög djurdensitet (Sevi *et al.*, 1999; Arsenault *et al.*, 2008).

Kunskap om faktorer som ökar risken att drabbas av mastit är viktig för att kunna etablera bra, förebyggande kontrollåtgärder mot mastit (Waage & Vatn, 2008). Arsenault *et al.* (2008) föreslår exempelvis att tackor som löper ökad risk att drabbas av mastit separeras från resten av besättningen i samband med lamning för att underlätta kontrollen av dessa tackor. Dessutom anser författarna att lamm till äldre tackor och lamm i stora kullar bör stödutfodras för att minska påfrestningen på tackornas juver och spenar. Att tackor med många lamm och tackor med dålig juverkonformation löper en ökad risk för att drabbas av mastit är kunskap som skulle kunna tillämpas i framtida avelsprogram. Det finns dock ett stort behov av svenska studier som studerar förekomst av och riskfaktorer för både klinisk och subklinisk mastit.

Behandling och kontroll

Det saknas fastställda svenska antibiotikariktlinjer för hur mastit hos får bör behandlas men rekommendationerna liknar dem för nötkreatur. Enligt svenska antibiotikariktlinjer för nötkreatur bör endast akuta kliniska mastiter bli föremål för behandling med antibiotika under laktation och bensylpenicillin är förstahandspreparat vid behandling av de flesta typer av mastit. Val av antibiotika ska dock alltid baseras på resultat från bakteriologisk odling och eventuell resistensbestämning. Eventuell antibiotikabehandling ska oftast kombineras med

understödjande behandling som exempelvis urmjölkning, parenteral vätska, juvermassage och antiinflammatoriska preparat. Vilken understödjande behandling som behövs bedöms i varje enskilt fall och baseras på symtomens allvarlighetsgrad (Husdjurssektionen, 2011). Det saknas studier som utvärderat effektiviteten av antibiotikabehandling vid akut klinisk mastit hos tacka (Bergonier *et al.*, 2003). Hos tackor med akut klinisk mastit kan allmäntillståndet förbättras genom administration av flunixin meglumin (Fthenakis, 2000). Prognosen för tackor med gangränös mastit är dålig men amputation av den drabbade juverhalvan kan vara ett alternativ till avlivning (Anderson *et al.*, 2002).

Enligt svenska rekommendationer för nötkreatur ska kor med kronisk subklinisk mastit om möjligt slås ut och eventuell antibiotikabehandling av subklinisk mastit ska endast utföras under sintiden (Husdjurssektionen, 2011). För närvarande saknas svenska rekommendationer om hur sintidsbehandling på tackor bör gå till. I en spansk studie har man sett att intramammär sintidsbehandling med antibiotika på mjölkproducerande får med subklinisk mastit reducerade frekvensen av sjukdomen i kommande laktation (Gonzalo *et al.*, 2004). De ekonomiska fördelarna av att sintidsbehandla tackor med subklinisk mastit i päls- och köttproducerande fårbesättningar är dock i dagsläget oklara.

I Sverige är det allmänt praktiserat att fårägare kontrollerar juvret hos samtliga tackor efter avvänjning eller inför nästa avelssäsong för att kunna identifiera och slakta ut tackor med synliga eller palpabla förändringar i juvret. De tackor som har haft klinisk mastit slaktas antingen ut direkt eller kontrolleras noggrant inför nästa avelssäsong. Waage och Vatn (2008) fann i en norsk studie att tackor som haft klinisk mastit någon gång under de senaste tre åren löper fyra gånger ökad risk att drabbas av en ny episod av sjukdomen i kommande laktationer. Resultatet från studien innebär att det kan finnas anledning att rekommendera att tackor som haft klinisk mastit bör slaktas ut innan nästkommande avelssäsong oavsett om det finns förändringar i juvret eller inte.

Konsekvenser av subklinisk mastit

Det krävs mer kunskap om de ekonomiska konsekvenserna av subklinisk mastit i päls- och köttproducerande fårbesättningar. Flera studier har visat att subklinisk mastit leder till minskad mjölkproduktion (Gonzalo *et al.*, 2002; Leitner *et al.*, 2004). Det har dock diskuterats huruvida den minskade mjölkproduktionen leder till minskad avvänjningsvikt hos lammen. Fthenakis och Jones (1990a) rapporterade att lamm till tackor med subklinisk mastit växte sämre än lamm till friska tackor. Andra författare anser dock att lammens avvänjningsvikt inte påverkas av om tackan har subklinisk mastit så länge lammen stödutfodras eller har tillgång till tackornas foder (Keisler *et al.*, 1992; Ciliax *et al.*, 2004). Arsenault *et al.* (2008) fann att lammens vikt vid avvänjning var negativt associerad till ökad CMT-klass hos tackan men inte med fynd av juverpatogen i mjölken. Det framgick dock inte av studien om lammen hade tillgång till stödutfodring eller inte.

Sambandet mellan subklinisk och klinisk mastit är för närvarande inte väl undersökt och endast ett fåtal studier har gjorts inom området. I en studie av Watkins *et al.* (1991) fann man ett signifikant samband mellan klinisk och subklinisk mastit. Av tackorna i studien som utvecklade klinisk mastit hade 38,5 % en föregående subklinisk mastit orsakad av samma bakterie. Även Mørk *et al.* (2007) fann att samma bakterie kan ge upphov till både klinisk och subklinisk mastit. Eftersom ett samband mellan de två formerna av sjukdomen verkar finnas kan en minskad prevalens subkliniska mastiter möjligtvis förhindra en del av de ekonomiska förluster och djurlidande som kliniska mastiter medför.

Förändringar i mjölkkompositionen vid mastit

Mastit ger upphov till stora förändringar i mjölksammansättningen på grund av de fysiologiska förändringar som sker i juvret vid en inflammation. Vid mastit ökar genomsläppligheten i blodkärlen i juvret vilket bland annat leder till en ökad migration av leukocyter från blodet till mjölken samt ett ökat läckage av plasmaproteiner till mjölken. De sjukdomsframkallande bakterierna frigör kemotaktiska ämnen som bidrar till att öka leukocytmigrationen ytterligare. Leukocyterna har till uppgift att rensa bort debris och bakterier från den skadade juvervävnaden (Sandholm, 1995; Sordillo *et al.*, 1997). Det ökade celltalet i mjölken vid mastit används ofta som en indikator på en inflammatorisk process i juvret (Leitner *et al.*, 2004).

Mastit ger förutom det förhöjda antalet inflammatoriska celler även upphov till en förändrad enzymaktivitet i mjölken. Enzymer som är inblandade i mjölksyntesen minskar samtidigt som enzymer som härstammar från leukocyter och blodet ökar (Sandholm, 1995). Exempel på enzymer som ökar i koncentration i mjölk från infekterade fårjuver är laktatdehydrogenas (LDH), N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAGas) och plasminogen (Leitner *et al.*, 2004, Katsoulos *et al.*, 2010).

En annan förändring i juvret vid mastit är att laktosyntesen i juvret minskar (McCarthy *et al.*, 1988; Leitner *et al.*, 2003). Eftersom laktos är ett viktigt osmotiskt ämne i mjölk bidrar den minskade laktosyntesen till en förändrad osmotisk gradient mellan blod och mjölk. Detta i kombination med en ökad permeabilitet i juverepitelet leder till ett ökat flöde av joner från blod till mjölk. Överföringen av bikarbonatjoner till mjölken ökar vilket i sin tur ger upphov till ett ökat pH. Dessutom ökar transporten av natrium- och kloridjoner över juverepitelet vilket leder till en ökad saltkoncentration i mjölken och en ökad elektrisk konduktivitet (Sandholm, 1995; Pyörälä, 2003).

Kemiska analyser av inflammationsmarkörer

För att identifiera tackor med subklinisk mastit kan man ta hjälp av kemiska metoder som mäter förändringar i mjölkens sammansättning. Exempel på inflammationsmarkörer är pH, laktosmängd, flockningstid, elektrisk konduktivitet och diverse enzymer (NAGas och LDH) (Andersson *et al.*, 2011).

Förändringar i den elektriska konduktiviteten används på mjölkkor för att detektera mastit. Metoden har ansetts vara attraktiv eftersom den kan användas i fält och eftersom förändringar i mjölkens elektrolytsammansättning sker tidigt under sjukdomsförloppet vid mastit (Radostis *et al.*, 2007). Metodens tillförlitlighet är dock ifrågasatt både för nötkreatur och för tacka (Mc Doughall *et al.* 2001; Radostits *et al.*, 2007).

Leitner *et al.* (2004) fann i en studie att aktiviteten av NAGas var signifikant högre hos tackor med juverinfektion jämfört med bakteriologiskt negativa tackor. Även LDH har i en studie visat sig vara en bra markör för att identifiera tackor med juverinfektioner (Katsoulos *et al.*, 2010). Analys av NAGase och LDH kan dock inte utföras i fält, vilket gör att det skulle vara svårt att använda metoderna för att detektera juverinfektioner i päls- och köttproducerande fårbesättningar (Radostits *et al.*, 2007).

Flera författare har uppmätt en minskad laktoshalt i mjölken från tackor med mastit men få har studerat hur väl den minskade laktoshalten fungerar som markör vid mastitdiagnostik hos tacka (McCarthy *et al.*, 1988; Leitner *et al.*, 2003).

Direkta och indirekta metoder för att uppskatta celltalet i mjölk

Ett av de vanligaste sätten att diagnostisera subklinisk mastit är att direkt eller indirekt uppskatta antalet somatiska celler i mjölk (Radostits *et al.*, 2007). Direkt uppskattning av antalet somatiska celler i mjölk kan göras manuellt via mikroskopering av mjölkutstryk eller genom användning av automatiserade cellräknare. Vid mikroskopering av mjölkutstryk är det möjligt att särskilja olika celltyper men då metoden är tids- och resurskrävande används den sällan (Andersson *et al.*, 2011). Automatiserade cellräknare är den metod som används oftast för att uppskatta antalet inflammatoriska celler i mjölk hos mjölkkor (Radostits *et al.*, 2007). Principen för automatiserade cellräknare är att DNA i mjölkens cellkärnor färgas in med fluorescerande reagens. En detektor registrerar sedan de fluorescerande signaler som uppstår när cellkärnorna och reagensen belyses med ljus och räknar med hjälp av dessa ut antalet celler i mjölken (DeLaval 2005; Andersson *et al.*, 2011). Automatiserade cellräknare har även visat sig vara tillförlitliga och användbara för att detektera subklinisk mastit hos tacka (Keisler *et al.*, 1992; McDougall *et al.*, 2001; Lafi 2006). Det finns portabla automatiserade cellräknare (t.ex. DeLavals celltalsräknare) men metoden kräver inköp av relativt dyr utrustning (Mc Dougall *et al.*, 2001).

California Mastitis Test (CMT) är en indirekt metod för att uppskatta antalet somatiska celler i mjölk. CMT är en fältmässig och subjektiv testmetod som baseras på mängden gel som bildas när mjölk blandas med en reagens. CMT-reagensen innehåller ett ämne som reagerar med DNA från cellkärnor vilket innebär att ju mer cellkärnor det finns i mjölken desto högre blir viskositeten på gelen (Schalm & Noorlander, 1957). CMT är den vanligaste metoden i fält för att detektera subklinisk mastit hos mjölkkor (Radostits *et al.*, 2007). Fördelen med metoden är att den är billig, snabb och enkel att använda (Andersson *et al.*, 2011). Uppgifterna i litteraturen om hur väl CMT fungerar för att förutsäga juverinfektion hos tacka går dock isär (Keisler *et al.* 1992; Heras *et al.* 1999; McDougall *et al.* 2001; Clements *et al.*, 2003; Lafi 2006; Arsenault *et al.*, 2008).

För tacka saknas vedertaget gränsvärde för vilket celltal i mjölken som anses vara sjukt/friskt (Fthenakis, 1994). Eftersom sättet att gradera CMT skiljer sig mellan olika länder saknas det också allmänna riktlinjer för hur CMT bör användas för att detektera tackor med juverinfektion. De flesta utländska studier i ämnet har utförts på mjölkproducerande djur (Keisler *et al.*, 1992; Heras *et al.*, 1999; McDougall *et al.*, 2001; Lafi, 2006). Eftersom Sverige domineras av päls- och köttproducerande fårbesättningar finns det ett stort behov av en svensk studie som undersöker hur man lämpligast använder celltalet som markör för att identifiera tackor med juverinfektion.

SYFTE

Det övergripande syftet med studien var att utvärdera CMT och DCC som fältmässiga metoder för identifiering av tackor med juverinfektion i päls- och köttproducerande fårbesättningar.

Specifika syften med studien var att undersöka:

- Hur effektivt CMT är som indirekt metod för att uppskatta celltalet i mjölken.
- Hur väl CMT och DCC-celltal kan förutspå bakteriologiskt status i juvret.
- Om det är möjligt att använda celltalet som markör för att detektera juverinfektion hos tackor utan tecken på klinisk mastit vid provtagning både i tidig och sen laktation

Dessutom syftade studien till att utveckla rekommendationer för hur man lämpligast använder CMT och DCC-celltal för att detektera juverinfektioner i päls- och köttproducerande fårbesättningar.

MATERIAL OCH METODER

Djur och gårdar

80 tackor från fyra olika besättningar (två i Uppland, en i Småland och en i Västergötland) provtogs vid ett eller två tillfällen mellan januari och augusti 2011. Tackorna från de två besättningarna i Uppland provtogs vid två tillfällen, dels i anslutning till lamningen och dels precis innan avvänjning. Besättningarna i Småland och Västergötland provtogs endast en gång i anslutning till lamningen. Samtliga tackor hölls för päls- och köttproduktion. Den minsta besättningen i Uppland hade 20 tackor av rasen gotlandsfår och medan den större av de Uppländska besättningarna hade 150 tackor som antingen var renrasiga finullstackor eller korsningar mellan finull och dorset. Besättningen i Västergötland bestod av 400 korsningstackor mellan finull och dorset och besättningen i Småland hade 117 tackor av rasen gotlandsfår.

Vid det första provtagningsstillfället valdes ca 20 tackor slumpmässigt ut från var och en av besättningarna. I besättningen som endast hade 20 tackor ingick samtliga tackor i försöket. Id-nummer och lamningsdatum protokollfördes för samtliga tackor. Samtliga tackor som ingick i studien lammade mellan januari och maj 2011. Tackor som hade symtom på en pågående juverinflammation i form av lesioner i juvret eller okulära förändringar i mjölken exkluderades ur studien.

Av 40 tackor från de två besättningarna i Uppland som ingick vid det första provtagningsstillfället provtogs totalt 35 tackor vid ytterligare ett tillfälle i anslutning till avvänjning, 19 tackor i den ena besättningen och 16 i den andra. Vid det andra provtagningsstillfället hade två tackor utvecklat klinisk mastit och dessa provtogs därför inte en andra gång, två tackor hade avlivats och en tacka saknade mjölk i juvret.

Provtagning

Totalt bestod studien av sex provtagningsstillfällen mellan 19 januari och 21 augusti 2011. Författaren var ansvarig för provtagningen vid samtliga tillfällen. Vid de första två provtagningarna separerades inte lammen från tackorna innan provtagning. Vid de återstående fyra provtagningarna separerades lammen från tackorna precis innan provtagningen för att undvika att lammen var i vägen vid provtagningen och diade slut på mjölken i juvret.

En initial okulär och manuell bedömning av mjölk respektive juver gjordes på samtliga tackor för att kunna identifiera och exkludera tackor med tecken på klinisk mastit. Därefter samlades 3-5 ml mjölk per juverdel för att gradera CMT på samtliga juverdelar. Lika stor mängd mjölk som CMT-reagens blandades försiktigt i en så kallad paddel. CMT-reaktionen avlästes sedan och graderades på en skala 1-5 enligt Schalm & Noorlander (1957) där fem indikerade högst celltal (se Tabell 1). Samma person gjorde den subjektiva bedömningen av CMT- graderingen vid samtliga provtagningsstillfällen.

Därefter togs ytterligare 5-10 ml mjölk per juverdel för att kunna analysera antalet celler i mjölken med DCC. Mjölk för DCC-analys dagen efter provtagningsstillfället togs i mjölkkrör med bronopol tillsatt som konserveringsmedel. Vid två av provtagningsstillfällena kunde dock proverna analyseras samma dag och mjölken samlades då i vanliga sterila mjölkkrör. Slutligen togs mjölkprover för bakteriologisk odling. Spenspetsarna rengjordes noggrant med bomull indränkt i sprit och lämnades att lufttorka. Därefter samlades 1-5 ml mjölk per juverdel aseptiskt i sterila provrör. Samtliga prover transporterades till Mastitlaboratoriet,

SVA i kylväska och förvarades därefter i kylskåp vid en temperatur av 4°C. Proverna analyserades inom 24 timmar efter provtagningstillfället.

Tabell 1. Klassificering av CMT (Schalm & Noorlander 1957)

CMT		Synlig reaktion/gelbildning
1	Negativ	Inga tecken på förtjockning eller gelbildning
2	Spår	En svag förtjockning uppstår som tenderar att försvinna när paddeln är i rörelse
3	Svagt positiv	En tydlig förtjockning men ingen tendens till gelbildning
4	Distinkt positiv	Gelblandningen blir omedelbart trögflytande med viss tendens till gelbildning. När paddeln roteras, samlas blandningen i paddelns mitt. Blandningen flyter åter ut över paddelns botten när den sätts tillbaka i rörelse
5	Starkt positiv	Stark gelbildning som tenderar att fastna i paddelns botten. Under rörelse bildas en distinkt, central ”topp”

Analys av prover

Analys av DCC-celtal i samtliga prover utfördes av författaren på Mastitlaboratoriet, SVA enligt rekommendation (DeLaval, 2005). En DCC-kassett användes för att pipettera upp 60 µl mjölk. Kassetten placerades i DCC-apparaten och celltalet/ml visades på displayen efter 45 sekunder. Resultatet protokollfördes tillsammans med övriga resultat.

Även de bakteriologiska undersökningarna utfördes på Mastitlaboratoriet, SVA. Författaren ansvarade för provhanteringen, men de bakteriologiska undersökningarna utfördes av personal enligt laboratoriets ackrediterade metoder. Mjölk i de sterila provrören blandades väl och 10 µl mjölk från varje prov odlades ut på blodagar med 5 % esculin. Plattorna inkuberades vid 37° C i 48 timmar. Preliminär bestämning av bakterieart gjordes baserat på kolonimorfologin. Typning till speciesnivå utfördes med hjälp av selektiva agarplattor och utvalda biokemiska tester. Prover som innehöll ≤ 3 kolonier bedömdes som negativ växt förutom prover med *S. aureus* som klassificerades som positiva vid växt av minst en koloni. Prover med växt av ≥ 3 bakterieagens bedömdes som blandfloror förutom vid växt av *S. aureus* eller då en annan misstänkt juverpatogen utgjorde en majoritet av växten i blandfloran. Mängden växt delades in enligt följande: sparsam ≤ 10 kolonier, måttlig = 10-50 kolonier, riklig ≥ 50 kolonier per platta.

Bearbetning av data

Resultatet från den bakteriologiska odlingen delades in i tre kategorier: ingen växt, växt av specifik infektion och växt av blandflora. Det geometriska medelvärdet för respektive kategori fastställdes för DCC-cellalet. Sensitiviteten och specificiteten för CMT att förutsäga bakteriologiskt status kontrollerades för $CMT \geq 2$, $CMT \geq 3$ och $CMT \geq 4$. Sensitiviteten och specificiteten för DCC-cellalet som markör för att förutsäga bakteriologiskt status fastställdes för tre olika gränsvärden: $\geq 500\ 000$ celler/ml, $\geq 700\ 000$ celler/ml och $\geq 1000\ 000$ celler/ml. Den nedre gränsen valdes eftersom man vid en tidigare studie konstaterat att friska fårjuver innehåller mindre än $500\ 000$ celler/ml och den övre gränsen valdes då man i flertalet tidigare studier konstaterats att $1000\ 000$ celler/ml är ett lämpligt gränsvärde för att detektera subklinisk mastit hos tacka (Lafi *et al.*, 1998; Berthelot *et al.*, 2006; Arsenault *et al.*, 2008).

Samband mellan de beroende variablerna (DCC-celltal och CMT) och de förklarande variablerna (bakteriologiskt status och laktationsstadium) undersöktes statistiskt med hjälp av parat t-test samt univariabel hierarkisk linjär och logistisk regressionsanalys där hänsyn tas till att det gjorts upprepade mätningar på juverdelsnivå. Även sambandet mellan CMT och DCC-celltal undersöktes med hierarkisk linjär regressionsanalys. För att undersöka samband mellan laktationsstadium och celltal gjordes ett celltalsmedelvärde per får baserat på juverdelscelltalet. De andra sambanden undersöktes på juverdelsnivå.

RESULTAT

Deskriptiv statistik

Besättningsnivå

I Tabell 2 ges detaljerad information om antal provtagna tackor, resultat från analys av celltal med CMT och DCC samt antal infekterade tackor från respektive besättning och provtagningstillfälle. Totalt provtogs 80 tackor i anslutning till lamningen och 35 tackor provtogs en andra gång innan avvänjning. Besättningarnas CMT-medelvärde vid provtagning efter lamning varierade från 1,2 till 2,4 och det geometriska medelvärdet i DCC-celltal varierade från 77 000 celler/ml till 283 000 celler/ml. Andelen tackor per besättning med specifik infektion varierade från 5 % till 50 % vid samma provtagning. Högst andel infekterade tackor detekterades på Gård C som även hade det högsta medelvärdet i CMT och DCC.

Tabell 2: Antal provtagna tackor, aritmetiskt medelvärde för CMT, geometriskt medelvärde (max-min) × 1000 celler/ml för DCC-celltal och antal (%) tackor med specifik infektion i fyra färbesättningar provtagna strax efter lamning (provtagning 1) och innan avvänjning (provtagning 2)

Besättning n(besättnings- storlek)	Antal tackor	provtagna	CMT Medelvärde	DCC Geometriskt medelvärde (Max-min)	Antal (%) infekterade tackor
Gård A, n=20					
Provtagning 1	19		1,2	90 (8-4319)	1 (5)
Provtagning 2	19		1,3	239 (48-4094)	4 (21))
Gård B, n=150					
Provtagning 1	20		2,2	227 (44-6825)	3 (15)
Provtagning 2	16		1,8	211 (57-7564)	1 (6)
Gård C, n=400	20		2,4	283 (46-6171)	10 (50)
Gård D, n=117					
Provtagning 1	21		1,2	77 (14-1291)	2 (9,5)

Juverdelsnivå

Totalt undersöktes 228 mjölkprover. Alla proverna undersöktes avseende CMT och bakteriologi medan tillräckligt material för DCC endast fanns i 220 av proverna (Tabell 3). Medelvärdet för CMT och DCC-celltal var signifikant ($p < 0,05$) högre i juverdelar med specifik infektion jämfört med bakteriologiskt negativa juverdelar. Av de undersökta proverna fanns specifik infektion i 23 (10 %) prov och från över hälften av dessa prov isolerades KNS. En detaljerad beskrivning av bakteriefynd ges i Tabell 3.

Av de 80 tackor som ingick i studien var 19 (24 %) infekterade i en eller båda juverdelarna vid något provtagningstillfälle. Hos två tackor detekterades juverinfektion i både höger och vänster juverdel och hos dessa växte samma bakteriespecies i båda juverdelarna.

Tabell 3: Resultat från bakteriologisk odling i 228 juverdelsprover från tacka samt aritmetiskt medelvärde för CMT och geometriskt medelvärde ($\times 1000$ celler/ml) för DCC-celltal för respektive kategori av bakteriefynd

Bakteriefynd	Antal (%) prover	Medelvärde CMT	Medelvärde DCC (min-max)
Specifik infektion	23 (10)	3,5	1267 (70-7564)
KNS pc-	11		
KNS pc+	1		
<i>Streptococcus</i> spp.	2		
<i>Staphylococcus aureus</i> pc-	2		
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	1		
<i>Escherichia coli</i>	1		
<i>Streptococcus uberis</i>	1		
<i>Mannheimia hemolytica</i>	3		
<i>Enterococcus</i> spp.	1		
Blandflora	11 (5)	1,4	127 (49-466)
Ingen växt	194 (85)	1,5	134 (8-6171)
Alla	228 (100)	1,7	164 (8-7564)

Samband mellan CMT och DCC

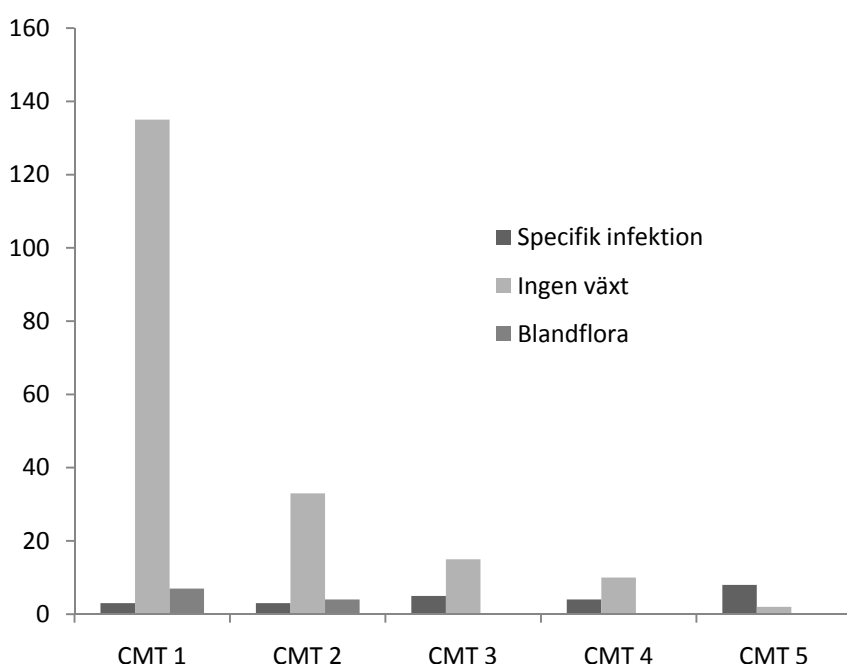
I Tabell 4 redovisas antalet mjölkprover för respektive CMT-klass samt celltal enligt DCC för motsvarande prov. En majoritet av proverna (81 %) hade CMT 1-2. Det geometriska medelvärdet i DCC-celltal ökade signifikant ($p < 0,05$) för varje CMT-klass.

Tabell 4: Antal (%) prov per CMT-klass, geometriskt medelvärde och spridning för DCC-celltal ($\times 1000$ celler/ml) från analys av juverdelsprover från tacka med CMT ($n=228$) och DCC ($n=220$)

CMT	Antal (%)	Medelvärde DCC	Min-max DCC
1	144 (63)	91	8- 606
2	40 (18)	185	46-743
3	20 (9)	484	110-5281
4	14 (6)	1539	75-5687
5	10 (4)	5330	3419-7564

CMT som markör för att förutsäga bakteriologiskt status i juvret

Juverdelar med CMT ≥ 3 hade signifikant ($p < 0,05$) högre risk att vara infekterade jämfört med juverdelar med CMT 1. Figur 2 visar antalet prov med specifik infektion, ingen växt eller med blandflora. Alla 11 prov med blandflora hade CMT ≤ 2 . CMT-medelvärdet för bakteriologiskt negativa prover var 1,5 jämfört med 3,5 för prover med specifik infektion. Av 184 prover med CMT ≤ 2 återfanns specifik infektion i 6 (3,3 %) prov. Motsvarande antal för prov (n=44) med CMT ≥ 3 var 17 (39 %). Specifik infektion detekterades endast i 6 prover med CMT ≤ 2 . Bakterier isolerade i prov från juverdelar med CMT ≤ 2 var KNS (n=2), *S. aureus* i blandflora (n=2) och *Streptococcus* spp. (n=2). I prov från juverdelar med CMT ≥ 3 isolerades KNS (n=10), *Mannheimia hemolytica* (n=3), *Streptococcus uberis* (n=1), *E. coli* (n=1), *Enterococcus* spp. (n=1) och *Arcanobacterium pyogenes* (n=1).



Figur 2: Antalet mjölkprov med specifik infektion, ingen växt och blandflora för respektive CMT-klass i 228 juverdelsprover från tacka.

Sensitiviteten och specificiteten för CMT som markör för att förutsäga bakteriologiskt status beräknades för olika CMT-gränsvärden (Tabell 5). Den högsta sensitiviteten återfanns vid gränsvärde ≥ 2 medan den högsta specificiteten återfanns vid gränsvärde ≥ 4 .

Tabell 5: Sensitivitet och specificitet för tre CMT-gränsvärden för att förutsäga bakteriologiskt status i juvret baserat på analys av 228 juverdelsprover från tacka

CMT	Sensitivitet	Specificitet
≥ 2	87 %	69 %
≥ 3	74 %	86 %
≥ 4	52 %	94 %

DCC-celltal som markör för att förutsäga bakteriologiskt status i juvret

Det geometriska medelvärdet för DCC-celltal för prover med specifik infektion var signifikant ($p < 0,05$) högre jämfört med celltalet för bakteriologiskt negativa prover (Tabell 3). Sensitiviteten och specificiteten för DCC-celltalet som markör för att förutsäga bakteriologiskt status testades för tre gränsvärden (Tabell 6). Högst sensitivitet erhöles när gränsvärdet 500 000 celler/ml användes medan specificiteten var likartad för de tre gränsvärdena. Endast fyra av 23 prover med specifik infektion hade ett celltal under 500 000 celler/ml och tre av dessa hade ett celltal under 100 000 celler/ml. Bakteriefynd i prover med celltal under 500 000 celler/ml var KNS ($n=2$), *S. aureus* ($n=1$) och *Streptococcus* spp. ($n=1$). I åtta prover som hade ett celltal $> 1000\ 000$ celler/ml kunde inga bakterier detekteras.

Tabell 6: Sensitivitet och specificitet för tre celltalsgränser för att förutsäga bakteriologisk status i juvret baserat på analyser av 220 juverdelprover

Antal celler $\times 10^3$	Sensitivitet	Specificitet
>500	79 %	92 %
>700	74 %	93 %
>1000	68 %	95 %

Skillnader mellan provtagningstillfällena

Celltalet från DCC-analyser i tidig laktation ($n=78$) och i sen laktation ($n=70$) jämfördes för de två besättningar där upprepade provtagningar utfördes. DCC-celltalet vid provtagning i anslutning till avvänjning var signifikant ($p < 0,05$) högre jämfört med DCC-celltalet från provtagningen nära lamning. Det geometriska medelvärdet i tidig laktation var 153 000 celler/ml jämfört med medelvärdet i sen laktation som var 221 000 celler/ml. Tillförlitligheten för DCC-celltalet och CMT som markör för att detektera tackor med juverinfektion påverkades inte av tidpunkten för provtagning i förhållande till lamning (resultat ej redovisade).

DISKUSSION

Förekomst av juverinfektion

Resultaten tyder på att juverinfektion är ett relativt vanligt problem i svenska päls- och köttproducerande besättningar då specifik infektion hittades hos cirka en fjärdedel av de undersökta tackorna. Ett liknande resultat erhöles i en studie på köttproducerande tackor i Kanada där juverinfektion kunde detekteras hos 28,8 % av 354 kliniskt friska tackor (Arsenault *et al.*, 2008). Variationen av andelen tackor med juverinfektion var stor mellan de svenska besättningarna. I en av besättningarna detekterades juverinfektion hos hälften av de provtagna tackorna och i en annan av besättningarna var endast en av 19 tackor infekterade.

Studien tyder också på att KNS är den vanligast förekommande bakteriesorten vid subklinisk mastit hos tackor i svenska päls- och köttproducerande färbesättningar vilket är i enlighet med resultat från studier i andra länder (Fthenakis, 1994; Heras *et al.*, 1999; McDougall *et al.*, 2002). Eftersom provtagningen endast utfördes i fyra olika besättningar är det dock möjligt att bakteriefynd inte är representativa för alla svenska färbesättningar.

Samband mellan CMT och DCC-celltal

Resultaten från vår studie visade att det fanns ett signifikant samband mellan CMT och DCC med ökande DCC-celltal vid ökande CMT-klass. Keisler *et al.* (1992) fann dock att CMT fungerar dåligt för att uppskatta antalet somatiska celler i mjölk jämfört med direktmikroskopi och automatiserade cellräknare. Därmed drog Keisler *et al.* (1992) slutsatsen att CMT är ett opålitligt test för att detektera subklinisk mastit hos tacka. Författarna undersökte dock inte sambandet mellan CMT och bakteriologiska fynd. Andra författare har hittat ett signifikant samband mellan CMT och celltalet analyserat med automatiserade cellräknare (Fthenakis, 1995; McDougall *et al.*, 2001). Flertalet faktorer bidrar troligen till att resultatet mellan olika studier skiljer sig åt. Exempelvis finns det påtagliga skillnader i raser och produktionsätt mellan olika studier och det finns skillnader i sättet att definiera subklinisk mastit och/eller juverinfektion. Alla författare använder sig inte heller av samma analysmetoder vid bearbetning av resultaten. Vidare skiljer sig prevalensen subklinisk mastit mellan olika besättningar och studier vilket påverkar de indirekta testmetodernas värde (McDougall *et al.*, 2001).

CMT som markör för att förutsäga bakteriologiskt status i juvret

I vår studie fanns ett signifikant samband mellan CMT och bakteriefynd vilket indikerar att CMT är en användbar analysmetod för att förutsäga bakteriologiskt status i mjölk hos tacka. McDougall *et al.* (2001) fann inget signifikant samband mellan CMT och infektionsstatus hos tackan. Det finns dock andra studier som visat att CMT korrelerar väl med bakteriologiska fynd (Fthenakis, 1995; Arsenault *et al.*, 2008).

KNS och *S. aureus* var de vanligast förekommande bakterierna i prover med låg CMT-klass men KNS var även ett vanligt fynd i prover med hög CMT-klass. Resultaten överensstämmer med tidigare uppfattningar om att KNS varierar i patogenicitet eftersom de ofta förekommer i både CMT-negativa och CMT-positiva prover (Watkins *et al.*, 1991; Gonzalo *et al.* 2002; Arsenault *et al.*, 2008). Även *S. aureus* har i en tidigare studie förekommit i både CMT-negativa och CMT-positiva prover (Arsenault *et al.*, 2008). I den här studien detekterades *S. aureus* endast i två prover och båda hade CMT 1. Det krävs dock ett större antal *S. aureus*-positiva prover innan några slutsatser kan dras om celltalet vid subklinisk *S. aureus*-infektion hos tacka. Det är viktigt att överväga risken för falskt positiva prover vid tolkning av

bakteriefynd. Exempel på orsaker som kan leda till falskt positiva resultat är förorening vid provtagningen, felaktig förvaring av prover under transport eller fynd av bakterier som härstammar från spenkanalen och inte från juvret (PerssonWaller, 2011).

Optimal sensitivitet och specificitet för CMT att detektera tackor med juverinfektion erhöles med gränsvärdet $CMT \geq 3$ i likhet med resultatet från en tidigare studie (Clements *et al.*, 2003). Sättet att gradera CMT skiljer sig ibland mellan olika författare vilket kan göra det svårt att jämföra gränsvärden mellan studier (Keisler *et al.*, 1992; Arsenault *et al.*, 2008).

Vilket gränsvärde som används för att separera sjuka och friska individer påverkar sensitiviteten och specificiteten för en testmetod. Ett lågt gränsvärde gör att ett högre antal av de sjuka individerna identifieras som testpositiva vilket ökar sensitiviteten på bekostnad av specificiteten eftersom risken för falskt positiva individer ökar. Det är viktigt att ta hänsyn till syftet med en provtagning vid val av ett gränsvärde. Om syftet provtagningen är att detektera samtliga sjuka djur i en besättning och om konsekvensen av att missa en sjuk individ är stor är det viktigt med en hög sensitivitet. Om det däremot är viktigare att korrekt identifiera majoriteten av de friska individerna i en besättning, eftersom konsekvensen av en hög andel falskt positiva individer är stor, är det viktigare med en hög specificitet.

Syftet med användandet av markörer för detektion av juverinfektion hos tackor beror på den enskilde djurägarens ambitionsnivå, hur stor andel av djuren som är infekterade och infektionsagens. För att det ska finnas något värde i att identifiera tackor med juverinfektion måste dock sensitiviteten för en testmetod vara tillräckligt hög för att detektera en majoritet av de infekterade tackorna och specificiteten måste vara tillräckligt hög för att inte generera en stor grupp falskt positiva individer eftersom kostnaden för bakteriologisk provtagning då kommer bli orimligt hög.

DCC-celldatalet som markör för att förutsäga bakteriologiskt status i juvret

Studien visade ett starkt signifikant samband mellan DCC-celldatalet och specifik infektion vilket är i enlighet med tidigare studier (Keisler *et al.*, 1992; McDougall *et al.*, 2001; Clements *et al.*, 2003). Det starka sambandet illustreras bland annat av ett betydligt högre geometriskt medelvärde i prover med specifik infektion (1267 000 celler/ml) jämfört med bakteriologiskt negativa prover (114 000 celler/ml). Högst sensitivitet (79 %) för DCC-celldatalet att förutsäga bakteriologiskt status erhöles vid gränsvärdet 500 000 celler/ml och högst specificitet (95 %) erhöles vid gränsvärdet 1000 000 celler/ml.

Eftersom det totala antalet prover med specifik infektion var relativt lågt fick ett fåtal prover med cellldatalet under 100 000 celler/ml en stor inverkan på sensitiviteten trots att bakterierna som isolerades i dessa prover möjligen saknar klinisk relevans. Åtta prover hade ett cellldatalet över 1000 000 celler/ml utan att bakterier kunde detekteras. Orsakerna till ett sant eller falskt bakteriologiskt negativt resultat är många; icke-infektiös mastit, patogener som redan eliminerats från juvret, infektion med mikroorganism som inte växer på standardmedium, intermitterande bakterieutskiljning eller felaktig provtagning, transport och odling (Persson Waller, 2011).

I tidigare studier har flera författare kommit fram till att ett gränsvärde på 1000 000 celler/ml fungerar bra för att detektera tackor med juverinfektion (Fthenakis, 1994; Lafi *et al.* 1998; Arsenault *et al.*, 2008). Berthelot *et al.* (2006) fastställde fysiologiska och patologiska gränsvärden för cellldatalet i färmjolk genom upprepad provtagning under laktationen av 215 mjolkproducerande tackor. Enligt studien ansågs ett juver som friskt om cellldatalet vid ett

tillfälle var under 500 000 celler/ml medan celltal som vid minst två tillfällen översteg 1000 000 celler/ml ansågs patologiskt. Det är dock möjligt att celltalet i friska juver skiljer sig mellan olika produktionsätt och mellan olika raser vilket gör att det är tveksamt om det går att extrapolera dessa gränsvärden till svenska tackor som hålls för päls- och köttproduktion. Clements *et al.* (2003) som studerade metoder för att diagnostisera juverinfektion hos just köttproducerande får kom fram till att ett gränsvärde på 1200 000 celler/ml var optimalt för att erhålla en godtagbar specificitet (72 %). I vår studie kunde vi dock erhålla en klart bättre specificitet (92 %) även vid ett gränsvärde på 500 000 celler.

Skillnader mellan provtagningstillfällen

Resultaten från studien visade att celltalet var signifikant högre för tackor i sen laktation jämfört med tidig laktation. Celltalet påverkades dock mer av infektionsstatus än av laktationsstadium. Det innebär att det är möjligt att använda sig av DCC-celltal och CMT som markörer för att detektera tackor med juverinfektion både i anslutning till lamning och innan avvänjning och samma gränsvärden kan användas vid båda tidpunkter.

Laktationsstadiet är den faktor som har störst påverkan på variationen av celltalet i det friska juvret (Bergonier *et al.*, 2003). Sevi *et al.* (2004) kom i enlighet med resultatet i vår studie fram till att celltalet är högre hos tackor i sen laktation jämfört med tidig laktation. Det saknas dock andra studier som undersökt hur laktationsstadiets inverkan på celltalet påverkar förmågan hos CMT att detektera tackor med juverinfektion.

Även om det är möjligt att utföra provtagning både i anslutning till lamning och innan avvänjning kan det finnas anledning att fundera över vilken tidpunkt som är bäst för provtagning. Fördelarna med provtagning i anslutning till lamning är att det då blir möjligt att separera tackor med smittsamma bakterier från resten av gruppen under laktationsperioden samt att stödutfodra lammen till tackor med subklinisk mastit. Fördelen med provtagning innan sinläggning är att man då har möjlighet till selekterad sintidsbehandling baserat på bakterieodling samt att man innan nästa avelssäsong kan välja att slå ut en del tackor med subklinisk mastit. Det ideala vore naturligtvis att utföra provtagning både i anslutning till lamning och vid sinläggning eftersom det är svårt att vid ett enda tillfälle identifiera samtliga tackor med subklinisk mastit (Keisler *et al.*, 1992).

Framtida studier och praktisk hänsyn

Det finns ett stort behov av en svensk studie som undersöker etiologi och riskfaktorer för subklinisk mastit i svenska päls- och köttproducerande besättningar. Det finns också ett stort behov av ökad kunskap om vilka ekonomiska konsekvenser sjukdomen medför i päls- och köttproducerande besättningar. Kontrollåtgärder för att minska förekomsten av juverinfektioner kommer antagligen endast bli aktuellt i besättningar som har problem med en hög förekomst av mastit. I besättningar där förekomsten av mastit är låg är antagligen de ekonomiska och hälsofrämjande effekterna av att kunna detektera tackor med subklinisk mastit inte tillräckligt stora för att täcka de kostnader och extra arbetsinsatser som en omfattande provtagning innebär. Dessutom är tillförlitligheten för CMT och automatiska cellräknare för att detektera tackor med subklinisk mastit lägre i besättningar med låg prevalens (Clements *et al.*, 2003 & McDougall *et al.*, 2001).

KONKLUSION

I studien sågs ett signifikant samband mellan CMT-klass och DCC-celltal. Både CMT-klass och DCC-celltal var signifikant korrelerat till infektionsstatus hos tackan och CMT ≥ 3 respektive 500 000 celler/ml bedömdes vara lämpliga gränsvärden för att identifiera juverinfektion hos tackor utan kliniska symtom. Tidpunkten för provtagning i förhållande till lamning saknade betydelse för testmetodernas tillförlitlighet eftersom celltalet påverkades mer av infektionsstatus än laktationsstadium.

RÅD TILL FÅRÄGARE

Baserat på resultaten från studien och tidigare litteratur om mastit hos tacka har jag konstruerat några konkreta råd till svenska fårägare:

- Mastit (juverinflammation) hos tacka orsakas främst av infektion i juvret med smittsamma bakterier (juverinfektion). I fårbesättningar med hög förekomst av klinisk mastit kan det vara lämpligt att införa kontrollåtgärder för att minska smittspridningen i besättningen.
- Tackor med klinisk mastit är lätta att upptäcka och kontrollera. Tackor med mastit utan kliniska symtom på sjukdom (subklinisk mastit) är dock svårare att upptäcka. Tackor med subklinisk mastit får dock ett förhöjt celltal i mjölken. Analys av tackornas mjölk med en portabel automatisk cellräknare (t.ex. DeLaval celltalsräknare) eller California Mastitis Test (CMT) kan användas på gården för att identifiera juverdelar med höga celltal.
- Provtagning för att uppskatta antalet celler bör ske på samtliga tackor i besättningen. Provtagningen bör helst ske både i anslutning till lamning och innan avvänjning.
- Från juverdelar med CMT ≥ 3 eller DCC-celltal $\geq 500\,000$ tas ett mjölkprov för bakteriologisk odling för att detektera den sjukdomsframkallande bakterien.
- I varje enskilt fall av juverinfektion baseras vidare åtgärder på bakteriologiskt fynd. Generellt bör dock tackor med smittsamma bakterier i juvret separeras från friska tackor för att minska smittspridningen. Det är också viktigt att vid behov stödutfodra lammen till tackor med subklinisk mastit eftersom sjukdomen ofta leder till en minskad mjölmängd hos tackan.
- Provtagning av mjölk fungerar bäst när tackorna står upp eftersom de tenderar att bli stressade när man sätter dem ned vilket hämmar mjölknedsläppet. Det är också bra att separera lammen från tackorna en eller ett par timmar innan provtagning för att inte riskera att lammen är i vägen vid provtagningen och diar slut på mjölken.
- Det är viktigt att inför varje ny avelssäsong undersöka tackornas juver och slå ut tackor med knölar eller förhårdnader i juvret eftersom de löper en ökad risk att drabbas av en ny episod av sjukdomen i kommande laktation. Tackor som har haft tidigare episoder av klinisk mastit orsakat av *S. aureus* bör också slås ut av samma anledning. Däremot kan tackor som har haft klinisk mastit tidigare, orsakad av en annan bakterie än *S. aureus* och som har tillfrisknat helt eventuellt betäckas på nytt. Det är också viktigt att tackorna har bra hull och att inte avla på tackor med dålig juverform.
- Äldre tackor och tackor med tre eller fler lamm löper ökad risk att drabbas av mastit. Genom att separera dessa tackor från resten av besättningen i samband med lamning underlättas kontrollen av tackorna. Det kan också vara bra att stödutfodra lamm till äldre tackor och lamm i stora kullar för att minska påfrestningen på tackornas juver och spenar.
- För att minska risken för miljörelaterad smitta är det viktigt att eftersträva god hygien i stallarna. Det är också viktigt att undvika överbeläggning eftersom den försämrade miljön i besättningar med hög djurdensitet ökar risken för att tackorna drabbas av mastit.

TACK TILL

Ett stort tack till min handledare Karin PerssonWaller för ovärderliga tips och idéer och all tid du har lagt ned på att göra arbetet så bra som möjligt. Tack till min biträdande handledare Ylva Persson för ditt fantastiska engagemang och stöd som gjort det roligt att genomföra det här projektet. Jag vill också tacka personalen på mastitlaboratoriet, SVA som hjälpt till med analysen av mina prover och Ann Nyman som hjälpt mig med statistiska beräkningar. Slutligen vill jag tacka alla fårägare för ett mycket trevligt bemötande under mina provtagningar och för att ni har gjort det möjligt att genomföra det här projektet!

LITTERATURFÖRTECKNING

- Al-Majali, A.M., Jawabreh, S. (2003) Period prevalence and etiology of subclinical mastitis in Awassi sheep in southern Jordan. *Small Ruminant Research*, 47:243-248.
- Anderson, D.E, Hull, B., Pugh, D.G. (2002) *Diseases of the mammary gland*. In: Puhg, D.G (ed.) *Sheep and Goat medicine*. 1:ed: 345-355. Philadelphia. ISBN:0-7216-9052-1
- Andersson, I., Andersson, H., Christiansson, A., Oscarsson, M., Persson, Y., Widell, A. (2011) Systemanalys celltal, Rapport nr: 7091: 2011-10-20.
- Arsenault, J., Dubrieuil, P., Higgins, R., Bélanger, D. (2008) Risk factors and impacts of clinical and subclinical mastitis in commercial meat-producing sheep flocks in Quebec Canada. *Preventive Veterinary Medicine*, 87:373-393
- Bergonier, D., De Crémoux, R., Rupp, R., Lagriffoul, G., Berthelot, X. (2003) Mastitis of dairy small ruminants. *Veterinary Research*, 34:689-716.
- Berthelot, X., Lagriffoul, G., Concordet, D., Barillet, F., Bergonier, D. (2006) Physiological and pathological thresholds of somatic cell counts in ewes milk. *Small ruminant research*, 62:27-31.
- Clements, C.A., Taylor, D.J., Fitzpatrick, J.L. (2003) Evaluation of diagnostic procedures for subclinical mastitis in meat-producing sheep. *Journal of Dairy Research*, 70:139-148.
- Ciliax, A.B., Holcombe, D.W., Redelman, D., Garner, D.L., Fernandez, G.C.J. (2004) Comparison of somatic cell counts, milk constituents and weaning weight in ewes with and without subclinical mastitis. *American Society of Animal Science*, 55:308-310.
- Contreras, A., Sierra, D., Sánchez, A., Corrales, J.C., Marco, J.C., Paape, M.J., Gonzalo, C. (2007) Mastitis in small ruminants. *Small Ruminant Research*, 68:145-153.
- DeLaval. (2005) Instruction book. DeLaval cell counter DCC. Tumba: DeLaval International AB.
- Fthenakis, G.C. (1994) Prevalence and aetiology of subclinical mastitis in ewes of southern Greece. *Small Ruminant Research*, 13:293-300.
- Fthenakis, G.C. (1995) California Mastitis Test and Whiteside Test in diagnosis of subclinical mastitis of dairy ewes. *Small Ruminant Research*, 16: 271-276.
- Fthenakis, G.C. (2000) Field evaluation of flunixin meglumine in the supportive treatment of ovine mastitis. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 23:405-407.
- Fthenakis, G.C., Jones, J.E.T. (1990a) The effect of experimentally induced subclinical mastitis on milk yield of ewes and on the growth of lambs. *British Veterinary Journal*, 146:43-49.
- Fthenakis, G.C., Jones, J.E.T. (1990b) The effect of inoculation of coagulase-negative staphylococci into the ovine mammary gland. *Journal of Comparative Pathology*, 102:211-219.
- Gonzalo, C., Ariznabarreta, A., Carriedo, J.A., San Primitivo, F. (2002) Mammary Pathogen and their relationship to somatic cell count and milk yield losses in dairy ewes. *Journal of Dairy Science*, 85:1460-1467.
- Gonzalo, C., Tardáguila, J.A., De La Fuente, L.F., San Primitivo, F. (2004) The effects of selective and complete dry therapy on prevalence of intramammary infection and on milk yield in the subsequent lactation in dairy ewes. *Journal of Dairy Research*, 71:33-38.
- Gustafsson, K., GrönlundAndersson, U. (2009) Clinical mastitis in ewes: Bacteriology and antibiotic resistance. The 7th International Sheep Veterinary Congress, Norway, Stavanger

- Heras, A.L., Dominguez, L., Fernández-Garayzábai, J.F. (1999) Prevalence and aetiology of subclinical mastitis in dairy ewes of the Madrid region. *Small Ruminant Research*, 32:21-29.
- Jones, J.E.T., Watkins, G.H. (2000). Mastitis and contagious agalactia. In: Martin, W.B., Aitken, I.D. (eds.) *Diseases of Sheep*. 3:ed: 75-86. London. ISBN: 0-632-05139-6.
- Katsoulos, P.D., Christodouloupolous, G., Minas, A, Karatzia, M.A., Pourliotis, K., Kritas, S. (2010) The role of lactate dehydrogenase, alkaline phosphatase and aspartate aminotransferase in the diagnosis of subclinical intramammary infections in dairy sheep and goats. *Journal of Dairy Research*, 77:107-111.
- Keisler, D.H., Andrews, M.L., Moffart, R.J. (1992) Subclinical mastitis and its effects on lamb performance. *Journal of Animal Science*, 70:1677-1681.
- Lafi, S.Q. (2006) Use of somatic cell count and California mastitis test results from udder halves milk samples to detect subclinical intramammary infection in Awassi sheep. *Small ruminant research*, 62:83-86.
- Lafi, S.Q., Al-majali, A.M., Rousan, M.D., Alawaneh, J.M. (1998) Epidemiological studies of clinical and subclinical mastitis in Awassi sheep in northern Jordan. *Preventive Veterinary Medicine*, 33:171-181.
- Larsgard, A.G., Vaabenoe, A. (1993) Genetic and environmental causes of variation in mastitis in sheep. *Small ruminant research*, 12:339-347.
- Leitner, G., Chaffer, M., Caraso, Y., Ezra, E., Kababea, D., Winkler, M., Glickman, A., Saran, A. (2003) Udder infection and milk somatic cell count, NAGase activity and milk composition – fat, protein and lactose – in Israeli- Assaf and Awassi Sheep. *Small Ruminant Research*, 49:157-164.
- Leitner, G., Shaffer, M., Shamay, A., Shapiro, F., Merin, U., Ezra, E., Sharan, A., Silanikove, N. (2004) Changes in Milk composition as affected by Subclinical Mastitis in Sheep. *Journal of Dairy Science*, 87:46-52.
- Marogna, G., Rolesu, S., Lollai, S., Tola, S., Geori, T. (2010) Clinical findings in sheep farms affected by recurrent bacterial mastitis. *Small ruminant research*, 88:119-125.
- McCarthy, F.D., Lindsey, J.B, Gore, M.T., Notter, D.R. (1988) Incidence and control of subclinical mastitis in intensively managed ewes. *Journal of Animal Science*, 66:2715-2721.
- McDougall, S, Murdough, P., Pankey, M., Delaney, C., Barlow, J., Scruton, D. (2001) Relationships among somatic cell count, California mastitis test, impedance and bacteriological status of milk in goats and sheep in early lactation. *Small Ruminant Research*, 40:245-254.
- McDougall, S., Pankey, W., Delaney, C., Barlow, J., Murdough, P.A., Scruton, D. (2002) Prevalence and incidence of subclinical mastitis in goats and dairy ewes in Vermont, USA. *Small Ruminant Research*, 46:115-121.
- Mørk, T., Waage, S., Tollersrud, T., Kvitle, B., Sviland, S. (2007) Clinical mastitis in ewes; bacteriology, epidemiology and clinical features. *Acta veterinaria Scandinavica*, 49:23. .
- PerssonWaller, K. (2011). Bakteriologisk undersökning av mjölkkor vid mastit hos kor. *Svensk veterinärtidning*, 8-9: 17-21.
- Pyörälä, S. (2003) Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Veterinary Research*, 34:565-578.
- Radostits, O.M., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W., Constable, P.D. (eds.) (2007) *Veterinary Medicine*. 10:ed: 685-687. Philadelphia. ISBN: 978-0702-07772.

- Sandholm, M., Honkanen-Buzalski, T., Kaartinen, L., Pyörälä, S. (eds.) (1995) *The bovine udder and mastitis*. 59-82. University of Helsinki, Faculty of Veterinary Medicine. ISBN: 951-834-047-1
- Saratis, P., Leontides, L., Tzora, A., Alexopoulos, C., Fthenakis, C.G. (1998) Incidence risk and aetiology of mammary abnormalities in dry ewes in 10 flocks in Southern Greece. *Preventive Veterinary Medicine*, 37:173-183.
- Schalm, O.W., Noorlander, D.O. (1957) Experiments and observations leading to development of the California mastitis test. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 130:199-204.
- Scott, M.J., Jones, J.E.T. (1998) The carriage of *Pasteurella haemolytica* in sheep and its transfer between ewes and lambs in relation to mastitis. *Journal of Comparative Pathology*, 118:359-363.
- Sevi, A., Massa, S., Annicchiarico, G., Dellaquila, S., Muscio, A. (1999) Effect of stocking density on ewes' milk yield, udder health and microenvironment. *Journal of Dairy Research*, 66:489-499.
- Sevi, A., Albenzio, M., Marino, R., Santillo, A., Muscio, A. (2004) Effects of lambing season and stage of lactation on ewe milk quality. *Small Ruminant Research*, 51:251-259.
- Sordillo, L.M., Shafer-Weaver, K., DeRosa, D. (1997) Immunobiology of the mammary gland. *Journal of Dairy Science*, 80:1851-1865.
- Vautor, E., Abadie, G., Guibert, J.M., Huard, C., Pepin, M. (2003) Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on farms with dairy sheep using pulsed-field gel electrophoresis. *Veterinary Microbiology*, 96:69-79.
- Waage, S., Vatn, S. (2008) Individual risk factors for clinical mastitis in meat sheep in Norway. *Preventive Veterinary Medicine*, 87:229-243.
- Watkins, G.H., Burriel, A.R., Jones, J.E.T. (1991) A field investigation of subclinical mastitis in sheep in southern England. *British Veterinary Journal*, 147:413-420.

Internet

- Husdjurssektionen (2011). Riktlinjer för antibiotikaanvändning till produktionsdjur: Nötkreatur och gris. In: Sveriges Veterinärförbund. Hemsida. [Online] (2011-12-08) Tillgänglig:
http://www.svf.se/Documents/S%C3%A4llskapet/Husdjurssektionen/SVS%20Riktlinjer%20f%C3%B6r%20anv%C3%A4ndning%20av%20antibiotika%20till%20produktionsdjur_2011-05-31.pdf
- Statens jordbruksverk. Hemsida. [Online] (2011-09-08) Tillgänglig:
http://www.sjv.se/webdav/files/SJV/Amnesomraden/Statistik%20fakta/Husdjur/JO20/JO20SM1101/JO20SM1101_kommentarer.htm