



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper

För- och nackdelar med PCR vid bakteriologisk diagnostik av mastit hos mjölkkor

Anna Svensson

Uppsala

2009

Examensarbete inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2009:48*

För- och nackdelar med PCR vid bakteriologisk diagnostik av mastit hos mjölkkor

Anna Svensson

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

Bitr handledare: Helle Ericsson Unnerstad, Enheten för bakteriologi, SVA

Examinator: Bernt Jones, Institutionen för kliniska vetenskaper

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2009
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper
Kurskod: EX0239, Nivå X, 30hp*

Nyckelord: mastit, juverinflammation, PCR, odling, mjölkkor, kor, mastitbakterier, juverpatogener

*Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>
ISSN 1652-8697
Examensarbete 2009:48*

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

SAMMANFATTNING	1
SUMMARY	2
INLEDNING	3
BAKGRUND	4
MASTIT	4
<i>Allmänt om mastit</i>	4
<i>Vanliga juverpatogener</i>	4
<i>Antibiotikaresistens</i>	6
KONVENTIONELL BAKTERIOLOGISK ODLING AV MJÖLKPROV	6
<i>När, var och hur?</i>	6
<i>Kända för- och nackdelar</i>	7
PCR FÖR BAKTERIOLOGISK DIAGNOSTIK AV MJÖLKPROV	9
<i>Hur fungerar PCR?</i>	9
<i>Kända för- och nackdelar</i>	9
<i>PathoProofTM Mastitis PCR assay</i>	11
SYFTE	12
MATERIAL OCH METODER	12
INSAMLANDE AV PROVER OCH PROVHANTERING	12
KONVENTIONELL ODLING	13
PCR-ANALYS.....	13
DATABEARBETNING.....	14
RESULTAT	15
JUVERDELSPROVER - ALLMÄN BESKRIVNING AV ODLINGS- OCH PCR-RESULTAT.....	15
JUVERDELSPROVER – JÄMFÖRELSE MELLAN ODLING OCH PCR.....	16
<i>Allmän jämförelse</i>	16
<i>Utvalda analyser</i>	17
SAMLINGSPROVER - <i>STREPTOCOCCUS AGALACTIAE</i> -SCREENING	20
DISKUSSION	21
JÄMFÖRELSE MELLAN PCR-FYND OCH ODLINGSSVAR	21
<i>Allmänna fynd</i>	21
<i>Diagnostik av stafylokocker och penicillinasproduktion</i>	22
<i>Diagnostik av Streptococcus agalactiae</i>	22
FÄLTVETERINÄRENS PERSPEKTIV	23
ALLMÄN BEDÖMNING AV FÖR- OCH NACKDELAR MED PCR	24
KONKLUSION	24
LITTERATURFÖRTECKNING	25

FÖRORD

Ett stort tack till min handledare Karin Persson Waller för fantastiskt engagemang och ovärderlig hjälp under arbetets gång. Jag vill även tacka min biträdande handledare Helle Ericsson Unnerstad samt personalen på Mastitlaboratoriet, SVA, för all hjälp under det praktiska arbetet. TACK!

SAMMANFATTNING

Mastit hos mjölkkor är en viktig sjukdom både ur ekonomisk synpunkt och djurhälsosynpunkt. Att snabbt ställa rätt diagnos är en förutsättning för korrekt behandling och andra förebyggande åtgärder såsom gruppering av mjölkorna och korrekt mjölkkningsordning. Idag sker den bakteriologiska diagnostiken med hjälp av konventionell odling, både i fält och på laboratorium. Att använda PCR, Polymerase Chain Reaction, för bakteriell diagnostik av mjölkprov från djur med mastit är dock på frammarsch och idag finns ett kommersiellt test tillgängligt vilket detekterar de 11 vanligaste juverpatogenerna samt genen för betalaktamasproduktion, *blaZ*. Några kända fördelar med PCR är den korta analys tiden och dess förmåga att detektera mycket små mängder bakterier. Nackdelar med metoden är t ex att den detekterar ett begränsat antal patogener samt svårigheter att utföra vidare analyser såsom undersökning av andra typer av antibiotikaresistens, då detta kräver en levande bakteriekultur.

I denna studie undersöktes totalt 133 mjölkprov med både konventionell odling och PCR. Resultaten tyder på att PCR-metoden detekterar fler prov med specifik infektion än odlingen och att förmågan att detektera *Streptococcus agalactiae* i både juverdels- och samlingsprov är bättre med PCR. PCR-resultaten rörande detektion av *Staphylococcus aureus* samt penicillin-produktion var dock svårtolkade. För att fältveterinären ska kunna tolka PCR-resultaten korrekt behövs noggranna instruktioner och utbildning.

Den ökade analyskostnad som PCR-tekniken innebär bör beaktas när nyttan med metoden utvärderas. PCR-analysen har potential som komplement till konventionell odling men bör utvecklas vidare innan den helt kan ersätta odlingen som rutinmetod vid bakteriologisk diagnostik av mastit.

SUMMARY

Mastitis in dairy cows is an important disease for economic reasons as well as for animal health. To quickly make a correct diagnosis is essential for adequate treatment and other preventive measures such as grouping of animals and correct milking order. Today, bacteriological diagnostics is based on conventional culture, both in the field and at the laboratory. To use PCR, Polymerase Chain Reaction, for bacteriological diagnostics of milk samples from animals with mastitis is, however, coming more and more. Today, a commercial test is available, which detects the 11 most common udder pathogens, and the gene for beta-lactamase production, *blaZ*. Some known advantages of PCR are the short analysis time and its ability to detect very small amounts of bacteria. Limitations with the method are for example that it detects a limited number of pathogens and difficulties to perform further tests such as evaluation of other types of antimicrobial resistance, as this requires a bacterial culture.

In this study 133 milk samples were analyzed using conventional culturing and PCR. The results indicate that the PCR method detects specific infection in more samples than culturing, and that the ability to detect *Streptococcus agalactiae* in both udder quarter samples and cow composite samples is better with PCR. The PCR results regarding detection of *Staphylococcus aureus* and beta-lactamase production were, however, difficult to interpret. To ensure that the field veterinarian interprets the PCR results correctly detailed instructions and education is needed.

The increased cost of analyses for PCR should be considered when evaluating the value of the method. The PCR analysis has potential as a complement to conventional culturing, but should be developed further in order to completely replace culturing as the standard method for bacteriological diagnostics of mastitis.

INLEDNING

Mastit (juverinflammation) är idag den vanligast förekommande infektionssjukdomen hos våra svenska mjölkkor. Sjukdomen orsakar stora problem för både djurens hälsa och för mjölkproducenternas ekonomi. I Sverige har kostnaderna för producenterna till följd av mastit beräknats till ca 450 miljoner kronor. Utslagning på grund av någon typ av mastit står sammanlagt för omkring 25 % av de totala utslagningssorsakerna (Djurhälsovård Svensk Mjök, 2007/2008). Förlusterna orsakas primärt av mindre mjölkproduktion, försämrad mjölkqualität och högre produktionskostnader (Riffon et al, 2001).

Det finns många olika bakteriella juverpatogener och diagnostik av dessa är av stor betydelse för t ex val av behandling, bedömning av prognos samt insättande av strategier för minskad smittspridning i en besättning. Idag sker diagnostiken i Sverige med hjälp av konventionell odling vilket inkluderar användning av biokemiska tester vid behov. Flertalet mjölkprov från kor med klinisk mastit odlas av fältveterinären själv, medan prover från subkliniska mastiter bör skickas till ett ackrediterat laboratorium för analys.

Konventionell odling har sedan länge varit den enda tillgängliga metoden för att diagnostisera den bakteriella orsaken bakom juverinflammationen. På senare tid har dock flera studier gjorts där molekylär metodik, Polymerase Chain Reaction (PCR), utvärderats som ersättning eller komplement till odling (Riffon et al, 2001; Phuektes et al, 2003; Gillespie & Oliver, 2005; Koskinen et al, 2009; Taponen et al, 2009). Det finns både single-PCR, där endast en bakteriell patogen påvisas, och multiplex-PCR, där flera agens kan identifieras samtidigt. Användandet av så kallad Realtids-PCR, där bakteriernas DNA påvisas både kvalitativt och kvantitativt, har lett till ytterligare framsteg.

I dagsläget finns en kommersiell multiplex Realtids-PCR, PathoProofTM Mastitis PCR Assay (Finnzymes Diagnostics), tillgänglig som alternativ till konventionell odling. Denna metod är en av de första i sitt slag som används kommersiellt och inte enbart i forskningssyfte (Koskinen et al, 2009). Denna Realtids-PCT kan detektera de 11 vanligast förekommande mastitpatogenerna samt genen *blaZ* som är ansvarig för pencillinproduktion hos stafylokocker.

Några av de kända fördelarna med PCR-metoden är den korta analystiden (3-4 timmar), möjligheten att detektera genen för beta-laktamasproduktion samt möjligheten att detektera små mängder bakterie-DNA i ett prov. Metoden har dock även vissa nackdelar och det finns i vissa fall osäkerhet om hur resultatet ska tolkas, vilket har betydelse för val av behandling och åtgärder i fält. Nyttan och behovet av PCR-tekniken jämfört med konventionell odling utifrån fältveterinärens perspektiv är inte heller klarlagda.

BAKGRUND

Mastit

Allmänt om mastit

Mastit är en multifaktoriell sjukdom vilken är svår att kontrollera då orsakerna kan vara många, trauma, kemisk irritation eller infektion med olika agens (Cremonesi et al, 2006). Vanligtvis orsakas sjukdomen av att bakterier invaderar juvret via spenkanalen och ger upphov till inflammation. Detta sker då djurets försvarsmekanismer sviker och bakterier multipliceras och retar till att initiera kroppens immunförsvar. Syftet med inflammationsreaktionen är att på sikt återställa juvrets normala funktion (Sandholm et al, 1995).

Sjukdomen kan yttra sig som klinisk eller subklinisk mastit. Vid klinisk mastit ses ofta förändringar i mjölkens utseende, svullnad i juvret och nedsatt mjölkproduktion. I vissa fall är även kons allmäntillstånd nedsatt. Vid subklinisk mastit ses inga kliniska symtom men vid provtagning av mjölken ses bland annat höga celltal.

Hur vanligt det är att en ko veterinärbehandlas för mastit (ffa klinisk mastit) i Sverige framgår av Djursjukdata från Svensk Mjolk för 2007/2008. Enligt Tabell 1 kan man se att mastit är vanligare hos äldre kor än hos yngre. Medelvärdet i Sverige under nämnd period var 14,3 sjukdomstillfällen/100 kor. Dessa siffror anger dock endast veterinärbehandlade och rapporterade fall och är en underskattning av det totala antalet kor som drabbats av mastit. Enligt Mörk (2009) veterinärbehandlas cirka 78 % av alla fall av klinisk mastit medan ungefär 75 % av de veterinärbehandlade fallen rapporteras till djursjukdatabasen. Om man tar hänsyn till dessa faktorer skulle den sanna incidensen för 2007/2008 varit cirka 23 kor/ 100 kor (Mörk, 2009).

Tabell 1. Hur vanligt det är att en ko behandlas av veterinär för mastit fördelat på laktationsnummer. Presenterat som antal sjukdomstillfällen/100 kor och år (efter Svensk Mjolk 2007/2008)

Laktationsnummer	Antal sjukdomstillfällen/100kor/år
1	9,1
2	14,0
3	18,7
4	22,3
5	23,9
>5	25,8
Totalmedel	14,3

Vanliga juverpatogener

Varje land har sitt panorama vad gäller juverpatogener, vilket bland annat kan bero på skillnader i behandlingsstrategier (Ericsson Unnerstad et al, 2009). År 1994-1995 utfördes en undersökning avseende vilka bakterier som låg till grund för kliniska mastiter i Sverige (Nilsson et al, 1997). En liknande undersökning

rörande akut klinisk mastit utfördes 2002-2003 (Ericsson Unnerstad et al, 2009). Eftersom fler besättningar gått över till lösdrift istället för uppbundna stallar samt att besättningarna ökat i storlek var förväntningen att bakteriepanoramata hade förändrats jämfört med den tidigare undersökningen. Enligt studien gjord 2002-2003 kunde dock ingen väsentlig förändring av fördelningen mellan de olika bakterierna vid klinisk mastit ses jämfört med den tidigare studien. Stafylokocker, streptokocker och koliformer är fortfarande de vanligaste bakteriegrupperna som orsakar mastit i Sverige men det finns även många andra bakterier som potentiellt kan infektera juvret (Ericsson Unnerstad et al, 2009). Fördelningen mellan olika infektionsagens ges i Tabell 2. Från tabellen kan utläsas att 8 patogener stod för över 80 % av alla kliniska mastiter.

Det finns ingen aktuell undersökning som speglar de vanligast förekommande mastitbakterierna vid subklinisk mastit i Sverige. Istället har resultat från prover analyserade vid SVA 2002/2003 (Svensk Mjolk, 2003) använts för att ge en bild av hur läget ser ut i Sverige idag (Tabell 2). Det materialet tyder på att stafylokocker och streptokocker står för den dominerande andelen patogener även vid subklinisk mastit.

Tabell 2. De vanligaste mastitpatogenerna vid klinisk mastit under åren 2002-2003 (Ericsson Unnerstad et al, 2009) samt fördelning bland bakteriologiskt positiva (specifik infektion) mjölkprov från subklinisk mastit analyserade vid SVA 2002-2003 (Svensk Mjolk, 2003) hos svenska mjölkkor

Patogener	Kliniska mastiter	Subkliniska mastiter
	Procent	Procent
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	6 %	1 %
<i>Escherichia coli</i>	16 %	3 %
<i>Klebsiella</i> spp.	4 %	2 %
Koagulasnegativa stafylokocker	6 %	23 %
<i>Staphylococcus aureus</i>	21 %	41 %
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1 %	2 %
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	16 %	13 %
<i>Streptococcus uberis</i>	11 %	11 %
Övriga bakterier ^a	3 %	1 %
Övriga streptokocker	1 %	3 %
Kontaminerade	5 %	-
Ingen växt	11 %	-

^a inkl enterokocker och övriga koliformer

Juverpatogenerna kan klassificeras som antingen kobundna eller miljöbundna beroende på deras primära reservoar och smittsätt. Den primära reservoaren för kobundna patogener är kons juver och dessa agens smittar vanligtvis via kontakt med infekterad mjölk. Viktiga bakterier inom denna grupp är *Staphylococcus aureus* och *Streptococcus agalactiae*. Utnyttjande av sintidsbehandling, spendesinfektion efter mjölkning, allmän mjölkningshygien och mjölkningsordning är viktiga åtgärder som kan hjälpa till att minska

smittspridningen. För de miljöbundna patogenerna sker smittspridningen vanligen mellan mjölkningarna då djuren utsätts för en miljö med dålig hygien. Dessa patogener är sk opportunister och för att hindra att djuren blir infekterade är det viktigt att minska exponeringen för bakterierna (god hygien) samt att stimulera djurens motståndskraft mot infektioner. De viktigaste bakterierna inom denna grupp är *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp och *Streptococcus uberis* (Makovec & Ruegg 2003).

Antibiotikaresistens

Antibiotikaresistens är ett ständigt ökande problem inom både human- och veterinärmedicinen (Bengtsson et al, 2009). Av den totala antibiotikaanvändningen till mjölkarna står mastiterna för en betydande del.

Bengtsson et al (2009) visade att de flesta av bakterierna associerade med akut klinisk mastit i Sverige är känsliga för de preparat som används för behandling. Idag behandlas 80 % av alla mastiter i Sverige med penicillin (Landin, 2006), vilket stämmer väl med fördelningen av bakterieagens angiven i Tabell 2. Värt att nämna är att majoriteten av stafylokockerna och alla streptokockerna var känsliga för penicillin. Resistens mot penicillin i form av beta-laktamasproduktion, även kallat penicillinasa, påträffades hos 7,1 % av alla *Staphylococcus aureus* och hos 12,5 % av alla koagulasnegativa stafylokocker isolerade från klinisk mastit (Bengtsson et al, 2009). Penicillinproducerande bakterier är resistenta mot penicillin eftersom de bryter ner beta-laktamringen i penicillin vilket gör det verkningslöst. *BlaZ* är den gen i stafylokockernas genom som kodar för beta-laktamasproduktion (Lowy, 2003). Påvisande av *blaZ*-genen vid Realtids-PCR korrelerar väl till penicillinproduktion och kan därför användas som diagnostisk metod (Haveri et al, 2005).

Konventionell bakteriologisk odling av mjölkprov

När, var och hur?

Diagnostiken av mastitörsakande bakterier i Sverige sker idag med hjälp av konventionell odling, vilken fortfarande är den gyllene standarden för identifikation av bakterier från mjölk. Identifiering av bakteriespecies sker baserat på fenotyp samt biokemiska och enzymatiska egenskaper (Gillespie & Oliver, 2005).

En stor del av proverna från kor med klinisk mastit odlas i fält av praktiserande veterinär. I fält används ibland vanliga blodagarplattor men oftast används selektiva agarplattor för att på ett smidigt sätt kunna skilja på streptokocker, stafylokocker samt koliformer. Plattorna inkuberas vanligen över natten i 37°C och nästa dag får djurägaren ett preliminärsvår angående vad som växer och utvärdering av insatt behandling sker. Genom bedömning av koloniutseende och växt eller inte växt på selektiva agar samt i vissa fall närvaro eller frånvaro av hemolyszoner kan den praktiserande veterinären vanligen skilja på de vanligaste bakterierna eller bakteriegrupperna. Det huvudsakliga målet med denna diagnostik är att skilja på gramnegativa och grampositiva bakterier för val av behandling samt detektion av smittsamma bakterier för insättning av besättningsåtgärder. Prover från mjölkkor med subklinisk mastit skickas med fördel till ett ackrediterat laboratorium för diagnostik då analysen av dessa prover

ofta är mer krävande. Det är i dessa fall också viktigt att identifiera olika bakteriespecies och inte bara bakteriegrupp.

Kända för- och nackdelar

Några troliga anledningar till att odling länge har varit den gyllene standarden för mastitdiagnostik är att det är relativt enkelt att utföra och att det inte behövs någon dyr utrustning, endast odlingsplattor, öglor och ett 37° C skåp för inkubation. Enkla kompletterande tester såsom gramfärgning, katalastest och kaliumhydroxidtest kan underlätta diagnostiken. Kostnaden för odling är lägre än nya molekylära metoder, vilket kan vara en viktig faktor när en bonde beslutar om provtagning eller inte i sin besättning. En annan fördel med odling är att man har en levande bakteriestam vilken kan testas med avseende på olika typer av antibiotikaresistens (Gillespie & Oliver, 2005). Det innebär också att det är möjligt att frysa in och spara bakteriestammen för eventuella senare undersökningar.

En mycket viktig fördel med konventionell odling är att den har potential att upptäcka de flesta mastitörsakande bakterierna. Över 135 olika mikroorganismer har isolerats från djur med mastit (Bradley, 2002). De ovanliga juverpatogenerna orsakar vanligen inte stora utbrott i Sverige, men diagnostik av dessa är ändå viktig på grund av deras potential att spridas inom en besättning. Dessutom är en del av dessa ovanliga patogener potentiella zoonoser. Exempel på mer ovanliga patogener som kan påträffas är *Enterobacter* spp, *Citrobacter freundii*, *Serratia* spp, *Proteus mirabilis*, *Candida* spp (jästsvamp), *Listeria* spp, *Pseudomonas aeruginosa* och *Mycoplasma* spp. De flesta av ovan nämnda patogener finns i kons miljö (Lindhagen & Persson Waller, 2006).

Exakt identifiering av flera mastitörsakande bakterier med konventionell odling är dock svår och kräver erfaren personal. Att t ex skilja mellan vissa streptokocker och enterokocker är svårt även med hjälp av biokemiska tester (Riffon et al, 2001). Som en konsekvens av detta kan resultat från olika laboratorier variera och felaktiga identifikationer är möjliga (Pitkälä et al, 2005; Koskinen et al, 2009). Dessutom är konventionell odling tidskrävande, tar allt från 24-48 timmar och uppåt, beroende på behov av ytterligare kompletterande tester vilka i sig ofta är tidskrävande (Koskinen et al, 2009). Tidskrävande bakterieidentifikation leder till fördröjning i ingripandet vid sjukdomsutbrott (Gillespie & Oliver, 2005).

Enligt Pitkälä et al (2005) finns det inga bestämda standarder idag utan enbart riktlinjer för hur mastitbakterier bör identifieras och resultaten konfirmeras. NMC, National Mastitis Council, har publicerat riktlinjer för hur mastitdiagnostiken bör gå till (National Mastitis Council, 1999). Laboratorierna bör vara ackrediterade för att säkerställa korrekthet och kompetens.

Enligt rekommendationerna bedöms prover i vilka det växer 3 eller fler olika bakteriespecies (baserat på koloniutseende) som blandflora. Undantag från regeln görs vid SVA om *Staphylococcus aureus* alternativt *Streptococcus agalactiae* misstänks på grund av deras dignitet som smittspridare. I vissa fall ansvarar en misstänkt juverpatogen för en dominerande del av växten. Dessa kolonier analyseras då vidare och provsvaret anges som växt av patogen i blandflora. I och med att alla specifika bakterier inte selekteras fram och analyseras vidare med

biokemiska analyser vid blandflora finns risken att viktiga patogener missas, dvs risk för falskt negativa prover. För att få en rättvisande bild av bakterieförekomsten i provet rekommenderas omtagning av prover med blandflora.

Negativa prover vid odling kan vara ett dilemma både för djurens hälsa och för behandlande veterinär. Andelen negativa prover vid klinisk mastit varierar kraftigt i olika studier men ligger runt 30 % i snitt även efter 48 timmars konventionell odling (Taponen et al, 2009). Bradley et al (2007) fann i sina studier i Storbritannien ingen växt vid 26,5 % av alla prover med klinisk mastit, medan Koivula et al (2007) fann ingen växt i 23,7 % av fall av klinisk mastit medan de subkliniska fallen var negativa i något större utsträckning, 28,7 %. Makovec & Ruegg (2003) visade på negativt resultat vid 30,7 % av alla prover från kliniska mastiter. Vid ovan nämnda svenska studie av akut klinisk mastit återfanns ingen växt dock i enbart 11 % av fallen (Ericsson Unnerstad et al, 2009).

Om ingen växt återfinns i ett prov kan resultatet vara sant negativt eftersom även annat än mikroorganismer kan orsaka mastit. Trauma mot juvret samt virusinfektion kan ge en inflammatorisk reaktion i juvret (Taponen et al, 2009). Ytterligare en anledning till sant negativa prover kan vara att patogenen redan eliminerats från juvret och att endast inflammationsreaktionen kvarstår när provet tas (Taponen et al, 2009).

Det är dock troligt att en inte oansenlig andel av proverna utan bakterieväxt är falskt negativa, vilket kan innebära att viktiga patogener missas och smittspridningen i besättningen kan öka. I vissa av dessa fall kan orsaken vara bakteriearter eller andra mikroorganismer som inte växer på standardmedium (Taponen et al, 2009) eller som växer långsamt och eventuellt kräver tillsats av tillväxtfaktorer (Makovec & Ruegg, 2003). Exempel på en patogen som kräver specialmedium är *Mycoplasma* spp, dock är detta ett litet problem då mykoplasma är en mycket ovanlig juverpatogen i Norden (Taponen et al, 2009).

Låg bakteriekoncentration i mjölken har nämnts som en annan möjlig anledning till negativ växt (Gillespie & Oliver, 2005). Vid vissa bakterieinfektioner kan bakterieutskiljningen vara intermittent och variera från dag till dag (Phuektes et al, 2001). Tas provet då inga bakterier utsöndras blir provet naturligtvis negativt. Även närvaro av bakteriehämmande substanser i mjölken kan hämma tillväxten vid odling (Taponen et al, 2009). Mjölken innehåller olika antimikrobiella faktorer såsom immunoglobuliner, vilka verkar opsonerande och hindrar bakterierna från att kolonisera och neutraliserar toxiner. Laktoferrin, lysozym, laktoperoxid och komplementfaktorer är alla ämnen som hindrar bakteriernas tillväxt på olika sätt (Pyörälä, 2002; Taponen et al, 2009). Andra orsaker till negativ växt kan vara felaktig miljö under transporten, kvarvarande antibiotikametaboliter från tidigare behandling eller desinfektionsmedel från spentvätt som kontaminerat mjölkprovet.

PCR för bakteriologisk diagnostik av mjölkprov

Hur fungerar PCR?

PCR-tekniken går ut på att en given nukleotidsekvens selekteras och snabbt replikeras upp till stora volymer (Viljonen et al, 2005). PCR-metoden baseras på användning av DNA-polymeras vilken kopierar DNA genom upprepade cykler. Var DNA-polymeraset fäster in på DNA och inleder replikationen bestäms av specifika primers. Dessa primers är små DNA-fragment, ca 20 nukleotider långa, vilka ser olika ut beroende på vilken patogen man vill identifiera. En förutsättning för att utveckla specifika primers är att patogenens genom är sekvenserat. Den del av genomet som valts måste vara specifik för den enskilda patogenen för att inte andra patogener ska korsreagera vid analysen. PCR-analysen inleds med att DNA separeras med hjälp av hög värme följt av tillsats av primers vilka fäster till den valda sekvensen. DNA-polymeraset fäster till primers och inleder DNA-syntesen. Tillsats av DNA byggstenar krävs för att nytt DNA ska kunna bildas. När DNA-syntesen är avslutad är första cykeln avklarad, varpå samma procedur upprepas igen och igen tills önskad mängd är detekterad. Vid varje cykel fördubblas mängden DNA. Efter 30 cykler finns ca 1 miljon kopior av DNA-sekvensen. DNA-fragmenten i provet kan analyseras med hjälp av gelelektrofores, vilken baseras på de negativt laddade DNA-partiklarnas förmåga att vandra mot en positiv katod i ett elektriskt fält. Olika stora partiklar separeras och delas upp beroende på molekylens storlek. Då den valda DNA-sekvensens längd är känd, förväntas ett band uppträda på ett specifikt ställe.

PCR finns i många olika varianter och utvecklingen går ständigt framåt. Initialt kunde inte kvantiteten beräknas utan påvisande av patogen eller inte var det svar som angavs. Realtids-PCR är en kvantitativ metod vilken mäter mängden PCR-produkt i realtid, dvs direkt efter varje cykel, och används allt mer vid all bakteriologisk diagnostik. Andra fördelar med realtids-PCR är att analysen ger ett resultat utan gelelektrofores vilket ger ett snabbare analys svar. Singel-PCR detekterar en specifik patogen åt gången medan en multiplex-PCR använder multipla primers varpå flera patogener kan detekteras simultant (Quinn et al, 2005). Fördelarna med en multiplex PCR jämfört med enskild PCR-analys är dess förmåga att på endast några timmar detektera flera patogener samtidigt (Gillespie & Oliver, 2005). Gillespie & Oliver (2005), beskriver att de i sin studie av multiplex-PCR visade att denna hade något lägre sensitivitet för varje individuell patogen jämfört med en individuell PCR. För att nå samma detektionsnivå behövdes ett extra anrikningssteg.

Kända för- och nackdelar

Flera publicerade studier visar att PCR-analys skulle kunna vara ett komplement till eller eventuellt kunna ersätta konventionell odling vid mastit hos mjölkkor (Riffon et al, 2001; Phuektes et al 2003; Gillespie & Oliver, 2005; Koskinen et al, 2009; Taponen et al, 2009). Koskinen et al (2009) visade t ex att PCR-analysens sensitivitet och specificitet var 100 % vid identifiering av ett stort antal bakterieisolat isolerade från bovin mastit. Detektion av *blaZ*-genen med PCR visade även den på 100 % specificitet och sensitivitet (Koskinen et al, 2009). När Pitkälä et al (2007) jämförde olika tester för detektion av beta-laktamasproduktion hos stafylokocker, var en PCR-metod (PathoproofTM Mastitis PCR assay) en av de metoder som utvärderades med positiva resultat.

Fördelar med PCR-metodik för detektion av bakterier är dess förmåga att detektera väldigt små mängder DNA, dess precision, höga sensitivitet samt specificitet (PathoProof, 2009). Ytterligare några kända fördelar är den korta analys tiden (3-4 timmar) vilket kan innebära snabbare insättning av rätt behandling. Andra fördelar är möjligheten att detektera avdödade bakterier samt bakterier som har en hämmad tillväxt vid konventionell odling. Dessutom blir PCR-resultaten desamma oavsett vem som läser av analysen till skillnad från vid odling där personlig erfarenhet har stor betydelse för bedömning av växt. Då PCR-analysen identifierar specifika baspar i en bakteries DNA-kedja kan den skilja mellan små variationer i genomet på bakterier som annars är svåra att differentiera med hjälp av konventionell odling (Riffon et al, 2001).

Med PCR är det också möjligt att detektera bakterier i bronopolkonserverad mjölk, vilket möjliggör att prover kan skickas utan kylning utan risk för tillväxt av blandflora. Mjölksprov som konserveras direkt efter provtagning representerar det sanna bakterieinnehållet, oberoende av hur provet förvaras och transporteras innan analys. Bronopol är ett bevisat effektivt konserveringsmedel som undviker att patogener i provet växer till under felaktiga transportförhållanden. Dessutom kan bakteriellt DNA detekteras även om djuret blivit antibiotikabehandlat (PathoProof, 2009).

Resultaten tyder vidare på att PCR-analys kan minska risken för falskt negativa resultat. Taponen et al (2009) visade att PCR-analys kunde detektera bakterier i nästan hälften av alla prover från klinisk mastit som svarats ut med negativ växt vid odling. Bakterienivåerna i dessa prover var inte speciellt låga, vilket talar emot hypotesen att det växer dåligt på en agarplatta för att det finns för lite bakterier i provet.

PCR-analys av tankmjölksprover kan vara ett billigt och mindre arbetskrävande alternativ vid screening av en besättning (Phuektes et al, 2003). Vid konventionell odling av tankmjölk är risken mycket stor för kontamination av omgivningsbakterier och att hitta en speciell patogen i en riklig blandflora är svårt. PCR-analys av tankmjölk kan användas för att få status på besättningen, t ex nyinfektion av *Streptococcus agalactiae* pga inköp av djur i en tidigare fri besättning (Phuektes et al, 2003).

Möjligheten att en PCR-analys helt skulle kunna ersätta konventionell odling anses dock begränsad då antalet agens som kan ge upphov till mastit är väldigt många och genetiskt lika (Koskinen et al, 2009). Dessutom finns PCR-hämmande substanser i mastitmjölk som ytterligare ökar kraven på analysens kvalitet. För att kunna använda PCR på mastitmjölk måste därför bland annat väl utarbetade extraktionsreagenser inkluderas i analysen (Koskinen et al, 2009). Enligt Gillespie & Oliver (2005) är dock kunskapen om PCR-hämmande substanser i mjölken fortfarande begränsad. I deras studie blev två prover innehållande *Staphylococcus aureus* upprepat negativa med multiplex PCR vilket pekar på att PCR-inhibitorer fanns i ursprungsprovet. I mjölk anses Ca^{2+} , proteinaser, fett och mjölkproteiner blockera DNA och hindra polymeraset från att binda och därmed hämma PCR-reaktionen (Wilson et al, 1997).

En annan nackdel med PCR är att det inte är möjligt att gå vidare med annan diagnostik, såsom full resistensundersökning, eftersom detta kräver att man har en levande bakteriekultur (Gillespie & Oliver, 2005). Av samma skäl kan inte heller bakterieisolatet enkelt sparas för eventuella senare analyser.

Flera av tidigare nämnda patogener vilka PCR-analysen kan påvisa är miljöbundna och kan därför förekomma i provet till följd av en kontamination. I provsvaret anges alla påträffade bakterier oavsett hur många och i vilken mängd. Detta innebär en risk för falskt positiva svar, dvs påträffande av patogener i provet som egentligen inte är orsaken till inflammationen. I enlighet med tidigare nämnda rekommendationer från NMC bör prover där 3 eller fler patogener detekterats bedömas som blandflora och nytt prov bör tas.

Eftersom PCR-metoden även kan detektera DNA från avdödade bakterier finns möjligheten att man kan få ett falskt positivt prov i de fall patogenen redan avdödats av immunförsvaret vilket skulle kunna leda till överanvändning av antibiotika.

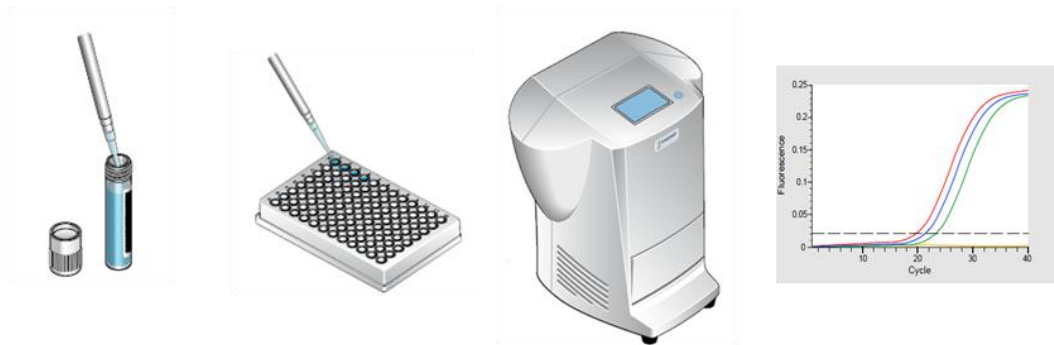
Kostnaderna för PCR är högre än för konventionell odling på grund av högre kostnader för reagenser och apparatur. Den ökade kostnaden måste beaktas utifrån de fördelar som metoden innebär innan den tas i bruk inom rutindiagnostiken (Koskinen et al, 2009).

PathoProof™ Mastitis PCR assay

PCR-analysen PathoProof™ Mastitis PCR är utvecklad för både kliniska och subkliniska mastiter och kan utföras direkt från färsk alternativt bronopolkonserverad mjölk. Metoden kan detektera de 11 vanligaste mastitbakterierna samt genen för beta-laktamas-produktion, *blaZ*. Bakterierna som kan detekteras med metoden är *Staphylococcus aureus*, koagulasnegativa stafylokocker (KNS), *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp., *Klebsiella* spp., *Corynebacterium bovis*, *Serratia marcescens*, *Arcanobacterium pyogenes* och *Peptoniphilus indolicus*. Dessa patogener stämmer väl överens med de vanligast förekommande patogenerna vid kliniska samt subkliniska mastiter i Sverige, med några undantag (Tabell 2).

Metoden består av ett antal olika steg (Figur 1). Först görs en DNA-extraktion vilken kan delas in i fyra steg nämligen enzymatiskt lysering av de somatiska cellerna, centrifugering av provet för att separera de bakteriella cellerna från PCR-hämmande substanser i mjölken, en andra enzymatiskt lysering vilken förstör cellväggen hos både gramnegativa och grampositiva bakterier och slutligen en magnetbaserad rening följt av spädning av extraherat DNA. Därefter blandas extraherat bakteriellt DNA med en reagensblandning, Master Mix, innehållande deoxynukleosidtrifosfater, DNA-polymeras samt en buffert. Blandningen fördelas i fyra brunnar i en 96-hålsplatta. För varje prov körs alltså fyra reaktioner vilka vardera identifierar tre olika mål. Därefter tillsätts specifika primers till respektive prov. Innan proverna är redo att analyseras kompletteras 96-hålsplattan med negativa kontroller.

Resultaten för de fyra olika reaktionerna kombineras i det slutliga svaret med hjälp av specifik mjukvara. Metoden ger information både om patogenen finns närvarande i provet och i så fall i hur stor mängd, dvs både kvalitativt och kvantitativt. Den kvantitativa informationen baseras på förhållandet mellan mängden DNA i provet innan PCR och mängden PCR-produkt som bildats under analysen. De olika DNA-målen detekteras med hjälp av fluorescerande molekyler som signalerar olika starkt beroende på mängden produkt. Vid tolkning av analysen används ett Ct-värde, vilket representerar antalet cykler som behövdes för att nå ett visst tröskelvärde på fluorescenssignalen. Ju lägre Ct-värde desto färre cykler krävdes för att nå en detekterbar fluorescenssignal, alltså fanns det mer DNA i ursprungsprovet initialt i provet (PathoProof™, 2009).



Figur 1. Arbetsgången för Pathoproof Mastitis PCR Assay. Initialt extraheras bakteriellt DNA vilket senare mixas med de olika reagenserna och pipetteras ut i en 96-hålsplatta tillsammans med positiv och negativ kontroll. Analysen startar och ett resultat redovisas efter 3-4 timmar. (Efter Instruktionsmanual version 2.1 aug 2009, Finnzymes Diagnostic)

SYFTE

Syftet med examensarbetet var att undersöka för- och nackdelar med PCR vid bakteriologisk diagnostik av mastit hos mjölkkor jämfört med konventionell odlingsteknik utifrån fältveterinärens perspektiv. Som en del av detta arbete gjordes en jämförande undersökning av ett antal mjölkprover från friska kor och från kor med klinisk eller subklinisk mastit.

MATERIAL OCH METODER

Insamlande av prover och provhantering

Mjölkprover som inkom till Mastitlaboratoriet, SVA, för rutindiagnostik under våren/sommaren 2009 sparades i frys (-21 °C) efter ordinarie odling och typning. Av insamlade prover valdes 133 stycken ut till studien varav 85 stycken härstammade från juverdelssprover och 48 prover från samlingsprov från alla fyra juverdelar per ko.

Bland utvalda juverdelssprover ingick prov från friska juverdelar (CMT 1) och juverdelar med klinisk eller subklinisk (CMT >1) mastit. Inom varje grupp valdes om möjligt prover med varierande bakteriefynd vid ursprungsodlingen dvs ingen växt (0), växt av blandflora, växt av vanlig juverpatogen i renkultur och växt av vanlig juverpatogen i blandflora. Både prover med penicillinasproducerande och

ej penicillinasproducerande stafylokocker valdes ut. Inom varje kategori med växt av juverpatogen valdes prover med sparsam, måttlig och riklig växt om möjligt.

Samlingsmjölkproverna kom från två olika gårdar där alla kor i besättningen provtagits för detektion av *Streptococcus agalactiae*. Från Gård A ingick 19 prover och från gård B 29 prover. Inom vardera besättningen valdes prover där ingen växt, växt av blandflora eller växt av *Streptococcus agalactiae* identifierats vid rutinodlingen.

De prover som ingick i studien numrerades slumpvis 1-85 för juverdelsprover och 86-133 för samlingsproverna för att ingen skulle veta vad som växte i proverna vid ursprungsodlingen. Information om provets ursprung dvs frisk juverdel, juverdel med klinisk eller subklinisk mastit samt samlingsprov behölls dock liksom CMT-värde när det fanns angivet. Anledningen till att odlingssvaren från ordinarie rutindiagnostik inte användes var för att minimera frysningens eventuella effekt på provsvaret och göra proverna analyserade med konventionell odling och PCR-teknik så lika som möjligt.

Mjölkrören tinades upp i rumstemperatur enligt nummerordning 1-133. Efter noggrann blandning av mjölkprovet gjordes konventionell odling. Därefter överfördes 1 ml mjölk till ett nytt provrör och bronopol, motsvarande 2 µl per ml mjölk, tillsattes för konservering varpå provet blandades noga. Proverna skickades med bud över natt till Finnzymes Diagnostics (Espoo, Finland) för PCR-analys.

Konventionell odling

Från varje mjölkprov odlades 10 µl ut på blodagar med 5 % esculin varpå plattorna inkuberades i 37°C i totalt 48 timmar enligt ordinarie rutindiagnostik på Mastitlaboratoriet, SVA. Plattorna avlästes efter 24 och 48 timmar. Typning till speciesnivå utfördes enligt rutinen på laboratoriet med användande av selektiva agarplattor samt utvalda biokemiska tester (Ericsson Unnerstad et al, 2009).

Avläsningen av bakterieodlingarna utfördes utan vetskap om PCR-svaret eller den ursprungliga odlingen. Prover med växt av ≤ 3 kolonier bedömdes som ingen växt med undantag vid växt av *Staphylococcus aureus* eller *Streptococcus agalactiae* då provet bedömdes som positivt vid växt av minst 1 koloni. Vid växt av 3 eller flera bakterieagens bedömdes det som blandflora, med samma undantag som ovan. Dessutom uppmärksammades de fall då en misstänkt juverpatogen ansvarade för en majoritet av växten i blandfloran. Dessa kolonier analyserades vidare och svarades ut som växt av patogen i blandflora. Grad av växt (sparsam ≤ 10 kolonier, måttlig = 10-50 kolonier, riklig ≥ 50 kolonier) registrerades också.

Undersökning av penicillinasproduktion med hjälp av den så kallade klöverbladsmetoden utfördes enligt rutin endast när specifik infektion med stafylokocker diagnosticerades (Bryan & Godfrey, 1991).

PCR-analys

Mjölkproverna analyserades med hjälp av PathoProofTM Mastitis PCR assay (Finnzymes Oy, Espoo, Finland) inom 48 timmar efter att de anlönt till

laboratoriet. Provsvarerna skickades elektroniskt i en datafil. I provsvaret angavs alla detekterade agens och kvantiteten av varje påvisad patogen angavs med +, ++ eller +++, ju fler plus desto mer bakterie-DNA i provet. Kvantiteten av betalaktamasgenen angavs på samma sätt när den detekterades. I de fall där en specifik patogen stod för >90 % av det totala innehållet av bakterie-DNA i provet angavs detta som >90 % eller >99 % beroende på grad av dominans. Prover där inga patogener påvisades angavs som negativa.

I PCR-analysen analyseras både förekomst av *Staphylococcus* spp (dvs någon typ av stafylokock) och förekomst av *Staphylococcus aureus*. När provet var positivt för *Staphylococcus* spp men inte för *Staphylococcus aureus* tolkades svaret som positivt för KNS. Om provet var positivt för både *Staphylococcus* spp och *Staphylococcus aureus*, och Ct-värdet för båda målen skiljde mindre än 3 cykler (vilket innebär mindre än 10 gångers skillnad i mängd) tolkades provet som positivt för enbart *Staphylococcus aureus*. Var Ct-värdet istället mer än 3 cykler högre för *Staphylococcus* spp än för *Staphylococcus aureus* ansågs provet positivt för båda målen, dvs både KNS och *Staphylococcus aureus* (Holopainen, 2009).

Databearbetning

Resultaten för juverdelsproverna från den konventionella odlingen delades upp i antal positiva respektive negativa prover. De positiva proverna delades in i fyra underkategorier; fynd av patogen i renkultur, patogen i blandflora, 2 olika patogener samt blandflora (Tabell 3). Även PCR-resultaten för juverdelsproverna delades upp i antal positiva respektive negativa prover. De positiva proverna fördelades sedan efter hur många patogener som detekterades, 1, 2 eller ≥ 3 stycken. För de sista två kategorierna beräknades hur stor del av det totala antalet prover i vardera kategori som utgjordes av ett bakteriefynd som stod för >90-99 % av innehållet (Tabell 4).

Dessutom sammanställdes PCR-resultaten där odlingen resulterat i blandflora respektive 0-växt och fördelades i tre grupper beroende på fynd av >90-99 % eller 1 patogen, övrig växt eller negativt prov (Tabell 5). De prover som odlingen detekterat som patogen i renkultur eller patogen i blandflora analyserades utifrån vilket PCR-svar som angetts varpå 6 undergrupper utformades (Tabell 6 & 7). Gruppernas indelning utformades för att klargöra om PCR-analysen detekterat odlingsfyndet och i så fall i vilken utsträckning.

För juverdelsproverna jämfördes även resultaten från den konventionella odlingen och PCR-analysen avseende andel prov positiva för *Streptococcus agalactiae* och *Staphylococcus aureus*, andel prover med penicillinasproduktion samt andel negativa prover. För samlingsproverna jämfördes endast resultaten från odling och PCR avseende andel prover positiva för *Streptococcus agalactiae*.

RESULTAT

Juverdelsprover - Allmän beskrivning av odlings- och PCR-resultat

I Tabell 3 redovisas resultaten från den konventionella odlingen fördelat mellan antalet positiva respektive negativa prover. I majoriteten av proverna återfanns bakterieväxt och specifik infektion detekterades i 79 % av dessa prover (65 % av alla juverdelsprov). Detekterade agens (antal positiva prov) var *Staphylococcus aureus* (16), KNS (9), *Streptococcus dysgalactiae* (7), *Streptococcus uberis* (7), *Escherichia coli* (4), *Streptococcus agalactiae* (4), *Arcanobacterium pyogenes* (3), *Klebsiella* spp (3), *Enterococcus* spp (2) samt *Serratia* spp (2).

Tabell 3. Resultat från konventionell bakteriologisk odling av 85 juverdelsprov

	Odlingsresultat	
	Antal	%
Negativa prov	15 st	17,6 %
Positiva prov	70 st	82,4 %
- Patogen i renkultur	41 st	58,6 % ^a
- Patogen i blandflora	12 st	17,1 % ^a
- 2 olika patogener	2 st	2,9 % ^a
- Blandflora	15 st	21,4 % ^a

^a Anger procent av totalt antal positiva prov

I Tabell 4 redovisas motsvarande fynd gjorda vid PCR-analysen. I 93 % av proverna återfanns bakterier i varierande mängd. Antalet bakterieagens isolerade per prov med PCR varierade mellan 1-6. Medelvärde för alla positiva prover var 2,4 agens/prov. Detekterade agens (antal positiva prov) var KNS (45), *Streptococcus uberis* (32), *Corynebacterium bovis* (25), *Streptococcus dysgalactiae* (22), *Arcanobacterium pyogenes* el *Peptoniphilus indolicus* (15), *Staphylococcus aureus* (15), *Escherichia coli* (11), *Streptococcus agalactiae* (11), *Enterococcus* spp (10) samt *Klebsiella* spp (2).

I 90 % av positiva PCR-prover (84 % av alla juverdelsprov) detekterades specifik patogen antingen som 1 patogen, 2 patogener eller med >90-99 % dominans. I dessa prover påvisades följande agens (antal positiva prov); KNS (24), *Streptococcus uberis* (10), *Staphylococcus aureus* (8), *Streptococcus dysgalactiae* (8), *Arcanobacterium pyogenes* el *Peptoniphilus indolicus* (7), *Corynebacterium bovis* (5), *Streptococcus agalactiae* (5), *Enterococcus* spp (4), *Escherichia coli* (4) samt *Klebsiella* spp (2).

Tabell 4. Resultat från PCR-analys av 85 juverdelstest

	Resultat från PCR-analys	
	Antal prover	%
Negativa prov	6 st	7,1 %
Positiva prov	79 st	92,9 %
- En patogen	20 st	25,3 % ^a
- 2 patogener	27 st	34,2 % ^a
- >90-99 % ^d	21 st	77,8 % ^b
- Övriga	6 st	22,2 % ^b
- ≥ 3 patogener	32 st	40,5 % ^a
- >90-99 % ^d	24 st	75,0 % ^c
- Övriga	8 st	25,0 % ^c

^a Anger procent av totalt antal positiva prov

^b Anger procent av ”2 patogener”

^c Anger procent av ”≥ 3 patogener”

^d En patogen i provet står för >90–99 % av totala bakteriemängden

Juverdelstest – Jämförelser mellan odling och PCR

Allmän jämförelse

I Tabell 5-7 redovisas resultaten från PCR-undersökningen för prov som bedömdes ha 0-växt, blandflora, patogen i renkultur respektive patogen i blandflora vid den konventionella odlingen. I Tabell 5 kan utläsas att PCR-analysen fann en patogen eller en dominerande patogen i 73,3 % av prover med blandflora och 60 % av prover med 0 växt. En tredjedel av proverna med 0-växt var negativa även vid PCR-analys.

Bland de 20 prover där PCR-fyndet var >90-99 % eller 1 patogen detekterades följande agens (antal positiva prov); KNS (8), *Corynebacterium bovis* (4), *Enterococcus* spp (2), *Arcanobacterium pyogenes* el *Peptoniphilus indolicus* (1), *Escherichia coli* (1), *Staphylococcus aureus* (1), *Streptococcus agalactiae* (1), *Streptococcus dysgalactiae* (1) samt *Streptococcus uberis* (1).

Tabell 5. Fynd vid PCR-analys av prover som vid konventionell odling var negativa (0-växt) eller bedömdes som blandflora

Fynd vid PCR-analys	Odlings svar			
	Blandflora (15 prover)		0-växt (15 prover)	
	Antal	Procent	Antal	Procent
>90-99 % el 1 patogen	11	73,3 %	9	60,0 %
Övrig växt	4	26,7 %	1	6,7 %
Negativt	0	0 %	5	33,3 %

Av totalt 85 juverdelssprover fick 41 st diagnosen patogen i renkultur vid den konventionella odlingen. Av dessa detekterades samma patogen vid PCR-analys i 85,4 % av fallen (Tabell 6) men inte alltid som huvudfynd eller som enda fynd. I 14,6 % av proverna detekteras inte fyndet vid odling med PCR-analysen.

Tabell 6. Fynd vid PCR-analys av prover där växt av patogen i renkultur detekterats vid konventionell odling .

Fynd vid PCR-analys	Odlingssvar	
	Patogen i renkultur (41 prover)	
	Antal	Procent
Detekterad som huvudfynd el som enda svar	30	73,2 %
Detekterad, men annat huvudfynd	2	4,9 %
Ej detekterad, annat huvudfynd	2	4,9 %
Detekterad, annan växt/blandflora	3	7,3 %
Ej detekterad, annan växt/blandflora	3	7,3 %
Negativt	1	2,4 %

Vid den konventionella odlingen fick 12 prover diagnosen patogen i blandflora (Tabell 7). Av dessa detekterades samma patogen i PCR-analysen i 66,7 % av fallen, dock inte alltid som huvudfynd eller som enda svar. I 33,3 % av proverna detekterades inte odlingsfyndet alls vid PCR.

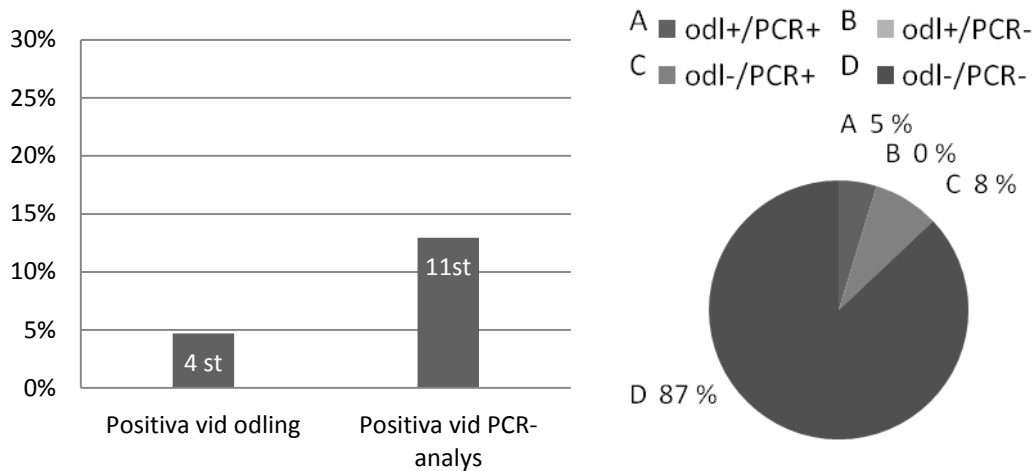
Tabell 7. Fynd vid PCR-analys av prover där växt av patogen i blandflora detekterats vid konventionell odling

Fynd vid PCR-analys	Odlingssvar	
	Patogen i blandflora (12 prover)	
	Antal	Procent
Detekterad som huvudfynd el som enda svar	7	58,3 %
Detekterad, men annat huvudfynd	0	0 %
Ej detekterad, annat huvudfynd	2	16,7 %
Detekterad, annan växt/blandflora	1	8,3 %
Ej detekterad, annan växt/blandflora	2	16,7 %
Negativt	0	0 %

Utvalda analyser

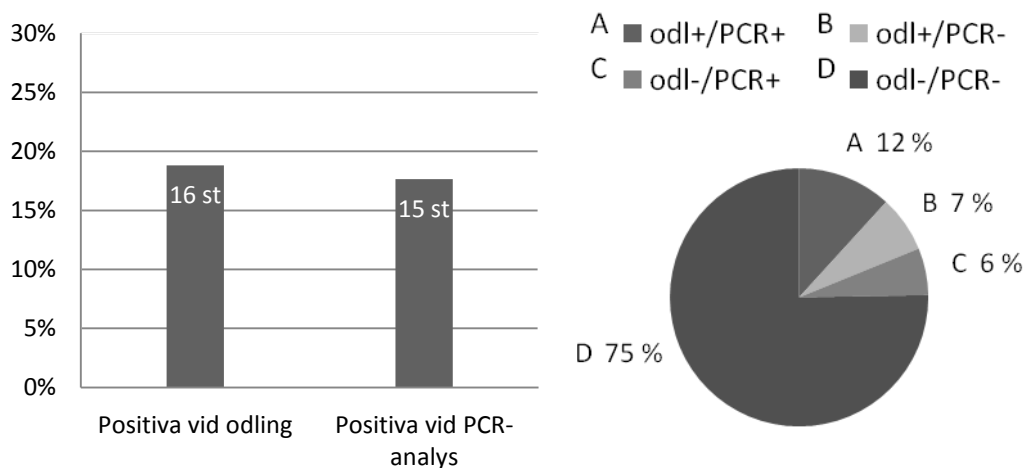
Jämförelser mellan konventionell odling och PCR-analys gjordes även avseende andel juverdelssprov med fynd av *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, penicillinasproduktion eller ingen växt/negativt prov.

PCR-metoden detekterade fler prover med *Streptococcus agalactiae* än konventionell odling (Figur 2). I cirkeldiagrammet kan utläsas att majoriteten av proverna var negativa vid både odling och PCR. Inga prover var positiva vid odling och negativa vid PCR.



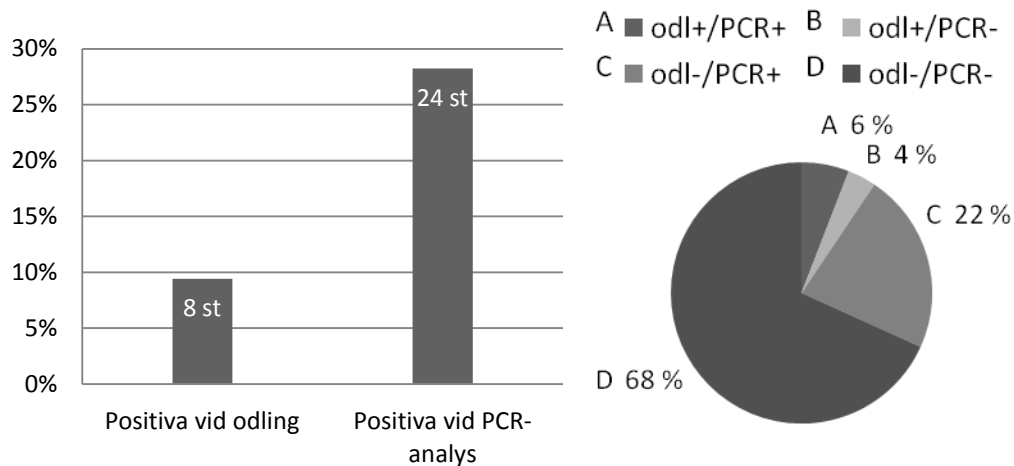
Figur 2. Detektion av *Streptococcus agalactiae* med konventionell odling och PCR i 85 juverdelssprover.

I Figur 3 redovisas samma resultat för *Staphylococcus aureus*. Ungefär lika många prover (16 vs 15) var positiva med odling som med PCR. Sex prov (7 %) av proverna var positiva vid odling men negativa vid PCR. Fyra av dessa prov var PCR-positiva för *Staphylococcus* spp och svarades därmed ut som KNS. Vid odlingen var kolonierna i 3 av dessa 4 prover både alfa- och betahemolyserande vid Camp-test, medan kolonierna i det fjärde var alfa-hemolyserande och koagulaspositiva. Övriga två prover visade annat fynd än stafylokocker vid PCR, men var både alfa och beta-hemolyserande. Sex % av proverna var positiva med PCR-metoden men negativa vid konventionell odling.



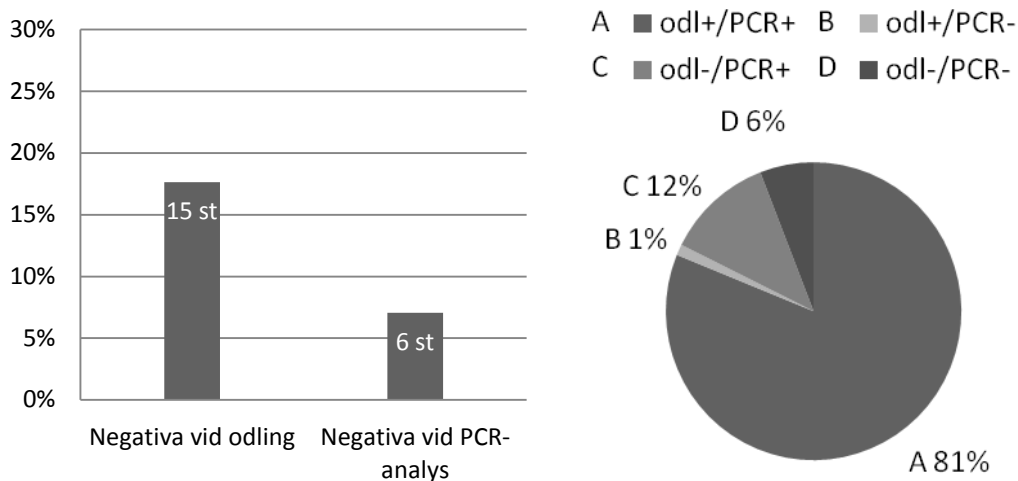
Figur 3. Detektion av *Staphylococcus aureus* med konventionell odling och PCR i 85 juverdelssprover.

Andel prover med pencillinasproduktion (konventionell odling) respektive förekomst av *blaZ* gen (PCR) presenteras i Figur 4. Antalet positiva prover var tre gånger högre med PCR-metoden än vid odling. Det bör dock påpekas att vid konventionell odling gjordes test av penicillinasproduktion endast vid växt av stafylokocker. I 4 % av proverna registrerades penicillinasproduktion vid odling men inte vid PCR-analys.



Figur 4. Antalet prover med penicillinasproduktion detekterade vid konventionell odling respektive PCR-analys i 85 juverdelsprover.

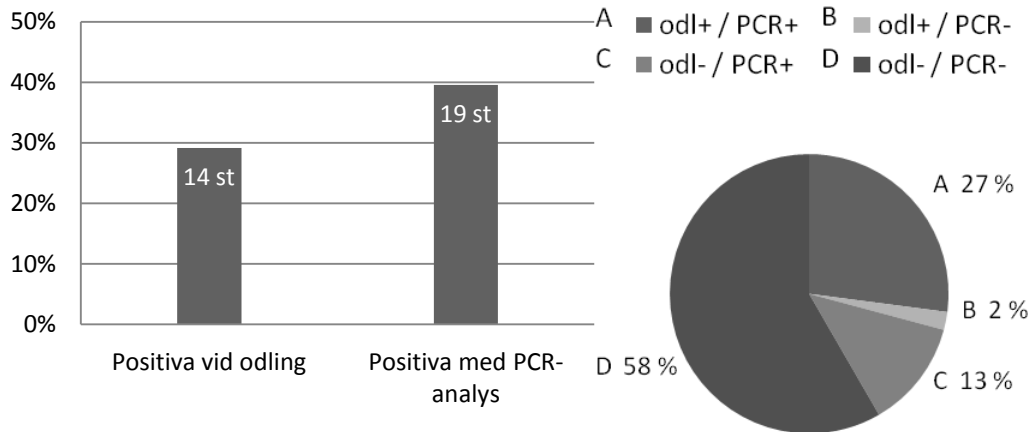
En mer detaljerad analys gjordes även av andelen negativa prov (Figur 5). Resultaten visar att ca 1,5 gånger fler prover bedömdes vara negativa vid konventionell odling än vid PCR. Ett prov var positivt vid odling men negativt vid PCR.



Figur 5. Förekomst av negativa (ingen växt) prover vid konventionell odling och PCR-analys av 85 juverdelsprover.

Samplingsprover - *Streptococcus agalactiae*-screening

Totalt analyserades 48 samlingsprover och av dessa var 14 positiva för *Streptococcus agalactiae* vid odling medan 19 prover var positiva vid PCR-analys dvs 36 % fler prover var positiva vid PCR-analys (Figur 6). Ett prov var positivt vid odling men inte med PCR.



Figur 6. Resultatet av jämförelsen mellan konventionell odling och PCR vid *Streptococcus agalactiae*-screening av 48 samlingsmjölkprov.

DISKUSSION

Resultaten från undersökningen visade på flera skillnader mellan PCR-analysen och den konventionella odlingen. I de flesta av dessa fall registrerades bakteriefynd vid PCR men inte vid odling, men det fanns även prover där bakterieagens detekterades vid odling men inte vid PCR.

En anledning till att bakteriefynd registreras med PCR men inte med odling är att PCR-metoden kan detektera lägre bakteriekoncentrationer i mjölkprovet. PCR kan också detektera avdödade bakterier samt bakterier som har en hämmad tillväxt vid konventionell odling. I det undersökta materialet hade mjölkproverna varit frysta innan analyserna gjordes vilket kan ha resulterat i ökad avdödning av vissa bakterier.

De fall där odlingen blev positiv men inte PCR-analysen kan bero på att odlingssvaret var felaktigt. Det händer från och till att även ackrediterade laboratorier i enstaka fall svarar fel (Pitkälä et al, 2005). Mjölken kan även innehålla PCR-hämmande substanser (Wilson et al, 1997; Koskinen et al, 2009). Extraktionsprotokoll av olika slag bör dock hindra att detta påverkar resultaten (Pathoproof, 2009). Ett tredje skäl är att provet innehöll ett bakterieagens som inte kan detekteras med PCR-analysen.

Jämförelse mellan PCR-fynd och odlings svar

Allmänna fynd

PCR-analysen hittade totalt fler prov med specifik infektion eftersom patogener detekterades i prov som bedömdes som negativa eller blandflora vid odlingen. Resultaten överensstämmer med en tidigare studie (Taponen et al, 2009) där mjölkprov från kliniska mastiter som resulterat i negativ växt undersöktes med PCR. Att fler patogener diagnosticeras kan vara en fördel då det kan leda till identifiering av fler infekterade djur och förhoppningsvis minskad smittspridning i en besättning. Eftersom PCR-tekniken detekterar mycket små mängder och även avdödade bakterier (t ex i fall där immunförsvaret redan tagit död på infektionen) finns det dock en risk att resultatet är falskt positivt. Detta skulle t ex kunna leda till ökad användning av antibiotika. I denna undersökning återfanns ffa omgivningsbakterier i de prover som bedömdes ha specifik infektion med PCR men var negativa eller innehöll blandflora vid odling. Detta kan tyda på att detekterade bakterieagens härrör från en kontamination av provet snarare än från en juverinfektion. Detta gäller speciellt de fall där fler än ett agens detekterades i samma prov.

Generellt sett hittade PCR-analysen många bakteriespecies per prov. Vid växt av flera species samtidigt måste provsvaret tolkas med försiktighet eftersom det är stor risk att ett sådant prov har blivit kontaminerat. Om tre eller flera agens detekteras i samma prov bör dessa prov bedömas som blandflora dvs samma rutin som vid odling. I vissa fall anges dock i PCR-svaret att en patogen står för >90-99 % av bakterieinnehållet vilket kan vara en indikation att denna patogen har större betydelse. I likhet med detta bedöms vissa odlingsprover som patogen i blandflora. I denna undersökning var dock majoriteten av de agens som detekterades ha >90-99 % av bakterieväxten vid PCR omgivningsbakterier vilket skulle kunna tyda på kontamination.

Eftersom flera av de bakterieagens som detekteras med PCR är omgivningsbakterier ökar kraven på sterilitet vid provtagning. I och med den ökade känsligheten finns annars risk för överdiagnostik och därmed överbehandling i samband med falskt positiva svar. Detektion av agens bör alltid korreleras till kliniskt status och vid oklarheter rekommenderas omtagning av mjölkprovet.

Diagnostik av stafylokocker och penicillinasproduktion

Ett viktigt fynd som framkom i studien var att PCR-analysen i 6 prov inte hittade *Staphylococcus aureus* som odlingen påvisade. Orsaken till denna diskrepans är oklar och vidare undersökningar av dessa prover rekommenderas. Enligt rutin vid odling anges *Staphylococcus aureus* som svar för alla stafylokocker med både alfa- och betahemolys och för alla stafylokocker som är koagulaspositiva. I en tidigare studie (Capurro et al, 1999) fann man dock att en mindre andel (ca 3 %) koagulaspositiva stafylokocker var antingen *Staphylococcus hyicus* eller *Staphylococcus intermedius*. Eftersom PCR-analysen detekterade förekomst av *Staphylococcus* spp (angivet som KNS) i 4 av proverna är det troligt att den korrekta diagnosen för dessa prover var antingen *Staphylococcus hyicus* eller *Staphylococcus intermedius*.

Förekomst av KNS var ett vanligt fynd när PCR-metoden användes. Det är dock inte möjligt att ta reda på om det fanns ett eller flera KNS-species i provet. Vid konventionell odling är det möjligt att i viss mån detektera förekomst av flera KNS-species eftersom vissa species har olika koloniutseende. När flera olika KNS förekommer i samma prov blir diagnosen ofta blandflora. Diagnosen KNS måste därför tolkas med försiktighet när PCR-metoden använts.

Skillnader i förekomst av beta-laktamasproduktion mellan odling och PCR detekterades också. Flertalet av de fall där PCR-analysen var positiv men inte odlingen kan förklaras av att undersökning för penicillinasproduktion i samband med odling endast gjordes vid specifik infektion av stafylokocker medan PCR-metoden innebar en test av *blaZ*-genen i samtliga prover. Många av de PCR-positiva proverna innehöll KNS vilka ofta tolkas som blandflora vid odling. I övriga fall där resultatet skiljde är orsaken inte känd. Möjliga förklaringar är att det fanns fler än ett KNS species (vid odling väljs endast en koloni ut för undersökning) eller felbedömning av klöverbladsmetoden. Enligt tidigare undersökningar anses dock både detektion av *blaZ*-genen samt analys med klöverbladsmetoden som bra metoder för detektion av beta-laktamasproduktion (Pitkälä et al, 2007).

Tolkningen av PCR-resultatet vid detektion av *blaZ*-genen kan vara svår när genen detekteras i ett prov som är positivt för både KNS och *Staphylococcus aureus* eftersom det är svårt att avgöra vilken av stafylokockerna som är beta-laktamasproducerande. I vissa fall kan dock mängden påvisad *blaZ*-gen kopplas till rätt bakterie genom att jämföra bakteriemängden för respektive fynd.

Diagnostik av *Streptococcus agalactiae*

Ett viktigt resultat var att fler prover var positiva för *Streptococcus agalactiae* vid PCR än vid odling både vid analys av juverdels- och samlingsprover. Fyra prov (1 juverdels- och 3 samlingsprov) var dock positiva för *Streptococcus agalactiae* vid

den ursprungliga odlingen vilket tyder på att frysningen påverkat odlingsresultatet negativt. Endast ett prov var positivt vid odling men negativt vid PCR. Vid undersökning av förekomst av *Streptococcus agalactiae* i en besättning är det viktigt att identifiera så många infekterade kor som möjligt för att kunna stoppa smittspridningen i besättningen. Detta är också viktigt för att undvika försäljning/inköp av infekterade kor. Resultatet tyder på att PCR-analys kan vara ett bra komplement vid screening av hela besättningar för denna bakterie eftersom analysen är mycket känslig. Ökad detektionsfrekvens kan innebära att antalet provtagningstillfällen i besättningen kan minskas. Enligt tidigare undersökningar kan metoden även användas för undersökning av tankmjölk (Phuektes et al, 2003).

Fältveterinärens perspektiv

För att metoden ska vara användbar i fält i samband med behandling av klinisk mastit är tidsaspekten viktig. Resultatet bör finnas tillgängligt senast nästa dag för att fördelarna ska överväga den extra kostnaden. Detta kan bli svårt om inte PCR-analysen finns tillgänglig inom det närmaste området. Om proverna behöver skickas med post blir metoden ändå tidskrävande och dessutom finns risk för tillväxt under transporten. Detta problem kan dock lösas med hjälp av bronopolkonservering av provet.

I samband med andra provtagningar t ex vid subklinisk mastit, inför sinläggning eller vid försäljning är tidsaspekten inte lika viktig. I dessa fall är en korrekt bedömning av bakterieväxt och identifiering av bakteriespecies viktigare vilket innebär att dessa prov i de flesta fall bör skickas till laboratorium för analys. På laboratoriet tar PCR-analysen avsevärt kortare tid än odlingen varför fältveterinären kan få provsvaret tidigare. Resultaten tyder också på att specifik infektion kan upptäckas i fler prover om PCR används vilket är speciellt viktigt i samband med vissa besättningsutredningar rörande smittsamma juverpatogener.

En viktig skillnad idag mellan odling och PCR är att fältveterinären själv måste bedöma och tolka PCR-svaret medan odlingssvaret har bedömts och tolkats av laborieveterinär eller annan erfaren personal. PCR-svaret kan vara svårt att bedöma t ex vid förekomst av flera bakterieagens samtidigt och vid förekomst av beta-laktamasproduktion i kombination med flera stafylokocker samtidigt. Det är därför viktigt att fältveterinären har god kunskap och utbildning innan man börjar använda metoden. I annat fall finns risk för överdiagnostik vilket kan leda till onödig eller felaktig antibiotikaanvändning.

PCR-analysen detekterar de vanligaste bakteriefynderna vid mastit. Övriga mer ovanliga patogener missas lätt även av fältveterinären. Vid odling t ex på SELMA-platta kan dock en platta med oklar växt sändas till laboratorium för vidare diagnostik vid behov. Det är i dessa fall även möjligt att göra annan resistensundersökning än penicillinasundersökning. Idag görs dock sällan sådana undersökningar. Vid fall som t ex inte svarar på behandling som planerat kan alltid omprov tas för vidare undersökning.

Allmän bedömning av för- och nackdelar med PCR

Det finns både för- och nackdelar med PCR-analys i samband med mastit och vilket som överväger kan diskuteras. Ett viktigt argument mot metoden är risken att viktiga patogener missas då analysen bara detekterar 11 olika bakterieagens. Dessa agens täcker dock in de vanligast förekommande mastitbakterierna i Sverige. En annan nackdel är att det inte är möjligt att utföra andra resistensundersökningar än beta-laktamasproduktion. Sådana undersökningar utförs dock sällan idag eftersom resistensläget i Sverige är gott.

Viktiga fördelar med metoden är den snabba analys tiden jämfört med odling och förmågan att detektera låga bakteriekoncentrationer. En hög känslighet är positivt i de fall där man vill detektera bakterieagens som normalt inte bör finnas i mjölken eller besättningen t ex vid screening av förekomst av smittsamma bakteriespecies i en besättning. Resultaten tyder på att PCR-metoden är lämplig för screening avseende förekomst av *Streptococcus agalactiae* men för *Staphylococcus aureus* var resultaten mer tveksamma. Dock var provmaterialet för litet för att dra några generella slutsatser. I undersökningen analyserades enbart juverdel- eller samlingsmjölkprov. Tidigare studier tyder dock på att PCR-analys också kan vara användbar för analys av smittsamma bakterieagens i tankmjölksprover (Phuektes et al, 2003). Vid analys av tankmjölk bör man tänka på att denna endast representerar de kor som mjölkades den aktuella dagen/dagarna varför upprepad provtagning och analys är nödvändig.

Förmågan att detektera mycket låga bakterienivåer kan också innebära ett bekymmer vid tolkningen av resultatet om provet är kontaminerat. Steriliteten vid provtagning är därför extra viktig vid PCR-analys. Att bronopol kan användas som konserveringsmedel för mjölkprovet talar för PCR-metoden jämfört med konventionell laboratorieodling eftersom det finns risk för bakterietillväxt i provet under transport till laboratorium, ffa under sommarhalvåret.

KONKLUSION

Att molekylära metoder såsom PCR är på frammarsch är tydligt. Med PCR-analys detekteras relativt få bakteriespecies jämfört med det totala antalet species som kan infektera juvret. Analysen är snabb jämfört med vanlig odling och kan detektera små mängder levande och avdödade bakterier. Kostnaden är högre än konventionell odling vilket bör beaktas när nyttan med metoden utvärderas. PCR-analys har potential för framtida bruk som komplement till konventionell odling. Fler studier bör dock utföras för att säkerställa korrekthet i analysen innan metoden tas i bruk i stället för odling vid bakteriologisk rutindiagnostik av mastit.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Bengtsson, B., Ericsson Unnerstad, H., Ekman, T., Artursson, K., Nilsson-Öst, M., Persson Waller, K. (2009) *Antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of acute clinical mastitis in dairy cows*, Veterinary Microbiology 136:142-149
- Bradley, A.J. (2002) *Bovine mastitis: an evolving disease*, Veterinary Journal 164:116-128
- Bradley, A.J., Leach, K.A., Breen, J.E., Green, L.E., Green, M.J. (2007) *Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales*, Veterinary Record 160:253-258
- Bryan, L.E., Godfrey, A.J. (1991) *Beta-lactam antibiotics: mode of action and bacterial resistance*, In: Lorian, V. (ed), Antibiotics in laboratory medicine, William & Wilkins, Baltimore, USA p. 648
- Capurro, A., Concha, C., Nilsson, L., Östensson, K. (1999) *Identification of coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk*, Acta Veterinaria Scandinavica 40:315-321
- Cremonesi, P., Castiglioni, B., Malferrari, G., Biunno, I., Vimercati, C., Moroni, P., Morandi, S., Luzzana, M. (2006) *Technical note: Improved method for rapid DNA extraction of mastitis pathogens directly from milk*, Journal of Dairy Science 89:163-169
- Ericsson Unnerstad, H., Lindberg, A., Persson Waller, K., Ekman, T., Artursson, K., Nilsson-Öst, M., Bengtsson, B. (2009) *Microbial aetiology of acute clinical mastitis and agent-specific risk factors*, Veterinary Microbiology 137: 90-97
- Gillespie, B.E., Oliver, S.P. (2005) *Simultaneous detection of mastitis pathogens, Staphylococcus aureus, Streptococcus uberis and Streptococcus agalactiae by multiplex real-time polymerase chain reaction*, Journal of Dairy Science 88:3510-3518
- Haveri, M.S., Suominen, S., Rantala, L., Honkanen-Buzalski, T., Pyörälä, S. (2005) *Comparison of phenotypic and genotypic detection of penicillin G resistance of Staphylococcus aureus isolated from bovine intramammary infection*, Veterinary Microbiology 106:97-102
- Hogan, J.S. (1999) *Laboratory Handbook on Bovine Mastitis*, National Mastitis Council, Madison, WI, US
- Holopainen, J. (2009) Personligt meddelande, Finnzymes Diagnostics, Espoo, Finland
- Koivula, M., Pitkälä, A., Pyörälä, S., Mäntysaari, E.A. (2007) *Distribution of bacteria and seasonal and regional effects in a new database for mastitis pathogens in Finland*, Acta Agriculture Scandinavica Section A 57:89-96
- Koskinen, M T., Holopainen, J., Pyörälä, S., Bredbacka, P., Pitkälä, A., Barkema, W., Bexiga, R., Roberson, J., Sølverød, L., Piccini, R., Kelton, D., Lehmusto, H., Niskala, S., Salmikivi, L. (2009) *Analytical specificity and sensitivity of a real-time polymerase chain reaction assay for identification of bovine mastitis pathogens*, Journal of Dairy Science 92:952-959
- Landin, H. (2006) *Mastitbehandling i svensk mjölkproduktion*, Svensk Veterinärtidning 58: 19-25
- Lindhagen, A., Persson Waller, K. (2006) *Ovanliga juverpatogener i mjölkproduktionen*, Svensk Veterinärtidning 58:11-18
- Lowy, F.D. (2003) *Antimicrobial resistance: the example of Staphylococcus aureus*, Journal of Clinical Investigation 111:1265-1273

- Makovec, J.A., Ruegg, P.L. (2003) *Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001*, Journal of Dairy Science 86:3466-3472
- Mörk Jansson, M. (2009) *Validation of Disease Recordings in Swedish Dairy Cattle*, Acta Universitatis Agriculture Sueciae, Doctorial Thesis No 66:57-63
- PathoProof™ Mastitis PCR assay (2009) *Instruction manual*, Version 2.1 augusti 2009, Finnzymes Oy, Espoo, Finland
- Phuektes, P., Mansell, P.D., Browning, G.F. (2001) *Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of Staphylococcus aureus and Streptococcal causes of bovine mastitis*, Journal of Dairy Science 84:1140-1148
- Phuektes, P., Browning, G.F., Anderson, G., Mansell, P.D. (2003) *Multiplex polymerase chain reaction as a mastitis screening test for Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae, Streptococcus dysgalactiae and Streptococcus uberis in bulk milk samples*, Journal of Dairy Research 70:149-155
- Pitkälä, A., Gindonis, V., Wallin, H., Honkanen-Buzalski, T. (2005) *Interlaboratory proficiency testing as a tool for improving performance in laboratories diagnosing bovine mastitis*, Journal of Dairy Science 88:553-559
- Pitkälä, A., Salmikivi, L., Bredbacka, P., Myllyniemi, A-L., Koskinen, M.T. (2007) *Comparison of tests for detection of β -lactamase-producing staphylococci*, Journal of Clinical Microbiology 45:2031-2033
- Pyörälä, S. (2002) *New strategies to prevent mastitis*, Reproduction of Domestic Animals 37:211-216
- Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J., Leonard, F.C. (2005) *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*, Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK
- Riffon, R., Sayasith, K., Khalil, H., Dubreuil, P., Drolet, M., Lagacé, J. (2001) *Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR*, Journal of Clinical Microbiology 39:2584-2589
- Sandholm, M., Honkanen-Buzalski, T., Kaartinen, L., Pyörälä, S. (1995) *The Bovine Udder and Mastitis*, University of Helsinki, Faculty of Veterinary Medicine, Helsinki, Finland ISBN: 951-834-047-1
- Svensk Mjölks (2003) *Djurhälsa 2002/2003: Årlig rapport från sektionen för djurhälsa*, Eskilstuna, Sverige
- Svensk Mjölks (2008) *Redogörelse för husdjursorganisationens djurhälsovård 2007/2008*, Stockholm, Sverige
- Taponen, S., Salmikivi, L., Simojoki, H., Koskinen, M.T., Pyörälä, S. (2009) *Real-time polymerase chain reaction based identification of bacteria in milk samples from bovine clinical mastitis with no growth in conventional culturing*, Journal of Dairy Science 92:2610-2617
- Viljonen, G.J., Nel, L.H., Crowther, J.R. (2005) *Molecular Diagnostic PCR Handbook*, Springer, Dordrecht, the Netherlands
- Wilson, I.G. (1997) *Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification*, Applied and Environmental Microbiology 63:3741-3751