



Sveriges lantbruksuniversitet  
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

# Vilka metoder används för att diagnostisera subklinisk mastit hos mjölkkor och hur väl fungerar dessa?

*Lisa Gustafsson*



---

Självständigt arbete i veterinärmedicin, 15 hp

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2011:11

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Uppsala 2011

---





Sveriges lantbruksuniversitet  
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

## **Vilka metoder används för att diagnostisera subklinisk mastit hos mjölkkor och hur väl fungerar dessa?**

Diagnostic methods of subclinical mastitis and their functionality.

*Lisa Gustafsson*

**Handledare:**

Ulf Emanuelson, SLU, Institutionen för kliniska vetenskaper  
Cecilia Wolff, SLU, Institutionen för kliniska vetenskaper

**Examinator:**

Mona Fredriksson, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

**Omfattning:** 15 hp

**Kurstitel:** Självständigt arbete i veterinärmedicin

**Kurskod:** EX0700

**Program:** Veterinärprogrammet

**Nivå:** Grund, G2E

**Utgivningsort:** SLU Uppsala

**Utgivningsår:** 2011

**Omslagsbild:** Okänd fotograf

**Serienamn, delnr:** Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2011:11  
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU

**On-line publicering:** <http://epsilon.slu.se>

**Nyckelord:** mastit, diagnostik, subklinisk, celltal, N-acetyl- $\beta$ -D-glukosaminidas, NAGas, laktatdehydrogenas, LDH, realtids-PCR, specificitet, sensitivitet

**Key words:** mastitis, diagnostic, subclinical, somatic cell count, N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase, NAGase, lactate dehydrogenase, LDH, real time PCR, specificity, sensitivity

## INNEHÅLLSFÖRTECKNING

<b>Sammanfattning</b> .....	<b>1</b>
<b>Summary</b> .....	<b>2</b>
<b>Inledning</b> .....	<b>3</b>
<b>Material och metoder</b> .....	<b>3</b>
<b>Litteraturöversikt</b> .....	<b>3</b>
Mätning av celltal .....	3
California Mastitis Test.....	4
Bakteriologisk odling och PCR .....	5
Elektrisk konduktivitet.....	5
Biomolekylära metoder .....	6
LDH - laktatdehydrogenas .....	6
NAGas .....	6
Akutfasproteiner .....	6
Modell med flera parametrar.....	7
<b>Diskussion</b> .....	<b>7</b>
Vilka egenskaper är viktiga för diagnostiska metoder? .....	7
Varför skiljer sig resultaten i olika studier? .....	8
Jämförelse av specificitet och sensitivitet.....	10
<b>Litteraturförteckning</b> .....	<b>11</b>

---

## ORDLISTA

<b>Specificitet:</b>	Andel positiva kor i testet som verkligen är infekterade. Anges i %. Låg specificitet = många falska positiva resultat.
<b>Sensitivitet:</b>	Andel verkligt infekterade kor som blir positiva i testet. Anges i %. Låg sensitivitet = många falska negativa resultat.
<b>SCC:</b>	Somatic cell count, celltal
<b>CMT:</b>	California mastitis test
<b>EC:</b>	Elektrisk konduktivitet
<b>LDH:</b>	Laktatdehydrogenas
<b>NAGas:</b>	N-acetyl- $\beta$ -D-glukosaminidas

## **SAMMANFATTNING**

Mastit är ett stort problem för mjölkproducenter världen över. Mastiter ger försämrad djurvälstånd och stora ekonomiska förluster, både på grund av behandlingskostnader och minskad mjölkavkastning. Studier tyder på att det är de subkliniska mastiterna som kostar mest för bönderna, då de är vanligare än de kliniska fallen och leder till minskad mjölkproduktion. Dessa mastiter ger inga kliniska symtom eller synliga förändringar i mjölk och är därför svåra att diagnostisera. I USA är det vanligt med sintidsbehandling med antibiotika av alla kor för att minska mastitprevalensen. Detta är en ifrågasatt metod och alternativ för att hitta de kor som faktiskt behöver behandling efterfrågas. De vanligaste metoderna för att identifiera kor med subkliniska mastiter bygger på att hitta komponenter i mjölk som ökar vid inflammationer. Somatiska celler, laktatdehydrogenas, N-acetyl- $\beta$ -D-glukosaminidas och akutfasproteiner är exempel på sådana. Även mjölkens förmåga att leda elektrisk ström kan vara en indikator på juverhälsa. I två studier som tas upp i denna översikt har man använt sig av flera parametrar för att bedöma juverhälsan.

California mastitis test är en indirekt mätning av celltal i mjölken. Användningen är utbredd, men när det gäller att detektera subkliniska mastiter är specificitet och sensitivitet i genomsnitt relativt låga. Celltalsmätning med automatiska räknare ger något bättre resultat, men även här är det svårt att få bra värden då subkliniskt infekterade kor inte alltid får så pass höga celltal att de visar positivt i testet. Elektrisk konduktivitet bygger på att mjölkens joninnehåll förändras vid infektioner, men metoden är inte speciellt känslig och många infekterade kor undgår upptäckt. De nyare metoderna så som akutfasprotein-, LDH- och NAGas-mätning visar på goda resultat, men dessa är baserade på färre studier och mer forskning behövs. Metoder där man räknar in flera parametrar verkar öka chansen för att ställa rätt diagnos. För att utvärdera metoderna används oftast bakteriologi som kalibrering. Senare studier tyder dock på att realtids-PCR kan användas istället och att denna metod är både snabbare och ger bättre diagnostiska resultat.

Det är viktigt att diagnostiska metoder är enkla att använda, inte alltför kostsamma och att de har tillräckligt bra specificitet och sensitivitet för att fylla sitt syfte.

## **SUMMARY**

Mastitis is a major problem for milk producers all around the world. The clinical cases lead to reduced animal welfare and economic losses (e.g. treatment and milk loss). However, several studies point out that subclinical cases of mastitis cause even more production losses as it lowers milk production, and is much more common than clinical mastitis. In the US the use of blanket treatment is common, where all cows in a herd receive antibiotic treatment during the dry period. Alternatives to the blanket treatment are necessary because of public concerns regarding food safety and antibiotic resistance in bacteria. Several methods for identifying cows with subclinical infections exist, though their effectiveness is debated. The aim of this study was to compare different methods for diagnosing subclinical mastitis. The methods compared in the study are: somatic cell count, California mastitis test, electrical conductivity and biomolecular methods, such as lactate dehydrogenase, N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase and acute phase proteins. Two studies base their diagnoses on several parameters to maximize the probability of getting the right diagnosis.

California mastitis test is an indirect measure of the somatic cell count and is widely used. It has been evaluated countless times with varying results, but it seems like the specificity and sensitivity is not good enough for detecting subclinical infections at an early stage. With automatic cell counters the results are slightly better, but not ideal. Electrical conductivity is based on the fact that ion concentrations in milk changes with infection. The method is not very sensitive on its own, and many infected cows remain negative in the test. The biomolecular methods show promising results, but there are relatively few studies, and more research is needed. It seems like the use of more than one parameter enhance the probability of correct diagnoses. For evaluating the results, bacteriology is often used as calibration but recent studies indicate that real-time PCR is a both faster, and more reliable, method.

Important features of a diagnostic method are the ability of being applied in daily farm work, costs, and the specificity and sensitivity of the method.

## INLEDNING

Mastit är ett stort problem för mjölkproducenter runt om i världen. Kliniska mastiter behandlas med antibiotika med varierande resultat och leder till stora ekonomiska förluster samt försämrad välfärd hos korna. Dock tyder studier på att de subkliniska mastiterna, de som inte ger några kliniska symtom eller synliga förändringar i mjölken, är en ännu större kostnad för bönderna (Halasa et al., 2007; Safi et al., 2009). Subklinisk mastit leder till förhöjda celltal i mjölken och flera studier har visat att mjölkproduktionen sjunker i takt med ökande celltal (Hagnestam-Nielsen et al., 2009; Safi et al., 2009). Subkliniska mastiter riskerar även att utvecklas till kliniska mastiter (Bhutto et al., 2010). Under senare år har allt större vikt lagts vid att identifiera mastiter och dålig juverhälsa så tidigt som möjligt för att minska prevalensen, smittrisen och för att öka effektiviteten av behandling. I USA används idag en så kallad ”blanket” på många gårdar, vilket innebär att man behandlar hela besättningar med antibiotika, till exempel penicillin, under sin tiden för att minska mastitprevalensen (Sanford et al., 2006; Pantoja et al., 2009; Bhutto et al., 2010). För att undvika antibiotikabehandling av friska kor och därmed risk för resistensutveckling vill man hitta sätt att identifiera de kor som är infekterade. Målet med denna studie är att gå igenom och jämföra de mest använda metoderna för att diagnostisera subklinisk mastit hos enskilda kor samt de metoder som är under utveckling och kan komma att användas inom en inte alltför avlägsen framtid.

## MATERIAL OCH METODER

För att hitta artiklar har olika databaser använts som PubMed, Web of Science och även Google. Sökord var i början:

- (subclinical mastitis OR udder health OR intramammary infection\* OR milk quality) AND (bovine OR cow OR dairy OR cattle) AND (diagnosis OR diagnostics OR diagnos\* OR milk quality OR monitoring OR somatic cell count).

När de första artiklarna valts ut, användes istället mer specifika sökord för de olika diagnostiska metoderna så som:

- (bovine OR cow OR dairy OR milk) AND (mastitis OR udder health OR udder infections OR intramammary infections) AND california mastitis test AND specificity AND sensitivity.

Användbara artiklar fanns även i referenser och i PubMeds ”relaterade artiklar”-funktion.

## LITTERATURÖVERSIKT

### Mätning av celltal

Vid en inflammation, oavsett orsak, ökar förekomsten av vita blodkroppar i det inflammerade området. Vid juverinflammation ökar halten somatiska celler, framförallt neutrofiler, också i mjölken (Hogan et al., 1999; Pyörälä, 2003). Detta kan användas i bedömningen av juverhälsa, hos enskilda kor eller på besättningsnivå. Friska kor har celltal på cirka 50 000 celler/ml, ofta något högre tidigt i laktationen (Halasa et al., 2007; Hagnestam-Nielsen et al., 2009). Tröskelvärdet för att en ko skall diagnostiseras med subklinisk mastit utifrån celltal skiljer sig mycket i olika studier men ligger för det mesta runt 100 000-200 000 celler/ml för

att få så bra specificitet och sensitivitet som möjligt (Pyörälä, 2003; Halasa et al., 2007). Olika agens ger dock olika stor ökning av celler i mjölken vilket gör att det är mycket svårt att sätta en gräns för subklinisk infektion (Pyörälä, 2003). Pantoja et al. (2009) har utvärderat celltalsmätning (SCC) vid sinläggning för att identifiera kor som bör behandlas och kommer fram till att kor med höga celltal löper mycket högre risk för att vara infekterade och därmed riskerar att utveckla en klinisk mastit under påföljande laktation. Specificiteten i denna studie varierade mellan 66 och 93% och sensitiviteten mellan 64 och 69% beroende på olika tröskelvärden (Pantoja et al., 2009). Man kan undersöka celltal för en hel besättning, en ko, eller för enskilda spenar. I diagnostiskt syfte är det bäst att testa enskilda spenar då kon kan ha höga celltal i mjölk från en infekterad spene medan de andra är oinfekterade och det sammanlagda värdet hamnar då lägre. När man mäter celltal i tankmjölk så är det mjölkens kvalitet och den genomsnittliga juverhälsan i en besättning som kan utvärderas (Pantoja et al., 2009). Det finns automatiska system för exakt mätning av celltal, till exempel De Laval celltalsräknare som räknar somatiska cellkärnor färgade med en DNA-specifik fluorescerande färgning (De Laval). Automatiska celltalsräknare är specifika men också kostsamma, och långt ifrån alla gårdar har möjlighet att använda sig av dessa (Safi et al., 2009). Pyörälä (2003) går i sin review igenom flera studiers värden för SCC som då är runt 75-85% specificitet och runt 73-89% sensitivitet.

### **California Mastitis Test**

Denna metod togs fram redan 1957 av Schalm och Noorlander (Bhutto et al., 2010) och är en indirekt mätmetod av höga celltal (Middleton et al., 2004). California Mastitis test (CMT) används i stor utsträckning, både i Sverige och i andra delar av världen (Hogan et al., 1999; Babaei et al., 2007). Testet består av en lösning innehållande en detergent som förstör cellväggen på de celler som finns i mjölken och sedan reagerar på pH-sänkningen som orsakas av dessa cellers DNA. Beroende på DNA-mängden i mjölken så ändrar lösningen konsistens, och är alltså en indikator på celltal (Bhutto et al., 2010). Resultatet graderas i dessa studier på en skala från 0-3 beroende på hur stor konsistensförändring som sker, där 0 inte är någon förändring alls och skall motsvara celltal under 200 000 celler/ml (Hogan et al., 1999; Pyörälä, 2003; Bhutto et al., 2010). Testet skall utföras med färsk mjölk (Hogan et al., 1999). Specificitet och sensitivitet skiljer sig väldigt mycket i olika studier, i vissa fall är specificiteten så pass hög som 80-94% (Middleton et al., 2004; Safi et al., 2009) och i andra betydligt lägre, runt 50% (Sanford et al., 2006; Bhutto et al., 2010). Sensitiviteten var i en studie av Safi et al. (2009) 82% men i andra studier (Pyörälä, 2003; Middleton et al., 2004) ligger den mellan 50 och 67%. Dessa skillnader kan bland annat bero på när i laktationscykeln man testat och vilken patogen det rörde sig om (Pyörälä, 2003; Safi et al., 2009; Bhutto et al., 2010). Framförallt koagulasnegativa stafylokocker har i flera studier visat sig vara svåra att identifiera med CMT (Middleton et al., 2004; Bhutto et al., 2010). Sanford et al. (2006) föreslår att en bidragande orsak till de stora skillnaderna kan vara att personen som testar alltid måste göra en subjektiv bedömning av mjölkprovet. Att CMT är en så pass enkel och billig testmetod gör att de flesta undersökningar anser att fortsatt användning är motiverad (Pyörälä, 2003; Sanford et al., 2006).



## Bakteriologisk odling och PCR

För att definitivt kunna bevisa att en ko är drabbad av en juverinfektion bör själva patogenen kunna påvisas (Bhutto et al., 2010). Bakteriologisk odling används i stor utsträckning för att ta reda på vilket agens som orsakat en infektion (Hogan et al., 1999; Pyörälä, 2003) men det är en alltför tidskrävande och kostsam metod för att den skall vara av praktisk användning på mjölkgårdar för att urskilja infekterade kor från friska (Pyörälä, 2003; Bhutto et al., 2010). Däremot används bakteriologi i de flesta vetenskapliga studier av mastit som kalibrering. Tillsammans med celltal utgör odling en slags diagnostisk standard, de får avgöra om en ko verkligen är infekterad eller inte (Pyörälä, 2003; Bansal et al., 2005; Bhutto et al., 2010). Hogan et al. (1999) beskriver i sin *Laboratory Handbook of Bovine Mastitis* olika odlingsmetoder beroende på vilka patogener som misstänks. Bakteriologisk odling kan tyckas vara den säkraste diagnostiska metoden men i vissa fall är den ändå inte helt säker. Vid tillväxt av mer än tre olika arter anses provet oftast vara kontaminerat och får kastas bort (Hogan et al., 1999; Koskinen et al., 2010). Subkliniskt eller kroniskt infekterade kor kan ha intermitterant bakterieutskiljning i mjölken och vissa patogener är svårödlade i kultur (Pyörälä, 2003; Babaei et al., 2007). Alla mastiter är inte heller av bakteriellt ursprung utan kan ha andra orsaker (Babaei et al., 2007). Som alternativ till bakteriologi har det de senaste åren gjorts försök med Realtids-PCR för att hitta orsakande agens vid mastiter. I en studie av Koskinen et al. (2010) fann man att PCR var både snabbare (4 timmar jämfört med de 48 timmar bakteriologisk odling tar) och effektivare då metoden kunde identifiera patogener i prover som inte visade någonting vid odling. I Koskinens studie användes ett kommersiellt testkit för Realtids-PCR som kan användas direkt på färsk mjölk och som känner igen 11 olika bakteriearter och grupper. Realtids-PCR bygger på att man kvantifierar och mäter mängden DNA i mjölkprovet, för att sedan göra en uppskattning på hur mycket bakteriellt DNA som fanns i provet från början (Koskinen et al., 2010).

## Elektrisk konduktivitet

Vid mastitinfektion kommer natrium- och kloridjonkoncentrationen att öka i mjölken från den drabbade spenen på grund av förstörda cellväggar, och därmed kommer även den elektriska konduktiviteten (EC) att öka (Norberg et al., 2004). Det är möjligt att implementera mätning av konduktiviteten i automatiska mjölkningssystem, och resultatet visas då direkt på en dataskärm vilket kan underlätta övervakningen av juverhälsa (Pyörälä, 2003; Chagunda et al., 2006). Konduktiviteten kan även mätas manuellt med en elektrisk handmätare (Musser et al., 1998; Pyörälä, 2003) Enligt Norberg et al. (2004) är det en signifikant skillnad på elektrisk konduktivitet, mellan friska kor och kor med kliniska mastiter, och även mellan friska kor och de med subkliniska mastiter. Specificiteten i denna studie var hög, 92%, men sensitiviteten låg, endast en femtedel av korna med subklinisk mastit kunde identifieras med hjälp av EC. Även andra studier (Lansbergen et al., 1994; Musser et al., 1998; Pyörälä, 2003) har visat att mätning av EC ger hög specificitet men låg sensitivitet och att metoden bör kombineras med andra parametrar för att öka effektiviteten.

## **Biomolekylära metoder**

### ***LDH - laktatdehydrogenas***

LDH är ett enzym som medverkar i glykolysen och omvandlar L-laktat till pyruvat. Enzymet finns normalt sett i cytoplasman och dess aktivitet i mjölk ökar vid mastiter (Chagunda et al., 2006a). Larsen (2005) har tagit fram en metod för att mäta LDH-nivåer som bygger på att man mäter när L-laktat omvandlas till pyruvat med hjälp av fluorometri. Denna metod kräver ingen förbehandling av mjölken och då den bara tar 4-7 minuter att utföra skulle den kunna användas storskaligt (Larsen, 2005). Specificiteten för att detektera klinisk mastit via LDH var i ett test av Chagunda et al. (2006a) ca 92-99% och sensitiviteten var 73-95% (olika värden beroende på vilket tröskelvärde man använde för att ett juver skulle räknas som friskt eller infekterat). Babaei et al. (2007) har jämfört LDH-värden med CMT och vid det tröskelvärde som gav bäst resultat (>180 IU/l) var specificiteten 90% och sensitiviteten 69%.

### ***NAGas***

N-acetyl- $\beta$ -D-glukosaminidas (NAGas) är ett lysosomalt enzym som frisätts från skadat juverepitel samt från somatiska celler i mjölk. Dess aktivitet visades redan 1980 vara en god indikator på höga celltal i mjölk i en studie av Kitchen et al. I en senare studie har Urech et al. (1999) jämfört NAGas med somatisk cellräkning och kommit fram till att NAGas i vissa fall är en känsligare indikator på subklinisk mastit än SCC, speciellt i colostrum. NAGas korrelerar också bättre med proteolys än SCC, vilket är användbart då proteolysen ökar i juver med subklinisk mastit (Urech et al., 1999). Beroende på vilket tröskelvärde man använde var specificiteten för NAGas som diagnostisk metod mellan 99 och 94% och sensitiviteten 47-77% i en studie av Chagunda et al. (2006a). Då man satte ett lägre tröskelvärde för specificitet sjönk sensitiviteten och vice versa.

### ***Akutfasproteiner***

Safi et al. (2009) har undersökt möjlighet att diagnostisera subkliniska mastiter genom att använda akutfasproteinhalten i mjölk. Man har jämfört metoden med SCC och CMT samt använt sig av bakteriologisk odling för att kunna utvärdera resultaten. De akutfasproteiner som testades var Haptoglobin och Amyloid A, som i tidigare studier visats öka vid kliniska mastiter och andra infektioner (Eckersall et al., 2001; Pyörälä, 2003). I studien av Safi et al. (2009) mättes Haptoglobin och Amyloid A i mjölk med ELISA-test. Man fann att Amyloid A var den bästa indikatorn på subklinisk mastit med en specificitet på 98% och sensitivitet på 91% vid ett tröskelvärde på 16,4 mg/l. Enligt testet var både specificitet och sensitivitet bättre för Amyloid A än för SCC och CMT. För haptoglobin var specificitet 69% och sensitivitet 91% (Safi et al., 2009). Även Gerardi et al. (2009) har undersökt akutfasproteiner som indikatorer på subklinisk mastit och också i denna studie fann man att Amyloid A i mjölk är den bästa indikatorn. I en tidigare studie gjord av Eckersall et al. (2001) var specificiteten 100% och sensitiviteten 93% när det gällde att diagnostisera kliniska mastiter med hjälp av Amyloid A. Safi et al. (2009) testade också serumhalten av Haptoglobin och Amyloid A men kom fram till att dessa värden inte är lika bra som mjölkhalten för att diagnostisera mastit.

## Modell med flera parametrar

Chagunda et al. (2006b) har i en studie tagit fram en modell som skall användas för att bevakas enskilda kors juverstatus. Denna modell baseras i första hand på LDH-nivåer i mjölken, en metod som redovisats tidigare i denna översikt. Man väger också in andra parametrar som påverkar sannolikheten för mastitförekomst, men som inte påverkar LDH-halten. Dessa parametrar inkluderar (specifika för varje ko):

- Elektrisk konduktivitet (om dessa data finns tillgängliga)
- Tidigare sjukdomshistoria (både mastiter och övriga sjukdomar)
- Mjölkavkastning, mjölkflöde samt mjölkningstid
- Juverkaraktistika (lågt hängande juver, korta spenar, spenläckage etc.)
- Antal dagar efter partus
- Ras
- Laktationsnummer
- Besättningens totala hälsa

Man ger dessa faktorer olika vikt och ett värde mellan 0 och 1 räknas ut för varje enskild ko, där 0 innebär att hon med största sannolikhet är mastitfri och ju större värdet blir desto större risk för mastit. Med hjälp av parametrarna räknar programmet också ut med vilka intervall det är lämpligt att testa varje ko. Modellen testades med simulerade data, där man ansåg en ko som mastitpositiv om hon hade ett värde på 0.7 eller högre. Detta gav en specificitet på 99% och en sensitivitet på 82% när det gällde att diagnostisera kliniska mastiter (Chagunda et al., 2006b).

Ett annat försök med flera parametrar gjordes 2009 av Sun et al. som i sin modell kombinerade mätning av elektrisk konduktivitet och mjölmängden från enskilda spenar. En ökad elektrisk konduktivitet tillsammans med minskad mjölkavkastning ansågs utgöra en större risk för att kon hade mastit. Denna modell, som baseras på ett dataprogram, ett så kallat artificiellt neuralt nätverk, är anpassad för användning i ett automatiskt mjölkningssystem och gav betydligt högre sensitivitet (runt 90%) för kliniska mastiter än om man bara testade mjölken med elektrisk konduktivitet. Specificiteten i studien låg mellan 79 och 87% (Sun et al., 2009).

## DISKUSSION

### Vilka egenskaper är viktiga för diagnostiska metoder?

Ekonomi är alltid en styrande faktor när det handlar om våra produktionsdjur, så även när det gäller att hitta metoder för att diagnostisera mastit. Behovet av en snabb, enkel och effektiv metod är dock stort för att i ett så tidigt stadium som möjligt identifiera och behandla kor med mastit. I USA är antibiotikabehandling under tiden som mastitprofylax vanligt förekommande (Sanford et al., 2006; Pantoja et al., 2009). Detta är naturligtvis förkastligt ur resistensutvecklings- och livsmedelssäkerhetssynpunkt och framför allt under det senaste decenniet har forskning och allmänhetens påtryckningar gjort att allt större ansträngningar görs för att hitta andra alternativ.

En diagnostisk metod bör ha vissa egenskaper för att den skall kunna vara användbar i praktiken:

- Den skall vara så enkel som möjligt att använda och bör kunna implementeras i automatiska mjölkningssystem eller utföras av lantbrukaren själv.
- Låg kostnad. En metod som kostar mer än den eventuella mjölkförlusten på grund av subklinisk mastit är ingen intresserad av.
- Hög specificitet och hög sensitivitet. Ju känsligare en metod är, desto fler falska positiva resultat blir det och tvärtom, hög specificitet gör ofta att många positiva kor blir falskt negativa i testet. Att hitta en metod som både ger bra specificitet och sensitivitet är svårt, och vilka tröskelvärden som skall användas är en balansgång som också beror på i vilket syfte man använder testet.

I vetenskapliga studier är det givetvis viktigt att få så exakta resultat som möjligt, den diagnostik som används för att avgöra om en ko verkligen var drabbad eller inte bör vara så nära 100% som möjligt både vad gäller specificitet och sensitivitet för att kunna utvärdera nya metoder. I det dagliga lantbruket blir inte behovet av exakta resultat lika stort, men det har fortfarande stor betydelse. En låg sensitivitet leder till att många kor blir falskt negativa i testet och därmed inte erhåller behandling. På sikt kan detta leda till minskad mjölkproduktion, ökad smittspridning och det finns även en risk för att mastiten skall utvecklas till klinisk mastit och minskad välfärd för kon. En låg specificitet däremot leder till att många friska kor blir positiva i testet, och därmed behandlas. Detta leder till större kostnader för lantbrukaren i form av onödiga behandlingar, men blir även ett samhällsekonomiskt problem i form av ökad antibiotikaanvändning med ökad resistensrisk och även risk för antibiotikarester i mjölk och livsmedel. Detta gör att det bör läggas ner mycket jobb på att ta fram metoder som bedöms ge tillräckligt goda resultat, både vad gäller specificitet och sensitivitet.

### **Varför skiljer sig resultaten i olika studier?**

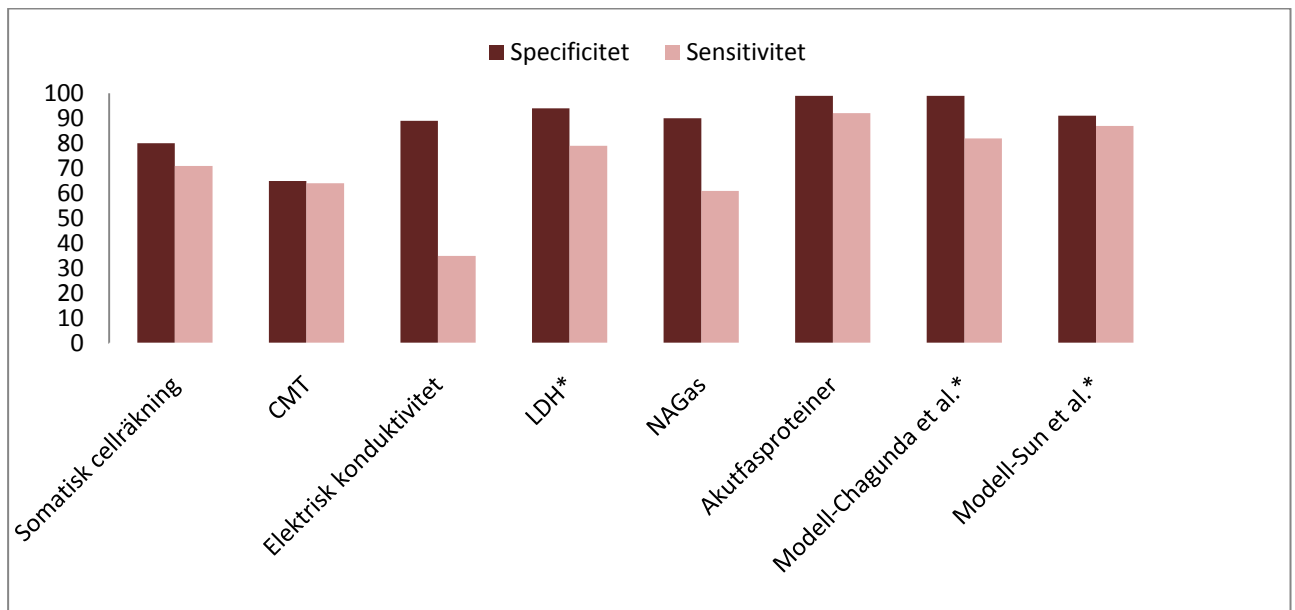
De studier i som tas upp i denna översikt har i flera fall fått väldigt varierande resultat när det gäller specificitet och sensitivitet för samma testmetod. Detta kan bero på många olika faktorer. Studierna är gjorda vid olika stadier i laktation eller under sintiden, på olika koraser, i olika länder och när det gäller CMT så måste personen som utför testet även göra en subjektiv bedömning av mjölkprovet. Även i andra fall kan den mänskliga faktorn påverka ett resultat åt endera hållet, på grund av kontaminering eller felhantering vid utförandet. Det finns ytterligare två faktorer som spelar mycket stor roll för testresultaten: Vilket agens som är orsak till mastiten och vad man jämför med när man bedömer hur väl testet fungerar.

Vilken patogen som orsakat en mastit påverkar till stor del hur bra diagnostiken fungerar. Vissa bakterier ger inte alls lika stor ökning av somatiska celler i mjölken som andra. I denna översikt har jag valt att inte gå in närmare på hur olika patogener påverkar testresultaten. Dels för att översikten då skulle blivit alltför omfattande, men också för att jag tror att det är viktigt att utveckla metoder som fungerar så bra som möjligt oavsett agens, eftersom man i en viss miljö inte kan veta vilka patogener man bör vara orolig för. Värt att nämna är dock att till exempel Bhutto et al. (2010) i sin studie av CMT och SCC visade att många kor inte fick

märkvärt ökade celltal vid infektion av koagulasnegativa stafylokocker (CNS) som är en vanlig omgivningsbakterie och som kan orsaka mastit. Även i den studie som utfördes av Middleton et al. (2004) på 278 Holsteinkor var CNS en orsak till att CMT och SCC fick låga värden på sensitivitet och specificitet. Sensitiviteten när man tog bort CNS från resultatet var över 90 på SCC och 86 på CMT. Middleton et al. (2004) föreslår att SCC skall användas i besättningar där man misstänker att det är andra bakterier än CNS som orsakar mastiter. Även andra testmetoder, som NAGas tycks vara sämre på att hitta koagulasnegativa stafylokocker (Pyörälä, 2003). Frågan är hur mycket kraft man skall lägga ner på att få bättre resultat även när det gäller dessa patogener. Just att bakterien inte ger så stor celltalsökning bör ju innebära att den heller inte påverkar mjölk kvaliteten eller juverhälsa i lika stor utsträckning som de patogener som ger ett större inflammatoriskt svar. Dessa stafylokocker finns dessutom i omgivningen så kanske är det bättre på att försöka minska bakterieförekomsten i kornas miljö generellt än att hitta och behandla subkliniska mastiter orsakade av CNS.

I de flesta undersökningar används SCC och bakteriologisk odling som referensram för att avgöra om en ko verkligen är infekterad eller inte. Dessa metoder är goda indikatorer på juverhälsan, men är inte 100 % säkra, då vissa agens, framförallt omgivningspatogener kan vara svårödlade, och i många fall inte heller ger så stor ökning av de somatiska cellerna vid subkliniska fall. Som tidigare nämnts finns även risk för att subkliniskt eller kroniskt infekterade kor kan ha intermittent bakterieutsöndring i mjölken (Babaei et al., 2007). En annan risk vid bakteriologi är kontaminering, och alla mastiter är dessutom inte bakteriella utan kan ha andra orsaker. Babaei et al. (2007) har i sin studie testat LDH-mätning som indikator på subklinisk mastit. För att avgöra om kon verkligen var infekterad eller inte så användes CMT. De resultat man får fram är alltså hur väl LDH stämmer överens med CMT och frågan är om det speglar hur bra LDH egentligen mäter subklinisk mastit. LDH kunde ju inte fått ett bättre mätvärde än CMT när CMT i detta fall innebär 100% både sensitivitet och specificitet. De studier som använt PCR som diagnostisk metod verkar lovande inför framtidens diagnostik men vissa problem med bakteriologisk odling kvarstår även vid PCR-användning, så som intermittent bakterieutsöndring. Koskinen et al. (2010) har gjort en stor studie på 1000 mjölkprov, men det är fortfarande bara en studie. Mer forskning behövs och är säkerligen på väg.

## Jämförelse av specificitet och sensitivitet



Figur 1. En jämförelse av specificitet och sensitivitet för olika diagnostiska metoder. Det redovisade värdet är ett medelvärde baserat på värden från olika studier upptagna i denna översikt.

\*Dessa värden är baserade på diagnostik av kliniska mastiter då inga specifika värden finns för subkliniska mastiter.

I figur 1 visas en sammanställning av värden på specificitet och sensitivitet för olika diagnostiska metoder utifrån de studier som finns med i denna översikt. Det är svårt att avgöra om jämförelsen ger en rättvis bild av hur bra metoderna faktiskt är. Vissa metoder som funnits länge, till exempel CMT och SCC, har utvärderats ett oändligt antal gånger, de studier som valts ut i denna översikt är förhoppningsvis ett representativt urval, men det är möjligt att siffrorna skulle sett annorlunda ut om andra artiklar använts istället. De två modellerna baserade på flera parametrar som finns med visar på mycket bra resultat men baseras ju enbart på just den egna studien. Den modell som Chagunda et al. (2006) tagit fram är dessutom enbart testad på simulerade data och det skulle vara intressant att se hur den fungerar ute i verkligheten. Också när det gäller de andra ”nyare” metoderna så är resultaten baserade på relativt få studier och även om det finns all anledning att hoppas på deras kapacitet för att detektera subkliniska mastiter så behövs mer forskning. Vissa studier har endast värden för klinisk mastit, men på grund av de tröskelvärden som används där, och metodernas uppbyggnad så är de ändå relevanta när det gäller diagnostik av subkliniska mastiter.

California mastitis test (CMT) är en billig och enkel metod som definitivt har ett värde i väntan på bättre metoders uppkomst. Testet fungerar bra som indikator på mastiter med mycket höga celltal, och för att ta reda på vilken juverdel som är infekterad hos en ko, men för att identifiera subkliniska mastiter på ett tidigt stadium är sensitivitet och specificitet inte tillräckligt bra.

Elektrisk konduktivitet (EC) kan ge viss indikation på subklinisk mastit, men då sensitiviteten är låg bör metoden användas i kombination med andra parametrar. Fördelar med EC är att metoden är billig och enkel att implementera i ett automatiskt mjölkningssystem, och den kan

vara till stor hjälp i diagnostiken, men precis som CMT så räcker den inte till för att hitta juverinflammationer på ett tidigt stadium.

De biomolekylära metoderna visar bra resultat i de studier som gjorts, men en nackdel är att det inte finns något enkelt sätt att mäta dem. Allt fler kommersiella lösningar verkar vara på väg, men det krävs fortfarande mer avancerad utrustning och kunnig personal för att kunna använda sig av dessa metoder. I takt med att allt fler mjölkgårdar moderniseras så kommer nog användningen av dessa metoder att öka.

Eftersom det är så många olika faktorer som spelar in (laktationsfas, agens etc.) när det gäller hur väl diagnostiken fungerar tror jag att modeller som mäter flera parametrar är det som fungerar bäst och det som kommer användas allt mer i framtiden. De parametrar som tas upp i undersökningen av Chagunda et al. (2006) känns relevanta, även Hagnestam-Nielsen et al., (2009) visar till exempel på att det är större risk för höga celltal ju fler laktationer en ko gått igenom, speciellt senare i laktationen. Att modellen kräver specifika data för varje ko tror jag också är positivt för att upptäcka andra sjukdomar eller missförhållanden i produktionen. För att denna och liknande metoder skall fungera bra krävs förstås att man har mjölkningssystem som tillhandahåller de data som behövs. Att se till att dessa möjligheter finns, samt att hålla en god miljö för att minska smittryck och förbättra djurvälstånd tror och hoppas jag kommer vara något som de allra flesta strävar efter i ett allt modernare lantbruk med allt mer högproducerande kor.

## LITTERATURFÖRTECKNING

- Babaei, H., Mansouri-Najand, L., Molaei, M.M., Kheradmand, A., Sharifan, M. (2007). Assessment of lactate dehydrogenase, alkaline phosphatase and aspartate aminotransferase activities in cow's milk as an indicator of subclinical mastitis. *Veterinary Research Communications*, 31, 419-425.
- Bansal, B.K., Hamann, J., Grabowski, N.T., Singh, K.B. (2005). Variation in the composition of selected milk fraction samples from healthy and mastitic quarters, and its significance for mastitis diagnosis. *Journal of Dairy Research*, 72, 144-152
- Bhutto, A.L., Murray, R.D., Woldehiwet, Z. (2010). California mastitis test scores as indicators of subclinical intramammary infections at the end of lactation in dairy cows. *Research in Veterinary Science*, doi:10.1016/j.rvsc.2010.10.006
- Chagunda, M.G.G., Larsen, T., Bjerring, M., Ingvarth, K.L. (2006a). L-lactate dehydrogenase and N-acetyl-b-D-glucosaminidase activities in bovine milk as indicators of non-specific mastitis. *Journal of Dairy Research*, 73, 431-440.
- Chagunda, M.G.G., Friggens, N.C., Rasmussen, M.D., Larsen, T. (2006b). A model for detection of individual cow mastitis based on an indicator measured in milk. *Journal of Dairy Science*. 89, 2980-2998.
- De Laval Sverige. [online] (2006-08-08). Tillgänglig: [http://www.delaval.se/Products/Milking/Cell-counter-DCC/DeLaval\\_DCC/Technical\\_data.htm](http://www.delaval.se/Products/Milking/Cell-counter-DCC/DeLaval_DCC/Technical_data.htm) [2011-02-21]
- Eckersall, P.D., Young, F.J., McComb, C., Hogarth, C.J., Safi, S., Weber, A., McDonald, T., Nolan, A.M., Fitzpatrick, J.L. (2001). Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. *Veterinary Record*, 148, 35-41.

- Gerardi, G., Bernardini, D., Azzurra Elia, C., Ferrari, V., Iob, L., Segato, S. (2009). Use of serum amyloid A and milk amyloid A in the diagnosis of subclinical mastitis in dairy cows. *Journal of Dairy Research*, 76, 411-417.
- Hagnestam-Nielsen, C., Emanuelson, U., Berglund, B., Strandberg, E. (2009). Relationship between somatic cell count and milk yield in different stages of lactation. *Journal of Dairy Science*, 92, 3124-3133.
- Halasa, T., Nielsen, M., De Roos, A.P.W., Van Hoorne, R., de Jong, G., Lam, T. J. G. M., van Werven, T., Hogeveen, H. (2009). Production loss due to new subclinical mastitis in dutch dairy cows estimated with a test-day model. *Journal of Dairy Science*, 92, 599-606.
- Hogan, J.S., González, R.N., Harmon, R.J., Nickerson, S.C., Oliver, S.P., Pankey, J.W., Smith, K.L. (1999). *Laboratory Handbook of Bovine Mastitis*. Revised edition. Walton Commons West, National Mastitis Council, Inc. Kap. 8.
- Kitchen, B.J., Middleton, G., Durward, I.G., Andrews, R.J., & Salmon, M.C. (1980). Mastitis diagnostic tests to estimate mammary gland epithelial cell damage. *Journal of Dairy Science*, 63, 978-983
- Koskinen, M.T., Wellenberg, G.J., Sampimom, O.C., Holopainen, J., Rothkamp, A., Salmikivi, L., van Haeringen, W.A., Lam, T.J.G.M., Pyörälä, S. (2010). Field comparison of real-time polymerase chain reaction and bacterial culture for identification of bovine mastitis bacteria. *Journal of Dairy Science*, 93, 5707-5715.
- Lansbergen, L.M.T.E., Nielsen, M., Lam, T.J.G.M., Pengov, A., Schukken, Y.H., Maatje, K. (1994). Evaluation of a prototype on-line electrical conductivity system for detection of subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 77, 1132-1140
- Larsen, T. (2005). Determination of lactate dehydrogenase (LDH) activity in milk by a fluorometric assay. *Journal of Dairy Research*, 72, 209-216.
- Middleton, J.R., Hardin, D., Steevens, B., Randle, R., Tyler, J.W. (2004). Use of somatic cell counts and California mastitis test result from individual quarter milk samples to detect subclinical intramammary infection in dairy cattle from a herd with a high bulk tank somatic cell count. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 224, 419-423.
- Musser, J.M., Anderson, K.L., Caballero, M., Amaya, D., Maroto-Puga, J. (1998). Evaluation of a hand-held electrical conductivity meter for detection of subclinical mastitis in cattle. *American Journal of Veterinary Research*, 59, 1087-1091.
- Norberg, E., Hogeveen, H., Korsgaard, I.R., Friggens, N.C., Sloth, K.H.M.N., Løvendahl, P. (2004). Electrical conductivity of milk: ability to predict mastitis status. *Journal of Dairy Science*, 87, 1099-1107.
- Pantoja, J.C.F., Hulland, C., Ruegg, P.L. (2009). Dynamics of somatic cell counts and intramammary infections across the dry period. *Preventive Veterinary Medicine*, 90, 43-54.
- Pyörälä, S. (2003) Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Research in Veterinary Science*, 34, 565-578.
- Safi, S., Khoshvaghti, A., Jafarzadeh, S.R., Bolourchi, M., Nowrouzian, I. (2009). Acute phase proteins in the diagnostics of bovine subclinical mastitis. *Veterinary Clinical Pathology*, 38, 471-476.



Sanford, C.J., Keefe, G.P., Sanchez, J., Dingwell, R.T., Barkema, H.W., Leslie, K.E., Dohoo, I.R. (2006). Test characteristics from latent-class models of the California mastitis test. *Preventive Veterinary Medicine*, 77, 96-108.

Sun, Z., Samarasinghe, S., Jago, J. (2010). Detection of mastitis and its stage of progression by automatic milking system using artificial neural networks. *Journal of Dairy Research*, 77, 168-165.

Urech, E., Puhan, Z., Schällibaum, M. (1999). Changes in milk protein fraction as affected by subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 82, 2402-2411.

