

# **Ultraljud som diagnostiskt hjälpmedel vid subklinisk mastit hos ko**

**Cicci Tjernström**

**Handledare: Torkel Ekman**

Inst. för Kliniska Vetenskaper

Avd. för Komparativ Reproduktion, Obstetrik och Juverhälsa

**Biträdande handledare: Renée Båge**

Inst. för Kliniska Vetenskaper

Avd. för Komparativ Reproduktion, Obstetrik och Juverhälsa

## INNEHÅLLSFÖRTECKNING

SAMMANFATTNING .....	3
SUMMARY .....	3
INLEDNING .....	4
Ultraljudet och dess funktion .....	4
Juvrets anatomi och histologi .....	5
Juvrets celler och uppbyggnad.....	7
Juvrets fysiologi .....	7
Mastit .....	8
Celltal.....	8
Vad innebär celltal?.....	8
Hur kan man mäta celltal .....	8
CMT, California Mastitis Test .....	8
Mastistrip™ .....	9
DeLaval cellräknare, DCC (Direct Cell Counter) .....	9
Mjölksprov genom Kokontrollen .....	9
Juverpatogener .....	9
Staphylococcus aureus.....	9
Koagulasnegativa stafylokocker, KNS.....	10
Streptokocker .....	10
Streptococcus agalactiae .....	10
Streptococcus dysgalactiae .....	10
Streptococcus uberis .....	10
Streptococcus zooepidemicus .....	10
Koliformer.....	11
E. coli .....	11
Klebsiella spp, K pneumoniae, K oxytoca .....	11
Juverpatogenernas påverkan på celler .....	11
GENOMFÖRANDE.....	12
RESULTAT .....	13
Individer som ingick i studien .....	13
Studiegruppen med höga celltal .....	13
Kontrollgruppen.....	17
Sammanfattning av resultat .....	19
DISKUSSION.....	20
SLUTSATS .....	21
Tack .....	22
LITTERATURFÖRTECKNING.....	23

## **SAMMANFATTNING**

För att undersöka möjligheten att använda ultraljud som hjälpmedel för att ställa diagnos vid subklinisk mastit hos kor undersöktes ett antal kor på Kungsängens gård i Uppsala med ultraljud. Kor med höga celltal och utan andra symtom valdes ut som försöksgrupp. Som kontrollgrupp valdes 4 kor med låga celltal. Försökskornas och kontrollgruppens juver ultraljundsundersöktes vid 5 respektive 3 tillfällen under en 5 veckorsperiod.

På ultraljudsbilden hos de kor som hade höga celltal sågs små, ca 1 cm i diameter, ibland konfluerande hyperekoiska foci, i närheten av spenbasen och mjölkcisternen. Förändringarna sågs dock inte på alla kor med höga celltal och bilden förändrades något över tiden. Inga hyperekoiska foci var synliga vid något tillfälle hos kontrollgruppen.

Ultraljud kan ha en framtida, kompletterande funktion inom mastitdiagnostiken men fler fall måste undersökas för att fastställa det diagnostiska värdet innan det tas i allmänt bruk.

## **SUMMARY**

This study was performed to investigate the possibility to use ultrasonography as a diagnostic tool for sub-clinical mastitis in dairy cows. Five cows with high cell counts, and four cows with low cell counts were selected as cases and controls, respectively, and their udders examined with ultrasound during a 5 week period. The image of the udders of cows with high cell counts exhibited small, hyper-echoic, rounded foci, approximately 1 cm in diameter, near the milk cisterns and the base of the teats. These changes were not found consistently in all cows with high cell count, however. Ultrasonography may be a valuable complementary tool in the diagnosis of sub-clinical mastitis in dairy cow, but more cases need to be monitored before its full value can be ascertained.

## **INLEDNING**

Mastit är ett kostsamt problem för de svenska mjölkproducenterna. Speciellt de subkliniska mastiterna kan vara svåra att bedöma. Ibland kan etiologin vara svår att fastställa då man inte alltid lyckas odla fram den patogen som orsakar inflammationen och celltalshöjningen. Även att säkerställa en prognos för kon, juvret eller juverdelen ställer till problem för behandlande veterinär och djurägare.

Tanken med föreliggande studie var att undersöka om ultraljud kan vara till hjälp för diagnostik och prognos vid subklinisk mastit hos mjölkkor.

Tekniken gör hela tiden framsteg och med de små och portabla ultraljud som idag finns att tillgå finns alla möjligheter att använda tekniken i de olika typer av besättningar och stall man som veterinär besöker. Det bör inte heller vara svårt att göra plats för utrustningen i bilen.

Väldigt få studier är publicerade vad gäller att använda ultraljud till hjälp för diagnos och prognos hos kor med juversjukdomar. Vid litteratursökning återfanns endast en publicerad studie där man ultraljudsundersökt juvret på kor med mastit (3).

Studien, som utfördes på veterinärhögskolan i Wien 2000-2004, omfattar 52 kor som inkom till universitetskliniken för idisslare. Oavsett av vilken anledning kon kom till kliniken undersöktes juvret med ultraljud och kor utan juversjukdomar fick fungera som kontrollgrupp. I denna studie behandlades i huvudsak kor med akut klinisk mastit (3).

I Wien har man även försökt studera juvervävnad med hjälp av tre-dimensionellt (3D) ultraljud där man använder två vanliga 2D ultraljud med 8,5 – 10,0 MHz prober, men med hjälp av datorprogram får fram en tredimensionell bild av vävnaden. Studien gjordes på 6 lakterande kor utan symtom och där vävnaden klassades som normal (5).

### **Ultraljudet och dess funktion**

Instrument med ultraljud använder högfrekventa ljudvågor för att framställa en bild som kan användas för diagnostik. Dessa ljudvågor bildas då kristaller i ultraljudsgivaren (proben) utsätts för ett elektriskt fält och ändrar form. De frekvenser som vanligtvis används inom ultraljudsdiagnostik ligger mellan 2 – 10 Megahertz (MHz), mycket högre än vad det mänskliga örat kan uppfatta.

Vid en undersökning placeras proben mot huden närmast det område man vill undersöka. Om det kommer in luft mellan huden och proben resulterar det i svarta streck på bilden och för att undvika det använder man en kontaktgel. En ultraljudsgivare både sänder ut ljudvågor och tar emot ekon från de vävnader som ljudvågorna träffar på. Den elektriska signal som uppstår av ekot analyseras beroende på hur långt det har färdats, hur mycket energi som har förbrukats, varifrån det kommer och beroende på hur lång tid det tog för ljudet att studsa tillbaka. Det upptagna ekot omvandlas till en bild som visas tvådimensionellt på en bildskärm. Olika vävnader och vätskor absorberar ljudvågorna olika mycket. Skelett, mineraliserade områden och gas ger en vit färg på bilden och kallas för

hyperekoiska. Andra vävnader är mindre ekoiska men ex fibrös vävnad och fett kan vara hyperekoiska. Vätska däremot är helt anekoiskt och ger svart färg på bilden. Visst innehåll i vätska kan däremot vara delvis ekoiskt och ger då en grynigare bild.

Det finns två huvudtyper av prober som kan användas, linjär eller sektorprob. Den linjära proben ger en rektangulär bild av den vävnad som finns under proben. En fördel är att bilden visar upp en relativt stor del av vävnaden. Nackdelar kan vara att den kräver en stor kontaktyta med huden över det område som ska undersökas och den kan vara svår att placera så att en korrekt bild erhålles.

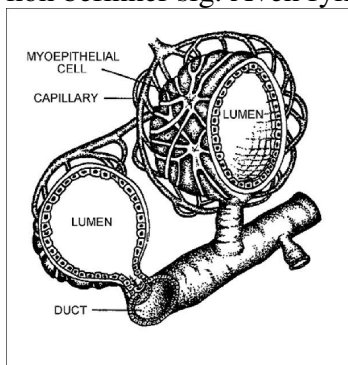
Sektorproben har kristaller som sänder ut sina ljudvågor i olika riktningar vilket ger en solfjäderformad bild. Denna typ av prob ger inte alltid en god bild av ytliga strukturer, men som fördel kan nämnas att den kräver betydligt mindre kontaktyta än den linjära proben (8).

Det finns olika prober som sänder ut ljudvågor med olika antal svängningar per sekund (MHz). Ju lägre Hertzstal desto längre in i vävnaden når ultraljudet. I veterinärt arbete med t ex stogynekologi används ofta en 5 MHz prob, medan diagnostik i finare och ytligare strukturer som t ex sensor kan kräva en prob med högre Hertzstal, t ex 7,5 (2).

## Juvrets anatomi och histologi

Mjölkkörtlarna, mammae, är modifierade svettkörtlar vars uppgift är att producera mjölk som näring till avkomma.

Hos kor utvecklas fyra separata mjölkproducerande enheter (4). De två juverdelarna som sitter på samma sida av kon (ipsilateralt) är helt separata enheter trots att det inte finns någon tydlig avgränsning liknande det kraftiga ligament som delar höger och vänster sida (6). Höger och vänster sida har i stort sett separat blodförsörjning och innervering. De två juverdelarna på samma sida delar blodförsörjning, innervering och upphängningsapparat men alveol- och gångsystem är helt separata så den mjölk som produceras i en juverdel kommer endast till denna juverdels cisterner (4). Varje enhet är uppbyggd av funktionella enheter, alveoler, vars form och storlek varierar beroende på var i laktationsfasen kon befinner sig. Även fyllnadsgraden av mjölk påverkar utseendet (6).



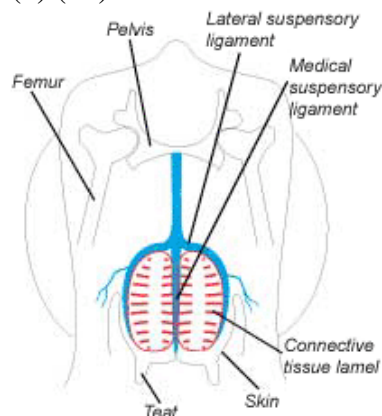
Alveolens uppbyggnad. <http://edis.ifas.ufl.edu/DS116>

En utförsgång löper från varje alveol till en samlingsgång som samlar upp mjölk från en grupp alveoler. Varje sådan grupp kallas lobulus. Även lobuli organiseras i grupper med gemensam gång, en sådan grupp kallas körtellob. Gångsystemet är således uppdelat i primära utförsgångar från alveolen, intralobulära inom lobulus,

interlobulära mellan lobuli, intralobala, intralobulära samt ductus lactiferi som slutligen mynnar i mjölkcisternen (6).

Mjölkcisternen övergår till spencistern vid spenbasen (6). Där spencisternen övergår till spenkanalen finns den sk Fürstenburgska rosetten, vilken spelar en viktig roll i försvaret mot mastit och hjälper till att förhindra mjölkkläckage. Den utgörs av tunna veck av slemhinna som sträcks vartefter mjölk fylls på i spencisternen (17). Runt spenkanalen finns glatt muskulatur som har till uppgift att hålla spenkanalen stängd mellan mjölknedsläpp som en fysisk barriär mot agens (18). Cellerna som klär insidan av spenkanalen utsöndrar keratin som hjälper till att "limma" igen spenkanalen och även har en viss antiseptisk verkan (19).

Då juvret hos en höglakterande ko kan bli mycket tungt krävs en kraftig upphängningsapparat för att hålla juvret på plats. Denna upphängning utgörs av fibroelastiska ligament, två ligament medialt och ett på vardera laterala sidan av juvret. De mediala ligamenten har sina ursprung i linea alba och pelvissymfyisen. Ligamenten är tjockast närmast bukväggen då delar av ligamenten avgår in i juvervävnaden för att ge ytterligare styrka och fördela vikten. De laterala ligamenten är mindre elastiska jämfört med de mediala och består ffa av bindväv (4) (18).



*Juvrets upphängningsapparat.*

[http://www.delaval.com/Dairy\\_Knowledge/EfficientMilking/The\\_Mammary\\_Gland.htm](http://www.delaval.com/Dairy_Knowledge/EfficientMilking/The_Mammary_Gland.htm)

Juvrets blodtillförsel sker ffa genom arteria pudenda externa och det venösa avflödet sker till en venring runt juvret som utgörs av vena pudenda externas båda grenar som fortsätter i vena epigastrica caudalis superficialis. En anastomos mellan de båda sistnämnda fullbordar venringen runt juvret som återfinns vid juvrets bas. Venöst blod töms sedan i mjölkvenen (4). Blodets viktigaste uppgift i ett lakterande juver, förutom att underhålla vävnaden, är att tillhandahålla en jämn tillgång på de näringsämnen som behövs för att bilda mjölk. För att kon ska kunna producera 1 liter mjölk krävs att 500 liter blod passerar juvret vilket innebär en stor påfrestning för en högproducerande ko i laktation (18).

Lymfsystemet består av fina kärl som täcker hela juvret och dränerar till juverlymfknutorna (4). Förutom att filtrera bort restprodukter tillhandahåller lymfknutorna även lymfocyter för det primära försvaret mot patogena agens.

Juvret är rikligt innerverat och då ffa spenen där nerver ska reagera på kalvens diande och signalera för mjölknedsläpp. Glatt muskulatur både i kärl och samlingsgångar har rikligt med nerver men det finns inga nerver som direkt påverkar den sekretoriska vävnaden i juvret (18).

## Juvrets celler och uppbyggnad

Cellerna som utgör alveolerna är kubformade körtelceller arrangerade på ett basalmembran i ett enkelt skick. Cellens form påverkas av om kon lakterar eller är i sin. Cellen i ett sinlagt juver är oregelbundet cylindrisk. Mellan basalmembran och epitel ligger platta, förgrenade kontraktila myoepitelceller vilka omger alveolen som ett nät. Lucker bindväv omger och håller samman alveolerna. Under sinperioden ändras förhållandet mellan bindväv och alveolers storlek då bindväven ökar och alveolernas storlek minskar.

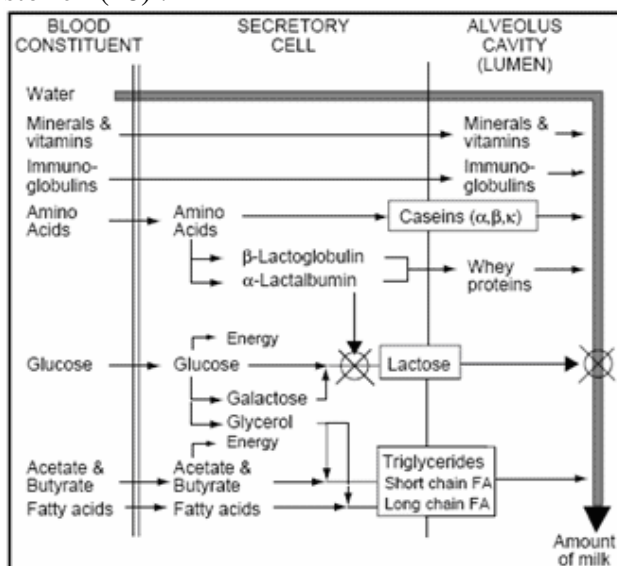
Samlingsgångarna från alveoler och till mjölkcisternen består av epitel men även glatt muskulatur på de större gångarna (6).

## Juvrets fysiologi

Mjölken som bildas i juvret ska fungera som näring åt avkomman. Det måste bildas flera typer av näringsämnen för att svara emot de krav som ställs för att avkomman ska växa och utvecklas rätt. Allt detta ska tillföras mjölken i rätt mängd och vid rätt tillfälle (6).

Alveolerna står för den stora delen av mjölkutsöndringen, även om viss del utsöndras även i de gångar som har enradigt epitel. Myoepitelcellerna som omger alveolerna reagerar på oxytocin och kontraheras för att tömma alveolen vid mjölkning (4).

Även om juvret anläggs redan under fosterperioden så sker den slutgiltiga utvecklingen av samlingsgångar och de sekretoriska cellerna i alveolerna i perioden mellan pubertet och första kalvning. Cellerna i juvret fortsätter att öka både i storlek och antal under de 5 första laktationerna för att därefter nått sin fulla storlek (18).



Översikt av mjölkbildning i den sekretoriska cellen. Överkorsade cirklar är regulatoriska steg. <http://babcock.cals.wisc.edu/downloads/de/20.en.pdf>

## **Mastit**

Mastit svarar för ca 7-8 % av utslagningen av de svenska mjölkorna. Sjukdomen orsakar stora förluster för mjölkproducenterna i landet. Av kopopulationen kan ca 35-40 % beräknas få klinisk mastit, i flertalet fall med lindriga symtom. Ungefär 25 % av svenska mjölkor beräknas bli behandlade av veterinär för mastit. Utifrån beräkningar gjorda av enskilda kors celltal i kokontrollen, uppskattar Svensk Mjolk att ca 65-70 % av mjölkorna får mastit varje år där alltså ungefär drygt hälften av fallen är subkliniska (2). Juvurinflammation uppstår oftast till följd av bakteriell infektion. Många olika faktorer predisponerar för mastit, t ex dåliga mjölkningsrutiner, felaktig mjölkningsutrustning, sår på spenar och juver samt en miljö med dålig hygien (20).

Mastit indelas i klinisk eller subklinisk mastit och båda dessa kan vara antingen akut eller kronisk. Allvarlighetsgraden benämns som kraftig, måttlig eller lindrig och beskriver symtom hos den drabbade individen.

Subklinisk mastit ger inga synliga symtom men yttrar sig bl a i ett förhöjt celltal i mjölken vilket kan ge kvalitetsavdrag på avräkningspriset för producenten (20).

En förbättrad diagnostik och riktat arbete för att förbättra juverhälsan i de svenska mjölkobesättningarna är av vikt både av ekonomiska och djurhälsoskäl. Minskad antibiotikaanvändning och säkrare livsmedel blir andra positiva följder vid en säkrare diagnostik (20).

## **Celltal**

### ***Vad innebär celltal?***

Vid en inflammation i juvret svarar kroppens immunförsvar med att föra vita blodkroppar till juvervävnaden och dessa vita blodkroppar tar sig igenom kapillär- och alveolväggarna mellan cellerna och hamnar i mjölken. Förhöjda halter av vita blodkroppar i mjölken visar att kon har eller har haft en inflammation i juvret. Hos den enskilda kon är det oftast bakterier som orsakar inflammationen (21).

Polymorfonukleära neutrofiler (PMN) utgör första ledet i immunförsvaret vid intramammär infektion. Epitelceller och makrofager i det infekterade juvret utsöndrar kemiska ämnen som fungerar som signal för att snabbt rekrytera PMN till platsen för infektion. I mjölk hos en ko med mastit utgörs de celler som ingår i celltalet av till största delen PMN, lymfocyter, eosinofiler, makrofager och epitelceller. Hos en frisk ko utgör makrofagerna större delen av celltalet (14).

### **Hur kan man mäta celltal**

#### ***CMT, California Mastitis Test***

Detta test utvecklades som en snabb cow-side test. CMT mäter DNA-innehållet i mjölken, vilket återspeglar mängden celler. Reagenten i CMT löser upp cell- och kärnmembran och bildar gel med cellulärt DNA. Reaktionen graderas i en 5 gradig skala. CMT har en begränsad sensitivitet och specificitet för uppskattning av celltal och ska endast användas som en fältindikator för mastit (13).



### ***Mastistrip™***

Mastistrip är ett testkit, utvecklat av SVA och Svensk Mjölk, för provtagning av kor med misstänkt juverinflammation och det kan med fördel användas av djurägaren. Mastistrip består av en kassett med fyra ”testpinnar” med två pappersbitar på varje pinne, en för analys av adenosintrifosfat (ATP) och en för odling av bakterier. En kassett motsvarar ett juver och samtliga juverdelar provtas. Bäst resultat erhålls om prov tas omedelbart efter mjölkning. En pinne på testet motsvarar en juverdel och det är viktigt att båda papperslapparna fuktas genom av mjölk. Efter provtagning skickas kassetten till SVA för att analyseras.

Celltalet i mjölken bedöms indirekt genom ATP-mätning. Bakterieodling görs på samtliga juverdelar. Anrikning av bakterier sker om det är låg växt av bakterier och ATP mätningen indikerar ett högt celltal. Detta görs för att öka möjligheten att hitta och bedöma vilka bakterier som växer i juverdelen. (22).

### ***DeLaval cellräknare, DCC (Direct Cell Counter)***

Är en bärbar optisk räknare. Celltalet bestäms automatiskt i flourescensmikroskop. 20 µl mjölk dras upp i en kassett innehållande en liten mängd reagent som färgar cellkärnorna. När komplexet mellan cellkärnor och reagens belyses med ljus ger det upphov till flourescerande signaler. Genom linser och filter registreras dessa till en bild som används för att bestämma antalet celler (13).

Vid ett försökt vid University of Guelph, Ontario, Canada jämfördes DeLaval DCC med gängse laboriemetoder för att fastställa celltal i mjölk. Man jämförde resultat med DCC mätningar gjorda både på laboriet och ”cow-side”. Resultaten med DCC var fullt jämförbara med övriga metoder. Mätningen i laboriet visade något bättre resultat än mätningen i lagården men även den mätningen gav tillfredsställande resultat (10). Även studier utförda i Sverige har visat god överensstämmelse mellan DCC och celltalsräkning med ordinarie analysmetodik med Fossomatic (13).

### ***Mjölksprov genom Kokontrollen***

De flesta mjölkerna i Sverige (86 %) ingår i Svensk Mjölks kokontroll. Det är ett kontrollprogram som är till för att hjälpa mjölkproducenterna att ha god kontroll på sina djur vad gäller bla avkastning, sjukdomar och mycket mer. Som en del i programmet ingår provmjölkning varje månad. Det ger svar på varje individs avkastning samt celltal. Från varje lakterande ko tas ett mjölkprov vid provmjölkningen som skickas till Steins laboratorium i Jönköping för celltalsanalys. Den metod som där används för att fastställa celltal är flourescens teknik där cellerna färgas in och räknas sedan automatiskt i ett analysinstrument som kallas Fossomatic (7).

## **Juverpatogener**

### ***Staphylococcus aureus***

Detta är den vanligaste bakterien vid mastit, både klinisk och subklinisk. Det är en juverbunden patogen som ofta ger ofta upphov till kroniska inflammationer. Bakterien finns i tonsiller, på juvret och på slemhinnor. Den är smittsam och

orsakar ofta besättningsproblem. Då bakterien ej finns naturligt i miljön måste smittan komma från en annan individ så det är viktigt med smittspårning vid nyinfektion i en besättning. Bakterien växer intracellulärt i epitelceller och fagocyter. Infektionen orsakar ibland allvarligare symtom nära kalvning (16).

### ***Koagulasnegativa stafylokocker, KNS***

Bakterien finns normalt på spen- och juverhud. Växt vid odling kan bero på förorening. KNS kan kolonisera via spenkanalen och kan ge upphov till allt från lindrigt förhöjda celltal till kraftiga kliniska mastiter beroende av art, mängd och kroppens försvar. De kan ge höga celltal under längre tid (16).

### ***Streptokocker***

Streptokocker är naturligt förekommande på hud, övre luftvägar och tarm. Det finns ffa tre arter att känna till i mastit sammanhang men även andra förekommer, främst lågpatogena som ex enterokocker men även övriga  $\beta$ -hemolyserande streptokocker som ex *Sr. zooepidemicus* (16).

### ***Streptococcus agalactiae***

Bakterien är bunden till juver och juvervävnad. Den ger upphov till både akuta och kroniska, kliniska och subkliniska mastiter och är mycket smittsam. Smittöverföring sker i samband med mjölkning, via mjölkningsutrustning, händer, trasor mm (16).

### ***Streptococcus dysgalactiae***

Denna bakterie är ej juverberoende. Den är smittsam och finns i miljön, uterus, vagina, tonsiller, juver och på slemhinnor. Den räknas som en sårpatogen och är en av de vanligaste juverpatogenerna. Smittöverföring sker ffa i samband med mjölkning. Den kan ge upphov till både akuta och kroniska, kliniska och subkliniska mastiter och ingår i begreppet "kvigmastit". Den drabbade individen uppvisar ofta allvarliga symtom (16).

### ***Streptococcus uberis***

Denna bakterie är ej juverberoende utan mer av en miljöbakterie. Den finns i halm, och normalt på spenhud, tonsiller, vagina, tarm, hud och läppar. Den isoleras från betesmarker och strömedel. *Sr. uberis* är en opportunist och ubiquitär bakterie som är resistent mot fagocytos. Den reduceras ej genom spendoppning. Smittöverföring sker under hela dagen. *Sr. uberis* ger upphov till akuta och kroniska, kliniska och subkliniska mastiter. Den orsakar oftast milda till måttliga symtom (16).

### ***Streptococcus zooepidemicus***

Bakterien har animalt ursprung från övre luftvägar eller livmoder, ffa från häst. Den smittar via omgivningen och orsakar vanligtvis akut klinisk mastit, men har även påvisats vid subklinisk mastit (11).

## **Koliformer**

*Esherichia coli* (*E.Coli*) är den vanligaste bakterien vid koliform mastit. Bland övriga koliformer förekommer Klebsiella-, Enterobacter-, Serratia-, Citrobacterarter med flera. De ger oftast akuta, kliniska mastiter. Dessa patogener finns i kons omgivning t ex i ströbädden, kontaminerat foder och vatten mm. Många infektioner spontanläker och vissa kan få ett perakut förlopp. Sinperioden, ffa de första två veckorna efter sinläggning och två veckor före kalvning anses som högriskperiod för alla typer av koliforma infektioner. En viktig riskfaktor i samband med sinläggning och strax före kalvning är en ökning av mängden bakterier på spenspetsen bla eftersom den rengöring och desinfektion som sker i samband med mjölkning upphör. Spenkanalen är också mer genomsläpplig i början och slutet av sinperioden och koncentrationen av försvarsfaktorer i juvret ändras under sinperioden (16).

### ***E. coli***

Denna bakterie ger oftast akuta mastiter. Den är ubiquitär och finns i faeces och spån. Den är serumresistent (motstår fagocytos i närvaro av serum) Bakterien smittar vanligen ej mellan kor utan den räknas i huvudsak som en miljösmitta. (16). Lam och andra har dock påvisat smittsamma *E. coli*. (2)

### ***Klebsiella spp, K pneumoniae, K oxytoca***

Den vanligaste smittkällan för Klebsiellainfektioner anses vara kontaminerat strömedel, ffa sågspån. Andra smittkällor är kroniskt infekterade kor, förorenat bete och vatten. Spenspetsens kondition kan också ha betydelse. Det är en miljösmitta som ger upphov till sporadisk mastit och som endast svarar endast för en liten del av mastiterna i Sverige (ca 6% av kliniska mastiter och en ännu mindre andel av de subkliniska mastiterna) (15).

## **Juverpatogenernas påverkan på celler**

Vid en bakteriell infektion i juvret finns det flera olika faktorer som epitelcellerna kan skadas av. Vid fagocytos av bakterierna kan lysosomala enzymer och oxidativa ämnen frisättas och skada den egna cellen. Cytokiner som frisätts av immunförsvaret kan också skada cellen. Dessutom kan bakterien producera både toxiner och andra ämnen som skadar värdcellen (12). En studie gjord vid Universitet i Tennessee har man visat att ämnen utsöndrade av *E. coli*, *S. aureus* samt *Sr. uberis* kan försämra proliferation av epitelceller ffa i samlingsgångar om kon infekteras under sinperioden och har en mastit när juvret ska börja ställa om till produktion igen. Denna studie visade även att förändringarna till största delen fanns vid spene och mjölkcisternen vid infektion av *E. coli* (12).

Bakterier som kan invadera celler i juvret har en större chans att orsaka en mer persistent infektion eftersom de då kan gömma sej för immunförsvaret. Förmåga till invasion har bla *S. aureus*, *Sr. uberis* och *Sr. dysgalactiae*. Men även vissa *E. coli* stammar har visats ha invasiva egenskaper och kan således orsaka kronisk infektion (1).

Fagocytos av bakterier av PMN är ett effektivt skydd mot infektion. Komplementfaktorer och immunoglobuliner hjälper PMN att känna igen bakterier som ska bekämpas. Vid avdödandet av bakterien frisätts oxidanter som dödar

bakterien samtidigt som den fagocyteras. Dessa oxidanter kan orsaka stor skada även på vävnadsceller. När det är sekretoriska celler som skadas sänks även mjölkproduktionen. En viss begränsning av vävnadsskadorna sker tack vare apoptos av PMN som är programmerade att dö efter att ha fagocyterat bakterier. De döda PMN fagocyteras i sin tur av makrofager (8, 14). Trots omfattande forskning inom området är patogenesen inte komplett vad gäller skador på juvervävnaden i samband med intramammär infektion (8, 12, 14).

## GENOMFÖRANDE

Besättningen på Kungsängens Gård användes för studien som genomfördes under ca 5 veckors tid under september – oktober 2006. Kungsängens kor var lämpliga då tillgängligheten till djuren är god och det finns tillräckligt många individer för att kunna genomföra studien.

I studien ingick totalt 11 kor varav 7 hade höga celltal och de andra 4 hade låga celltal och fungerade som kontrollgrupp. 6 kor med höga celltal valdes ut efter provmjölkkningslista, samt en ko med höga celler som flyttats över till kliniken för idisslarmedicin (IME) vid klinikcentrum, Sveriges Lantbruksuniversitet, SLU, för att sedan gå till slakt. Kontrollgruppens 4 kor valdes ut från samma lista. Tanken var att kontrollgruppen skulle bestå av 5 kor men endast 4 lämpliga kor fanns i D-stallet under hela perioden. Av praktiska skäl valdes kor som stod uppstallade i Kungsängens D-stall då det bedömdes att det skulle vara svårt att ensam ultraljuda kor i robotstallets lösdrift.

Den ultraljudsapparat som användes var av märket Pie Medical försedd med en 5 MHz linjär prob.

Innan ultraljudsundersökning gjordes en klinisk bedömning om kons allmäntillstånd, aptit och kroppstemperatur. Samtliga fyra juverdelar kontrollerades med CMT och den juverdel med högst CMT valdes för undersökning med ultraljud. Inga juverdelar med CMT under 3 undersöktes hos kogruppen med höga celltal. På juverdelar med CMT högre än 3 togs mjölkprov för odling och bakteriebestämning. Odling gjordes på SELMA+ plattor.

Kor med höga celltal undersöktes på detta sätt vid 5 tillfällen under en 5 veckor lång period. Kontrollgruppen undersöktes vid 3 tillfällen, 1:a, 3:e och 5:e gången de kor med höga celltal undersöktes så att deras undersökningsperiod blev lika lång som för gruppen med höga celltal.

Vilken juverdel hos kontrollkorna som undersöktes med ultraljud var godtyckligt och beroende på hur kon stod uppbounden. Vikt lades dock vid att både främre och bakre juverdelar undersöktes i lika hög utsträckning. Ingen juverdel med CMT högre än 1 undersöktes hos kontrollgruppen.

Kor i kontrollgruppen undersöktes först. Kor med högt celltal undersöktes i ordning efter vilka bakterier som odlats fram efter, dvs de två kor som visat sej ha *Staphylococcus aureus* undersöktes sist.

Resultaten av ultraljudsundersökningen dokumenterades med digitalkamera vid de fyra första undersökningstillfällena och med video vid det sista tillfället.

Ultraljudsapparaten som användes hade ej någon skrivare att ansluta och ej heller gick den att koppla till en dator för kopiering av bilder.

## RESULTAT

### Individer som ingick i studien

#### *Studiegruppen med höga celltal*

Individ 1: senaste kalvning 21/8 –06, laktation nr 7. Kon är ej seminerad efter kalvning. Går i försök med kontinuerlig mjölkning.

Datum för provmjölkning	Morgon/kväll mjölkning	Antal celler i tusental
2006-06-12	kväll	166
2006-06-13	morgon	62
2006-07-17	kväll	310
2006-07-18	morgon	196
2006-09-11	kväll	1719
2006-09-12	morgon	132
2006-10-11		61

Hos denna ko visar ultraljudet inga förändringar i juvervävnaden vid något av de fyra tillfällena då kon undersöks.

Kon har under hela perioden varit vid gott AT, haft god aptit och normal kroppstemperatur. Vid sista undersökningstillfället hade hon flyttats till lösdriftsstallet och blev därmed ej undersökt, hon hade då också gått ner i celltal. Vid inget undersökningstillfälle kunde någon juverpatogen odlas fram. Samtliga undersökningar är gjorda på eftermiddagen innan mjölkning.

2005 diagnostiserades kon med subklinisk mastit men blev då ej behandlad.

Individ 2: Senaste kalvning 30/10 –05. Laktationsnummer 3. Dräktig, förväntad kalvning 31/10 –06

Datum för provmjölkning	Morgon/kväll mjölkning	Antal celler i tusental
2006-04-18	kväll	219
2006-04-19	morgon	178
2006-05-16	kväll	341
2006-05-17	morgon	244
2006-06-12	kväll	305
2006-06-13	morgon	207
2006-09-11	kväll	612
2006-09-12	morgon	541

Hos denna ko ses förändringar i juvervävnaden vid undersökning med ultraljud. Små runda hyperekoiska förtätningar, ca 1 cm i diameter. Dessa förändringar ses nära spenbas och juvercisternen. Dessutom får gränsen mellan cisternen och vävnaden ett mer oregelbundet utseende. Vid sista undersökningstillfället syns förändringarna inte lika tydligt.

Kon har haft gott allmäntillstånd under hela perioden, normal aptit och kroppstemperatur. 18/9 hade hon ett spent tramp på vänster framspene, CMT 1 på den juverdelen.

Individ 3: Senaste kalvning 8/9 –06. Laktationsnummer 4, ej seminerad. Går i försök, biopsier tas från juvret.

Datum för provmjölkning	Morgon/kväll mjölkning	Antal celler i tusental
2006-07-17	kväll	113
2006-08-14	kväll	110
2006-08-15	morgon	75
2006-09-11	kväll	18890
2006-09-12	morgon	8742
2006-10-11		54

Hos denna ko ses förändringar i juvervävnaden vid undersökning med ultraljud. Små runda hyperekoiska förtätningar, ca 1 cm i diameter. Dessa förändringar ses nära spenbas och juvercisternen men till skillnad från övriga kor i försöksgruppen ses förändringarna även något högre upp i juvret. Också på bilden från denna ko får gränsen mellan cisternen och vävnaden ett mer oregelbundet utseende. Här kvarstår samtliga förändringar även vid sista undersökningstillfället.

Kon har gått till slakt efter projektets slut då behandlingen ej var framgångsrik och hon hade fortsatta problem med juverdelen höger fram.

Kons allmäntillstånd har under hela perioden varit gott. Aptit och temp normal. Mjölken på höger fram har dock varit förändrad under hela perioden initialt gul tjock mjölk och i slutet blodtillblandad. Behandlad av ambulatoriska kliniken 18/9 för mastit. Detta är även den juverdel där biopsi var tagen 4/9 –06. HF har konstant haft CMT 5 vid alla 5 undersökningstillfällen.

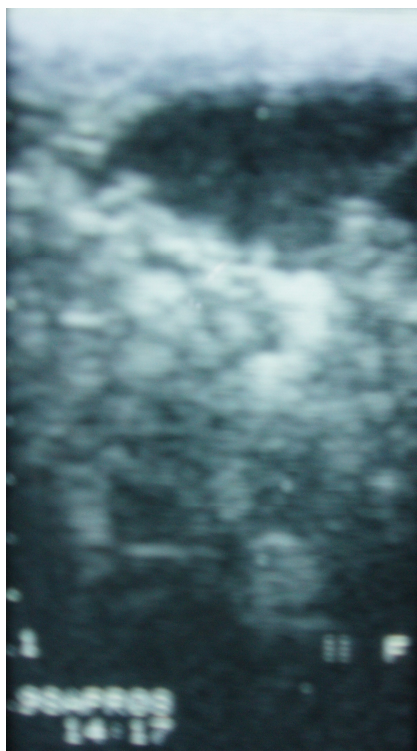
Ambulatoriska kliniken provtog kon den 18/9. Enligt uppgift från personalen på Kungsängens gård diagnostiserades streptokocker.

Kon har tidigare haft problem med mastit. I april 2005 fick hon mastit efter en traumatisk skada på spenen. I augusti samma år diagnostiserades en subklinisk mastit och kon behandlades med långtidsverkande intramammarier vid sinläggningen.

Individ 4: Senaste kalvning 12/1 –06. Laktationsnummer 2. Ej seminerad.

Datum för provmjölkning	Morgon/kväll mjölkning	Antal celler i tusental
2006-04-18	kväll	45
2006-04-19	morgon	24
2006-05-16	kväll	51
2006-05-17	morgon	27
2006-06-12	kväll	84
2006-06-13	morgon	47
2006-07-17	kväll	206
2006-07-18	morgon	126
2006-08-14	kväll	170
2006-08-15	morgon	112
2006-09-11	kväll	348
2006-09-12	morgon	128
2006-10-11		3312

Även hos denna ko ses förändringar i juvervävnaden vid undersökning med ultraljud. Små runda hyperekoiska förtätningar, ca 1 cm i diameter. Dessa förändringar ses ff nära spenbas och juvercisternen. Också på bilden från denna ko får gränsen mellan cisternen och vävnaden ett mer oregelbundet utseende. Vid sista undersökningstillfället var förändringarna mer diffusa men bilden var något grynigare jämfört med ett friskt juver.



*Bilden tagen med digitalkamera från bildskärm i samband med undersökningen.*

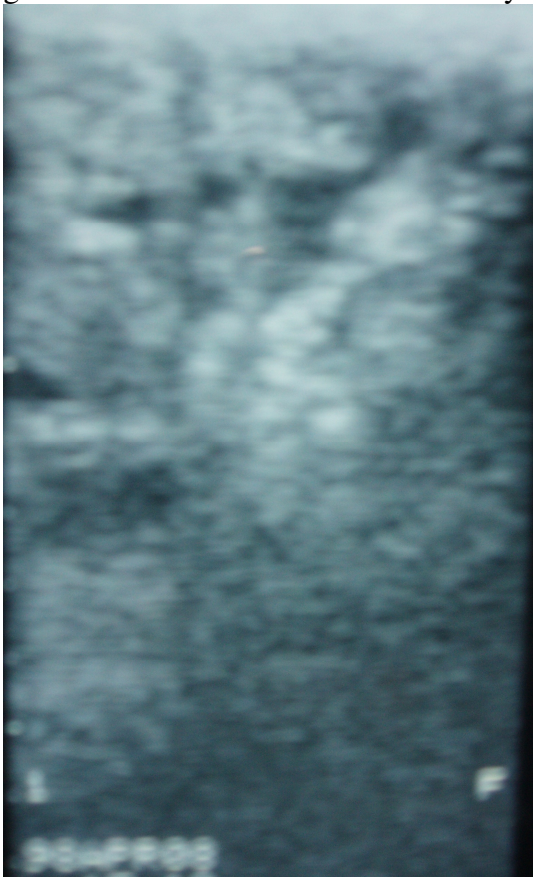
Kon har under hela perioden haft gott allmäntillstånd. Aptit och temp normala.

Undersökning 22/9 CMT 5 höger bak, gulaktig flockig mjölk första strålarna. Mjölk provtagen för bakterieodling på SELMA + och till SVA som konfirmerat att kon har en *S. aureus* infektion.

Individ 5: Senaste kalvning 12/8 –06. Laktationsnummer 2. Ej seminerad.

Datum för provmjölkning	Morgon/kväll mjölkning	Antal celler i tusental
2006-05-16	kväll	102
2006-05-17	morgon	69
2006-09-11	kväll	481
2006-09-12	morgon	145
2006-10-11		163

Undersökning med ultraljud ger generellt en ”grynigare” bild jämfört med övriga kor som undersökts, både i gruppen men högt celltal och med kontrollgruppen. Här ses inte samma tydligt avgränsade förtätningar, men även på denna bild blir gränsen mellan cisterner och vävnad otydligare.



*Bilden tagen med digitalkamera från bildskärm i samband med undersökningen.*

Kon har under hela perioden haft gott allmäntillstånd. Aptit och temp är normala. Kungsängen har lämnat mjölkprov till SVA som odlat fram *S. aureus* även hos denna ko.



Individ 6: Senaste kalvning 6/9 –06. Laktationsnummer 1. Ej seminerad. Inkalvad kviga. CMT höger fram-2, höger bak-4, vänster bak-2, vänster fram-1 vid undersökning 15/9. Uteslöts ur studien då hon hade höga celler endast initialt under laktationen och dessutom var ”sparkig” och svår att undersöka. Flyttades över till lösdriften i VMS stallet.

Individ 7: Flyttad till Kliniken för Idisslarmedicin (IME) vid Klinikcentrum, Sveriges Lantbruksuniversitet (SLU) för att vara tillgänglig för veterinärstudenter under årskurs 5 för att träna klinisk undersökning mm. Sinlagd 19/9 . Övningsopererad under specialiceringskurs. Högersidigt flanksnitt och omentumpexi 21/9.

Undersökt 22/9 då hon på Kungsängen stått med högt celltal under en längre tid. Allmäntillstånd och aptit är utan anmärkning. Temp 38,2 postoperativt.

Ultraljudsundersökning gjordes av samtliga 4 juverdelar då kon var i sin och CMT ej kunde tas. Det är svårare att se några förändringar då juvret är tomt på mjölk. Tydliga blodkärl är fortfarande synliga men de verkar inte utgöra tillräcklig kontrast mot juvervävnaden. Ingen skillnad är detekterbar mellan de olika juverdelarna på ultraljudsbilden. Vissa synliga förtätningar ses vid undersökning men det är dock svårt att avgöra vikten av dessa fynd.

### **Kontrollgruppen**

Individ 11: Senaste kalvning 1/3 –06. Laktationsnummer 4. Ej seminerad. Denna ko kan ej vara i stallet för automatisk mjölkning (VMS-stallet) då hon har en våmfistel för andra försök.

Datum för provmjölkning	Morgon/kväll mjölkning	Antal celler i tusental
2006-04-18	kväll	50
2006-04-19	morgon	13
2006-05-16	kväll	70
2006-05-17	morgon	25
2006-06-12	kväll	58
2006-06-13	morgon	20
2006-07-17	kväll	61
2006-07-18	morgon	16
2006-08-14	kväll	85
2006-08-15	morgon	32
2006-09-11	kväll	51
2006-09-12	morgon	58
2006-10-11		16

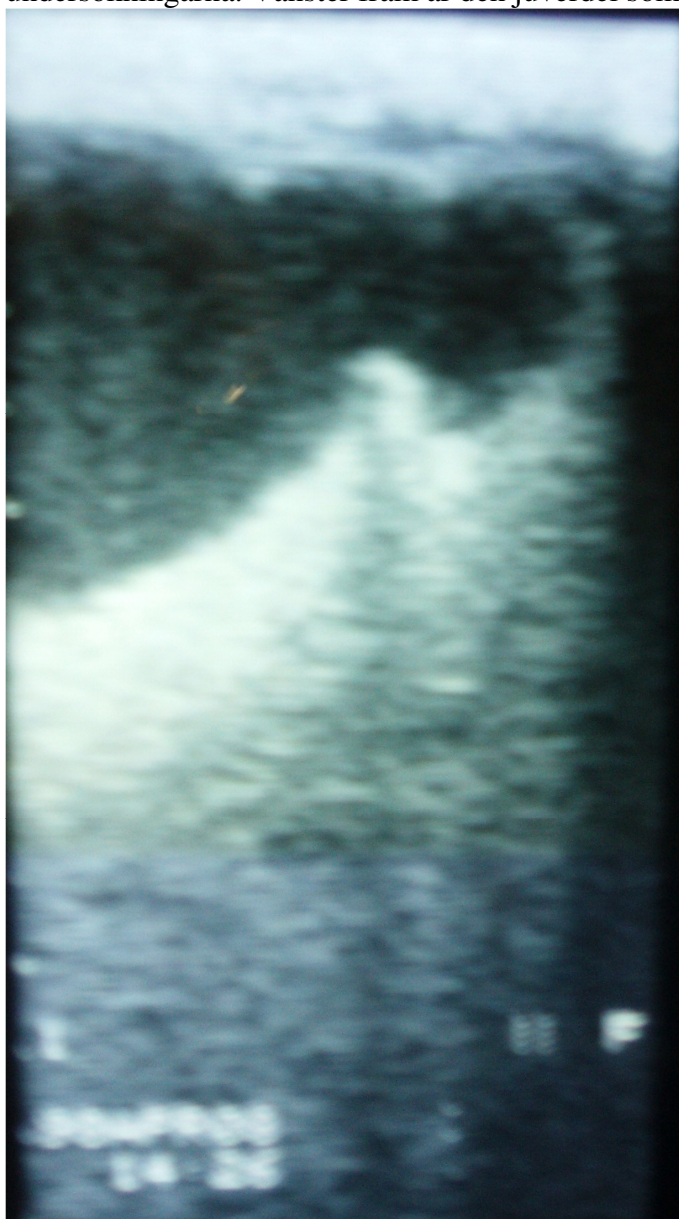
Inga synliga förändringar i juvret kunde upptäckas vid någon av de tre undersökningarna. Vid undersökning den 5/10 var juvret något mer hopsjunket än vid tidigare undersökning men bilden var fortfarande homogen, dock något mindre vätskefyllda håligheter.

Kon har under hela perioden haft ett gott allmäntillstånd, aptit och temp normala. Denna ko diagnostiserades med en akut klinisk mastit i november 2005.

Individ 12: Senaste kalvning 17/8 –06. Laktationsnummer 4. ej seminerad.

Datum för provmjölkning	Morgon/kväll mjölkning	Antal celler i tusental
2006-05-16	kväll	157
2006-05-17	morgon	118
2006-09-11	kväll	135
2006-09-12	morgon	118
2006-10-11		42

Inga synliga förändringar i juvret kunde upptäckas vid någon av de tre undersökningarna. Vänster fram är den juverdel som undersökts på denna ko.



*Bilden tagen med digitalkamera från bildskärm i samband med undersökningen.*

Kon har under hela perioden haft ett gott allmäntillstånd, aptit och temp normala.

Individ 13: Senaste kalvning 21/8. Laktationsnummer 2. Ej seminerad.

Datum för provmjölkning	Morgon/kväll mjölkning	Antal celler i tusental
2006-04-18	kväll	33
2006-04-19	morgon	12
2006-05-16	kväll	58
2006-05-17	morgon	17
2006-09-11	kväll	88
2006-09-12	morgon	42
2006-10-11		6

Inga synliga förändringar i juvret vid någon av de tre undersökningarna. CMT under studien utan anmärkning. Kon har under hela perioden haft ett gott allmäntillstånd, aptit och temp normala.

Individ 14: Senaste kalvning 7/10 –05. Laktationsnummer 1. Seminerad 25/4 –06 beräknad kalvning 1/12 –06.

Datum för provmjölkning	Morgon/kväll mjölkning	Antal celler i tusental
06-12	kväll	31
06-13	morgon	21
07-17	kväll	32
07-18	morgon	15
08-14	kväll	40
08-15	morgon	23
09-11	kväll	41
09-12	morgon	26
10-11		58

Inga synliga förändringar i juvret vid någon av de tre undersökningarna. CMT under studien utan anmärkning.

Kon har under hela perioden haft ett gott allmäntillstånd, aptit och temp normala.

### ***Sammanfattning av resultat***

De resultat som studien visar är att ett normalt juver hos en ko utan symtom från mastit och med låga celltal uppvisar en homogen ultraljudsbild med tydligt utlinjerade kärl och mjölkcisterner. Vidare har också visats att det är enklare att läsa ultraljudsbilden hos ett juver som är fyllt med mjölk då vätskan dels fyller ut vävnaden och dessutom utgör en bra kontrast till vävnaden. Den ko som var sinlagd och vars samtliga 4 juverdelar ultraljudsundersöktes samt de slaktjuver som undersöktes som förberedelse för studien var mycket svåra att se några avvikelser i.

Samtliga kor i kontrollgruppen uppvisade en homogen ekogenicitet och väl avgränsade vätskefyllda mjölkgångar och blodkärl på ultraljudsbilden. Hos

kontrollgruppen var ultraljudsbilden väl överensstämmande mellan individer såväl som mellan juverdelar.

Försökskorna med höga celltal uppvisade förändringar i juvervävnaden vid jämförelse med kontrollgruppen. Hos försöksgruppen med höga celltal sågs vissa områden med förändrad bild, ffa i form av ökad ekogenicitet. Hyperekoiska områden sågs hos vissa individer och den förändring som var mest framstående var små runda hyperekoiska områden ca 1 cm i diameter. Dessa förändringar sågs hos flera kor i gruppen men förändringarna förblev ej oförändrade under hela perioden. De förändringar som sågs på ultraljudsbilden var framför allt samlade vid spenbasen eller i närheten av mjölkcisternen.

Inga skillnader i ultraljudsbilderna mellan kor kunde härledas till olika patogener som orsakat inflammationen. Hos två av korna var *S. aureus* konstaterat medan två andra hade streptokockinfektioner. Hos den femte kon i studien gick det ej att odla fram några bakterier från mjölkprov under perioden som studien pågick.

## DISKUSSION

Denna studie ska som nämnts tidigare ses som ett första steg mot att utreda möjligheterna för ultraljud inom mastitdiagnostiken.

För fortsatt arbete kan man lägga ner mer tid för att välja ut lämpliga kandidater för undersökning. Möjligtvis finns det större förändringar att finna i juvret på en individ som stått med kronisk subklinisk mastit under en betydligt längre period än de kor som ingick i försöksgruppen. Att följa individer under en längre tid av laktationen vore önskvärt. Flera av de kor som ingick i denna studie var nykalvade och eftersom tiden för studien var ganska knapp blev det ffa första perioden i laktationen som undersöktes.

För att ytterligare säkerställa resultaten kan det vara en god idé att använda ett ultraljud där man kan byta prob och få möjlighet att undersöka olika djup i vävnaden. En ytterligare fördel vore med ett ultraljud som går att koppla till en dator för att man i efterhand ska kunna studera de olika bilderna på ett bra sätt.

Den studie som gjordes på universitetskliniken i Wien lade tyngdpunkten på kor med klinisk mastit och där såg forskarna en ganska varierande bild på de olika juvren beroende på dels vilken patogen som orsakat inflammationen, dels hur sjuk kon var. Den studien indelade de olika resultaten i sju olika grupper från 0 som motsvarade bilden hos ett juver utan vävnadsförändringar till 6 som motsvarade allvarliga och tydliga förändringar i juvervävnaden. Hos individer med endast milda kliniska symtom hamnade bilden från undersökningen i grupp 0, dvs inga synliga förändringar. Men även i studien från Wien har man fått oklara resultat vad gäller förändringar beroende på vilken patogen som orsakat inflammationen. Så t ex har man isolerat *S. aureus* från grupp 0, 1, 2 och 5 vilket indikerar inga/mycket små eller mycket stora vävnadsförändringar. Detsamma gäller för streptokocker, KNS, gramnegativer och jästsvamp. Dock var det vanligare med stora vävnadsförändringar vid infektion med gramnegativer eller *Arcanobacterium pyogenes*.

## **SLUTSATS**

Det finns några kliniska situationer då ultraljudet potentiellt kunde vara till god hjälp. Ett sådant exempel är nykalvade kvigor med blod i mjölken. Om man på ultraljudsbilden då ser normal vävnad kan man antagligen dra slutsatsen att ingen infektion/inflammation föreligger och därför avvakta med att sätta in antibiotikabehandling. Ett annat exempel är vid traumatiska spenskador där det är svårt eller omöjligt att få fram någon mjölk. Även i det fallet kan man ha god vägledning av ultraljudsbilden vid val av behandling av kon. Som ett tredje exempel kan man använda ultraljudet för att undersöka en juverdel med högt celltal men där man ej lyckats odla fram någon bakterie. Har man i det fallet en inflammatorisk bild på ultraljudet kan man nog bedöma prognosen som mer pessimistisk och rekommendera att göra kon trespent om det endast gäller en juverdel eller överväga att sätta upp henne på slaktlistan.

## **Tack**

Jag vill framföra ett varmt tack till Personal och Kor vid Institutionen för Husdjurens Utfodring och Vård (HUV), Kungsängens gård. Speciellt Gunnar, Märta och Gunilla som vänligt ställt upp och hjälp till men det mesta, men också övrig personal som utan att knota mjölkat halkiga spenar efter att jag varit framme med glidmedel.

Jag vill också tacka mina handledare; Torkel Ekman som kommit med goda råd och glada tillrop och framför allt att han hade idén till detta arbete från början, och Renée Båge för konstruktiv kritik på det skrivna arbetet.

För hjälp med att överföra min film från VHS till DVD tackar jag Sven Andersson och Power Media.

Till slut vill jag tacka familj och kamrater som stått ut med mej under denna tiden och fått lyssna på mina många funderingar om detta arbete, och då framförallt min make Olav som jag har haft långa och givande diskussioner med.

## LITTERATURFÖRTECKNING

1. Belgin Dogan, S. Klaessig, M. Rishniw, R. A. Almeida, S. P. Oliver, K. Simpson, Y. H. Schukken. 2006. Adherent and invasive *Escherichia coli* are associated with persistent bovine mastitis. *Veterinary Microbiology* 116, 270-282;
2. Ekman, Torkel (Personligt meddelande)
3. Flöck M., Winter P., University of Veterinary Medicine, Wien, Austria. 2006. Diagnostic ultrasonography in cattle with diseases of the mammary gland. *The Veterinary Journal*, vol 171 nr 2 mars 2006 sid 314-321,
4. Frandson R.D., Lee Wilke W., Dee Fails A. 2003 *Anatomy and Physiology of Farm Animals*, 6:th ed
5. Franz S., Hofmann-Parisot M. M., Baumgartner W. 2004 Evaluation of three-dimensional ultrasonography of the bovine mammary gland. *American Journal of Veterinary Research* Vol 65 No 8 Augusti 2004;
6. Knutsson P.G., Dahlin G. April 1986 *Kompendiesamling: Något om mastit och traumatiska spenskador hos ko*
7. Larsson, N-E, *Svensk Mjölk* (Personligt meddelande)
8. Lauzon K., Zhao X., Bouetard A., Delbecchi L., Paquette B., Lacasse P. 2005. Antioxidants to Prevent Bovine Neutrophil-induced Mammary Epithelia Cell Damage. *Journal of Dairy Science* 88:4295-4303 2005;
9. Lee R. 1995. *Manual of Small Animal Diagnostic Imaging*, BSAVA, 2:nd ed.
10. Leslie K. et al, University of Guelph, Ontario, Canada. 2006 An evaluation of DeLaval DCC for determining udder health status in dairy cattle. <http://adsa.asas.org/meetings/2006/abstracts/92.pdf>, 23.
11. Lindhagen A., Persson Waller K. 2006. Ovanliga juverpatogener i mjölkproduktionen. *Svensk Veterinärtidning* nr 6, 2006 Volym 58;
12. Matthews K. R., Rejman J. J., Turner J.D, Oliver S. P, Institute of Agriculture, Dept of Animal Science, University of Tennessee. 1994; Proliferation of a Bovine Mammary Epithelial Cell Line in the Presence of Bacterial Virulence Factors. *Journal of Dairy Science* 77:2959-2964
13. Nelson Y. 2004. Tre metoder för diagnos av mastit i fält. Examensarbete Veterinärmedicinska fakulteten, SLU;
14. Paape M., Mehrzad J., Zhao X., Detilleux J., Burvenich C. 2002. Defense of the Bovine Mammary Gland by Polymorphonuclear Neutrophil Leukocytes. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* Vol 7, No 2, April 2002;
15. Persson Waller K., Unnerstad H. 2004. Klebsiellamastit hos mjölkkor. *Svensk Veterinärtidning* nr 10•2004 Volym 56
16. Radostits O.M, Gay C.C, Blood D.C, Hinchcliff K.W. 2003. *Veterinary Medicine* 9th ed.
17. <http://www.milkquality.org/Course/ch1/ch1sec2g.html> 20/11 kl 10.57
18. [http://www.delaval.com/Dairy\\_Knowledge/EfficientMilking/The\\_Mammary\\_Gland.htm](http://www.delaval.com/Dairy_Knowledge/EfficientMilking/The_Mammary_Gland.htm) 20/11 2006 kl 10.13
19. <http://www.milkquality.org/Course/ch1/ch1sec2f.html> 20/11 2006, kl 10.59
20. <http://sva.se/static/232.html> 2/11 kl 09.48
21. <http://www.sva.s/dokument/stmall.html?id=379> 2/11 kl 09.59

## 22. SVA:s informationsblad om Maststrip