



Vurdering af PCR mastitis-test

til diagnostik af intramammære infektioner med *Staphylococcus aureus* og *Streptococcus agalactiae* i ydelseskontrolprøver ved besætningsrådgivning

Klaas, Ilka Christine; Mahmmod, Yasser; Cederlöf, Ellinor; Katholm, Jørgen

Published in:
Dansk Veterinaertidsskrift

Publication date:
2015

Document version
Tidlig version også kaldet pre-print

Citation for published version (APA):
Klaas, I. C., Mahmmod, Y., Cederlöf, E., & Katholm, J. (2015). Vurdering af PCR mastitis-test: til diagnostik af intramammære infektioner med *Staphylococcus aureus* og *Streptococcus agalactiae* i ydelseskontrolprøver ved besætningsrådgivning. *Dansk Veterinaertidsskrift*, 98(2), 28-33.

Vurdering af PCR mastitis-test

til diagnostik af intramammære infektioner med *Staphylococcus aureus* og *Streptococcus agalactiae* i ydelseskontrolprøver ved besætningsrådgivning



Abstract

Diagnostic test properties of a real-time PCR test on samples taken at routine milk recording were investigated in two studies in 13 dairy cattle herds. The PCR test had a higher sensitivity (Se) to detect *Staphylococcus aureus* (*Staph. aureus*) and *Streptococcus agalactiae* (*Strep. agalactiae*) than bacteriologic culturing. Se of the PCR test increased with increasing cycle threshold (Ct) value cut-off, whereas the Se for bacteriologic culturing decreased. These changes point towards changes in the underlying disease condition from 'pathogen positive' at high Ct-value cut-off to 'shedding high amounts of pathogen/being truly infected' at low Ct-value cut-offs. Pre-sampling procedures including teat disinfection reduced the odds of being positive for *Staph. aureus* in the PCR test, but did not reduce the odds of being positive for *Strep. agalactiae*. To reduce the number of false positive results, we recommend proper hygiene and teat disinfection before sampling. The PCR results of cows milked consecutively showed some correlation indicating that carry-over does occur. Hence, milking order should be considered when interpreting results.

Sammendrag

Den diagnostiske værdi af real-time PCR-tests fra mælkeprøver udtaget ved ydelseskontrollen blev undersøgt i to studier i 13 malkekægbesætninger. PCR-testen havde en højere sensitivitet (Se) til at identificere *Staphylococcus aureus* (*Staph. aureus*) og *Streptococcus agalactiae* (*Strep. agalactiae*) i forhold til bakteriologisk dyrkning. Ved stigende cycle threshold (Ct)-værditærskel observeredes en højere Se af PCR-testen, imens Se af bakteriologisk dyrkning faldt. Disse ændringer peger på, at den underliggende sygdomsdefinition ændres samtidigt fra »patogen positiv« ved høje Ct-værditærskler til »udskillelse af høj koncentration af bakterier/sand inficeret ko« ved lave Ct-værditærskler. Koens forberedelse inkl. pattedesinfektion reducerede oddsene for at være positiv for *Staph. aureus* i PCR-testen, men ikke oddsene for *Strep. agalactiae*. For at reducere forekomsten af falske positive testresultater anbefales det at desinficere pattespidserne og kassere de første mælkestråler inden prøveudtagning. Da PCR-resultater af køer malket med samme mælkesæt er korreleret, anbefales det at tage højde for malkefølgen, når PCR-testresultater fortolkes.

Baggrund

Intramammære infektioner (IMI) med *Streptococcus agalactiae* (*Strep. agalactiae*) og *Staphylococcus aureus* (*Staph. aureus*) kan medføre store økonomiske tab i malkekvægsbesætninger pga. reduceret mælke kvalitet og ydelsestab. Effektive behandlings- og kontrolstrategier for smitsom mastitis kræver, at inficerede køer kan diagnosticeres korrekt. Derfor har vi behov for valide, hurtige og økonomiske diagnostiske værktøjer.

Siden 2010 har danske landmænd automatisk kunnet bestille PCR-analyse af ydelseskontrolmælk med PathoProof™ Mastitis PCR Assay. Ved manuelt udtagne kirtelprøver fra kliniske mastiter er metoden hurtig og har en høj analytisk sensitivitet (Se) og specificitet (Sp) i forhold til bakteriologisk dyrkning (1,2).

I Danmark anvendes PCR-testen på enkeltdyrsniveau ved goldning eller til test af hele besætningen, fx i besætninger med B-streptokokker eller *Staph. aureus*-problemer, som ønskes saneret. Således viser udtrækket fra kvægdatabasen, at der i 2013 analyseredes og registreredes i alt 65.364 PCR komælkeprøver på Eurofins Laboratorium i Holstebro.

PathoProof™ Mastitis PCR Assay er en semikvantitativ test, hvor resultater fra en PCR-test angives som cycle threshold (Ct)-værdi. Jo lavere Ct-værdien, jo større mængde DNA af det pågældende patogen findes i prøven. Producenten anbefaler en Ct-værditærskel på 37 for at betragte en test som positiv.

Da prøverne ved ydelseskontrollen udtages uden at desinficere pattespidserne eller malkesæt/udstyr mellem køerne, kunne der være problemer med overslæb i mælken og/eller falsk positive pga. pattekanalinfektioner, pattehudinfektioner eller kontamination fra den almindelige pattehudflora eller udstyr.

Få studier belyser Se og Sp af PCR-mastitistests på mælkeprøver udtaget ved ydelseskontrollen. Derfor har vi iværksat to feltstudier til at undersøge testegenskaberne af PathoProof™ Mastitis PCR

Assay på prøver udtaget ved ydelseskontrollen og bakteriologisk dyrkning af aseptisk udtagne kirtelprøver. Formålet med studierne var at undersøge:

- Se og Sp af PCR-test og dyrkning for *Strep. agalactiae* (**studie A**)
- Se og Sp af dyrkning og PCR-test ved forskellige Ct-værditærskler for *Staph. aureus* ved goldning (**studie B**)
- Effekten af aseptisk forberedelse inden prøveudtagning på forekomsten af PCR-positive testresultater for *Strep. agalactiae* og *Staph. aureus* (**studie A**)
- Effekten af malkeækkfølgen på forekomsten af PCR-positive prøver for *Strep. agalactiae* (**studie A**)

Til sidst vil vi på basis af foreliggende resultater give anbefalinger til fortolkning af PCR-resultater i besætningskontekst med varierende forekomst af *Staph. aureus* og *Strep. agalactiae*.

Materiale og metode

Studie A: besætningsstudiet af smitsom mastitis

Seks besætninger med Holstein køer udvalgte iblandt 34 besætninger, som deltog i et projekt vedr. sammenhængen mellem tankmælk PCR-resultat og prævalens af IMI med *Strep. agalactiae* og *Staph. aureus*. Selektionskriterierne var, at besætningerne havde en konventionel malkestald og at en tank PCR-test for *Strep. agalactiae* og *Staph. aureus* havde en Ct-værdi < 40 ved den årlige tankmælktest i oktober 2010 og ved tre månedlige tankmælktests fra januar til marts 2011 (3). Besætningsstørrelsen varierede fra 146 til 372 lakterende køer. Ved ydelseskontrollen i april/maj 2011 blev PCR-testprøver udtaget hos alle køer på individniveau. Derudover tog vi aseptiske formælk kirtelprøver fra 50 % af tilfældigt udvalgte køer inden påsætning af malkesættet ved samme malkning, dvs. fra alle køer på hver anden malkeplads. Denne fremgangsmåde skulle sikre, at effekten af udtagning af aseptiske for-

mælk kirtelprøver på PCR-resultatet kunne undersøges (4).

Denne såkaldte aseptiske forberedelse indebar pattedesinfektion med 70 % alkohol, kassering af de første mælkestråler og udtagning af en kirtelmælksprøve. Malkeækkfølgen på hver malkeplads blev registreret for at kunne vurdere risiko for overslæb (5).

Studie B: Se og Sp for Staph. aureus for PCR og dyrkning ved goldning

Med hjælp fra besætningsdyrlægerne blev 7 besætninger udvalgt, som regelmæssigt udtog PCR goldkopprøver ved ydelseskontrollen og som forventede at udtage mindst 10 goldkopprøver ved ydelseskontrollen i marts 2011, herunder 3 besætninger med automatiske malkesystemer (AMS) (6). De involverede landmænd udpegede køer på basis af forskellige kriterier, fx celletalsværdi (CTV) med tærskel 2, 3 eller 4, tidligere behandlinger eller højt celletal. I konventionelle besætninger blev PCR-prøver udtaget under ydelseskontrollen ved Trutest mælkemåleren. I de 3 AMS-besætninger blev PCR-prøver udtaget automatisk med en shuttle. Aseptiske formælksprøver blev udtaget i malkestalden (4 besætninger) eller i separationsafsnit i de 3 AMS-besætninger. Formælksprøverne blev udtaget samme dag som PCR-prøverne.

Laboratorieanalyser

Prøver til PCR

Alle prøver til PCR blev udtaget efter malkepersonalets eller AMS' rutinemæssige forberedelse af koen i prøveglas med bronopol for at hæmme bakterievækst. Prøverne blev transporteret på køl til Eurofins laboratorie i Holstebro inden for 24 timer. Det kommercielle real-time PCR-test kit (PathoProof™ Mastitis PCR Assay (Finnzymes Oy, Espoo, Finland) blev brugt til at analysere mælkeprøverne som beskrevet af producenten. Til DNA-ekstraktion anvendtes 350 µl mælk. Resultater blev angivet i Ct-værdi. En Ct-værdi angiver antallet af PCR-cycli, som er nød-

vendige, for at maskinen kan detektere et specifikt fluorescerende signal. Ved foreliggende test omfatter protokollen 40 cycli per reaktion. Jo højere koncentration af DNA i prøven er, des lavere Ct-værdier findes (7).

Bakteriologisk dyrkning

Studie A

Prøverne blev dyrket iht. anbefalinger af National Mastitis Council (8) og Dinsmore et al. (9). Fra hvert kirtelprøve blev der samtidigt udsået 0,01 ml mælk på kalveblod-agar, chromagar og på *Strep. agalactiae* selektivt medie, N-plate-agar media (9 ml selektiv agar i en Petriskål med 5 % sterilt kalveblod, 1 % (wt/vol) aesculin suppleret med neomycinsulfat, polymyxin B, natriumfusidat og *Staph. aureus*-toxin (10)). Pladerne blev inkuberet ved 37 °C i 18–24 timer og vurderet for kolonivækst for *Strep. agalactiae*. Hvidgrålige kolonier med eller uden beta-hæmolyse på blodagar og lys blå farve på chromagar blev betragtet som *Strep. agalactiae* og bekræftet ved vækst på det selektive medie samt positiv CAMP-test. En ko blev klassificeret som positiv, hvis hun havde ≥ 1 koloni i ≥ 1 kirtel. Ingen prøve blev ekskluderet pga. kontamination, som defineredes som påvisning af 3 eller flere bakteriespecies (11).

Studie B

Prøverne blev frosset ned til -20 °C og tøet op ved rumtemperatur inden udsåning af 0,01 ml på blodagar. Repræsentative kolonier blev undersøgt yderligere. Mellemstore, glatte, hvide eller gule kolonier samt hæmolytiske kolonier med grampositive katalasepositive kokker blev betragtet som stafylokokker og testet med koagulasetest. Ved ≥ 1 koloni af koagulasepositive stafylokokker i ≥ 1 kirtel

blev koen klassificeret som *Staph. aureus*-positiv ved dyrkning. Prøver med flere end 3 forskellige kolonityper betragtedes som kontamineret og blev udelukket fra yderligere analyse.

Statistiske analyser

Testegenskaberne Se, Sp og prævalens for PCR-test og dyrkning blev analyseret med latentklassemodel (12), hvor man undgår at antage, at én af de to tests er en perfekt test. Antagelsen er derimod, at begge tests evaluerer en underliggende latent (ikke-observerbar) sygdomstilstand, i vores tilfælde en yverinfektion. Den frit tilgængelige Winbugs software blev anvendt til analysen.

For at kunne estimere Se og Sp af begge tests, skal populationen opdeles i mindst to subpopulationer, som har forskellig prævalens. I studie A estimerede vi prævalensen i hver af de 6 besætninger. I studie B blev besætningerne samlet i 2 subpopulationer baserende på deres geografiske beliggenhed. Vi undersøgte også virkningen af at vælge forskellige Ct-værdier som tærskel for at betragte en ko som inficeret. Effekten af Ct-værdien blev undersøgt ved at analysere latentklassemodeller ved forskellige Ct-værditærskler (≤ 39 , ≤ 37 , ≤ 34 , ≤ 32).

For at kunne demonstrere effekten af testegenskaber i besætninger med forskellig prævalens af køer med IMI, beregnede vi negative og positive prædiktive værdier (NPV og PPV) for to scenarier: En besætning med en forventet prævalens på 10 % og en med 40 % sandt inficerede køer efter Bayes Theorem (13).

Effekten af køens forberedelse, dvs. aseptisk udtagning af kirtelprøver, på risikoen at være PCR-positiv blev analyseret i seks besætninger med en logistisk regressionsmodel. Køer med PCR Ct-værdi ≤ 37

blev betragtet som PCR-positiv iht. producentens anbefaling. Den statistiske analyse blev gennemført med »glm« funktionen i R version 2.14.0 (14) ved et generaliseret hierarkisk logistisk mixed model med besætning som tilfældig effekt og pattedesinfektion (ja/nej), celletal ($< 200.000/\text{ml}$, $200.000\text{--}400.000$ og $> 400.000/\text{ml}$), laktationsstadiet (< 90 dage efter kælvning (dek), $90\text{--}300$ og > 300 dek), mælkeydelse i EKM < 24 kg, $24\text{--}33$ kg og > 33 kg), og kælvningsnummer (første paritet, anden paritet, ældre køer). Kun signifikante variabler forblev i den endelige model.

Effekten af malkeækkfølgen på risikoen for en positiv PCR-test for *Strep. agalactiae* blev undersøgt for tre Ct-værditærskler (≤ 39 , ≤ 37 og ≤ 34) i fire besætninger med logistisk regression. Overslæb blev vurderet ved at undersøge korrelationen mellem køer malket ved samme malkesæt på samme malkeplads (generalized estimating equation, GEE, med variablerne malkeplads og malketid). Analyserne blev lavet med Stata software (Stata version 11.2, Stata Corporation, College Station TX, USA). Forklarende variabler var celletal, laktationsstadiet, EKM, besætning (fiks effekt), kælvningsnummer og pattedesinfektion.

Resultater

Latentklasseanalyse *Strep. agalactiae*
Efter dataredigering blev testresultater fra 614 køer fra 6 besætninger for *Strep. agalactiae* med latentklassemodellen analyseret. PCR-testen havde en højere Se end bakteriologisk dyrkning ved alle Ct-værditærskler. Ved stigende Ct-værditærskel observeredes stigende Se_{PCR} , imens Se_{DYRK} faldt (tabel 1). Sp_{PCR} og Sp_{DYRK} var næsten upåvirket af Ct-værditærskel og altid over 95 %. Stigning af Ct-

Tabel 1. Sensitivitet og specificitet af PCR og dyrkning for at diagnosticere intramammære infektioner med *Strep. agalactiae* ved forskellige Ct-værditærskel fra 614 køer i 6 besætninger. Positivt dyrkningsresultat: ≥ 1 koloni i ≥ 1 kirtel.

Ct-værditærskel	PCR				Dyrkning			
	Se	95 % PPI*	Sp	95 % PPI	Se	95 % PPI	Sp	95 % PPI
≤ 32	74	58 ; 89	97	95 ; 99	72	52 ; 91	99	97 ; 100
≤ 34	87	73 ; 97	97	94 ; 99	60	45 ; 77	99	98 ; 100
≤ 37	92	81 ; 99	97	90 ; 100	30	22 ; 39	100	98 ; 100
≤ 39	96	88 ; 99	97	91 ; 100	26	19 ; 34	100	99 ; 100

*posterior probability interval, Bayesians' udtryk sammenligneligt med konfidensinterval

værditærskel medførte en stigning af den estimerede prævalens af *Strep. agalactiae*. Den synlige prævalens baseret på dyrkningsresultater var 8,6 % (n = 53) på tværs af besætninger og varierede fra 1,6 % i besætning 5 til 27,5 % i besætning 6. Den estimerede sande prævalens steg med stigende Ct-værditærskel. Den var højest med et besætningsgennemsnit på 40 % ved Ct-værditærskel ≤ 39 (fra 9-84 %) og lavest ved Ct-værditærskel ≤ 32 med i gennemsnit 12 % (fra 2-36 %).

Latentklasseanalyse *Staph. aureus*
Komplette data fra 140 køer inden afgoldning fra 7 besætninger blev analyseret i latentklassemodellen (tabel 2). Køerne havde et celletal fra ydelseskontrollen mellem 8.000 og 5340.000 celler/ml, i gennemsnit 483.000 (95 % konfidensinterval 343.000;623.000). Køerne producerede i gennemsnit 23 kg mælk (95 % KI 22; 24) og den gennemsnitlige kælvningsnummer var 2,6 (95 % KI 2,3;2,9). Ved stigende Ct-værditærskel observeredes en stigende Se_{PCR} fra 61 til 93 % (tabel 2). Se_{DYRK} var højest ved Ct-værditærskel ≤ 32 og faldt med stigende Ct-værditærskel til 78 %. Specificiteten varierede mindre og lå mellem 99-93 % for PCR-testen og mellem 90-97 % ved stigende Ct-værditærskel.

Tabel 3 viser positive og negative prædiktive værdier som udtryk for sandsynligheden for, at et testresultat angiver den sande sygdomsstatus. I en besætning med lav forekomst af IMI med *Strep. agalactiae* (10 %) er den positive prædiktive værdi for både dyrkning og PCR-test 77 %, dvs. 77 % af positivt testede køer vil være sandt positive. Forskellen i den negative prædiktive værdi mellem dyrkning og PCR-test er lille. Uanset hvilken test man vælger, vil der være en høj sand-

synlighed for, at en testnegativ ko er sandt negativ. I en besætning med høj sand prævalens af IMI med *Strep. agalactiae* er den positive prædiktive værdi for dyrkning og PCR-test 95 %, dvs. meget højere i forhold til den positive prædiktive værdi i en besætning med lav prævalens. Den lave negative prædiktive værdi på 68 % for dyrkning ved høj prævalens afspejler den lave Se af dyrkning.

Vi fandt en lavere forekomst af *Staph. aureus* vurderet ved PCR-test hos køer med aseptisk forberedelse inden PCR-prøveudtagning. At udtage en aseptisk formælkirtelprøve inden udtagning af PCR-prøven reducerede således køens odds for at være *Staph. aureus* positiv i PCR-testen til 0,75 (95 % KI 0,58–0,97) i forhold til køer, hvor der ikke blev udtaget en aseptisk formælkirtelprøve. Køer med højt celletal havde en højere odds for at være *Staph. aureus*-positive. De øvrige variabler var ikke signifikante og er ekskluderet fra den endelige model. Besætningseffekten forklarede 8,9 % af variationen.

Tabel 4 viser faktorer, som påvirker risikoen for at være PCR-testpositiv for *Strep. agalactiae*. Celletal og besætning var signifikante risikofaktorer ved alle Ct-værditærskler, imens aseptisk forberedelse kun var signifikant i modellen ved Ct-værditærskel ≤ 37. De øvrige variabler var ikke signifikante. I modellen ved Ct-værditærskel ≤ 37 var oddsene for at være PCR-

positiv for *Strep. agalactiae* 1,60 (95 % KI 1,08–2,36) gange højere hos køer med aseptisk forberedelse i forhold til køer uden aseptisk forberedelse. Overslæb i form af korrelationen mellem på hinanden følgende prøver per malkesæt blev bedst beskrevet med autoregressiv korrelation. Således var korrelationen mellem køer malket med samme malkesæt hhv. var 13 %, 11 % og 9 %, ved Ct-værditærskel ≤ 39, ≤ 37, og ≤ 34.

Diskussion

Vores resultater viser, at PCR-testen for *Strep. agalactiae* og *Staph. aureus* har en højere Se end dyrkning ved den fra producenten anbefalede Ct-værditærskel på 37. Især den lave Se af dyrkning for *Strep. agalactiae* er problematisk i besætninger med forventet høj forekomst af *Strep. agalactiae*-infektioner. Når kun 68 % af dyrkningnegative køer er sandt negative (som i vores eksempel med 40 % prævalens af sandt *Strep. agalactiae*-inficerede køer) kan det i praksis være umuligt effektivt at adskille inficerede fra ikke-inficerede køer baseret på dyrkningsresultater.

At en ændring af Ct-værditærsklen kan påvirke Se_{DYRK} kan fortolkes således, at man samtidig ændrer den underliggende sygdomsdefinition: Ved høj Ct-værditærskel kan definitionen være, at koen er positiv for det respektive yverpatogen. Det kan således også indbefatte køer som

Tabel 3. Positive (PPV) og negative (NPV) prædiktive værdier for *Strep. agalactiae* ved forskellig prævalens, Ct-værditærskel 37.

	Sand prævalens i %	PPV i %	NPV i %
PCR test (Se 92; Sp 97)	10	77	99
	40	95	95
Dyrkning (Se 30; Sp 99)	10	77	93
	40	95	68

Tabel 2. Sensitivitet (Se) og specificitet (Sp) i % for PCR og dyrkning til at diagnosticere intramammære infektioner med *Staph. aureus* ved forskellige Ct-værditærskler hos 140 køer fra 7 besætninger inden goldning. Positivt dyrkningsresultat: ≥ 1 koloni i ≥ 1 kirtel.

Ct-værditærskel	PCR				Dyrkning			
	Se	95 % PPI*	Sp	95 % PPI	Se	95 % PPI	Sp	95 % PPI
≤ 32	61	36 ; 97	99	95 ; 99	94	76 ; 99	90	79 ; 99
≤ 34	81	61 ; 99	96	90 ; 99	88	70 ; 99	94	86 ; 99
≤ 37	93	80 ; 99	95	85 ; 99	83	66 ; 99	97	91 ; 99
≤ 39	93	80 ; 99	93	82 ; 99	78	60 ; 98	97	91 ; 99

*posterior probability interval, Bayesians' udtryk sammenligneligt med konfidensinterval

bare er kontaminerede, og/eller har koloniseret pattehud eller pattekanaler. Ved lav Ct-værditærskel kan definitionen være, at koen udskiller store mængder af bakterier. Det vil således være usandsynligt, at det kun er en forurening eller kolonisering af pattehud og pattekanal. Dermed er koen højst sandsynligt »stærkt inficeret«. Hvilken Ct-værditærskel, der skal vælges, afhænger af formålet med undersøgelsen. Vil man finde alle *Staph. aureus* eller *Strep. agalactiae* positive køer, vælges en høj Ct-værditærskel. Vil man kun finde køer, som er stærkt inficerede og dermed sandsynligvis de mest »smit-somme«, vælges en lav Ct-værditærskel. Imens enhvert fund af *Strep. agalactiae* i besætningen er uønsket, skal man nøje

definere hvilket niveau af *Staph. aureus* der anses for uønsket og som tærskel for at iværksætte tiltag.

At køer med aseptisk forberedelse har en lavere odds for at være *Staph. aureus*-positive i PCR-testen kan indikere, at antal bakterier på patte huden/i pattekanalen kan påvirke PCR-resultater. Jo renere patterne er inden påsætningen af malkesættet, jo mindre er risikoen for falsk positive resultater. Derfor anbefaler vi, at patterne rengøres grundigt og at patte huden desinficeres, samt at de første stråler mælk malkes ud og kasseres for at minimere risikoen for falsk positive køer. I modsætning til *Staph. aureus* fandt vi ingen effekt af aseptisk forberedelse for *Strep. agalactiae* ved Ct-værditærskel

≤39 og ≤34, samt en højere odds for PCR-positive tests ved Ct-værditærskel ≤37. En mulig forklaring kan være, at *Strep. agalactiae* i modsætning til *Staph. aureus* ikke i samme omfang koloniserer pattehud og pattekanal. Der kan endvidere være forskelle i udskillelsesmønster under malkningen, som bør belyses nærmere.

Korrelationen mellem køer, malket med samme malkesæt indikerer, at der forekommer overslæb fra ko til ko, som påvirker PCR-testresultaterne. Størrelsen af korrelationen bliver større, jo højere Ct-værditærskel der vælges, imens det underliggende overslæb sandsynligvis ikke påvirkes. Indtil vi har undersøgt effekten yderligere, anbefaler vi ved test af hele besætningen at tage højde for

Tabel 4: Risikofaktorer og odds ratios for intramammære infektioner med *Strep. agalactiae* diagnosticeret med PCR-test ved ydelseskontrollen i fire besætninger. Resultater fra tre modeller med Ct-værditærskel ≤39, ≤37 og ≤34.

Ct værditærskel	Variabler	Kategori	PCR positive <i>Strep. agalactiae</i> , n (%)	Odds ratio	95% konfidensinterval	P værdi
≤39	Celleletal*	1: < 200	165 (29,7)	Ref.	Ref.	<0,01
		2: ≥ 200; <400	40 (43,9)	1,7	1,0–2,9	
		3: ≥ 400	87 (58,8)	3,2	2,0–5,3	
	Besætning	B1	93 (73,2)	Ref.	Ref.	< 0,01
		B2	88 (27,8)	0,1	0,1–0,2	
		B3	18 (9,3)	0,03	0,02–0,06	
		B4	93 (59,2)	0,4	0,2–0,8	
≤37	Aseptisk forberedelse	Nej	97 (25,3)	Ref.	Ref.	0,02
		Ja	132 (32,1)	1,6	1,1–2,4	
	Celleletal *	1: < 200	120 (21,6)	Ref.	Ref.	<0,01
		2: ≥ 200; <400	33 (36,3)	1,8	1,1–3,2	
		3: ≥ 400	76 (51,4)	3,9	2,4–6,1	
	Besætning	B1	72 (56,7)	Ref.	Ref.	<0,01
		B2	70 (22,1)	0,2	0,1–0,3	
B3		14 (7,3)	0,05	0,03–0,1		
B4		73 (46,5)	0,5	0,3–0,9		
≤34	Celleletal *	1: < 200	49 (8,8)	Ref.	Ref.	<0,01
		2: ≥ 200; <400	22 (24,2)	2,8	1,5–5,4	
		3: ≥ 400	59 (39,9)	6,4	3,9 – 10,6	
	Besætning	B1	25 (19,7)	Ref.	Ref.	<0,01
		B2	47 (14,8)	0,8	0,5–1,4	
		B3	5(2,6)	0,1	0,04–0,3	
		B4	53 (33,8)	1,7	0,9–3,1	

*i 1000/ml

malkerækkefølgen i vurderingen af testresultater og altid at gentage testen hos svagt positive køer med høje Ct-værdier. Vi anbefaler desuden at genteste køer med høje Ct-værdier ved manuelt udtagne individprøver inden sektionering eller behandling.

Ved goldkopprøver, eller når der kun testes få køer i besætningen, kendes infektionsstatus af koen, malket inden den testede ko, ikke. Her bør altid suppleres med yderligere tests, som fx CMT og celletal ved ydelseskontrollen til at understøtte beslutningen om evt. medicinsk goldbehandling.

Ikke aseptisk udtagne prøver til PCR under ydelseskontrollen indebærer en vis risiko for falsk positive testresultater pga. kontamination, pattehudinfektioner, pattekanalinfektioner og/eller overslæb mellem køer, som kan håndteres og begrænses ved at tage højde for malkerækkefølgen, god hygiejne ved personalets forberedelse samt gennemførelse af aseptisk forberedelse. Især i besætninger med formodentlig høj prævalens af køer med IMI med *Strep. agalactiae* og som ønsker sektionering af kørerne i inficerede og ikke inficerede dyr, kan dyrkning ikke anbefales pga. den lave Se_{DYRK} .

Konklusionen

PCR-test på mælk udtaget ved ydelseskontrollen kan være et værdifuldt værktøj til yversundhedsmanagement i kvægbesætninger. Ved lav Ct-værdi kan vi være meget sikre på, at koen faktisk er inficeret. Ved højere Ct-værdier bør resultaterne fortolkes ved at inddrage yderligere information, herunder CMT/celletal, besættningens nøgletal for yversundhed og effektive managementtiltag til at forebygge smitte. Yderligere studier er nødvendige for at vurdere omfang og betydning af overslæb og kontamination af patter.

Vi takker de deltagende landmænd for deres deltagelse i projektet og Carsten Grønbæk fra Eurofins for hjælp med den bakteriologiske dyrkning af prøverne. ■

Litteraturliste

1. Koskinen, M. T., Holopainen, J., Pyörala, S., Bredbacka, P., Pitkala, A., Barkema, H. W., Bexiga, R., Roberson, J., Solverod, L., Piccinini, R., Kelton, D., Lehmusto, H., Niskala, S., Salmikivi, L. Analytical specificity and sensitivity of a real-time polymerase chain reaction assay for identification of bovine mastitis pathogens. *Journal of Dairy Science* 2009, 92, 952-959.
2. Taponen, S., Salmikivi, L., Simojoki, H., Koskinen, M. T., Pyörala, S. 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* 2009, 92, 2610-2617.
3. Mahmmod, Y. S., Toft, N., Katholm, J., Gronbaek, C., Klaas, I. C. Estimation of test characteristics of real-time pcr and bacterial culture for diagnosis of subclinical intramammary infections with *Streptococcus agalactiae* in Danish dairy cattle in 2012 using latent class analysis. *Preventive Veterinary Medicine* 2013, 109, 264-270.
4. Mahmmod, Y. S., Klaas, I. C., Nielsen, S. S., Katholm, J., Toft, N. 2013. Effect of pre-sampling procedures on real-time pcr used for diagnosis of intramammary infections with *Staphylococcus aureus* in dairy cows at routine milk recordings. *Journal of Dairy Science*, 96, 2226-2233.
5. Mahmmod, Y. S., Mweu, M. M., Nielsen, S. S., Katholm, J., Klaas, I. C. Effect of carryover and presampling procedures on the results of real-time pcr used for diagnosis of bovine intramammary infections with *Streptococcus agalactiae* at routine milk recordings. *Preventive Veterinary Medicine* 2014, 113, 512-521.
6. Cederlöf, S. E., Toft, N., Aalbaek, B., Klaas, I. C. Latent class analysis of the diagnostic characteristics of pcr and conventional bacteriological culture in diagnosing intramammary infections caused by *Staphylococcus aureus* in dairy cows at dry off. *Acta Veterinaria Scandinavica* 2012, 54, 65.
7. Koskinen, M. T., Holopainen, J., Salmikivi, L., Lehmusto, H., Niskala, S., Kurkela, J. Analytical detection limit of the Patho-ProofTMMastitis PCR assay determined using two different experimental approaches. *Proceedings of international conference 30 Sep-2 Oct. 2008 (Mastitis control-From Science to Practice)*, 183-189. Wageningen Academic publishers, The Netherlands. Lam, T. J. G. M., Ed., 2008.
8. Laboratory Handbook on Bovine Mastitis, National Mastitis Council: 1999.
9. Dinsmore, R. P., English, P. B., Gonzalez, R. N., Sears, P. M., Schulte, H. F. Evaluation of methods for the diagnosis of *Streptococcus agalactiae* intramammary infections in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 1991, 74, 1521-1526.
10. Andersen, H. J., Pedersen, L. H., Aarestrup, F. M., Chriel, M. Evaluation of the surveillance program of *Streptococcus agalactiae* in Danish dairy herds. *Journal of Dairy Science* 2003, 86, 1233-1239.
11. Parker, K. I., Compton, C. W. R., Anniss, F. M., Heuer, C., McDougall, S. Quarter-level analysis of subclinical and clinical mastitis in primiparous heifers following the use of a teat sealant or an injectable antibiotic, or both, precalving. *Journal of Dairy Science* 2008, 91, 169-171.
12. Hui, S. L., Walter, S. D. Estimating the error rates of diagnostic tests. *Biometrics* 1980, 36, 167-171.
13. Nielsen, S. S., Houe, H., Ersbøll, A. K., Toft, N. Evaluating diagnostic tests. In *Introduction to Veterinary Epidemiology*, Houe, H., Ersbøll, A. K., Toft, N., Eds., Bio-folia: Frederiksberg, 2004, Chapter 9.
14. Bates, D., Maechler, M., Bolker, B. lme4: Linear mixed effects models using S4 classes. R package version 0.999375-42. <http://CRAN.R-project.org/package=lme4> accessed 26-6-2014.