



Norges miljø- og biovitenskapelige universitet

NMBU Veterinærhøgskolen  
Institutt for produksjonsdyrmedisin  
Seksjon for dyrevelferd, epidemiologi og  
samfunnsmedisin

Fordypningsoppgave 2021

Produksjonsdyrmedisin og mattrygghet

## **Milk Amyloid A i mjølk som diagnostisk markør for subklinisk mastitt hos norske mjølkekyr**

Milk Amyloid A in milk as a diagnostic marker for  
subclinical mastitis in norwegian dairy cows

Sofie Delphin-Solli, Guri Løfaldli Rindalsholt, Idunn Øien  
Kull 2015

Veiledere: Ingrid Toftaker, Håvard Nørstebø

## Innholdsfortegnelse

<b>Sammendrag</b> .....	<b>- 4 -</b>
<b>Definisjoner og forkortelser</b> .....	<b>- 6 -</b>
<b>Innledning</b> .....	<b>- 10 -</b>
Mastittøkonomi .....	- 10 -
Utvikling av mastitt .....	- 11 -
Påvisning av mastitt .....	- 12 -
Akutfaseproteiner .....	- 15 -
<b>Formål</b> .....	<b>- 17 -</b>
<b>Materiale og metode</b> .....	<b>- 18 -</b>
Studieutvalget og prøvetakingsmetoder .....	- 18 -
Laboratorieanalyser .....	- 19 -
Mastittstatus .....	- 20 -
Databehandling .....	- 21 -
Variable .....	- 24 -
Statistisk analyse .....	- 26 -
<b>Resultater</b> .....	<b>- 28 -</b>
Studieutvalget .....	- 28 -
Dager i laktasjon (DIM) .....	- 30 -
Laktasjonsnummer .....	- 30 -
Kalvingstidspunkt .....	- 31 -
MAA .....	- 33 -
Subklinisk mastitt og bakteriefunn .....	- 34 -
Statistisk analyse .....	- 35 -
MAA og laktasjonsnummer .....	- 35 -
MAA og dager i laktasjon (DIM) .....	- 37 -
MAA, subklinisk mastitt og bakteriefunn .....	- 38 -
Celletall og subklinisk mastitt .....	- 41 -
MAA og celletall .....	- 42 -
MAA som diagnostisk test for subklinisk mastitt .....	- 43 -
Celletall som diagnostisk test for subklinisk mastitt .....	- 46 -
<b>Diskusjon</b> .....	<b>- 48 -</b>
Vår studie .....	- 48 -
MAA .....	- 49 -
Subklinisk mastitt og bakteriefunn .....	- 51 -
MAA og dager i laktasjon (DIM) .....	- 52 -
MAA, laktasjonsnummer og subklinisk mastitt .....	- 52 -
MAA, subklinisk mastitt og bakteriefunn .....	- 53 -
Celletall .....	- 55 -
MAA og celletall .....	- 57 -
Validitet og begrensninger .....	- 59 -
Framtidsperspektiver .....	- 61 -

<b>Konklusjon</b> .....	<b>- 63 -</b>
<b>Takk til bidragsyttere</b> .....	<b>- 64 -</b>
<b>Summary</b> .....	<b>- 65 -</b>
<b>Referanser</b> .....	<b>- 67 -</b>

## Sammendrag

Tittel: Milk Amyloid A i mjølk som diagnostisk markør for subklinisk mastitt hos norske mjølkekyr

Forfattere: Sofie Delphin-Solli, Guri Løfaldli Rindalsholt og Idunn Øien

Veiledere: Ingrid Toftaker, Institutt for produksjonsdyrmedisin NMBU  
Veterinærhøgskolen, og Håvard Nørstebø, Spesialrådgiver TINE SA

I denne fordypningsoppgaven har formålet vært å undersøke egenskapene til akutfaseproteinet Milk Amyloid A (MAA) som diagnostisk markør for subklinisk mastitt hos norske mjølkekyr. Det ble tatt utgangspunkt i et datasett innhentet mellom 2016 og 2017 ved Senter for Husdyrforsk ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet. Studien ble gjennomført som en tverrsnittstudie, da vi kun beholdt én observasjon per ku. I vårt studieutvalg var kun klinisk friske kyr og kyr med subklinisk mastitt inkludert. Subklinisk mastitt ble definert etter gitte kriterier, basert på bakteriefunn på enkeltspenepøver. Av de 126 kyrne i vårt utvalg ble 12 definert til å ha subklinisk mastitt.

Vi har undersøkt om tidspunkt i laktasjonen, laktasjonsnummer, celletallsnivå, bakteriefunn og subklinisk mastitt påvirker nivået av MAA. Det ble funnet statistisk signifikant sammenheng mellom MAA og subklinisk mastitt, samt mellom MAA og bakteriefunn. Vi kom fram til gjennomsnittlige MAA-verdier for kyr med og uten subklinisk mastitt i vårt utvalg, på henholdsvis 20 774 ng/mL og 3 504 ng/mL. Vi undersøkte hvilken grenseverdi for MAA som ga best mulighet for å korrekt klassifisere kyr med subklinisk mastitt.

Grenseverdien på 2 459 ng/ml ga sensitivitet på 75 og spesifisitet på 64, som korrekt klassifiserte 9 av de 12 kyrne med subklinisk mastitt i vårt utvalg. Vi sammenlignet MAA og celletall sine egenskaper som diagnostisk test for subklinisk mastitt for kyrne i vårt utvalg. Vi

mener det er gode muligheter for at MAA i framtida kan brukes som supplement til celletall for å fange opp kyr med subklinisk mastitt.

## Definisjoner og forkortelser

<b>APP</b>	Akutfaseproteiner. Proteiner som øker i konsentrasjon i blodet ved en inflammasjon, infeksjon eller vevsskade. Eksempler: fibrinogen, haptoglobin, Serum Amyloid A, Milk Amyloid A
<b>AMS</b>	Automatic Milking System, mjølkerobot.
<b>Betennelsesceller</b>	Celler som bidrar i kroppens forsvar mot infeksjoner. Øker i antall ved infeksjon. Eksempler: makrofager, mononukleære celler, nøytrofile granulocytter.
<b>CMT</b>	California Mastitis Test/Schalmtest. Test som brukes til måling av celletall i mjølk. Reagensvæske blandes med mjølk, grad av geldannelse indikerer ulike nivåer av celletall.
<b>Ekstracellulærvæske</b>	Den delen av kroppens væske som finnes utenfor cellene.
<b>Friske smittebærere</b>	Ei ku som ikke er sjuk, men som har smittefarlige agens, for eksempel bakterier, og kan smitte og gi sjukdom hos andre kyr.
<b>Homeostase</b>	Opprettholdelse av væskemiljøet som omgir de enkelte celler hos en organisme, men hensyn på fysikalsk-kjemiske forhold.

<b>Immunglobuliner</b>	Antistoffer. Proteiner som binder seg til smittestoffer, og dermed bidrar til bekjempelse av infeksjoner.
<b>Infeksjon</b>	Når mikroorganismer øker i antall og fører til invasjon av og skade på slimhinner, hud og dypereliggende vev.
<b>Infektivitet</b>	Den evnen en mikroorganisme har til å forårsake en infeksjon.
<b>Inflammasjon</b>	Betennelse.
<b>Intramammær infeksjon</b>	Infeksjon i juret.
<b>Ionetall</b>	Mengden ioner, som $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ , $\text{Cl}^-$ , estimert i mjølk for å beregne konduktivitet.
<b>Isoform</b>	Proteiner som har samme funksjon i kroppen, men som kodes av ulike gener. Proteinene er foldet på ulike måter.
<b>Jurparenchym</b>	Jurvev. Parenchym er vev som består av celler som fysiologisk sett skaper organets funksjon.
<b>Klinisk mastitt</b>	Jurbetennelse som gir symptomer fra juret og/eller kua.
<b>Konduktivitet</b>	Mål på et materials evne til å lede strøm.
<b>Kukontrollen</b>	Mjølkeprodusenters informasjonssystem, hvor data om avstamning, mjølkeproduksjon, reproduksjon og helseregistreringer hos norske kyr samles.

	<p>Fungerer som et styringsverktøy i norsk mjølkeproduksjon, og er tilgjengelig for alle landets mjølkeprodusenter.</p>
<b>MAA</b>	<p>Milk Amyloid A, et akutfaseprotein som produseres i jurvevet og lever ved infeksjon. SAA og M-SAA3 sammen kalles MAA, og kan detekteres i mjølk.</p>
<b>Mastitt</b>	<p>Jurbetennelse.</p>
<b>Mikroorganismer</b>	<p>Mikroskopiske, encella organismer, for eksempel bakterier, virus, protozoer og noen sopparter.</p>
<b>Mjølkealveoler</b>	<p>Mjølkeblære. Blærer i juret, hvor innsiden består av epitelceller som produserer mjølk.</p>
<b>M-SAA3</b>	<p>En isoform av SAA, som produseres lokalt i jurvevet.</p>
<b>NMBU</b>	<p>Norges miljø- og biovitenskapelige universitet.</p>
<b>Normalflora</b>	<p>Mikroorganismer som normalt finnes på hud og slimhinner.</p>
<b>NRF</b>	<p>Norsk Rødt Fe.</p>
<b>Nøytrofile granulocytter</b>	<p>En betennelsescelle. Øker typisk ved bakterieinfeksjoner.</p>
<b>OCC</b>	<p>Online Cell Count. DeLavals system for måling av celletall direkte på mjølkeroboten.</p>



<b>Opportunistisk</b>	En mikroorganisme som vanligvis ikke forårsaker sykdom, men som kan gi infeksjoner når den normale bakteriefloraen forstyrres, eller når viktige komponenter i immunsystemet svikter.
<b>Patogen</b>	Sjukdomsframkallende. Patogene bakterier har evne til å skape infeksjon og sykdom.
<b>QMS</b>	Quarter Milk Samples/enkeltspenepøver.
<b>Reservoar</b>	Mikroorganismers oppholdssted, enten i miljøet eller i andre levende organismer.
<b>SAA</b>	Serum Amyloid A, et akutfaseprotein.
<b>SCC</b>	Somatic Cell Count/celletall. Celler i mjølk, bestående av jurepitelceller og betennesceller. Stiger ved en infeksjon i juret.
<b>SHF</b>	Senter for husdyrforskning, en del av NMBU på Ås.
<b>Subklinisk mastitt</b>	Jurbetennelse som ikke gir symptomer fra kua eller juret, sees gjerne kun som forhøyet celletall.

## **Innledning**

Mastitt er den hyppigst forekommende og mest økonomisk tapsbringende sjukdommen hos mjølkekyr i Norge, og ellers i verden (Seegers et al., 2003; Tranås, 2021). Mastitt er definert som en inflammasjonsprosess i jurparenchymet, uavhengig av utløsende årsak (Bull, 2011). Inflammasjonen skyldes ikke nødvendigvis en infeksjon, da den også kan oppstå på grunn av fysiske irritasjoner eller traumer på juret. Et traume vil gi en rekruttering av betennelsesceller som vil gi en inflammasjon i juret uten tilstedeværelse av mikroorganismer. Dersom det er mikroorganismer til stede i juret kalles det intramammær infeksjon, og dersom det er en samtidig inflammasjonsrespons kalles det mastitt. En intramammær infeksjon uten verken kliniske tegn eller økt celledtall defineres dermed ikke som mastitt. Infeksjoner i juret er den klart viktigste årsaken til utvikling av mastitt (Reksen, 2015).

## **Mastittøkonomi**

Mastitt er en viktig årsak til økonomisk tap i mjølkeproduksjonen over store deler av verden (Deb et al., 2013; DeGraves & Fetrow, 1993). Forekomst av mastitt i besetningen kan påvirke bondens økonomi negativt på flere måter. Noe av det mest tydelige for bonden selv er selvfølgelig de direkte kostnadene som går til veterinærbehandling av kyr med klinisk mastitt, og kasting av mjølk grunnet tilbakeholdelsestider etter medikamentell behandling. Inntekt tapes også ved at mjølke kvaliteten blir dårligere ved mastitt, noe som gir redusert utbetaling fra meieriet. Mastitt kan også føre med seg noen skjulte kostnader, ved at det fører til produksjonstap hos kua, grunnet redusert mjølkeproduksjon fra affisert kjertel. Dette som følge av stengte mjølkeganger grunnet innvekst av arrvev, ødelagte mjølkesekrerende celler og forstyrrelse av blodsirkulasjonen i juret (Haque, 2014; Sølverød & Whist, 2017). Ei ku som har blitt "satt tilbake" av mastitt vil ha vanskeligheter for å oppnå sitt fulle produksjonspotensial. I Norge var, ifølge "Helsekortordningen, storfe statistikk-samling" av

Olav Østerås i TINE, de gjennomsnittlige årlige kostnadene knyttet til mastitt 19 146 kr per besetning i 2016 (Østerås, 2016). Kostnadene varierer naturligvis mellom ulike besetninger.

## Utvikling av mastitt

Infeksjoner i juret kan forårsakes av enten strikt patogene eller opportunistiske mikroorganismer. Disse mikroorganismene er i de fleste tilfeller bakterier, men kan også være virus eller sopp. For at det skal utvikles en infeksjon i juret må mikroorganismene ha et reservoar, enten hos dyra eller i miljøet, og det må skje en vellykket overføring fra reservoaret over til spenekanalen. Deretter må det foregå en invadering av jurvet gjennom spenekanalen, og mikroorganismene må så kunne etablere og oppformere seg inne i selve juret (Reksen, 2015).

Bakteriene som kan forårsake mastitt deles gjerne inn i smittsomme mastittbakterier og miljømastittbakterier (Sølverød & Whist, 2017). *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae* og *Streptococcus agalactiae* er de vanligste smittsomme mastittbakteriene i Norge (Sølverød & Whist, 2017). Friske smittebærere i fjøset er den viktigste risikofaktoren for utbrudd av smittsomme mastitter. Om det er flere slike kyr i en besetning kan det enkelt utvikle seg til et besetningsproblem med dårlig jurhelse, da friske smittebærere ikke blir oppdaget av bonden. Bakterier som *Staphylococcus aureus* og *Streptococcus dysgalactiae* finnes normalt på hud, i sår og på slimhinner i juret, og kyr kan utvikle mastitt ved at egne bakterier overføres til speneåpningen og gir en infeksjon. Rutiner rundt mjølking, som hygiene og vedlikehold av mjølkeanlegget, er viktig for å hindre spredning av de smittsomme mastittbakteriene (Sølverød & Whist, 2017).

Miljømastittbakterier har reservoar i miljøet rundt kyrne, og det er her de blir eksponert og eventuelt smittet. De vanligste miljømastittbakteriene er *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis*, *Trueperella pyogenes*, *Klebsiella* sp., *Enterococcus* sp. og Koagulase Negative Stafylokokker (KNS) (Sølverød & Whist, 2017). Dette er bakterier som trives i fuktig miljø, som møkk og gjørmete beiter, og mange av dem er en del av kyrnes normalflora (Sølverød & Whist, 2017). God hygiene i fjøset og rundt mjølking, samt gode beiteforhold, er viktige forebyggende tiltak.

### **Påvisning av mastitt**

Mastitt kan være klinisk eller subklinisk. Celletall (Somatic Cell Count; SCC) i mjølka er det hjelpemiddelet som er vanligst å bruke for å detektere mastitt, sammen med kliniske tegn hos kua. Celletall har blitt brukt som en anerkjent indikator på inflammasjon i juret siden 1960-tallet (Pyörälä, 2003), og har inngått i Kukontrollen som et mål på jurhelse siden 1982 (Osterås & Sølverød, 2009). Celletallet utgjøres hovedsakelig av betennelsesceller, som nøytrofile granulocytter, makrofager og mononukleære celler, i tillegg til celler fra jurets slimhinne (Hussein et al., 2018). I et friskt jur vil mellom 1 og 11 % av celletallet bestå av nøytrofile granulocytter, mens andelen av disse kan stige opp til 90 % ved en intramammær infeksjon (Hussein et al., 2018). Celletallet kan være forhøyet ved både klinisk og subklinisk mastitt.

De vanligste tegnene ved klinisk mastitt er smerte, varme, rødme og hevelse i juret, samt mulig nedsatt allmenntilstand og endret temperatur hos kua (Reksen, 2015). Det kan også være sekretforandringer i mjølka, som fargeforandringer og slintrer.

Ved subklinisk mastitt vil ikke kua være allment påvirket, og det vil ikke være synlige tegn på inflammasjon i juret eller synlige forandringer i mjølka (Haque, 2014). Det eneste tegnet ved subklinisk mastitt er gjerne forhøyet celletall i mjølka, og/eller endret pH og konduktivitet.

Kyr med subklinisk mastitt vil være utfordrende å ha i en besetning, da de kan være vanskelig for bonden å oppdage, nettopp på grunn av manglende kliniske tegn (Jaeger et al., 2017). De kan dermed være en smittekilde til mastitt hos andre kyr. Mjølkekvaliteten og –mengden vil være påvirket både ved klinisk- og subklinisk mastitt (Hussein et al., 2018).

Å tidlig oppdage kyr med subklinisk og klinisk mastitt er viktig for å raskt kunne sette i gang nødvendige tiltak. Man vil slik begrense omfanget av mastitten, både med tanke på skader i juret hos den enkelte kua, og smittepotensialet for andre kyr i besetningen. Både kyr med subklinisk og klinisk mastitt kan ha forekomst av mastittagens i juret, som kan overføres til andre dyr i besetningen. Som nevnt tidligere vil begge mastittformene påvirke bondens økonomi negativt. I tillegg vil særlig klinisk mastitt virke negativt inn på kuas velferd, da dette er en smertefull tilstand.

I TINEs jurhelsebok beskrives det at normalt celletall for friske, norske kyr er mellom 10 000 og 50 000 celler/mL (Sølverød & Whist, 2017). Ifølge studiene til Petzer et al. (Petzer et al., 2017) og Schwarz et al. (Schwarz et al., 2011) regnes et jur for å være friskt ved et celletall på mindre enn 100 000 celler/mL. Det er derimot satt en grenseverdi for kategorisering av mastitt på 200 000 celler/mL for å ta hensyn til naturlige variasjoner hos kua, og eventuelle feil ute i felt (Dohoo & Leslie, 1991; Sumon et al., 2020; van den Borne et al., 2010). I Kukontrollen brukes grensen på 200 000 celler/mL for å beregne parameterne infeksjonsnivå og nyinfeksjonshastighet (Sølverød & Whist, 2017).

Ifølge Lakic et al. (Lakic et al., 2009) vil celletallet påvirkes av flere faktorer hos kua, og et forøket celletall tilsier ikke alltid en infeksjon i juret. Faktorer celletallet påvirkes av er blant annet kuas laktasjonsnummer, dager i laktasjon, årstid, stress, oppstillings- og driftsforhold, og dag-til-dag variasjoner hos den enkelte ku (Pyörälä, 2003; Sølverød & Whist, 2017). Ifølge TINEs jurhelsebok (Sølverød & Whist, 2017) vil celletallet variere gjennom laktasjonen, med høyere celletall like etter kalving og mot avsining. Det er også vist at mjølkingsfrekvens påvirker celletallet, da kyr som blir mjølka tre ganger daglig har lavere celletall enn kyr som blir mjølka to ganger daglig (Pyörälä, 2003). En celletallsmåling gir et øyeblikksbilde av jurhelsestatusen, da det kan være svært fluktuerende. Celletallet kan øke fra 10 000 til 1 500 000 celler/mL i løpet av få timer, og deretter være tilbake på normalt nivå noen timer senere (Sølverød & Whist, 2017).

Det er vanlig å benytte seg av Schalmtest (California Mastitis Test; CMT) for å få en indikasjon på celletall hos kyr. Dette er en enkel test som bonden selv kan utføre, og gir et indirekte mål på celletallet. Testen utføres ved å blande like deler mjølk og reagensvæske på et brett med fire brønner, én til hver spene. Det vil dannes en stadig mer viskøs gel ved stigende celletall i mjølka. Testen leses av på en skala fra 1 til 5, ut ifra grad av viskositet og eventuell geldannelse (Reksen, 2015). Reagensvæsken som brukes i testen har i tillegg en indikatorfarge som endrer farge fra blå til fiolett ved høy pH ( $\geq 7.0$ ), og fra blå til gul ved lav pH ( $\leq 5.2$ ) (Sølverød & Whist, 2017). pH-en i mjølka vil øke ved mastitt, fra 6.6 – 6.8 til nærmere blodets pH på 7.4 (Reksen, 2015). Dette skyldes at blod-mjølkk-barrieren skades ved mastitt, og blodkomponenter som immunglobuliner, akutfaseproteiner og betennelsesceller, samt ekstracellulærvæske, vil lekke over til mjølkealveolene (Nguyen & Neville, 1998; Wall et al., 2016). Dette fører til en stigning i pH, da blodkomponentene er mer basiske enn mjølk (Kandeel et al., 2019). En alternativ metode for å måle pH i mjølk er pH-papir

(bromtymolpapir). Papiret har ett felt for hver spene, som vil få et fargeomslag fra gult til blått ved økt pH.

Tradisjonelt har celletall blitt målt i samlemjølk fra gårdstanken ved mjølkehenting, samt gjennom månedlige veieprøver fra enkeltkyr sendt inn gjennom Kukontrollen. Dette har blitt gjort for å kunne overvåke jurhelse hos mjølkekyr i Norge. Det er mulig for bønder med mjølkerobot (Automatic Milking System; AMS) å kjøpe tilleggsutstyr til mjølkeroboten. Da kan man måle celletall for hver ku ved hver mjølking, og på den måten få en mer kontinuerlig overvåking av jurhelsen i besetningen. For DeLaval kalles dette systemet DeLaval Online Cell Counter (OCC). OCC-målinger skal være like pålitelige som de tradisjonelle celletallmålingene (Dalen et al., 2019).

I fjøs med mjølkerobot er det også muligheter for å måle konduktiviteten, elektrisk ledningsevne, i mjølka. Dette systemet kan brukes som et hjelpemiddel for å oppdage kyr med uregelmessigheter i mjølka, og forhindre at denne mjølka havner på tanken. Konduktiviteten er basert på økt ionetall i mjølka, spesielt natrium ( $\text{Na}^+$ ), kalium ( $\text{K}^+$ ) og klorid ( $\text{Cl}^-$ ) (Pyörälä, 2003). Det er en rekke faktorer som påvirker mjølkas ionesammensetning, blant annet lekkasje av blodkomponenter over i mjølka, som ved mastitt. Konduktiviteten i mjølka påvirkes også av mjølkas pH og sammensetning av fett (Pyörälä, 2003). I likhet med celletallet vil konduktiviteten variere mye, både mellom og innad i mjølkinger (Sølverød & Whist, 2017).

## **Akutfaseproteiner**

Akutfaseproteiner (Acute Phase Protein; APP) har blitt stadig mer interessante som diagnostiske biomarkører innen veterinærmedisin. Dette er proteiner som produseres

hovedsakelig i lever, og som går ut i serum som en del av akutfaseresponsen til immunsystemet ved en inflammasjon, vevsskade eller infeksjon (Eckersall & Conner, 1988; Mackiewicz, 1997). Formålet med en akutfase er å isolere og ødelegge det eventuelt infektive agenset, opprette homeostase og bidra til helingsprosessen (Tóthová et al., 2018). Ved en akutfase kan konsentrasjonen av akutfaseproteiner få en kraftig økning, men vil raskt stabilisere seg etter at stimuli er fjernet (Petersen et al., 2004). Det finnes en rekke aktuelle akutfaseproteiner innen veterinærmedisin, blant annet Serum Amyloid A (SAA), C-reaktivt protein (CRP), haptoglobin (Hp) og fibrinogen.

Hvilke akutfaseproteiner som er mest reaktive varierer fra art til art. De mest sensitive akutfaseproteinene hos storfe er haptoglobin og SAA (Eckersall & Bell, 2010). Ved en normaltilstand er konsentrasjonen av akutfaseproteiner i serum så lav at den nærmest ikke er mulig å måle (Petersen et al., 2004). Ifølge Safi et al. (Safi et al., 2009) kan derimot konsentrasjonen av haptoglobin og SAA hos storfe øke flere hundre ganger i respons på en akutt inflammasjon.

SAA kan komme over i mjølka ved at blod-mjølkebarrieren svekkes ved en mastitt (Eckersall et al., 2001). I tillegg finnes det en egen isoform av SAA, M-SAA3, som produseres direkte fra jurets epitelceller (McDonald et al., 2001). SAA og M-SAA3 sammen kalles Milk Amyloid A (MAA), og kan detekteres i mjølk (Jaeger et al., 2017). I studiene av Hussein et al. (Hussein et al., 2018), Gerardi et al. (Gerardi et al., 2009), Grönlund et al. (Grönlund et al., 2005) og Safi et al. (Safi et al., 2009) er MAA foreslått som en sensitiv indikator for både klinisk og subklinisk mastitt hos mjølkekyr.



## **Formål**

Det overordnede målet med denne fordypningsoppgaven var å undersøke egenskapene til MAA som diagnostisk markør for subklinisk mastitt. Det overordnede målet skulle nås gjennom to delmål:

1. Å gjøre en deskriptiv sammenligning av MAA-verdier for ulike tidspunkter i laktasjonen, for ulike laktasjonsnummer og for ulike celletallsnivåer.
2. Å estimere sensitivitet og spesifisitet for MAA som diagnostisk test for subklinisk mastitt.

# Materiale og metode

## Studieutvalget og prøvetakingsmetoder

Studieutvalget vårt er tidligere beskrevet i en studie av Dalen et al. (Dalen et al., 2019) om bruk av celletall for deteksjon av intramammær infeksjon. Data ble hentet inn fra en besetning ved Senter for husdyrforsøk (SHF) ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU) på Ås. Perioden for datainnsamling strakk seg over 17 måneder, fra 5. januar 2016 til 22. mai 2017, i en longitudinell observasjonsstudie. Vi beholdt imidlertid bare én observasjon per ku (beskrevet senere), og denne studien kan derfor betraktes som en tverrsnittstudie. Totalt ble det tatt prøver av 173 kyr. Kyrne som inngikk i studien var alle av rasen Norsk Rødt Fe (NRF), og samtlige hadde pålitelig ID-merking. De var oppstallet i løsdrift, i to like binger med identiske mjølkeroboter av typen DeLaval VMS (Voluntary Milking System). Kyrne ble i snitt mjølka 2.6 ganger daglig i studieperioden, og gjennomsnittlig daglig mjølkeproduksjon per ku var 27.9 kg mjølk (Dalen et al., 2019). Kalvingene i besetningen var semikonsentrerte, med hovedvekt i høstmånedene. Besetningen var medlem av Kukontrollen, og sendte inn månedlige mjølkeprøver for kvalitetskontroll.

Mjølkerobotene var utstyrt med en celletallsmåler (Online Cell Counter), som måler celletall (Online Cell Counts; OCC) for hver enkelt ku ved hver mjølking. Dette gjøres ved at det tas ut prøve fra luftutskiller, hvor mjølk fra de fire spenekoppene møtes. Systemet i roboten var justert for å unngå restmjølk, og dermed hindre forurensing av mjølk fra ei ku til den neste (Dalen et al., 2019). Av 96 542 mjølkinger manglet celletallsmåling for ca. 15 %. Mangelfull måling skyldtes enten feil med roboten, eller mangelfull service av celletallsmåleren og påfylling av reagens. I henhold til Dalen et al. (Dalen et al., 2019) var det et gjennomsnittlig celletall i studieperioden på 115 103 celler/mL, basert på de daglige celletallsmålingene foretatt av mjølkerobotene.

I tillegg til OCC-målingene ved hver mjølking ble det innhentet enkeltspenepøver (Quarter Milk Samples; QMS) månedlig fra alle lakterende kyr. Prøvene ble tatt ut av veterinært personell etter anbefalte retningslinjer fra TINE. Ved å følge retningslinjene gitt i TINEs “Veiledning i uttak av spenepøver”, er det forhåndsbestemt hvilket prøveglass som tilhører hvilken spene. Det er stort fokus på hygiene før, under og etter prøveuttak, og veiledning for korrekt oppbevaring og forsending av spenepøvene (TINE-Mastittlaboratoriet-Molde, 2019). Totalt ble det samlet inn 5 330 enkeltspenepøver. Av disse prøvene ble det foretatt mikrobiologiske analyser, i tillegg til MAA-målinger.

### **Laboratorieanalyser**

Alle mjølkeprøver ble fryst etter uttak og under transport, før de ble tint på laboratoriet for mikrobiologiske analyser. Disse analysene ble utført etter standard prosedyrer (Hogen, 1999).

Det ble sådd ut 0.01 mL mjølk fra hver spenepøve på blodagarskåler av storfeblod med esculin. Skålene ble deretter inkubert ved 37 °C, og avlest etter 24 og 48 timer.

Artsbestemmelse av bakteriene ble gjort ved hjelp av MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry) Microflex LT (Chauzeville, 2015).

Prøvene med mer enn to morfologisk ulike kolonytyper ble vurdert som kontaminerte, og ble ekskludert fra videre analyser.

De samme spenepøvene ble analysert for nivå av Milk Amyloid A (MAA). Det ble brukt et ELISA-kit fra Tridelta, med navn PHASE Milk Amyloid A (TrideltaDevelopment, 2011).

Resultatene ble oppgitt i ng/mL. Laveste deteksjonsgrense for testen er 0.10 µg/mL.

## Mastittstatus

I studien av Dalen et al. (Dalen et al., 2019) ble bakteriefunn registrert på spenenivå. I og med at celletall var registrert for hver enkelt ku, ble resultatene av bakteriefunn også omgjort til å gjelde ei og ei ku. Det vil si at ei ku ble definert til å ha bakteriefunn, dersom den hadde bakteriefunn på én eller flere spener. Hovedmålet i studien av Dalen et al. (Dalen et al., 2019) var å detektere episoder av subklinisk mastitt forårsaket av mastittpatogener. Bakteriene ble delt i to grupper, basert på kjent forventet økning i celletall ved subklinisk mastitt.

Patogengruppe 1 besto av bakteriearter som typisk forventes å gi stor økning i celletall. Andre kjente mastittpatogener, som ikke passet inn i gruppe 1, ble plassert i patogengruppe 2 sammen med resterende påviste bakteriearter.

Tabell 1. Oversikt over inndeling av mastittpatogener i to patogengrupper, i en fordypningsoppgave om Milk Amyloid A i mjølk. Tabellen er basert på informasjon fra Dalen et al. (Dalen et al., 2019).

<b>Patogengruppe 1</b>	<b>Patogengruppe 2</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Corynebacterium bovis</i>
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	<i>Staphylococcus chromogenes</i>
<i>Streptococcus uberis</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Aerococcus viridans</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Staphylococcus hominis</i>
<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Staphylococcus xylosus</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+ andre påviste bakteriearter
<i>Staphylococcus simulans</i>	

For at ei ku skulle bli definert til å ha en episode med subklinisk mastitt måtte minst ett av følgende tre kriterier være oppfylt: (1)  $\geq 1\ 000$  cfu/mL av ett enkelt patogen fra én prøve i minst én spene, (2)  $\geq 500$  cfu/mL av et patogen ble påvist i 2 av 3 påfølgende prøver fra samme spene, eller (3)  $\geq 100$  cfu/mL av et patogen ble påvist i 3 påfølgende prøver fra samme spene. Kriteriene ble satt i henhold til definisjonen fra Zadoks et al. (Zadoks et al., 2002). Disse kriteriene tar ikke hensyn til celletallsmålinger eller andre indikatorer på inflammasjon. Kyr med speneprøver med bakteriefunn, som ikke oppfylte noen av disse kriteriene, ble regnet som forbigående koloniserte (Nørstebø et al., 2019). Disse kyrne ble altså ikke vurdert til å ha subklinisk mastitt.

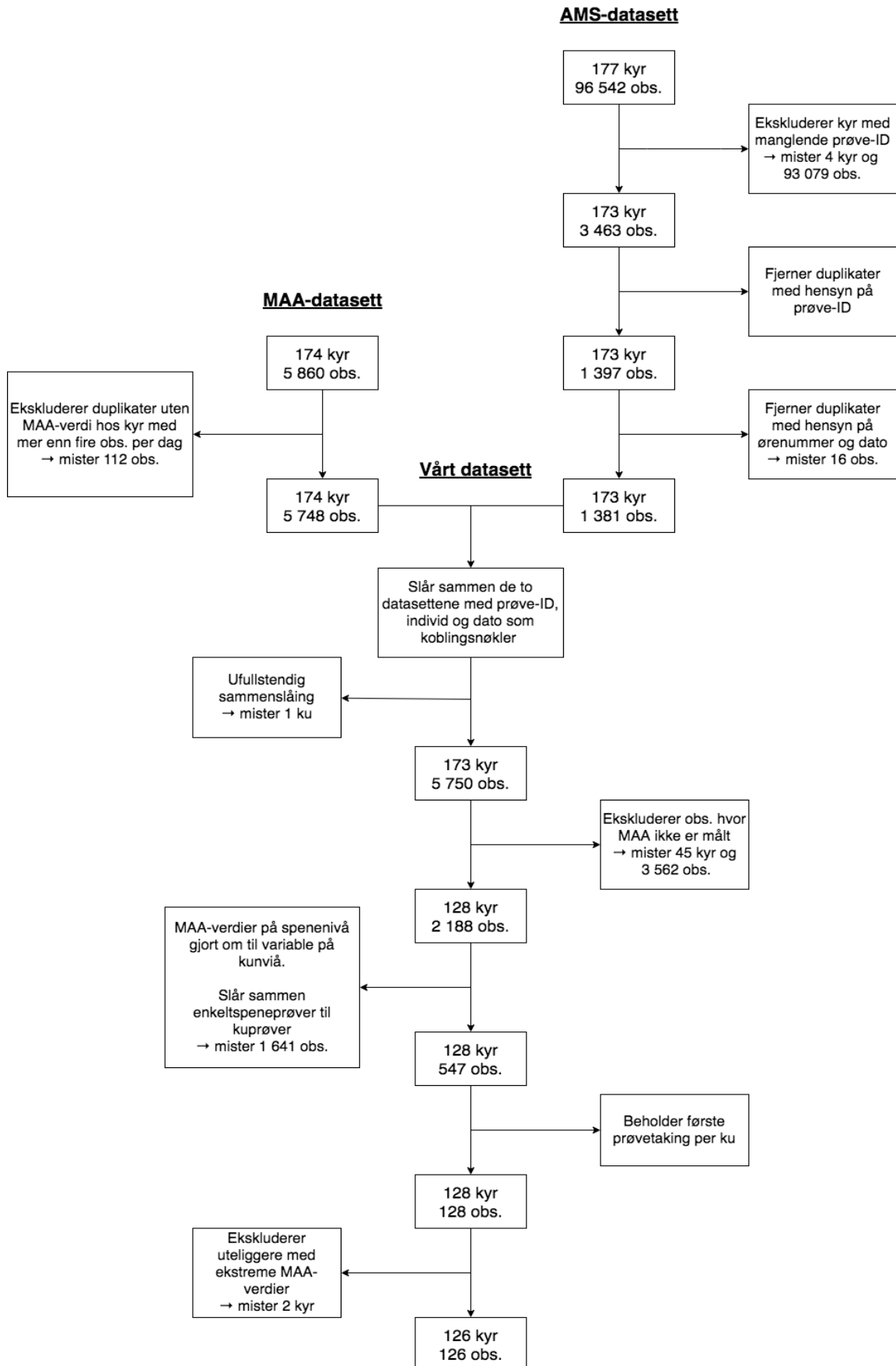
Ved mistanke om klinisk mastitt ble kyr undersøkt av veterinær. Kyrne ble plukket ut av røktene ved SHF basert på generelle kliniske symptomer, inkludert nedsatt matlyst, letargi eller forhøyet rektal temperatur. Kyr som fikk veterinærbehandling for mastitt ble flyttet over til en sjukebinge uten mjølkerobot, og ble ikke prøvetatt under behandlingsperioden. Studien omfattet derfor kun prøvemateriale fra klinisk friske kyr og kyr med subklinisk mastitt (Dalen et al., 2019).

## **Databehandling**

Vi brukte dataprogrammet Stata (Stata/SE 16) (StataCorp., 2019) til all databehandling, og for å gjøre statistiske analyser. Vi tok utgangspunkt i to datasett; ett med målingene fra AMS-systemet, samt bakteriestatus basert på innsendte speneprøver, og ett datasett med MAA-analysene gjort på de samme innsendte speneprøvene. I datasettene er hver ku/individ identifisert med ørenummer (*tag*), og har en egen prøve-ID (*sample\_id*) for de dagene det er tatt ut speneprøver. Hver ku har en unik prøve-ID for hver prøvetakningsdato.

De to datasettene måtte kobles sammen før vi kunne begynne videre analyse av datasettet. Før det kunne gjøres måtte datasettene vaskes. Fordi MAA måles på enkeltspenenivå, skal det kun være fire målinger per ku på hver prøvetakingsdato. I MAA-datasettet så vi at det var kyr som hadde flere enn fire datalinjer per dato. De ekstra datalinjene manglet MAA-måling, og ble derfor slettet. I AMS-datasettet ekskluderte vi alle observasjoner som ikke var koblet til en prøve-ID. AMS-datasettet inneholdt svært mange duplikate observasjoner, det vil si identiske datalinjer. Alle duplikate observasjoner ble med hensyn på prøve-ID redusert til én datalinje per prøve.

Datasettene ble slått sammen med prøve-ID, individ og dato som koblingsnøkler. Vi ekskluderte ett individ som kun fantes i det ene datasettet. Deretter fjernet vi alle observasjoner hvor MAA ikke var målt. For å unngå å måtte ta hensyn til repeterte målinger per ku i analysen ønsket vi kun å beholde én observasjon per ku. Derfor valgte vi å beholde første prøvetaking for hver ku. MAA-verdier på spenenivå ble slått sammen til kunivå, som beskrevet nærmere i neste avsnitt. Vi endte dermed opp med 128 kyr, med tilsvarende antall observasjoner. To av kyrne i datasettet hadde meget ekstreme MAA-verdier (uteliggere), og ble derfor ekskludert fra vårt datasett. Totalt endte vi opp med 126 kyr og 126 observasjoner i det endelige datasettet vårt. Se Figur 1 for detaljert beskrivelse av databehandlingen, og ulike eksklusjoner.



Figur 1. Flytskjema som viser databehandlingen, i en fordypningsoppgave om Milk Amyloid A i mjølk.

## Variable

### *Milk Amyloid A*

For å lettere kunne undersøke sammenhengen mellom MAA-verdier og andre variable, måtte vi generere en rekke nye MAA-variable. De nye variablene ble generert i forkant av at observasjoner på enkeltspenenivå ble gjort om til kunivå. De er altså basert på MAA-målinger fra alle fire spener hos hver ku på den gitte prøvedatoen. Det var en rekke MAA-målinger med verdi 0. Vi genererte en ny variabel hvor vi la på 1 ng/mL på alle MAA-målingene, for å kunne gjøre log-transformering. Deretter brukte vi den nye variabelen til å generere en rekke andre MAA-variable. De nye variablene var: hver enkelt ku sin laveste og høyeste MAA-verdi (*min\_maa* og *max\_maa*), gjennomsnittlig MAA-verdi på de fire spenene (*avg\_maa*), og differansen mellom høyeste og laveste verdi (*diff\_maa*). Vi så at fordelingen av MAA var veldig skjevfordelt hos de 126 kyrne i vårt utvalg. Derfor besluttet vi å lage en log-transformert variabel for gjennomsnittlig MAA (*log\_avg\_maa*). Dette gjorde vi for å enklere kunne framstille sammenligninger av variable grafisk.

- *Min\_maa*: hver ku sin laveste MAA-verdi på spenenivå (den spenen med lavest verdi av de fire spenene), målt i ng/mL.
- *Max\_maa*: hver ku sin høyeste MAA-verdi på spenenivå (den spenen med høyest verdi av de fire spenene), målt i ng/mL.
- *Avg\_maa*: gjennomsnittet av MAA-målingene fra hver spene (det vil si fire målinger), målt i ng/mL.
- *Diff\_maa*: differansen mellom hver enkelt ku sin høyeste (*max\_maa*) og laveste (*min\_maa*) MAA-verdi på spenenivå, målt i ng/mL.
- *Log\_avg\_maa*: log-transformert variabel for hver enkelt ku sin gjennomsnittlige MAA-verdi (*avg\_maa*).



### ***Subklinisk mastitt***

I AMS-datasettet var det lagd egne variable for de to ulike patogengruppene, med navn *pat1* og *pat2*. Disse variablene var binære, og kyrne fikk verdi 0 eller 1 avhengig av dyrkningsresultatet på speneprøvene. Vi genererte en ny variabel, *anypat*, som fikk verdi 1 dersom det var bakteriefunn fra enten fra patogengruppe 1 eller 2. Det var også egne binære variable for subklinisk mastitt, *pat1imi* og *pat2imi*, avhengig av hvilken patogengruppe det forårsakende agenset hørte til. For å få verdi 1 på disse variablene måtte minst ett av kriteriene for subklinisk mastitt etter definisjonen til Zadoks et al. (Zadoks et al., 2002) være oppfylt. Basert på *pat1imi* og *pat2imi* genererte vi variabelen *anyimi*. Denne variabelen ga oss muligheten til å framstille subklinisk mastitt uavhengig av bakterieart.

- *Anypat*: binær variabel som angir bakteriefunn på speneprøvene. Denne variabelen har verdi 1 ved bakteriefunn, og verdi 0 når det ikke er noe vekst.
- *Anyimi*: binær variabel som angir om kyrne har subklinisk mastitt eller ikke. Verdi 1 tilsvarer subklinisk mastitt, etter kriterier satt av Zadoks et al. (Zadoks et al., 2002). Verdi 0 tilsier at kua ikke er definert til å ha subklinisk mastitt.

### ***Kalvingstidspunkt og laktasjonsnummer***

For oversiktlig framstilling av data var det hensiktsmessig å gjøre om kalvingsdato til en kategorisk variabel. Vi genererte derfor en ny variabel, *month*, basert på hvilken måned kua kalvet i. Deretter definerte vi hvilke måneder som hørte til hvilken årstid, og genererte variabelen *season*. Det er denne variabelen vi har brukt i framstillinger av studietutvalget. Vi genererte også variabelen *lactgroup*, som grupperte kyrne i to grupper basert på laktasjonsnummer. Én gruppe for førstelaktasjon, og én for resterende laktasjoner. De to gruppene ble kalt laktasjonsgruppe 1 og laktasjonsgruppe 2. Dermed kunne vi undersøke om det var noe forskjeller mellom de to gruppene når vi sammenlignet dem med ulike variable.

### ***Celletall***

AMS-datasettet inneholdt flere variable for celletallsmålinger, målt av mjølkerobotens celletallsmåler (Online Cell Counter). Vi valgte å bruke variabelen *avg\_occ\_7* til våre sammenligninger, som oppga det gjennomsnittlige celletallet for hver ku de siste 7 dagene før prøvetaking. Ved å velge denne variabelen håpet vi å unngå tilfeldig variasjon på enkeltmålingene av OCC, da celletallet påvirkes av en rekke andre faktorer enn kun subklinisk mastitt. I tillegg konkluderte studien til Dalen et al. (Dalen et al., 2019) at denne variabelen var best for deteksjon av subklinisk mastitt forårsaket av mastittpatogener i patogengruppe 1. I vårt utvalg manglet 3 av kyrne en verdi for *avg\_occ\_7*, og disse kyrne ble dermed ekskludert fra framstillinger med denne variabelen.

### **Statistisk analyse**

Vi sammenlignet nivået av MAA ved ulike dager i laktasjonen og ved forskjellige laktasjonsnummer. Vi sammenlignet også MAA-verdier hos kyr med og uten bakteriefunn og subklinisk mastitt. For å vurdere om det var en statistisk signifikant sammenheng mellom MAA-nivå og laktasjonsnummer utførte vi Mann and Whitney ranksum-test. Dette er en ikke-parametrisk hypotesetest. Vi satte signifikansnivået på 0.05. Vi utførte den samme testen for MAA-nivå og bakteriefunn (*anypat*), MAA-nivå og subklinisk mastitt (*anyimi*), samt laktasjonsnummer og subklinisk mastitt (*anyimi*). Gjennom et spredningsplott undersøkte vi sammenhengen mellom MAA og dager i laktasjonen. Vi gjorde det samme for MAA og celletall (*avg\_occ\_7*).

For å evaluere hvorvidt MAA kunne brukes som diagnostisk test for subklinisk mastitt, ville vi finne den grenseverdien som ga oss høyest mulig sensitivitet (Se) og spesifisitet (Sp). Vi gjorde en visuell evaluering (Figur 10) av hvordan ulike grenseverdier for MAA påvirket

sensitivitet og spesifisitet med hensyn på å predikere subklinisk mastitt (*anyimi*). Deretter brukte vi den grenseverdien som ga høyest mulig sensitivitet og spesifisitet på samme tid for å generere en ny binær variabel for *avg\_maa*. Denne variabelen fikk navnet *scm*, som står for subklinisk mastitt. Vi undersøkte også *avg\_occ\_7* sine egenskaper som diagnostisk test. Vi brukte grenseverdien som i dette utvalget ga høyest mulig sensitivitet og spesifisitet, samt grenseverdier funnet i litteraturen. Vi ekskluderte kyr som manglet måling for *avg\_occ\_7*, slik at vi analyserte det samme utvalget av kyr for både *avg\_maa* og *avg\_occ\_7*.

# Resultater

## Studieutvalget

I vårt datasett sto vi igjen med 126 kyr som utgjorde vårt studieutvalg. Kun første måling per ku var inkludert, og hver av de 126 kyrne bidro med én verdi for hver variabel. Studieenheten var ei ku, og alle variable var på kunivå. Tabeller og figurer i denne oppgaven er basert på målingene til disse 126 kyrne.

Innsamling av data foregikk over en periode på 17 måneder, og det ble totalt sendt inn speneprøver på 16 ulike datoer i løpet av studieperioden. Ved å velge første prøvetakingsdato for hver ku endte vi opp med fem av disse datoene i vårt studieutvalg, alle mellom januar og mai 2016. Vi ser av Tabell 2 at 89 av kyrne (71 %) hadde prøvetakingsdato 12. januar 2016.

Tabell 2. Fordeling av datoer for innsendte speneprøver for de 126 kyrne i studieutvalget.

Første prøvetakingsdato er valgt ut for hver ku, i en fordypningsoppgave om Milk Amyloid A i mjølk.

<b>Prøvetakingsdato</b>	12.01.16	01.02.16	29.02.16	26.04.16	18.05.16
<b>Antall kyr</b>	89 (71 %)	7 (6 %)	6 (5 %)	21 (17 %)	3 (2 %)

Tidspunkt i laktasjonen (Days in milk; DIM) for kyrne i studieutvalget varierte fra 4 dager til 302 dager, med et gjennomsnitt på 85 dager. Laktasjonsnummeret var i snitt litt over 2. laktasjon, med en median på 2, og variasjonsbredde fra 1. til 6. laktasjon. Gjennomsnittlig celletall de siste sju dagene før innsending av speneprøver lå på 117 330 celler/mL.

Hver ku fikk en gjennomsnittlig MAA-verdi basert på gjennomsnittet av målinger av mjølk fra kuas fire spener, kalt *avg\_maa*. Gjennomsnittet av MAA for alle de 126 kyrne var 4 123 ng/mL. Den aller laveste MAA-verdien i vårt utvalg var 1 ng/mL, imens den høyeste verdien var 120 331 ng/mL. Gjennomsnittlig differanse mellom laveste og høyeste MAA-verdi på enkeltspenenivå hos hver enkelt ku var 11 237 ng/mL. Medianen for denne differansen var 2 574 ng/mL.

**Tabell 3.** Deskriptiv statistikk over nøkkelvariable basert på observasjoner fra 126 kyr, i en fordypningsoppgave om Milk Amyloid A i mjølk.

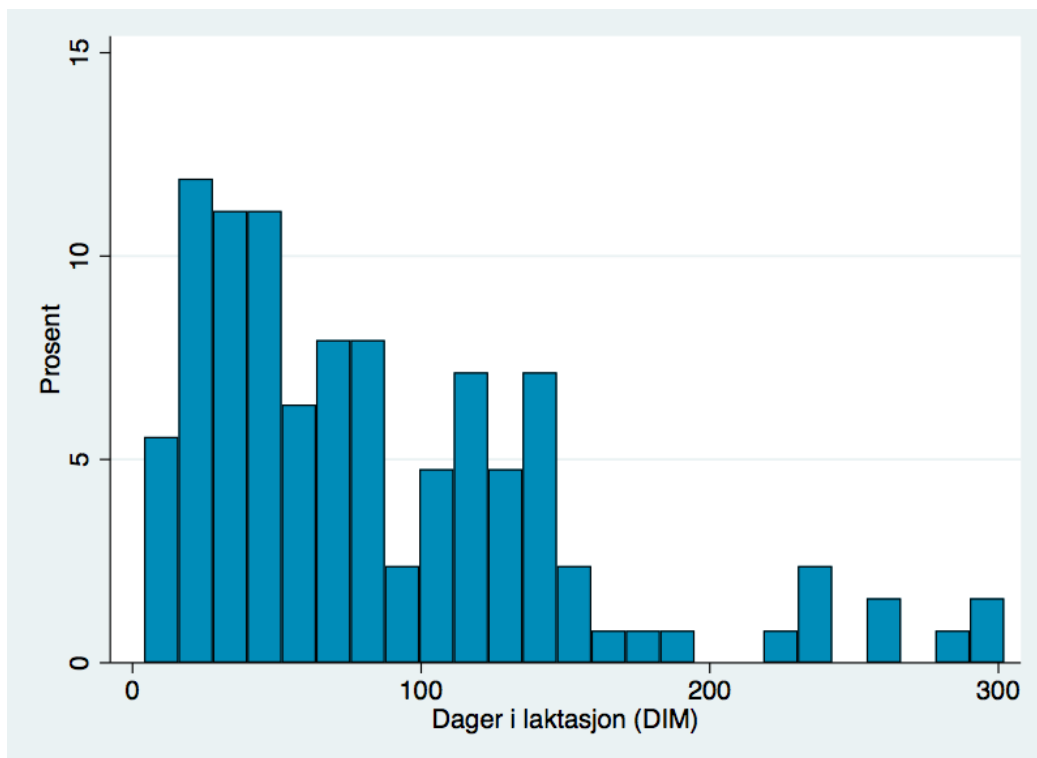
Variable*	Min	Max	Gjennomsnitt	Median
Dager i laktasjon (DIM) (dager)	4	302	85	85
Laktasjonsnummer	1	6	2	2
OCC ( <i>avg_occ_7</i> ) <sup>1)</sup> (1 000 celler/mL)	4	1 068	117	33
Min MAA <sup>2)</sup> (ng/mL)	1	7 026	600	27
Max MAA <sup>3)</sup> (ng/mL)	1	120 331	11 836	3 251
Avg MAA <sup>4)</sup> (ng/mL)	1	40 964	4 123	1 402
Diff MAA <sup>5)</sup> (ng/mL)	0	120 330	11 237	2 574
Log avg MAA <sup>6)</sup>	0.00	10.62	6.23	7.24

\* Alle MAA-variable (*min\_maa*, *max\_maa*, *avg\_maa*) er lagt til 1 ng/mL for å kunne gjøre log-transformering.

- 1) *Avg\_occ\_7*: gjennomsnittlige celletallet for hver ku de siste 7 dagene før prøvetaking, målt i 1 000 celler/mL.
- 2) *Min\_maa*: hver ku sin laveste MAA-verdi på spenenivå (den spenen med lavest verdi av de fire spenene), målt i ng/mL.
- 3) *Max\_maa*: hver ku sin høyeste MAA-verdi på spenenivå (den spenen med høyest verdi av de fire spenene), målt i ng/mL.
- 4) *Avg\_maa*: gjennomsnittet av MAA-målingene fra hver spene (det vil si fire målinger), målt i ng/mL.
- 5) *Diff\_maa*: differansen mellom hver enkelt ku sin høyeste (*max\_maa*) og laveste (*min\_maa*) MAA-verdi på spenenivå, målt i ng/mL.
- 6) *Log\_avg\_maa*: log-transformert variabel for hver enkelt ku sin gjennomsnittlige MAA-verdi (*avg\_maa*).

### Dager i laktasjon (DIM)

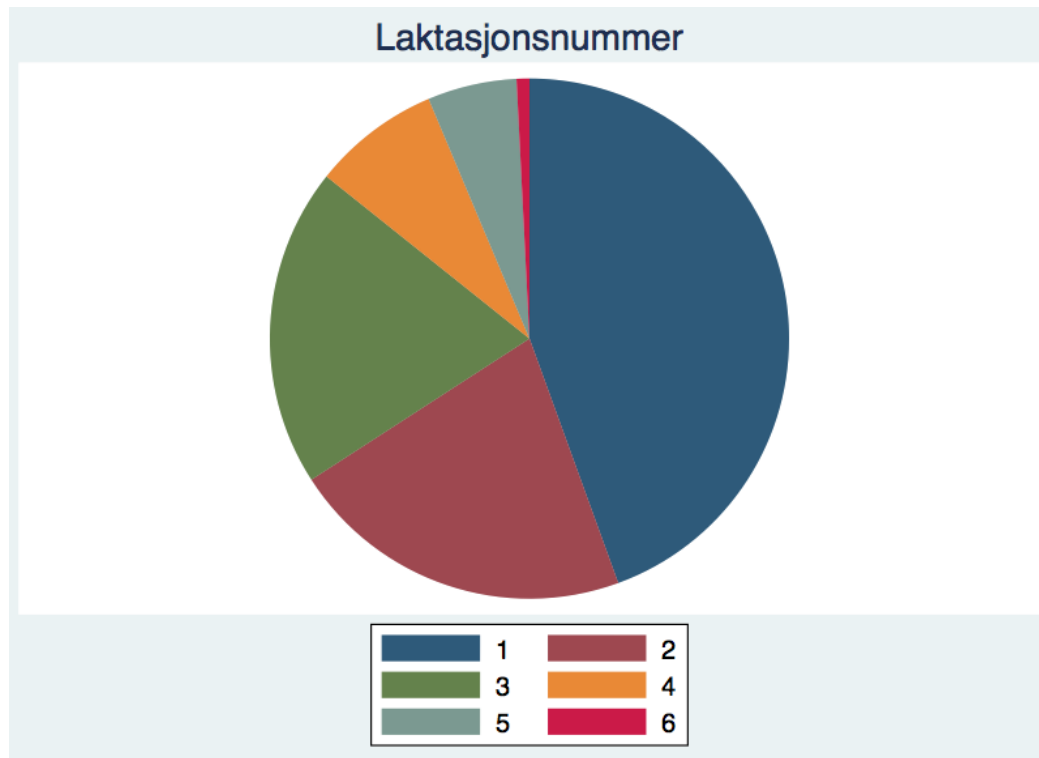
Det var stor spredning i dager i laktasjon (DIM) for kyrne i studieutvalget. Ettersom første prøvetaking per ku ble brukt i denne oppgaven var det en viss skjevfordeling av DIM, vist i Figur 2. Halvparten av kyrne hadde verdier mellom 36 og 118 DIM. Både gjennomsnitt og median for DIM var 85 dager.



Figur 2. Histogram som viser prosentfordelingen av dager i laktasjon (DIM) for de 126 kyrne i studieutvalget, i en fordypningsoppgave om Milk Amyloid A i mjølk.

### Laktasjonsnummer

Laktasjonsnummeret hos kyrne i vårt utvalg varierte fra første til sjette laktasjon, der hver enkelt ku bidro med kun én laktasjon. 56 av våre 126 kyr var i 1. laktasjon (44 %), og de resterende 70 kyrne var i 2. laktasjon eller høyere (56 %). Medianen for laktasjonsnummer var 2. Fordeling av kyrne med hensyn på laktasjonsnummer er vist i Figur 3.



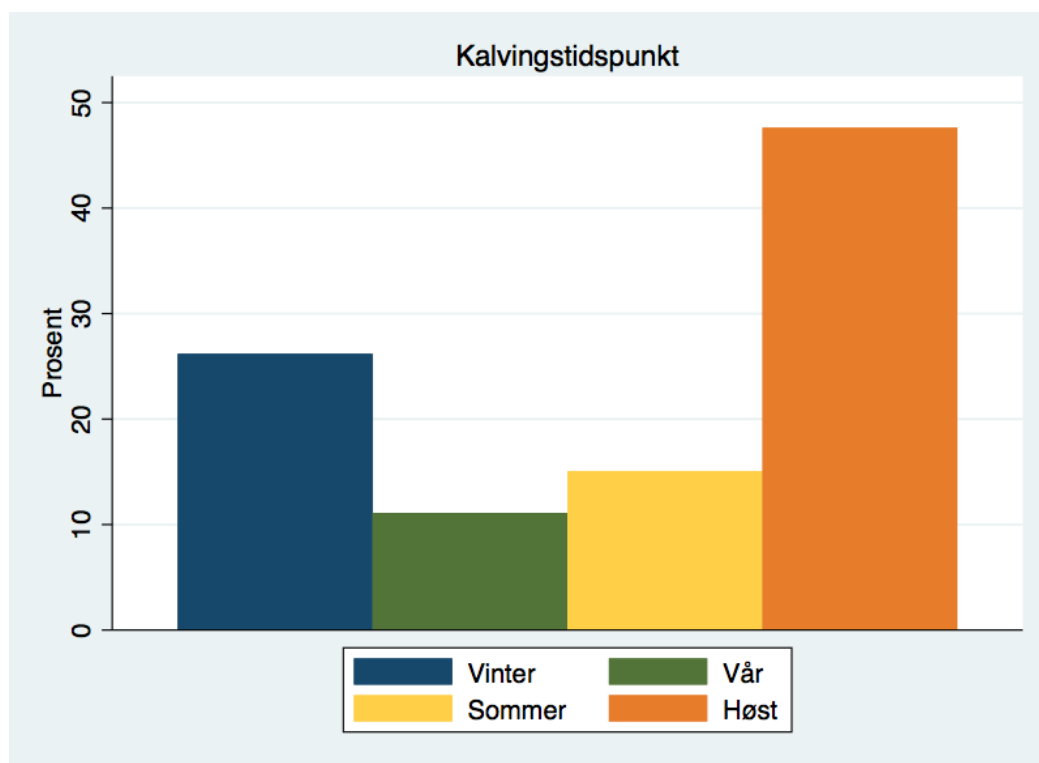
Figur 3. Fordelingen av laktasjonsnummer hos de 126 kyrne, i en fordypningsoppgave om Milk Amyloid A i mjølk.

### **Kalvingstidspunkt**

I Figur 4 er kalvingsdato for de 126 kyrne vist per sesong (årstid). Inndeling av måneder i sesonger er framstilt i Tabell 4. Som man ser av Figur 4 hadde størst andel kyr kalving i høstmånedene, med totalt 60 kyr (48 %) som kalvet. 33 kyr (26 %) kalvet på vinteren. Det var lavest andel kyr som kalvet på vår og sommer, med 14 kyr (11 %) på våren, og 19 kyr (15 %) på sommeren.

Tabell 4. Oversikt over inndeling av måneder i sesong, i en fordypningsoppgave om Milk Amyloid A i mjølk.

Sesong	Måneder
Vinter	Desember, januar, februar
Vår	Mars, april, mai
Sommer	Juni, juli, august
Høst	September, oktober, november



Figur 4. Prosentvis fordeling av kalvingstidspunkt hos de 126 kyrne i studieutvalget, i en fordypningsoppgave om Milk Amyloid A i mjølk.

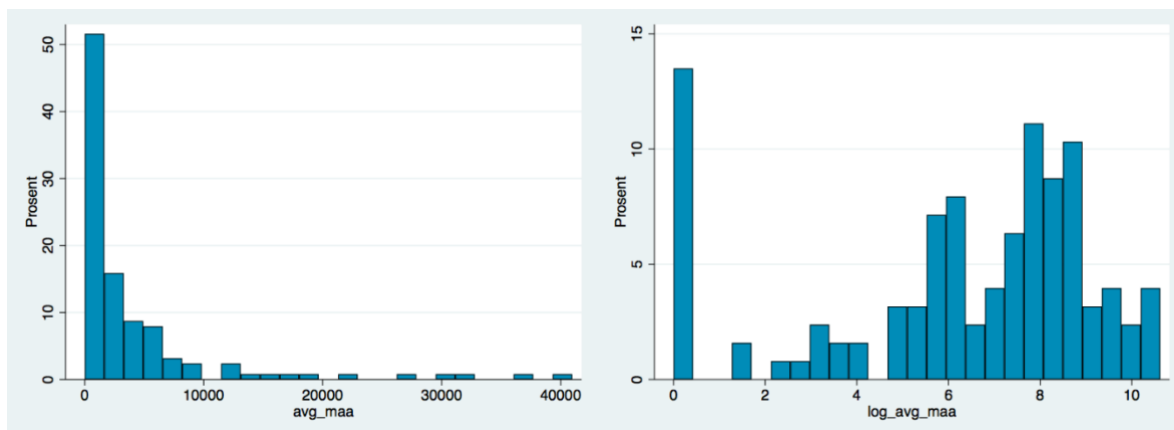


## MAA

MAA på kunivå, målt som gjennomsnittet av kuas fire spener, framstilles i Tabell 3. Det kommer fram at gjennomsnittet for variabelen *avg\_maa* var 4 123 ng/mL, med en variasjonsbredde (range) fra 1 ng/mL til 40 964 ng/mL. Medianen var 1 402 ng/mL.

Gjennomsnittlig MAA-verdi (*avg\_maa*) framstilles grafisk i venstre panel av Figur 5. Som man ser av figuren var variabelen svært skjevfordelt, de fleste kyrne hadde lave verdier, mens noen få hadde svært høye verdier, over 10 000 ng/mL.

I høyre panel av Figur 5 vises grafisk framstilling av *avg\_maa* etter log-transformering. Disse verdiene framstår mindre skjevfordelte enn før log-transformeringen. Verdiene for *log\_avg\_maa* hadde en variasjon mellom 0 og 10.62 log (ng/mL), med et gjennomsnitt på 6.23 log (ng/mL), se Tabell 3.



**Figur 5.** Histogram som viser gjennomsnittlig MAA-verdi (*avg\_maa*)<sup>1)</sup> i venstre panel, og log-transformert variabel (*log\_avg\_maa*)<sup>2)</sup> i høyre panel. Fordelingen er basert på de 126 kyrne i vårt utvalg, i en fordypningsoppgave om Milk Amyloid A i mjølk.

- 1) *Avg\_maa*: gjennomsnittet av MAA-målingene fra hver spene (det vil si fire målinger), målt i ng/mL.
- 2) *Log\_avg\_maa*: log-transformert variabel for hver enkelt ku sin gjennomsnittlige MAA-verdi (*avg\_maa*).

## **Subklinisk mastitt og bakteriefunn**

Det ble undersøkt for bakterier på alle innsendte speneprøver. Av de 126 kyrne i utvalget fikk 22 påvist bakterier på speneprøvene. Det var en lik fordeling av vekst av mastittagens fra de to patogengruppene, altså 11 positive dyrkningsvar innen hver gruppe. Av de 22 kyrne med bakteriefunn ble 12 kyr definert til å ha subklinisk mastitt. Mastittpatogener fra patogengruppe 1 ble funnet ved åtte av tilfellene med subklinisk mastitt, mens det ble funnet bakterier fra patogengruppe 2 i fire av tilfellene.

Tabell 5 viser forekomst av subklinisk mastitt og bakteriefunn hos kyr med ulike laktasjonsnummer. Som tidligere nevnt tilhørte henholdsvis 56 kyr gruppen med førstelakterende dyr (laktasjonsgruppe 1), og 70 kyr tilhørte gruppen med høyere laktasjonsnummer (laktasjonsgruppe 2). 14 av de 22 kyrne (64 %) med bakteriefunn tilhørte laktasjonsgruppe 2, imens de resterende 8 kyrne (36 %) var i førstelaktasjon. Av de 12 kyrne med subklinisk mastitt tilhørte 8 av dem (67 %) laktasjonsgruppe 2. Totalt hadde 7 % av kyrne i 1. laktasjon subklinisk mastitt, imens forekomsten var 11 % blant kyrne i 2. laktasjon eller høyere. Det var ikke en statistisk signifikant forskjell mellom forekomsten av subklinisk mastitt i de to laktasjonsgruppene ( $p=0.62$ ).

**Tabell 5.** Forekomst av subklinisk mastitt og bakteriefunn hos 126 kyr, fordelt på de to laktasjonsgruppene, i en fordypningsoppgave om Milk Amyloid A i mjølk.

	Subklinisk mastitt <sup>1)</sup>		Bakteriefunn <sup>2)</sup>	
	Ikke subklinisk mastitt	Subklinisk mastitt	Ikke bakteriefunn	Bakteriefunn
<b>Laktasjonsgruppe 1<sup>3)</sup></b> <b>n = 56</b>	52 (46 %)	4 (33 %)	48 (46 %)	8 (36 %)
<b>Laktasjonsgruppe 2<sup>4)</sup></b> <b>n = 70</b>	62 (54 %)	8 (67 %)	56 (54 %)	14 (64 %)
<b>Sum</b>	114 (100 %)	12 (100 %)	104 (100 %)	22 (100 %)

1) Subklinisk mastitt (*anyimi*): binær variabel som angir om kyrne har subklinisk mastitt eller ikke. Verdi 1 tilsvarer subklinisk mastitt, etter kriterier satt av Zadoks et al. (Zadoks et al. 2002). Verdi 0 tilsier at kua ikke er definert til å ha subklinisk mastitt.

2) Bakteriefunn, (*anypat*): binær variabel som angir bakteriefunn på speneprøvene. Denne variabelen har verdi 1 ved bakteriefunn, og verdi 0 når det ikke er noe vekst.

3) Laktasjonsgruppe 1: kyr i 1. laktasjon

4) Laktasjonsgruppe 2: kyr i 2. til 6. laktasjon

## Statistisk analyse

### MAA og laktasjonsnummer

Tabell 6 viser verdier for gjennomsnitt og median for ulike MAA-variable, fordelt på kyr i de to laktasjonsgruppene. Alle MAA-variablene hadde høyere verdier for både gjennomsnitt og median hos kyr i laktasjonsgruppe 2, sammenlignet med laktasjonsgruppe 1. Gjennomsnittet for *avg\_maa* var 3 193 ng/mL for kyrne i førstelaktasjon, og 4 867 ng/mL for kyrne i laktasjonsgruppe 2. Forskjellen i *avg\_maa* mellom de to laktasjonsgruppene var ikke signifikant ( $p=0.32$ ).

Tabell 6. Framstilling av MAA-variable fordelt på de to laktasjonsgruppene. Tabellen er basert på målinger fra 126 kyr, 56 i laktasjonsgruppe 1, og 70 i laktasjonsgruppe 2, i en fordypningsoppgave om Milk Amyloid A i mjølk.

MAA-variable (ng/mL)		Laktasjonsgruppe 1 <sup>1)</sup>	Laktasjonsgruppe 2 <sup>2)</sup>
Min MAA <sup>3)</sup>	Gjennomsnitt	453	717
	Median	5	67
Max MAA <sup>4)</sup>	Gjennomsnitt	9 730	13 521
	Median	2 986	3 572
Avg MAA <sup>5)</sup>	Gjennomsnitt	3 193	4 867
	Median	1 099	1 676

1) Laktasjonsgruppe 1: kyr i 1. laktasjon

2) Laktasjonsgruppe 2: kyr i 2. til 6. laktasjon

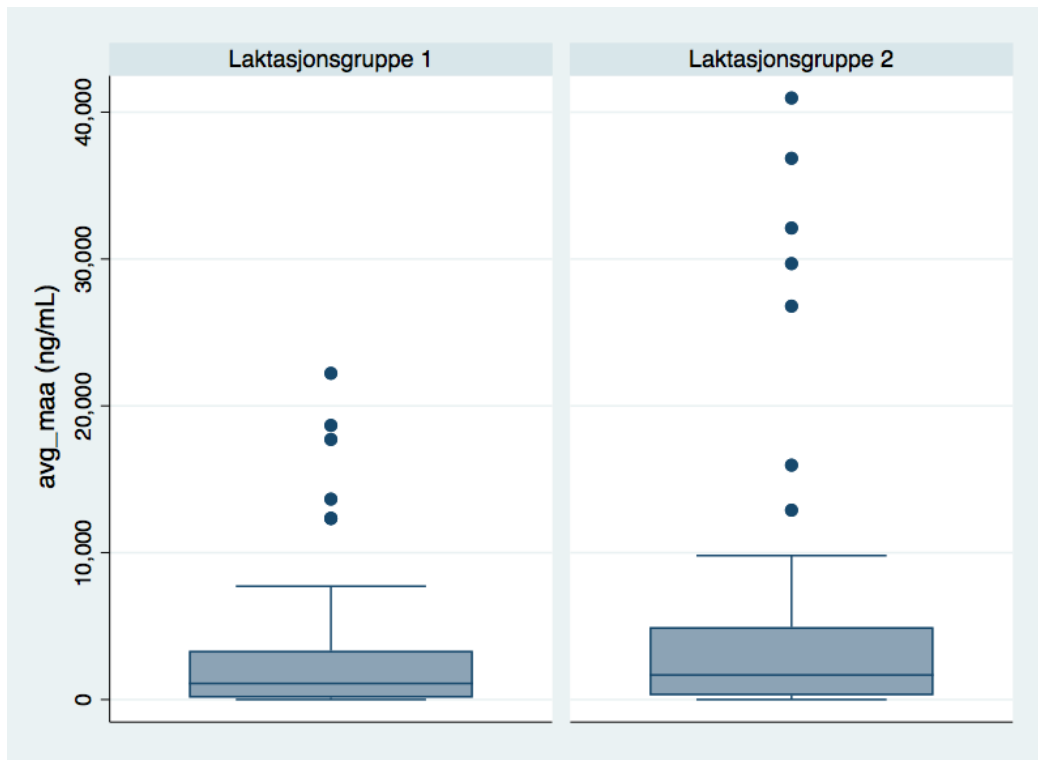
3) *Min\_maa*: hver ku sin laveste MAA-verdi på spenenivå (den spenen med lavest verdi av de fire spenene), målt i ng/mL

4) *Max\_maa*: hver ku sin høyeste MAA-verdi på spenenivå (den spenen med høyest verdi av de fire spenene), målt i ng/mL.

5) *Avg\_maa*: gjennomsnittet av MAA-målingene fra hver spene (det vil si fire målinger), målt i ng/mL.

I Figur 6 vises en grafisk framstilling av *avg\_maa* fordelt på de to laktasjonsgruppene.

Fordelingen i MAA var ikke markant forskjellig mellom de to laktasjonsgruppene, men det var noe større variasjon i laktasjonsgruppe 2 sammenlignet med laktasjonsgruppe 1. Kyrne med de høyeste verdiene (ekstremverdier) tilhørte også laktasjonsgruppe 2.

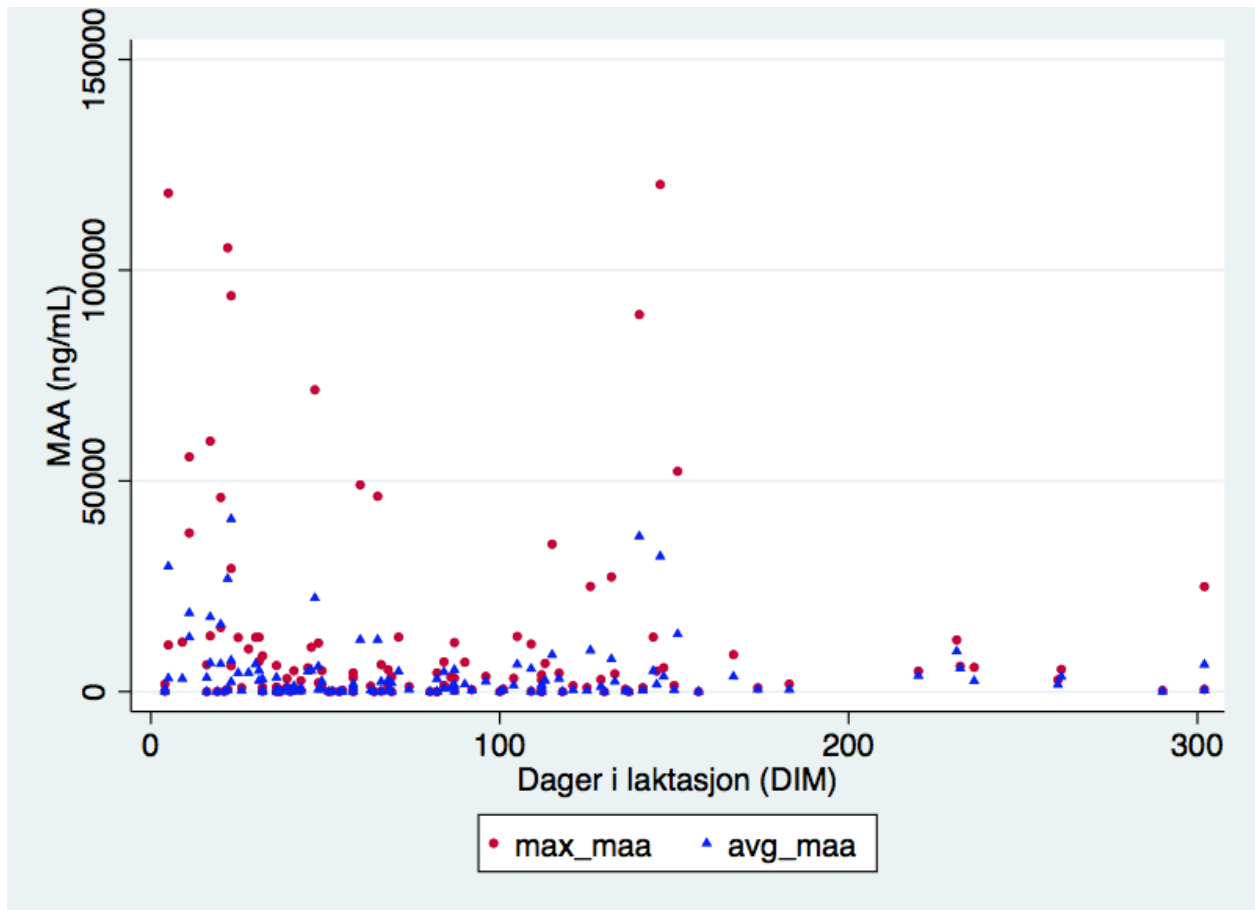


**Figur 6.** Boksploott som sammenligner MAA på kunivå (*avg\_maa*)<sup>1)</sup> mellom kyr i førstelaktasjon (laktasjonsgruppe 1) og kyr i andre eller høyere laktasjon (laktasjonsgruppe 2). Boksploottene er basert på målinger fra de 126 kyrne i vårt studieutvalg, i en fordypningsoppgave om Milk Amyloid A i mjølk.

1) Avg\_maa: gjennomsnittet av MAA-målingene fra hver spene (det vil si fire målinger), målt i ng/mL.

### MAA og dager i laktasjon (DIM)

De fleste kyrne i vårt utvalg lå på mellom 36 og 118 dager i laktasjon (DIM). I Figur 7 visualiseres verdiene for *avg\_maa* og *max\_maa* på ulike dager i laktasjonen, og det var ingen klar sammenheng mellom DIM og MAA-verdiene. De høyeste *max\_maa*-verdiene forekommer både tidlig i laktasjonen og rundt 150 DIM. Det er ingen særlig høye MAA-verdier hos kyrne som er lengst ut i laktasjonen.



Figur 7. Spredningsplott som viser sammenhengen mellom dager i laktasjon (DIM) og  $max\_maa$ <sup>1)</sup> (rødt) og  $avg\_maa$ <sup>2)</sup> (blått), i en fordypningsoppgave om Milk Amyloid A i mjølk. Hver ku (n=126) representeres av én rød og én blå prikk.

- 1)  $Max\_maa$ : hver ku sin høyeste MAA-verdi på spenenivå (den spenen med høyest verdi av de fire spenene), målt i ng/mL.
- 2)  $Avg\_maa$ : gjennomsnittet av MAA-målingene fra hver spene (det vil si fire målinger), målt i ng/mL.

### MAA, subklinisk mastitt og bakteriefunn

Av de 126 kyrne i utvalget fikk 22 påvist bakterier på de innsendte speneprøvene. 12 av disse ble vurdert til å ha subklinisk mastitt i henhold til vår definisjon. I Tabell 7 og 8 listes verdier for gjennomsnittlige ( $avg\_maa$ ) og høyeste ( $max\_maa$ ) MAA-målinger basert på bakteriefunn og mastittstatus.

Av Tabell 7 kommer det fram at det er en forskjell på gjennomsnitt og median, for variabelen *avg\_maa*, mellom de ulike grupperingene av kyr med og uten bakteriefunn og subklinisk mastitt. De høyeste verdiene, både for gjennomsnitt og median, er å finne i gruppene med subklinisk mastitt og bakteriefunn. Det er samme høyeste verdi (max) av *avg\_maa* i gruppen med bakteriefunn og i gruppen med subklinisk mastitt. I Tabell 8 er også de høyeste gjennomsnittene og medianene for *max\_maa* å finne i de samme to gruppene. Til forskjell fra Tabell 7 sees høyeste verdi (max) for *max\_maa* ikke i gruppen med subklinisk mastitt. Vi ser verdi 120 331 ng/mL i gruppen uten subklinisk mastitt og i gruppen med bakteriefunn.

Tabell 7. Ulike framstillinger av *avg\_maa* hos kyr med og uten subklinisk mastitt og bakteriefunn i en fordypningsoppgave om Milk Amyloid A i mjølk. Basert på målinger fra 126 kyr, hvor hver ku er klassifisert med hensyn på mastitt og med hensyn på bakteriefunn.

	Avg MAA <sup>1)</sup> (ng/mL)				Antall kyr
	Min	Max	Gj.snitt	Median	
<b>Ikke subklinisk mastitt<sup>2)</sup></b>	1	32 110	3 504	1 208	114
<b>Subklinisk mastitt<sup>2)</sup></b>	5	40 964	20 774	5 047	12
<b>Ikke bakteriefunn<sup>3)</sup></b>	1	26 791	3 027	861	104
<b>Bakteriefunn<sup>3)</sup></b>	1	40 964	9 302	3 571	22

1) *Avg\_maa*: gjennomsnittet av MAA-målingene fra hver spene (det vil si fire målinger), målt i ng/mL.

2) Subklinisk mastitt (*anyimi*): binær variabel som angir om kyrne har subklinisk mastitt eller ikke. Verdi 1 tilsvarer subklinisk mastitt, etter kriterier satt av Zadoks et al. (Zadoks et al. 2002). Verdi 0 tilsier at kua ikke er definert til å ha subklinisk mastitt.

3) Bakteriefunn, (*anypat*): binær variabel som angir bakteriefunn på speneprøvene. Denne variabelen har verdi 1 ved bakteriefunn, og verdi 0 når det ikke er noe vekst.

**Tabell 8.** Ulike framstillinger av *max\_maa* hos kyr med og uten subklinisk mastitt og bakteriefunn, i en fordypningsoppgave om Milk Amyloid A i mjølk.. Basert på målinger fra 126 kyr, hvor hver ku er klassifisert med hensyn på mastitt og med hensyn på bakteriefunn.

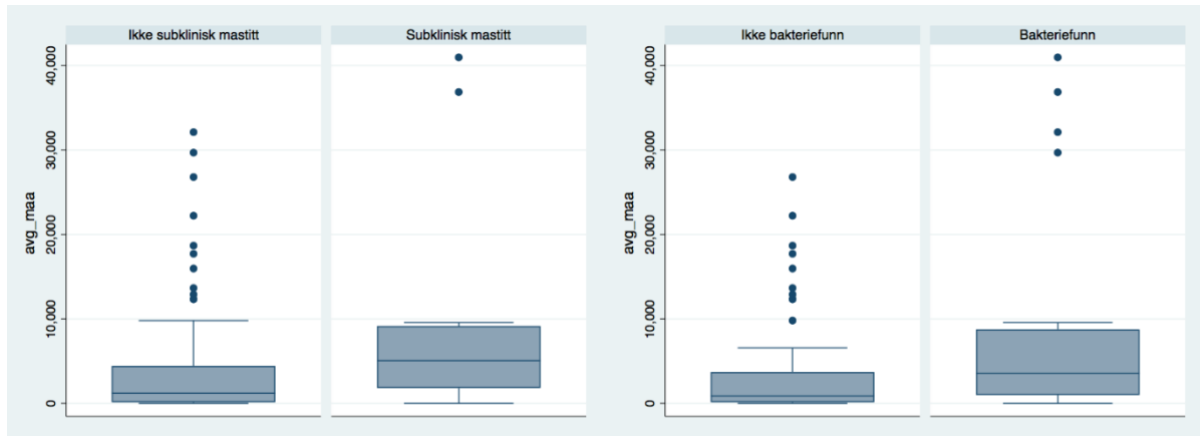
	Max MAA <sup>1)</sup> (ng/mL)				Antall kyr
	Min	Max	Gj.snitt	Median	
<b>Ikke subklinisk mastitt<sup>2)</sup></b>	1	120 331	10 617	2 824	114
<b>Subklinisk mastitt<sup>2)</sup></b>	18	93 925	23 424	10 516	12
<b>Ikke bakteriefunn<sup>3)</sup></b>	1	105 323	8 656	2 692	104
<b>Bakteriefunn<sup>3)</sup></b>	1	120 331	26 870	7 736	22

- 1) *Max\_maa*: hver ku sin høyeste MAA-verdi på spenenivå (den spenen med høyest verdi av de fire spenene), målt i ng/mL.
- 2) Subklinisk mastitt (*anyimi*): binær variabel som angir om kyrne har subklinisk mastitt eller ikke. Verdi 1 tilsvarer subklinisk mastitt, etter kriterier satt av Zadoks et al. (Zadoks et al. 2002). Verdi 0 tilsier at kua ikke er definert til å ha subklinisk mastitt.
- 3) Bakteriefunn, (*anypat*): binær variabel som angir bakteriefunn på speneprøvene. Denne variabelen har verdi 1 ved bakteriefunn, og verdi 0 når det ikke er noe vekst.

Figur 8 viser grafisk framstilling av gjennomsnittlig MAA (*avg\_maa*) hos kyr med og uten subklinisk mastitt og bakteriefunn. Figuren gjenspeiler tallene som kom fram av Tabell 7. Begge panelene viser at hovedtyngden av kyrne har lavere og mindre spredte MAA-verdier i gruppene uten subklinisk mastitt eller bakteriefunn. Dette kommer også fram av interkvartilbredden til de ulike gruppene. Kyrne uten subklinisk mastitt har en interkvartilbredde for *avg\_maa* fra 138 til 4 423 ng/mL, mens kyrne med subklinisk mastitt har en interkvartilbredde fra 1 826 til 9 155 ng/mL. Kyrne med og uten bakteriefunn hadde lignende resultater. I begge boksplokkene er det en del uteliggere, men verdiene hos disse er



høyere hos kyrne med subklinisk mastitt og de med bakteriefunn. Det var statistisk signifikant forskjell i *avg\_maa* både mellom kyr med og uten subklinisk mastitt ( $p=0.0134$ ) og kyr med og uten bakteriefunn ( $p=0.0132$ )



**Figur 8.** Boksplott som viser gjennomsnittlig MAA-verdi (*avg\_maa*)<sup>1)</sup> hos kyr med og uten subklinisk mastitt<sup>2)</sup> (venstre panel) og bakteriefunn<sup>3)</sup> (høyre panel) i en fordypningsoppgave om Milk Amyloid A i mjølk. Basert på målinger fra 126 kyr.

- 1) *Avg\_maa*: gjennomsnittet av MAA-målingene fra hver spene (det vil si fire målinger), målt i ng/mL.
- 2) Subklinisk mastitt (*anyimi*): binær variabel som angir om kyrne har subklinisk mastitt eller ikke. Verdi 1 tilsvarer subklinisk mastitt, etter kriterier satt av Zadoks et al. (Zadoks et al. 2002). Verdi 0 tilsier at kua ikke er definert til å ha subklinisk mastitt.
- 3) Bakteriefunn, (*anypat*): binær variabel som angir bakteriefunn på speneprøvene. Denne variabelen har verdi 1 ved bakteriefunn, og verdi 0 når det ikke er noe vekst.

### Celletall og subklinisk mastitt

Celletallsmåling for de siste 7 dagene, *avg\_occ\_7*, manglet for 3 av kyrne i studieutvalget på totalt 126 kyr. Tabell 9 viser at kyrne med subklinisk mastitt hadde et høyere gjennomsnittlig celletall, og en høyere median, enn kyrne uten subklinisk mastitt. Den høyeste celletallsmålingen var å finne i gruppen kyr uten subklinisk mastitt.

Tabell 9. Ulike framstillinger av celletall (*avg\_occ\_7*), hos kyr med og uten subklinisk mastitt. Basert på målinger fra 123 kyr, i en fordypningsoppgave om Milk Amyloid A.

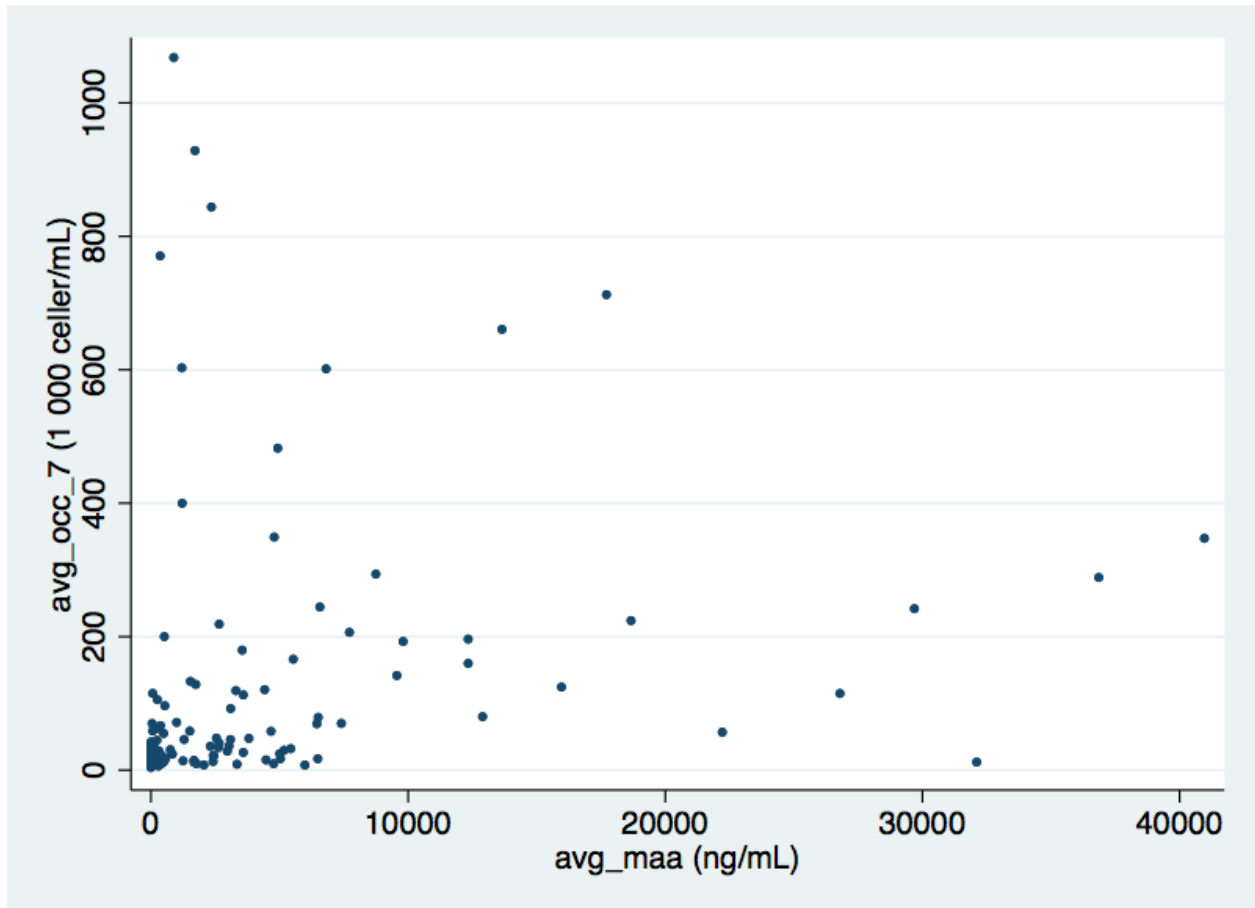
	Celletall <sup>1)</sup> (1 000 celler/mL)			
	Min	Max	Gj.snitt	Median
<b>Ikke subklinisk mastitt<sup>2)</sup></b>	4	1 068	110	30
<b>Subklinisk mastitt<sup>2)</sup></b>	20	601	188	127

- 1) Celletall (*avg\_occ\_7*): gjennomsnittlige celletallet for hver ku de siste 7 dagene før prøvetaking, målt i 1 000 celler/mL.
- 2) Subklinisk mastitt (*anyimi*): binær variabel som angir om kyrne har subklinisk mastitt eller ikke. Verdi 1 tilsvarer subklinisk mastitt, etter kriterier satt av Zadoks et al. (Zadoks et al. 2002). Verdi 0 tilsier at kua ikke er definert til å ha subklinisk mastitt.

## MAA og celletall

123 av kyrne i vårt studietvalg hadde en egen verdi for både *avg\_occ\_7* og *avg\_maa*, da 3 kyr manglet verdi for *avg\_occ\_7*. I Figur 9 sammenlignes disse verdiene i et spredningsplott. Ved visuell vurdering var det ingen tydelig trend ved undersøkelse av sammenhengen mellom *avg\_occ\_7* og *avg\_maa*. Hos ei ku med høy OCC-verdi kunne det være både høye og lave MAA-verdier. Ved de høyeste MAA-verdiene var det i dette utvalget nokså lave OCC-verdier.

Vi lagde også et tilsvarende spredningsplott for å undersøke om det var korrelasjon mellom kyrnes høyeste MAA-verdi (*max\_maa*) og OCC (*avg\_occ\_7*). Heller ikke her var det noen tydelig sammenheng (resultat ikke vist).



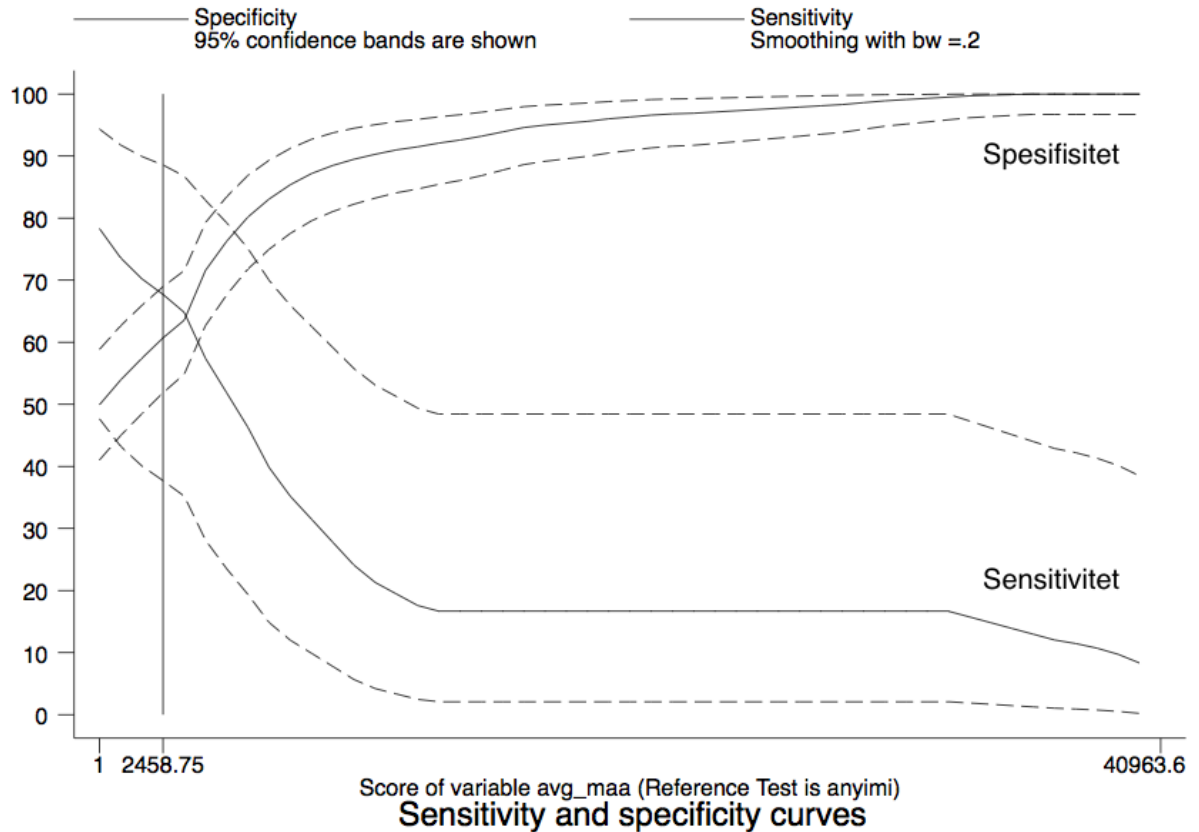
Figur 9. Spredningsplott som sammenligner gjennomsnittlig MAA-verdi ( $avg\_maa$ )<sup>1)</sup> og gjennomsnittlig OCC-verdi de siste 7 dagene ( $avg\_occ\_7$ )<sup>2)</sup>. Basert på målinger fra 123 av de 126 kyrne i studieutvalget, i en fordypningsoppgave om Milk Amyloid A i mjølk.

- 1)  $avg\_maa$ : gjennomsnittet av MAA-målingene fra hver spene (det vil si fire målinger), målt i ng/mL.
- 2)  $avg\_occ\_7$ : gjennomsnittlige celledetallet for hver ku de siste 7 dagene før prøvetaking, målt i 1 000 celler/mL.

## MAA som diagnostisk test for subklinisk mastitt

For å finne MAA sin egenskap som diagnostisk test for subklinisk mastitt måtte vi finne en aktuell grenseverdi. Vi gjorde en visuell evaluering, ved hjelp av kommandoen `roctg` for  $avg\_maa$  (MAA), for å vise hvordan ulike grenseverdier påvirker sensitivitet (Se) og spesifisitet (Sp). I Figur 10 visualiseres kurvene for Se og Sp, og forholdet mellom dem, ved ulike grenseverdier for  $avg\_maa$ . I Tabell 10 ser man at 9 av de 12 kyrne med subklinisk mastitt ble korrekt klassifisert ved en grenseverdi for MAA på 2 459 ng/mL. Denne

grenseverdien ga høyest mulig Se og Sp på samme tid, med Se på 75 og Sp på 64. Vi testet ut ulike grenseverdier for å se hvordan disse påvirket Se og Sp, se Tabell 11.



**Figur 10.** Visuell evaluering av grenseverdier for MAA (*avg\_maa*)<sup>1)</sup> og påvirkning på Se og Sp med hensyn på å predikere subklinisk mastitt (*anyimi*)<sup>2)</sup>. Basert på målinger fra 123 kyr, i en fordypningsoppgave om Milk Amyloid A i mjølk.

- 1) *Avg\_maa*: gjennomsnittet av MAA-målingene fra hver spene (det vil si fire målinger), målt i ng/mL.
- 2) Subklinisk mastitt (*anyimi*): binær variabel som angir om kyrne har subklinisk mastitt eller ikke. Verdi 1 tilsvarer subklinisk mastitt, etter kriterier satt av Zadoks et al. (Zadoks et al. 2002). Verdi 0 tilsier at kua ikke er definert til å ha subklinisk mastitt.

**Tabell 10.** Krysstabell av *avg\_maa* mot subklinisk mastitt, der kyr er kategorisert med subklinisk mastitt etter Zadoks et al. (Zadoks et al., 2002) sin definisjon. *avg\_maa* over 2 459 ng/mL er brukt som grenseverdi for subklinisk mastitt. Basert på målinger fra 123 kyr, i en fordypningsoppgave om Milk Amyloid A i mjølk.

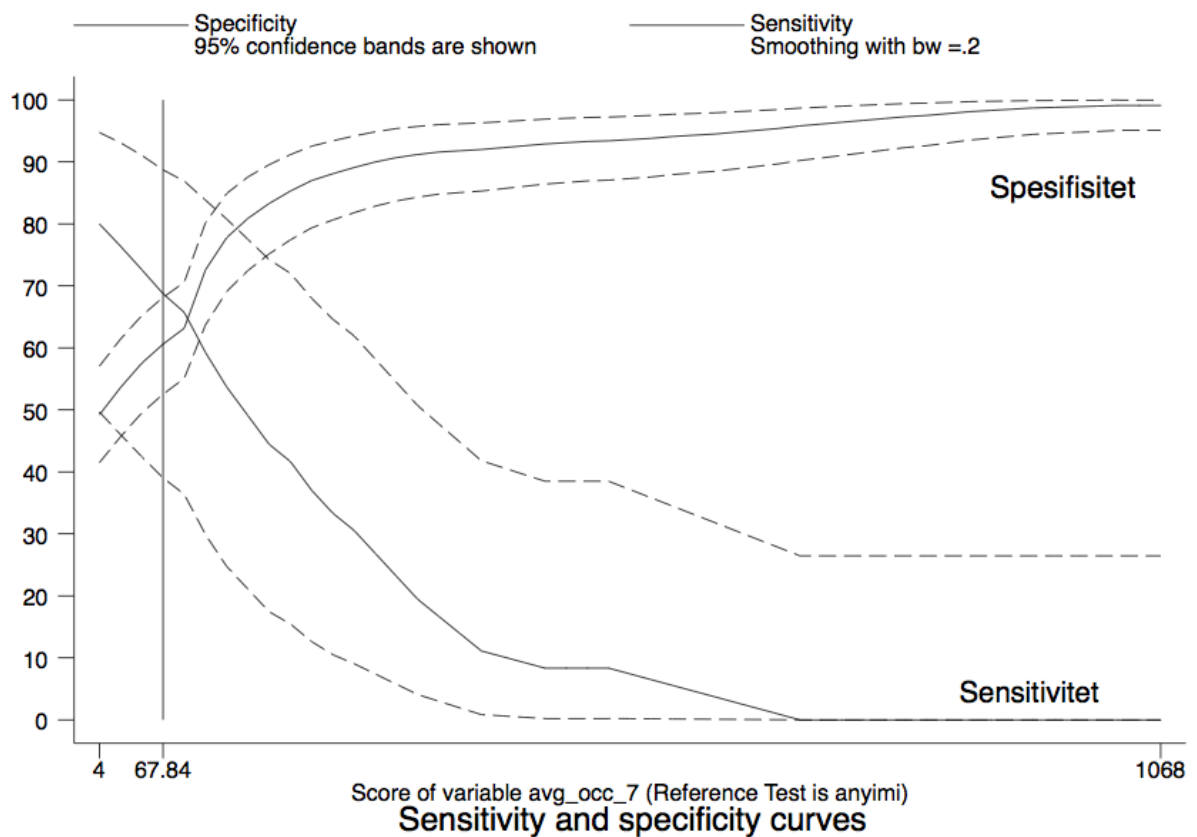
	MAA		
<b>Subklinisk mastitt</b>	<b>Negativ</b>	<b>Positiv</b>	<b>Sum</b>
<b>Negativ</b>	71	40	111
<b>Positiv</b>	3	9	12
<b>Sum</b>	74	49	123

**Tabell 11.** Tabell som viser ulike grenseverdier og tilhørende Se og Sp for *avg\_maa* med hensyn på å diagnostisere subklinisk mastitt. Basert på målinger fra 123 kyr, i en fordypningsoppgave om Milk Amyloid A i mjølk.

<b>Grenseverdi MAA (ng/mL)</b>	<b>Se</b>	<b>Sp</b>
1 500	75	52
2 000	75	59
2 459	75	64
3 000	67	68
3 500	58	71

## Celletall som diagnostisk test for subklinisk mastitt

Vi gjorde tilsvarende visuelle evaluering for gjennomsnittlig celletall de siste 7 dagene (*avg\_occ\_7*) som diagnostisk test for subklinisk mastitt. Figur 11 viser ulike grenseverdier for *avg\_occ\_7* og tilhørende Se og Sp. Grenseverdien som gir høyest mulig Se og Sp samtidig er her 67 840 celler/mL, med Se på 75 og Sp på 69. Ved denne grenseverdien ble 9 av 12 kyr med subklinisk mastitt korrekt klassifisert, se Tabell 12. I Tabell 13 testet vi ut ulike grenseverdier for celletall ved subklinisk mastitt.



**Figur 11.** Visuell evaluering av grenseverdier for *avg\_occ\_7*<sup>1)</sup> og påvirkning på Se og Sp med hensyn på å predikere subklinisk mastitt (*anyimi*)<sup>2)</sup> Basert på målinger fra 123 kyr, i en fordypningsoppgave om Milk Amyloid A i mjølk.

- 1) *Avg\_occ\_7*: gjennomsnittlige celletallet for hver ku de siste 7 dagene før prøvetaking, målt i 1 000 celler/mL.
- 2) Subklinisk mastitt (*anyimi*): binær variabel som angir om kyrne har subklinisk mastitt eller ikke. Verdi 1 tilsvarer subklinisk mastitt, etter kriterier satt av Zadoks et al. (Zadoks et al. 2002). Verdi 0 tilsier at kua ikke er definert til å ha subklinisk mastitt.

Tabell 12. Krysstabell med 67 840 celler/mL som grenseverdi for *avg\_occ\_7*. Basert på målinger fra 123 kyr, i en fordypningsoppgave om Milk Amyloid A i mjølk.

	Celletall		
<b>Subklinisk mastitt</b>	<b>Negativ</b>	<b>Positiv</b>	<b>Sum</b>
<b>Negativ</b>	77	34	111
<b>Positiv</b>	3	9	12
<b>Sum</b>	80	43	123

Tabell 13. Tabell som viser ulike grenseverdier for *avg\_occ\_7*, og tilhørende Se og Sp. Basert på målinger fra 126 kyr, i en fordypningsoppgave om Milk Amyloid A i mjølk.

<b>Grenseverdi celletall (1 000 celler/mL)</b>	<b>Se</b>	<b>Sp</b>
50	75	63
68	75	69
100	58	75
200	42	87

## Diskusjon

### Vår studie

I denne fordypningsoppgaven har vi undersøkt nivåer av MAA og hvordan de påvirkes av ulike faktorer. Vi har undersøkt verdiene av MAA med hensyn på dager i laktasjon, laktasjonsnummer, celletall, bakteriefunn og mastittstatus. Vi estimerte sensitivitet og spesifisitet for MAA ved ulike grenseverdier, for å se på MAA sine egenskaper som diagnostisk test for subklinisk mastitt. Til slutt sammenlignet vi MAA sine testegenskaper med egenskapene til celletallsmålinger i dette utvalget, for å vurdere hvilken av de to variablene som var best egnet til å detektere subklinisk mastitt.

Studien omfatter kun én besetning ved Senter for husdyrforsk (SHF) på Ås. Dette vil begrense generaliserbarheten til funnene i studien, men vil likevel kunne gi en indikasjon på om målte verdier av MAA kan brukes til å detektere subklinisk mastitt hos mjølkekyr. Fordelen med at alle kyrne kom fra samme besetning, er at stell- og oppstallingsforholdene var like, slik at kyrne i utvalget ble utsatt for de samme ytre faktorene.

Alle kyrne som deltok i studien bidro med én prøve hver, da vi valgte å kun bruke første prøvetaking per ku. Dette ble gjort for å unngå å måtte ta hensyn til avhengighet mellom speneprøver til de enkelte kyrne. Ved å selektere for første dato hver ku ble prøvetatt, endte vi opp med fem ulike prøvetakingsdatoer, alle mellom januar og mai 2016. Flesteparten av kyrne ble prøvetatt på den første av disse datoene. Den begrensede prøvetakingsperioden gjorde at det var liten mulighet for å fange opp eventuelle sesongvariasjoner i nivået av MAA. Ved å kun selektere én prøvetakingsdato, og dermed kun én MAA-måling for hver ku, mistet vi muligheten til å kunne observere variasjon i MAA-nivå gjennom laktasjonen.



De fleste kyrne i vårt utvalg var relativt tidlig i laktasjonen, og flesteparten hadde mindre enn 118 laktasjonsdager (DIM) ved prøvetakingsdatoen. Dette skyldes prøvetakingsperioden og den semikonsentrerte kalvingen i besetningen, samt at vi valgte å kun bruke første prøvetaking per ku. I vårt utvalg var det kalvinger i perioden juli 2015 til april 2016, med hovedtyngde mellom september og desember 2015. Litt under halvparten av kyrne i vårt utvalg var i førstelaktasjon, mens de resterende kyrne hadde laktasjonsnummer fra 2 til 6. I gruppen med høyere laktasjonsnummer var de fleste i andre- og tredjelaktasjon. Fordelingen av laktasjonsnummer i vårt utvalg gjenspeiler fordelingen i norske besetninger godt (Østerås, 2016).

## **MAA**

Det var stor variasjon på MAA-verdiene på enkeltspener hos kyrne i vårt utvalg, med en variasjonsbredde fra 0 ng/mL til over 120 000 ng/mL. Det var også store forskjeller mellom enkeltspeneverdiene hos hver enkelt ku, hver ku hadde i gjennomsnitt en differanse på over 11 000 ng/mL mellom spenene med høyest og lavest verdi. Variasjonen på spenenivå er å forvente, ettersom MAA delvis produseres lokalt i juret (Jacobsen et al., 2005).

Gjennomsnittet for samtlige MAA-variable var høyere enn medianen, grunnet ekstremverdier som dro opp snittet. Medianen gir derfor en mer korrekt oversikt over typiske MAA-nivåer hos kyrne i utvalget. Variabelen som beskrev gjennomsnittlig MAA-verdi for hver enkelt ku (*avg\_maa*) hadde et gjennomsnitt som var ca. tre ganger høyere enn medianen, og er et tydelig eksempel på at ekstremverdiene påvirker gjennomsnittet.

Vi valgte å hovedsakelig bruke variabelen for gjennomsnittlig MAA hos hver ku (*avg\_maa*) i vår oppgave. En av årsakene til dette var den store individuelle variasjonen i MAA-verdi på enkeltspenenivå hos den enkelte kua. I tillegg er det slik at det i dag måles celletall fra

samlemjølk i roboten, slik at det automatisk blir et gjennomsnitt av celletallsverdiene for alle spenene hos hver enkelt ku. Vi tenker at dette også er en mulighet for MAA-måling i framtida.

Ifølge Jacobsen et al. (Jacobsen et al., 2005) er MAA-nivåer i mjølk fra friske kyr lavt. Det er gjort studier som har kommet fram til gjennomsnittsverdier av MAA for friske kyr. I Berry et al. (Berry et al., 2005) sin studie beskrives det at MAA-verdier over 500 ng/mL indikerer en inflammatorisk respons i juret. Thomas et al. (Thomas et al., 2015) definerte et basalnivå på 960 ng/mL for kyr uten subklinisk og klinisk mastitt. Kyrne i vårt utvalg som ble definert som friske, altså som ikke hadde subklinisk mastitt etter Zadoks et al. (Zadoks et al., 2002) sin definisjon, hadde en gjennomsnittlig MAA-verdi på 3 503 ng/mL. Dette er en mye høyere gjennomsnittsverdi enn det som ble foreslått i Berry et al. (Berry et al., 2005) og Thomas et al. (Thomas et al., 2015) sine studier. To andre studier, av Nazifi et al. (Nazifi et al., 2008) og Haghkhah et al. (Haghkhah et al., 2009) foreslår enda høyere gjennomsnittsverdier for friske kyr enn hva vi fant i vår studie, på henholdsvis 6 960 ng/mL og 9 900 ng/mL.

Gjennomsnittsverdien for MAA hos friske kyr i vår studie samsvarer altså dårlig med alle gjennomsnittsverdiene i overnevnte studier. Samtlige av studiene som beskriver normalverdiene for MAA er gjort på andre kuraser enn NRF, og det er tenkelig at det er raseforskjeller når det gjelder MAA-nivåer. Det store spennet i verdiene tyder på at det trengs mer forskning for å etablere en referanseverdi for MAA.

Det er flere studier som beskriver individuell variasjon i MAA-nivå. I en studie av Grönlund et al. (Grönlund et al., 2005) ble det funnet stor individuell variasjon i MAA-nivåer mellom kyr. Åkerstedt et al. (Åkerstedt et al., 2011) beskriver i sin studie at SAA er et apolipoprotein,

og dermed muligens vil variere i mjølk med ulik fettprosent. Fettprosenten i mjølka varierer gjennom laktasjonen og påvirkes av en rekke faktorer, spesielt fôringsrelaterte (Heringstad, 2017). Kyr vil dermed ha en individvariasjon når det kommer til fettprosent i mjølka, som igjen kan gi forskjellige resultater ved måling av SAA og MAA. Å ta høyde for denne variasjonen i fettprosent kan være hensiktsmessig ved bestemmelse av faktiske MAA-nivåer hos enkeltkyr.

### **Subklinisk mastitt og bakteriefunn**

Det var få kyr i vårt utvalg som ble definert til å ha subklinisk mastitt. 22 av de 126 kyrne i studieutvalget vårt fikk påvist bakterier på speneprøvene, og under halvparten av disse ble definert til å ha subklinisk mastitt. De resterende kyrne som fikk påvist bakterier hadde altså for liten grad av bakterievekst til å ha subklinisk mastitt, etter Zadoks et al. (Zadoks et al., 2002) sine kriterier. Totalt hadde under 10 % av kyrne i vårt studieutvalg subklinisk mastitt. Det er viktig å huske på at kyrne ble tatt prøve av ved fem ulike datoer, så vi kan ikke si noe om hvor stor andel av kyrne som hadde mastitt på samme tidspunkt.

Ved å bruke Zadoks et al. (Zadoks et al., 2002) sine kriterier tas det ikke hensyn til celletall. I Thomas et al. (Thomas et al., 2015) sin studie ble et celletallsnivå på mellom 101 000 og 200 000 celler/mL brukt som grenseverdier for subklinisk mastitt. Van der Borne et al. (van den Borne et al., 2010) brukte derimot en grenseverdi på 200 000 celler/mL i sin studie. Om vi hadde brukt en av disse grenseverdiene i vår studie hadde vi mest sannsynlig definert andre kyr i vårt utvalg til å ha subklinisk mastitt, enn vi gjorde ved bruk av Zadoks et al. (Zadoks et al., 2002) sine kriterier. Dette hadde påvirket våre estimater for Se og Sp for MAA som diagnostisk test for subklinisk mastitt i vårt utvalg.

### **MAA og dager i laktasjon (DIM)**

Ifølge TINEs Jurhelsebok er celletallet noe høyere rett etter kalving, og lavere i midtlaktasjon, før det igjen øker mot slutten av laktasjonen (Sølverød & Whist, 2017). Vi ønsket å undersøke om dette også var tilfellet for MAA. Det var stor variasjon i nivå av *avg\_maa* og *max\_maa* hos kyrne, framstilt i Figur 7. Figuren viser imidlertid ikke hvilke av kyrne som har subklinisk mastitt, så de høyeste MAA-verdiene kan tilhøre både kyr med og uten subklinisk mastitt. Vi klarte ikke å konstatere at det var sammenheng mellom MAA-verdier og dager i laktasjon, ettersom vi verken så en positiv eller negativ korrelasjon i spredningsplottet. Det eneste vi kan si ut fra spredningsplottet er at de høyeste MAA-målingene, både for *max\_maa* og *avg\_maa*, fant sted tidlig i laktasjonen, og rundt dag 150. Dette kan skyldes tilfeldigheter, og det må tas i betraktning at det er et lite utvalg, med kun noen få kyr som er mot slutten av laktasjonen. For å bedre undersøke sammenhengen mellom MAA og tidspunkt i laktasjonen kunne man ha gjennomført en longitudinell studie, hvor man følger de samme kyrne gjennom laktasjonen og ser hvordan MAA-verdiene forandrer seg.

### **MAA, laktasjonsnummer og subklinisk mastitt**

Vi observerte forskjeller mellom kyr i laktasjonsgruppe 1 (1. laktasjon) og kyr i laktasjonsgruppe 2 (2. - 6. laktasjon), både i forhold til bakteriefunn og MAA-nivå. Forekomsten av subklinisk mastitt var 7 % i laktasjonsgruppe 1 og 11 % i laktasjonsgruppe 2. I en studie av van der Borne et al. (van den Borne et al., 2010) var gjennomsnittlig forekomst på besetningsnivå av subklinisk mastitt 12.8% hos kyr i førstelaktasjon og 27.1 % hos kyr i høyere laktasjon. Selv om studien til van der Borne et al. (van den Borne et al., 2010) avdekket en høyere forekomst av subklinisk mastitt enn i vårt utvalg, viser våre funn samme tendenser til at eldre kyr har en høyere forekomst av subklinisk mastitt enn kyr i førstelaktasjon.

Forskjellen i forekomst var ikke statistisk signifikant (på 5 % signifikansnivå). En av årsakene til det kan være det lave antallet kyr med subklinisk mastitt, samt tilfeldigheter rundt hvor mange kyr som har subklinisk mastitt ved prøvetakingstidspunktet.

I Tabell 6 sammenlignet vi verdier for ulike MAA-variable hos kyr i de to laktasjonsgruppene. Vi så at kyrne i laktasjonsgruppe 2 hadde høyere verdier av både gjennomsnitt og median for samtlige MAA-variable. Dette kan ha sammenheng med at denne gruppen hadde et større antall kyr med subklinisk mastitt. I boksplottet i Figur 6 ser vi den samme trenden. Variabelen *avg\_maa* hadde en høyere median for kyrne i laktasjonsgruppe 2, og det var en større interkvartilbredde. Det var også flere ekstremverdier i denne laktasjonsgruppen. Det var ikke en statistisk signifikant forskjell i gjennomsnittlig MAA mellom de to laktasjonsgruppene, til tross for tilsynelatende store forskjeller både i Tabell 6 og Figur 6.

### **MAA, subklinisk mastitt og bakteriefunn**

For å kunne benytte MAA som diagnostisk test for subklinisk mastitt i framtida, håpet vi å finne høyere MAA-verdier hos kyrne med bakteriefunn og/eller subklinisk mastitt, enn hos de uten. I Tabell 7 og 8 sammenlignet vi verdier for henholdsvis *avg\_maa* og *max\_maa* hos kyr med og uten subklinisk mastitt, og hos kyr med og uten bakteriefunn. Hver ku var representert på to linjer i hver av tabellene. Ei ku i gruppen med bakteriefunn vil enten være i gruppen med eller i gruppen uten subklinisk mastitt. Derimot kan ikke ei ku uten bakteriefunn også være i gruppen med subklinisk mastitt.

Hos kyrne med subklinisk mastitt og kyrne med bakteriefunn var det høyere verdier for gjennomsnitt og median for både *avg\_maa* og *max\_maa*. Kyrne med subklinisk mastitt hadde

et gjennomsnitt på 20 774 ng/mL for *avg\_maa*, imens kyrne uten subklinisk mastitt hadde et gjennomsnitt på 3 504 ng/mL. Det var også høyere maksimumsverdier for *avg\_maa* i gruppene av kyr med subklinisk mastitt og bakteriefunn, sammenlignet med de andre gruppene. Dette er et forventet resultat da vi vet at konsentrasjonen av MAA vil øke ved en inflammasjon i juret. De store forskjellene i nivå av MAA for kyr med og uten subklinisk mastitt samsvarer godt med funn i andre studier, til tross for at våre MAA-nivåer var noe lavere. Nazifi et al. (Nazifi et al., 2008) kom fram til gjennomsnittsverdier for MAA på henholdsvis 6 960 ng/mL og 54 530 ng/mL for kyr uten og med subklinisk mastitt. I en studie av Sadek et al. (Sadek et al., 2017) hadde de friske kyrne et gjennomsnittlig MAA-nivå på 13 600 ng/mL. Kyrne med subklinisk mastitt hadde et snitt på 22 410 ng/mL, som er ganske nært vårt gjennomsnitt.

I studien vår fant vi den høyeste verdien for *max\_maa* i gruppen av kyr uten subklinisk mastitt og i gruppen av kyr med bakteriefunn. Denne verdien var den samme i de to gruppene, og tilhører ett og samme individ. Denne kua var altså ett av individene som hadde bakterievekst, men ikke i stor nok grad til å bli klassifisert som subklinisk mastitt etter Zadoks et al. (Zadoks et al., 2002) sin definisjon. Det er interessant at denne kua har en så høy MAA-verdi uten å ha diagnosen subklinisk mastitt. Det kan tenkes at mastittagenset som ble funnet i dette tilfellet, hadde en større evne til å gi økt MAA-nivå. I en studie av Kovačević-Filipović et al. (Kovačević-Filipović et al., 2012) ble konsentrasjonen av MAA i mjølk fra Holstein-kyr med subklinisk mastitt forårsaket av *Staphylococcus aureus* undersøkt. De fant ut at kyr med denne typen subklinisk mastitt hadde 100 ganger høyere MAA-konsentrasjon i mjølk enn de uten subklinisk mastitt. De observerte også en stor individuell variasjon i konsentrasjon av MAA mellom gruppen kyr med subklinisk mastitt og de uten. Som tidligere nevnt kan det også generelt være store individuelle forskjeller i MAA-nivå (Grönlund et al., 2005).

For grafisk framstilling av resultatene lagde vi et boksplokk, Figur 8, som sammenlignet nivåer av *avg\_maa* for de ulike grupperingene. Vi så at interkvartilbredden for MAA var større hos kyrne med subklinisk mastitt og bakteriefunn, sammenlignet med kyrne uten dette. Dette må ses i sammenheng med utvalget er svært lite, da det kun er henholdsvis 12 og 22 kyr i gruppen for kyr med subklinisk mastitt og kyr med bakteriefunn. Vi så også at det er forekomst av ekstremverdier i alle gruppene.

Det viste seg å være statistisk signifikant forskjell i MAA-nivå for kyr med og uten subklinisk mastitt i vårt utvalg. Det samme gjaldt for kyr med og uten bakteriefunn. Dette indikerer at MAA-nivået påvirkes av om kua har subklinisk mastitt eller bakteriefunn. Til sammenligning fant også Safi et al. (Safi et al., 2009) i sin studie at gjennomsnittlig MAA-konsentrasjon var signifikant høyere hos kyr med bakterievekst enn hos de uten. Den tidligere nevnte studien av Kovačević-Filipović et al. (Kovačević-Filipović et al., 2012) beskrev en stor økning i MAA-konsentrasjon ved subklinisk mastitt forårsaket av *Staphylococcus aureus*. I vår studie har vi ikke skilt på bakteriearter, kun på forekomst av bakterier eller ikke, så vi kan dermed ikke si noe om hvorvidt en viss type bakterie forårsaket en høyere MAA-konsentrasjon i mjølka.

### **Celletall**

For å vise hvilke celletallsverdier de 126 kyrne i vårt utvalg hadde valgte vi å bruke variabelen *avg\_occ\_7*. Denne variabelen oppgir hver ku sitt gjennomsnittlige celletall de siste 7 dagene før prøvetaking. Kyrne i vår studie hadde i gjennomsnitt et celletall på 117 000 celler/mL, og en median på 33 000 celler/mL. I 2016 var det på landsbasis et gjennomsnittlig celletall på 131 000 celler/mL, noe som ikke er langt unna vårt gjennomsnitt (Østerås, 2016). Vårt gjennomsnitt er noe lavere enn landssnittet, men det er kjent at gjennomsnittlig celletall varierer mellom besetninger. Det lave gjennomsnittet kan henge sammen med at flesteparten

av prøvene er innhentet om vinteren. Dohoo et al. (Dohoo & Leslie, 1991) beskriver i sin studie at celletallet vanligvis er lavere om vinteren enn om sommeren. Celletallsnivåene hos kyrne i vårt utvalg hadde en variasjonsbredde fra omkring 4 000 til 1 068 000 celler/mL. Dette var ikke uventet, da det er kjent at celletall kan variere mye og raskt (Sølverød & Whist, 2017).

Vi så en stor forskjell på gjennomsnitt og median for celletallet mellom kyr med og uten subklinisk mastitt. Verdiene var høyest hos kyrne med subklinisk mastitt, og medianen var betraktelig høyere hos disse. Dette er forventet basert på kunnskap om celletallsøkning ved infeksjon. Gjennomsnittlig celletall for kyrne med subklinisk mastitt på om lag 187 000 celler/mL var noe lavere enn den mye brukte grenseverdien på 200 000 celler/mL ved mastitt (Dohoo & Leslie, 1991; Sumon et al., 2020; Sølverød & Whist, 2017; van den Borne et al., 2010). Medianen var enda lavere, med en verdi på omtrent 127 000 celler/mL.

Det er også interessant at gjennomsnittlig celletall for kyrne uten subklinisk mastitt var på litt over 100 000 celler/mL. Flere studier har foreslått at et friskt jur har et celletall lavere enn dette (Petzer et al., 2017; Schwarz et al., 2011). Medianen, som var på rundt 30 000 celler/mL, samsvarer godt med opplysninger om at friske, norske mjølkekyr oftest har et normalt celletall på mellom 10 000 og 50 000 celler/mL (Sølverød & Whist, 2017). Den høyeste celletallsmålingen i vårt studieutvalg tilhørte derimot ei ku uten subklinisk mastitt, ut fra definisjonen til Zadoks et al. (Zadoks et al., 2002), noe som er interessant. Det er en mulighet for at den brukte definisjonen for subklinisk mastitt feilaktig ikke fanget opp denne kua. Det må allikevel ikke glemmes at celletallet kan stige av andre årsaker enn infeksjon i juret (Lakic et al., 2009; Pyörälä, 2003; Sølverød & Whist, 2017).



Det er også viktig å være klar over at ulike bakterier forårsaker ulik økning i celletall hos kua. Enkelte bakteriearter er kjent for å gi enten høye eller lave celletall (Reksen, 2015). I vår studie har vi ikke differensiert mellom bakteriearter, men kun sett på forekomst av bakterier generelt.

### **MAA og celletall**

Vi ønsket å undersøke om det var en klar positiv korrelasjon mellom MAA-verdi og celletallsverdi. Det så vi ikke da vi sammenlignet dem ved hjelp av spredningsplottet i Figur 9. Vi så heller ingen negativ korrelasjon, men det var ofte nokså lavt celletall ved høye MAA-verdier, og kyrne med høyest celletall hadde gjerne lave MAA-verdier. Det var få kyr som hadde samtidig høye verdier av både celletall og MAA, men en del kyr hadde en svak økning i begge variable på samme tid.

Om det var slik at celletall og MAA responderte likt på samme stimuli, ville vi forventet en positiv korrelasjon mellom de to variablene. Som tidligere nevnt påvirkes celletallet av en rekke faktorer, og kan ha en kraftig økning innenfor en kort tidsperiode (Sølverød & Whist, 2017). MAA øker hovedsakelig ved akutt inflammasjon (Eckersall & Conner, 1988). Dette betyr at vi vil forvente å se ulike nivåer av celletall og MAA hos ei ku i en gitt situasjon, avhengig av hvilke faktorer kua påvirkes av. Dette er ingen ulempe hvis målet er å kunne bruke MAA som et supplement til celletall. Om begge testene diagnostiserer ei ku med subklinisk mastitt kan man stole mer på resultatet, ettersom det er mindre sannsynlig at både MAA og celletall er samtidig forhøyet av andre årsaker enn en reell inflammasjon.

I likhet med vår studie fant Thomas et al. (Thomas et al., 2015) ingen signifikant sammenheng mellom MAA og celletall. Det ble foreslått at dette kan skyldes at

akutfaseproteinet er mer sensitivt for intramammær infeksjon enn for økt celletall. I en annen studie, av Gerardi et al. (Gerardi et al., 2009) påviste de derimot en signifikant korrelasjon mellom MAA og celletall. Både Gerardi et al. (Gerardi et al., 2009) og Thomas et al. (Thomas et al., 2015), i tillegg til en tredje studie av Hussein et al. (Hussein et al., 2018), foreslår i sine studier at MAA kan brukes som en markør for subklinisk mastitt. Hussein et al. (Hussein et al., 2018) konkluderte med at MAA er et mer nyttig hjelpemiddel enn celletall for diagnostikk av subklinisk mastitt.

Vi ønsket å undersøke MAA sine egenskaper som diagnostisk test for subklinisk mastitt i vårt utvalg, samt sammenligne dette med *avg\_occ\_7* sine egenskaper. Vi valgte ut den grenseverdien som ga samtidig høyest sensitivitet (Se) og spesifisitet (Sp). Ved å bruke denne grenseverdien, på 2 459 ng/mL, fikk vi Se på 75 og Sp på 64. Dermed klarte vi å korrekt klassifisere 9 av de 12 kyrne med subklinisk mastitt. Vi fokuserte på å ha høyest mulig Se, uten at Sp ble for lav, da vi ønsket å kunne ta ut flest mulig kyr med økte MAA-verdier som burde undersøkes videre. Faren med for lav Se er at for få av individene med mulig subklinisk mastitt hadde blitt fanget opp, som ville gjort MAA dårlig egnet som et screeningverktøy.

Vi testet ut en rekke andre grenseverdier for å se hvordan Se og Sp forandret seg. Vi så at Se forble uendret ved lavere grenseverdier, imens Sp sank. For å kunne fange opp flere kyr med subklinisk mastitt måtte grenseverdien settes mye lavere, men dette ville gått på bekostning av Sp. Ved høyere grenseverdi økte Sp, men dette ga en Se som var alt for lav til at MAA kunne blitt brukt som en diagnostisk test.

Celletall er mye brukt som diagnostisk test i forbindelse med både klinisk og subklinisk mastitt. Det er vanlig å bruke en grenseverdi mellom 100 000 og 200 000 celler/mL for å

skille mellom friske kyr og kyr med subklinisk mastitt. I vårt utvalg ga grenseverdien 67 840 celler/mL høyest Se og Sp samtidig, henholdsvis 75 og 69. Vi testet også etablerte grenseverdier fra litteraturen, men ingen av disse ga tilsvarende høy Se og Sp på samme tid, for vårt utvalg. En grenseverdi på 200 000 celler/mL ga Se på kun 42, og Sp på 87.

Grenseverdiene for både MAA og celletall var lavere i vårt utvalg enn vi hadde forventet, sammenlignet med grenseverdier brukt i flere andre studier. Dette kan ha sammenheng med at vi hadde et lite studieutvalg, og få kyr med subklinisk mastitt. I Safi et al. (Safi et al., 2009) sin studie, som omhandler bruk av akutfaseproteiner i diagnostikk av subklinisk mastitt hos storfe, ble en grenseverdi for MAA på 16 400 ng/mL brukt for karakterisering av subklinisk mastitt. Dette ga Se og Sp på henholdsvis 91 og 98. Grenseverdien på 16 400 ng/mL for MAA, ga en grenseverdi for celletall for subklinisk mastitt på 130 celler/mL. Dette ga celletall sensitivitet og spesifisitet på henholdsvis 90 og 72 i Safi et al. (Safi et al., 2009) sin studie. Jaeger et al. (Jaeger et al., 2017) brukte en lavere grenseverdi for MAA på 1 600 ng/mL i sin studie, med Se på 88 og Sp på 65. I den samme studien hadde celletall som diagnostisk test Se på 90 og Sp på 72, når grenseverdien ble satt til 150 000 celler/mL.

I vårt utvalg ga de foreslåtte grenseverdiene for MAA og celletall nokså lik Se og Sp. Begge klarte å korrekt klassifisere 9 av de 12 kyrne i utvalget vårt med subklinisk mastitt. Det vil si at nokså mange av kyrne med subklinisk mastitt ikke vil fanges opp av verken MAA eller celletall som diagnostisk hjelpemiddel i vårt utvalg.

## **Validitet og begrensninger**

All data som ble brukt i vår studie stammer fra kun én besetning, og resultatene er sannsynligvis ikke representative for andre besetninger. Vi hadde også et nokså lite

studieutvalg, bestående av kun 126 kyr. Vi valgte å kun bruke én prøvetaking per ku for å unngå avhengighet mellom prøvene. Det hadde vært optimalt å beholde alle prøveresultater, for deretter å analysere disse samtidig som man tar høyde for korrelasjonen mellom dem. Metodologien som kreves for denne typen analyse var utenfor målet med oppgaven vår, men kan gjøres i framtidige analyser av denne typen målinger. Det lille studieutvalget gjorde at prøvene fra de 12 kyrne som ble definert til å ha subklinisk mastitt hadde stor innvirkning på resultatene i studien. Om vi hadde brukt data fra et større antall kyr spredt over flere besetninger, hadde studien fått både større teststyrke og bedre validitet.

Alle kyrne i vårt studieutvalg var av rasen NRF, som betyr at funnene kun er generaliserbare for andre kyr av samme rase. I de fleste andre studiene om MAA er kyr av rasen Holstein brukt som datagrunnlag, noe som gjør sammenligningene våre med andre studier usikre. På en annen side er det en fordel at det gjøres flere studier på NRF, slik at det er mulig å komme fram til referanseverdier for MAA også hos denne rasen.

Innsamling av data foregikk utelukkende på vinteren og våren, så vi kan dermed ikke si noe om eventuelle sesongvariasjoner i MAA-nivåer. Den korte prøvetakingsperioden gjorde også at en stor andel av kyrne endte opp med å bli tatt prøve av på den samme datoen. Det betyr at de var påvirket av de samme ytre faktorene, noe som kan ha hatt effekt på resultatene. Ideelt skulle vi hatt en lengre prøvetakingsperiode, der en mindre andel av kyrne ble prøvetatt på samme tidspunkt.

Det må også tas hensyn til at det kan ha forekommet både menneskelige og tilfeldige feil. Det kan ha skjedd feil ved uttak eller oppbevaring av speneprøvene, slik at det har blitt en forurensning av prøvematerialet. Feil oppbevaring eller dyrkning kan også ha gitt kyr med

subklinisk mastitt falske negative svar. Ved manuell avlesing av prøvesvar foreligger det også muligheter for menneskelige feil.

## **Framtidsperspektiver**

Det er tenkelig at det i framtida blir mulig å måle MAA-nivåer i mjølk ved hjelp av tilleggsutstyr til mjølkeroboter, slik som det i dag er for blant annet celletall og konduktivitet. Slik oppbygginga av de fleste mjølkeroboter er i dag, vil det være mest praktisk gjennomførbart at MAA måles på samlemjølk. Det kan for eksempel gjøres ved hjelp av automatiserte ELISA-kit for MAA i mjølkeroboten. En slik type måling av MAA kan bidra til å ha en kontinuerlig overvåkning av jurhelsestatusen i besetningen.

Det er også tenkelig at MAA kan måles på enkeltspenenivå, på lik linje med Schalmtest. Da kan man sammenligne resultater for både MAA og celletall, og avgjøre om det burde utføres videre diagnostikk. Celletallet vil variere mer, og av flere ulike årsaker, enn det MAA sannsynligvis gjør. Om ei ku har veldig høyt celletall, men lavt MAA-nivå, er det mindre sannsynlig at det faktisk foreligger en infeksjon i juret.

I framtida hadde det vært interessant å gjennomføre studier hvor man så på sammenhengen mellom bakteriearter og MAA-nivåene de forårsaker. Da kan MAA i større grad brukes til å anslå hvilke typer bakterier det er snakk om ved tilfeller av mastitt, både klinisk og subklinisk.

For at MAA skal være av diagnostisk støtte i jurhelsearbeidet, må det etableres et referanseområde for normalt MAA-nivå hos mjølkekyr. Under norske forhold vil det være mest aktuelt å få på plass referanseverdier særlig for NRF, men gjerne også for andre aktuelle

mjølkekuraser. Å etablere et referanseområde kan vise seg å være krevende, ettersom flere studier konkluderer med at det er stor individuell variasjon i MAA-nivå hos kyr. Siden våre funn viser at nivå av MAA og celletall ikke nødvendigvis korrelerer, i tillegg til at celletall kan stige av andre årsaker enn infeksjoner i juret, vil det være av stor interesse å få MAA som et supplement for å identifisere kyr som burde undersøkes videre.

## **Konklusjon**

Vi fant signifikant forskjell i MAA-nivå mellom kyr med og uten subklinisk mastitt. Kyrne med subklinisk mastitt hadde et høyere gjennomsnittlig MAA-nivå. MAA kan ha verdi som diagnostisk test for subklinisk mastitt, og i denne studien ble sensitiviteten og spesifisiteten estimert til henholdsvis 75 og 64. Mer forskning behøves for å etablere referanseverdier for MAA hos NRF.

## **Takk til bidragsytere**

Vi ønsker å takke veilederne våre, Ingrid Toftaker og Håvard Nørstebø, for teknisk og faglig bistand gjennom databehandlings- og skriveprosessen. Takk for stort engasjement og positivitet gjennom hele perioden, og for raske og gode svar på spørsmål vi har hatt underveis. Vi vil også takke Gunnar Dalen og alle andre som deltok i datainnsamlingen ved Senter for Husdyrforsøk ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet, som ga grunnlaget for dataen brukt i vår oppgave.



## Summary

**Title:** Milk Amyloid A in milk as a diagnostic marker for subclinical mastitis in norwegian dairy cows

**Authors:** Sofie Delphin-Solli, Guri Løfaldli Rindalsholt and Idunn Øien

**Supervisors:** Ingrid Toftaker, Department of Production Animal Clinical Sciences NMBU Veterinærhøgskolen, and Håvard Nørstebø, Specialist advisor TINE SA

The primary aim of this study was to investigate the acute phase protein Milk Amyloid A's properties as a diagnostic marker for subclinical mastitis in norwegian dairy cows. The base of our study was a dataset collected between the years 2016 and 2017 at The Livestock Production Research Centre (SHF) at the Norwegian University of Life Science. The study was performed as a cross-sectional study, since we only kept one observation per cow. Only healthy cows and cows with subclinical mastitis were included in our study. Subclinical mastitis was defined using set criteria, based on bacterial findings on quarter milk samples. Of the 126 cows in our study selection, 12 were determined to have subclinical mastitis.

We investigated if days in milk, parity, somatic cell count, bacterial findings and subclinical mastitis affected the level of MAA. We found statistically significant correlations between MAA and subclinical mastitis, as well as between MAA and bacterial findings. We also estimated average MAA levels for cows with subclinical mastitis and healthy cows, at respectively 20 774 ng/mL and 3 504 ng/mL. We investigated at which cutoff MAA had the best ability to correctly classify cows with subclinical mastitis. When the cutoff was set to 2 459 ng/ml, MAA had sensitivity 75 and specificity 64, meaning that 9 of the 12 cows in our study were correctly classified with subclinical mastitis. We compared MAA and cell counts' abilities as diagnostic tests for subclinical mastitis for the cows in our study. We concluded

that there is great potential for MAA to be used as a supplement to somatic cell count to detect cows with subclinical mastitis in the future.

## Referanser

- Akerstedt, M., Forsbäck, L., Larsen, T. & Svennersten-Sjaunja, K. (2011). Natural variation in biomarkers indicating mastitis in healthy cows. *J Dairy Res*, 78 (1): 88-96. doi: 10.1017/s0022029910000786.
- Berry, Hillerton & Torgerson. (2005). Use of acute phase proteins in bovine milk. *British Mastitis Conference*.
- Bull. (2011). Suggested interpretation of mastitis terminology. *Int. Dairy Fed*.
- Chauzeville, L. (2015). *Rapid detection of microorganisms in the dairy value chain by MALDI-TOF MS*. Brage: University of Stavanger, TN-IMN. Centre for Organelle Research. Upublisert manuskript.
- Dalen, G., Rachah, A., Nørstebø, H., Schukken, Y. H. & Reksen, O. (2019). The detection of intramammary infections using online somatic cell counts. *J Dairy Sci*, 102 (6): 5419-5429. doi: 10.3168/jds.2018-15295.
- Deb, R., Kumar, A., Chakraborty, S., Verma, A. K., Tiwari, R., Dhama, K., Singh, U. & Kumar, S. (2013). Trends in diagnosis and control of bovine mastitis: a review. *Pak J Biol Sci*, 16 (23): 1653-61. doi: 10.3923/pjbs.2013.1653.1661.
- DeGraves, F. J. & Fetrow, J. (1993). Economics of mastitis and mastitis control. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 9 (3): 421-34. doi: 10.1016/s0749-0720(15)30611-3.
- Dohoo, I. R. & Leslie, K. E. (1991). Evaluation of changes in somatic cell counts as indicators of new intramammary infections. *Preventive Veterinary Medicine*, 10 (3): 225 - 237.
- Eckersall, P. D. & Conner, J. G. (1988). Bovine and canine acute phase proteins. *Vet Res Commun*, 12 (2-3): 169-78. doi: 10.1007/bf00362798.
- 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. *Vet Rec*, 148 (2): 35-41. doi: 10.1136/vr.148.2.35.
- Eckersall, P. D. & Bell, R. (2010). Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *Vet J*, 185 (1): 23-7. doi: 10.1016/j.tvjl.2010.04.009.
- 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. *J Dairy Res*, 76 (4): 411-7. doi: 10.1017/s0022029909990057.
- Grönlund, U., Hallén Sandgren, C. & Persson Waller, K. (2005). Haptoglobin and serum amyloid A in milk from dairy cows with chronic sub-clinical mastitis. *Vet Res*, 36 (2): 191-8. doi: 10.1051/vetres:2004063.
- Haghighi, M., Nazifi, S., Ghaderian & Jahromi, A. (2009). Evaluation of milk haptoglobin and amyloid A in high producing dairy cattle with clinical and subclinical mastitis in Shiraz. *Comp Clin Pathol*.
- Haque, E. (2014). Rapid Detection of Subclinical Mastitis in Dairy Cow. *Journal of Fisheries & Livestock Production*, 3 (1).
- Heringstad, M. (2017). Fettprosent i melk hos kyr på beite. *Buskap, utgave 2, 2017* (2).
- Hogen. (1999). Laboratory handbook on bovine mastitis.
- Hussein, H. A., El-Razik, K., Gomaa, A. M., Elbayoumy, M. K., Abdelrahman, K. A. & Hosein, H. I. (2018). Milk amyloid A as a biomarker for diagnosis of subclinical mastitis in cattle. *Vet World*, 11 (1): 34-41. doi: 10.14202/vetworld.2018.34-41.

- Jacobsen, S., Niewold, T. A., Kornalijnslijper, E., Toussaint, M. J. & Gruys, E. (2005). Kinetics of local and systemic isoforms of serum amyloid A in bovine mastitic milk. *Vet Immunol Immunopathol*, 104 (1-2): 21-31. doi: 10.1016/j.vetimm.2004.09.031.
- Jaeger, S., Virchow, F., Torgerson, P. R., Bischoff, M., Biner, B., Hartnack, S. & Rüegg, S. R. (2017). Test characteristics of milk amyloid A ELISA, somatic cell count, and bacteriological culture for detection of intramammary pathogens that cause subclinical mastitis. *J Dairy Sci*, 100 (9): 7419-7426. doi: 10.3168/jds.2016-12446.
- Kandeel, S. A., Megahed, A. A., Ebeid, M. H. & Constable, P. D. (2019). Ability of milk pH to predict subclinical mastitis and intramammary infection in quarters from lactating dairy cattle. *J Dairy Sci*, 102 (2): 1417-1427. doi: 10.3168/jds.2018-14993.
- Kovačević-Filipović, M., Ilić, V., Vujčić, Z., Dojnov, B., Stevanov-Pavlović, M., Mijačević, Z. & Božić, T. (2012). Serum amyloid A isoforms in serum and milk from cows with *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis. *Vet Immunol Immunopathol*, 145 (1-2): 120-8. doi: 10.1016/j.vetimm.2011.10.015.
- Lakic, B., Wredle, E., Svennersten-Sjaunja, K. & Ostensson, K. (2009). Is there a special mechanism behind the changes in somatic cell and polymorphonuclear leukocyte counts, and composition of milk after a single prolonged milking interval in cows? *Acta Vet Scand*, 51 (1): 4. doi: 10.1186/1751-0147-51-4.
- Mackiewicz, A. (1997). Acute phase proteins and transformed cells. *Int Rev Cytol*, 170: 225-300. doi: 10.1016/s0074-7696(08)61623-x.
- McDonald, T. L., Larson, M. A., Mack, D. R. & Weber, A. (2001). Elevated extrahepatic expression and secretion of mammary-associated serum amyloid A 3 (M-SAA3) into colostrum. *Vet Immunol Immunopathol*, 83 (3-4): 203-11. doi: 10.1016/s0165-2427(01)00380-4.
- Nazifi, S., A, K. & Gheisari, H. (2008). Evaluation of serum and milk amyloid A in some inflammatory diseases of cattle. *Iran J Vet Res* 9: 222-226.
- Nguyen, D. A. & Neville, M. C. (1998). Tight junction regulation in the mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 3 (3): 233-46. doi: 10.1023/a:1018707309361.
- Nørstebø, H., Dalen, G., Rachah, A., Heringstad, B., Whist, A. C., Nødtvedt, A. & Reksen, O. (2019). Factors associated with milking-to-milking variability in somatic cell counts from healthy cows in an automatic milking system. *Prev Vet Med*, 172: 104786. doi: 10.1016/j.prevetmed.2019.104786.
- Osterås, O. & Sølverød, L. (2009). Norwegian mastitis control programme. *Ir Vet J*, 62 Suppl 4 (Suppl 4): S26-33. doi: 10.1186/2046-0481-62-s4-s26.
- Petersen, H. H., Nielsen, J. P. & Heegaard, P. M. (2004). Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet Res*, 35 (2): 163-87. doi: 10.1051/vetres:2004002.
- Petzer, I. M., Karzis, J., Donkin, E. F., Webb, E. C. & Etter, E. M. (2017). Somatic cell count thresholds in composite and quarter milk samples as indicator of bovine intramammary infection status. *Onderstepoort J Vet Res*, 84 (1): e1-e10. doi: 10.4102/ojvr.v84i1.1269.
- Pyörälä, S. (2003). Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Vet Res*, 34 (5): 565-78. doi: 10.1051/vetres:2003026.
- Reksen, O. (2015). *Jur og spenesykdommer hos drøvtyggere*. NMBU (red.).
- Sadek, K., Saleh, E. & Ayoub, M. (2017). Selective, reliable blood and milk bio-markers for diagnosing clinical and subclinical bovine mastitis. *Tropical Animal Health and Production*, 49 (2): 431-437. doi: 10.1007/s11250-016-1190-7.
- Safi, S., Khoshvaghti, A., Jafarzadeh, S. R., Bolourchi, M. & Nowrouzian, I. (2009). Acute phase proteins in the diagnosis of bovine subclinical mastitis. *Vet Clin Pathol*, 38 (4): 471-6. doi: 10.1111/j.1939-165X.2009.00156.x.

- Schwarz, D., Diesterbeck, U. S., König, S., Brügemann, K., Schlez, K., Zschöck, M., Wolter, W. & Czerny, C. P. (2011). Microscopic differential cell counts in milk for the evaluation of inflammatory reactions in clinically healthy and subclinically infected bovine mammary glands. *J Dairy Res*, 78 (4): 448-55. doi: 10.1017/s0022029911000574.
- Seegers, H., Fourichon, C. & Beaudeau, F. (2003). Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet Res*, 34 (5): 475-91. doi: 10.1051/vetres:2003027.
- StataCorp. (2019). *Stata Statistical Software: Release 16*. Station, C. (red.).
- Sumon, S., Parvin, M. S., Ehsan, M. A. & Islam, M. T. (2020). Dynamics of somatic cell count and intramammary infection in lactating dairy cows. *J Adv Vet Anim Res*, 7 (2): 314-319. doi: 10.5455/javar.2020.g423.
- Sølverød, L. & Whist, A. C. (2017). *Jurhelse*.
- Thomas, F. C., Waterston, M., Hastie, P., Parkin, T., Haining, H. & Eckersall, P. D. (2015). The major acute phase proteins of bovine milk in a commercial dairy herd. *BMC Vet Res*, 11: 207. doi: 10.1186/s12917-015-0533-3.
- TINE-Mastittlaboratoriet-Molde. (2019). *Uttak av speneprøver*.
- Tóthová, C., Nagy, O. & Ková, G. (2018). Acute phase proteins and their use in the diagnosis of diseases in ruminants: a review. *Veterinarni Medicina*, 59: 163-180.
- Tranås, K. W. (2021). *Data fra melkeroboter kan bidra til friske kyr*. Tilgjengelig fra: <https://www.nmbu.no/forskning/disputaser/pressemeldinger/node/39295>.
- TrideltaDevelopment. (2011). Tilgjengelig fra: <http://www.trideltatld.com/Milk-Amyloid-A.html>.
- van den Borne, B. H., van Schaik, G., Lam, T. J. & Nielen, M. (2010). Variation in herd level mastitis indicators between primi- and multiparae in Dutch dairy herds. *Prev Vet Med*, 96 (1-2): 49-55. doi: 10.1016/j.prevetmed.2010.05.010.
- Wall, S. K., Wellnitz, O., Hernández-Castellano, L. E., Ahmadpour, A. & Bruckmaier, R. M. (2016). Supraphysiological oxytocin increases the transfer of immunoglobulins and other blood components to milk during lipopolysaccharide- and lipoteichoic acid-induced mastitis in dairy cows. *J Dairy Sci*, 99 (11): 9165-9173. doi: 10.3168/jds.2016-11548.
- Zadoks, R. N., Allore, H. G., Hagenaars, T. J., Barkema, H. W. & Schukken, Y. H. (2002). A mathematical model of *Staphylococcus aureus* control in dairy herds. *Epidemiol Infect*, 129 (2): 397-416. doi: 10.1017/s0950268802007483.
- Østerås, O. (2016). *HELSEKORTORDNINGEN, STORFE 2016-STATISTIKKSAMLING*. storfe, T. R. H. f. (red.).



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
67 23 00 00  
[www.nmbu.no](http://www.nmbu.no)