

Utprovning av ny metod för detektion av *Staphylococcus aureus* vid mastit

PERSSON WALLER, KARIN, docent, statsveterinär, adjungerad professor och PERSSON MARIA, biomedicinsk analytiker.*

Staphylococcus aureus-mastit orsakar fortfarande stora problem i många mjölkbesättningar. För ett effektivt juverhålsarbete är det viktigt att säkert och snabbt kunna diagnostisera alla *S aureus*-infekterade kor. Med idag tillgängliga metoder finns det risk att man missar vissa av dessa infektioner. Det finns därför ett behov av säkrare diagnostiska metoder. I artikeln beskrivs en utprovning av ett ELISA-kit för detektion av *S aureus*-infektion. Resultaten visar emellertid att testet inte ger en tillräckligt tillförlitlig diagnostik under svenska förhållanden.

Inledning

Mastit är den mest förlustbringande sjukdomen bland mjölkkor och orsakar årligen stora förluster för mjölkproducenterna. Vid ett stort antal mastiter kan infektion med *Staphylococcus aureus* (*S aureus*) diagnostiseras. Dessa infektioner leder ofta till subkliniska mastiter och minskad mjölkproduktion samt ökad risk för spridning av bakterier till andra kor i besättningen.

För att kunna förebygga mastit i en besättning är det viktigt att identifiera infekterade kor för att åtgärda dem på lämpligt sätt. Hittills har man använt en kombination av celltal och bakterieväxt i mjölken för denna diagnostik. Vid subkliniska *S aureus*-mastiter är dock antalet bakterier i mjölken ibland mycket lågt, vilket gör att man inte alltid upptäcker en infektion såvida man inte gör upprepade provtagningar och bakteriologiska analyser. Detta är kostsamt och tidskrävande. Det finns därför behov av bättre diagnostiska metoder så att infekterade kor kan identifieras på ett säkert, snabbt och billigt sätt.

ELISA-test

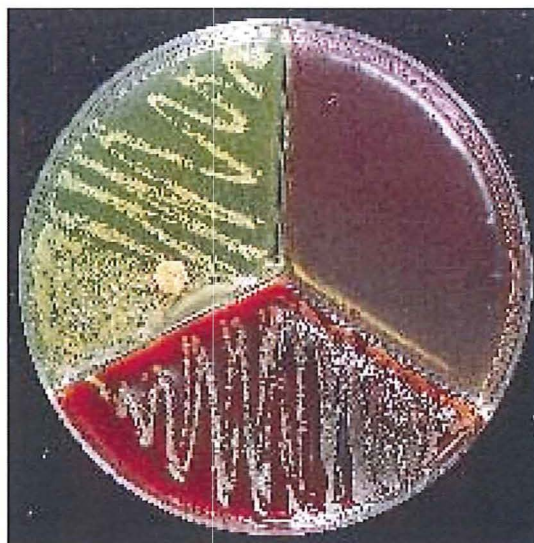
I USA finns ett ELISA-test framtaget för detektion av antikroppar riktade mot *S aureus* i mjölk, vilket har testats för diagnostik både på individ- och besättnings-

nivå (2, 3, 5, 6, 7). Testet bygger på att kon, i samband med en infektion, utvecklar lokala antikroppar mot infektionsämnet. Detta tar ca en till två veckor, varför ett sådant test inte kan upptäcka nya infektioner. Vid subklinisk mastit har dock infektionen pågått under tillräckligt lång tid för att antikroppar ska ha bildats.

Det aktuella testet, *Staphylococcus aureus*-Antibody Test Kit, bygger på att ett bakterieantigen i kitet ska detektera antikroppar i mjölken. Det bakterieantigen som används kommer från en amerikansk human *S aureus*-stam. Skillnader mellan olika

bakteriestammar kan förekomma (1) varför det inte är självklart att detta test även fungerar för att upptäcka antikroppar riktade mot bakteriestammar förekommande i svenska mjölkbesättningar.

Syftet med föreliggande studie var därför att undersöka ett antal mjölkprover med känd bakteriologisk diagnos från juverdelar med eller utan infektion med *S aureus*, för att undersöka om testet fungerar även under svenska förhållanden. Avsikten var också att jämföra resultaten från analys av juverdelprov och samlingsprov från juver hos enskilda kor samt att undersöka om det finns



Figur 1. SELMA-platta med växt av penicillinpositiva *Staphylococcus aureus*. Författarna har undersökt hur ett antikroppsbaserat test för detektion av bakterien fungerar under svenska förhållanden. Foto: Bengt Ekberg.

ett samband mellan celltalsnivå och förekomst av *S aureus*-antikroppar i tankmjölkprover.

Material och metoder

Mjolkprover

Mjolkprover togs både i mjölkkrör och med MASTISTRIP (SVA, Uppsala) från individuella juverdelar hos 88 kor från fem olika besättningar i sydöstra Sverige i samband med en tidigare studie (8) och frystes (-20°C). Proverna kom från kor i juverhälsoklass 6-9, dvs från kor med subklinisk mastit i minst en juverdel. Fler-talet kor (61 stycken) provtogs vid två tillfällena med en månads mellanrum. Bakteriologisk undersökning av proverna gjordes vid Avdelningen för mastit och substratproduktion, SVA, Uppsala, enligt ackrediterade rutiner. Celltal, mätt som ATP analyserades från MASTISTRIP-kassetten. Bakteriologisk undersökning gjordes både av mjolkproverna och MASTISTRIP-kassetten. Samlingsprov från varje juver/ko gjordes genom att blanda lika volymer mjölk från vardera juverdel. Endast kor med prover från alla fyra juverdelarna (80 kor) ingick i detta material. Samlingsprov erhölls vid två provtagningstillfällena från 54 av dessa kor och vid ett tillfälle från 26 kor. Prover från individuella juverdelar (126 prover) valdes ut beroende på bakteriefynd från 84 av korna. Från varje ko analyserades antikropps-nivån endast från ett prov per provtagningstillfälle.

Tabell 1. Antal juverfjärdedelsprover med positiv, tveksam eller negativ reaktion i *S aureus*-ELISA, fördelat på olika bakteriologiska fynd.

Bakteriefynd	ELISA positiv	ELISA tveksam	ELISA negativ	Totalt
<i>S aureus</i>	28	0	5	33
Koagulasnegativa stafylokokker (f d stafylokokker övriga)	7	2	9	18
Str dysgalactiae, Str uberis	13	1	6	20
Gramnegativer	3	0	1	4
Ingen växt/blandflora + ATP>10	16	2	10	28
Ingen växt/blandflora + ATP<10	2	5	16	23
Totalt	69	10	47	126

Tankmjölkprover insamlades via mjölkbedömningslaboratorium (Steins, AC, Jönköping). Alla prover insamlades vid ett tillfälle och 20 prover per celltalsklass (1: <100 000, 2: 1-200 000, 3: 2-300 000, 4: 3-400 000, 5: >400 000 celler/ml) frystes och skickades till SVA för analys. Som framgår av Figur 2 var de faktiska celltalen i överensstämmelse med specificerade selektionskriterier.

Analys av *S aureus*-antikroppar

Förekomst av antikroppar mot *S aureus* analyserades med hjälp av ELISA-kit enligt tillverkarens instruktioner (*Staphylococcus aureus* Antibody Test Kit, Veterinary Medical Research and Development (VMRD), Pullman, WA, USA). Ett prov som genererar ett värde för optisk densitet (OD) som är lika med eller större än den positiva kontrollen anses positivt. Ett prov som har ett OD-värde som är 15 procent lägre än den positiva kontrollen anses negativt. Ett prov vars OD hamnar mellan dessa värden

anses misstänkt och bör analyseras om. I denna studie gjordes inga sådana konfirmerande analyser.

Resultat

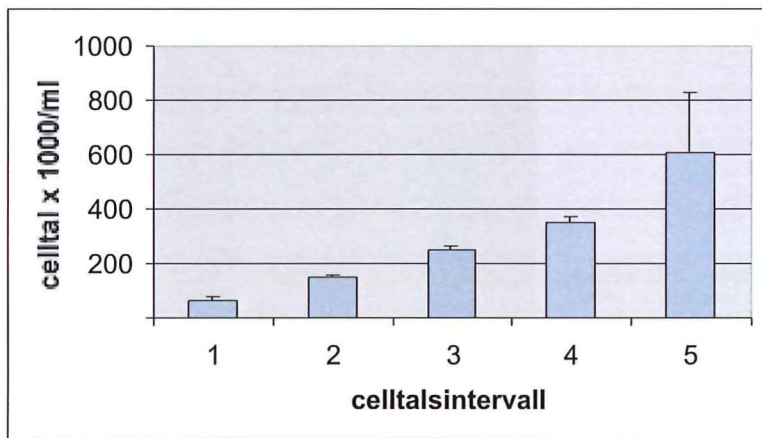
Individuella juverdelprover

Bakteriologiska fynd och ELISA-resultat ges i Tabell 1. I 33 av 126 mjolkprover detekterades växt av *S aureus*. I 51 prov kunde ingen specifik växt av bakterier återfinnas. Dessa prover delades upp i två ATP-klasser, ATP <10 och ATP ≥10, för att särskilja juverdelar med subklinisk mastit. I övriga prover återfanns växt av olika streptokocker, koagulasnegativa stafylokokker och, i ett fåtal fall, gramnegativa bakterier. Av 33 prover med växt av *S aureus* var 28 (85 %) positiva i ELISA-testet. Bland övriga prover var 41 av 93 prov, dvs 44 procent, ELISA-positiva. Cirka en tredjedel (35 %) av proverna utan specifik bakteriologisk växt och 44 procent av proverna med växt av andra patogener var ELISA-positiva.

Om man räknar alla tveksamma prover (10 stycken) som negativa var ELISA-testets sensitivitet 85 procent och specificitet 56 procent för denna provgrupp. Det positiva prediktionsvärdet var 40 procent medan det negativa prediktionsvärdet var 91 procent. Om man istället räknar alla tveksamma prover som positiva blev testets sensitivitet 85 procent, specificitet 45 procent, positivt prediktionsvärde 35 procent och negativt prediktionsvärde 89 procent.

Samplingsprov

I Tabell 2 anges bakteriologiskt fynd detekterat i minst en av de



Figur 2. Medelcelltal (SD) i tankmjölk från prover i fem olika celltalsintervall (1: <100 000, 2: 1-200 000, 3: 2-300 000, 4: 3-400 000, 5: >400 000 celler/ml).

Tabell 2. Antal samlingsprov från juver med positiv, tveksam eller negativ reaktion i *S aureus*-ELISA, fördelat på olika bakteriologiska fynd.

Bakteriefynd	ELISA positiv	ELISA tveksam	ELISA negativ	Totalt
<i>S aureus</i>	26	3	9	38
Koagulasnegativa stafylokokker (fd stafylokokker övriga)	6	2	11	19
Str dysgalactiae, Str uberis	16	1	4	21
Gramnegativer	3	0	1	4
Ingen växt/blandflora + ATP > 10	12	3	8	23
Ingen växt/blandflora + ATP < 10	11	2	16	29
Totalt	74	11	49	134

Tabell 3. Antal tankmjölkprover med positiv, tveksam eller negativ reaktion i *S aureus*-ELISA, fördelat på olika celltalsintervall (grupp 1: <100 000, 2: 1-200 000, 3: 2-300 000, 4: 3-400 000, 5: >400 000 celler/ml).

Celltalsintervall	ELISA positiv	ELISA tveksam	ELISA negativ	Totalt
1	5	4	9	18
2	12	2	4	18
3	14	1	3	18
4	13	2	3	18
5	9	4	5	18
Totalt	53	13	24	90

fyra juverdelarna från vars mjölkprov samlingsprovet härstammar, samt ELISA-resultat för de olika grupperna. Hos 38 av 134 samlingsprov kunde växt av *S aureus* diagnostiseras i minst en juverdel. Hos 52 samlingsprov kunde ingen specifik växt av bakterier återfinnas. Av 38 prov med växt av *S aureus* i någon juverdel var 26 (68 %) positiva i ELISA-testet. Bland övriga prover var 48 av 96 prov, dvs 50 procent, ELISA-positiva. Knappt hälften (44 %) av proverna utan specifik bakteriologisk växt och 57 procent av proverna med växt av andra patogener var ELISA-positiva.

Om man räknar alla tveksamma prover som negativa var ELISA-testets sensitivitet 68 procent och dess specificitet 50 procent. Det positiva prediktionsvärdet var 35 procent medan det negativa prediktionsvärdet var 80 procent. Om man istället räknar alla tveksamma prover som positiva blev testets sensitivitet 76 procent, specificitet 42 procent, positiva prediktionsvärde 34 procent och negativa prediktionsvärde 82 procent.

Tankmjölkprov

18 tankmjölkprover per celltalsklass analyserades. I Tabell 3 ges de faktiska ELISA-resultaten och i Figur 3 ges andelen ELISA-

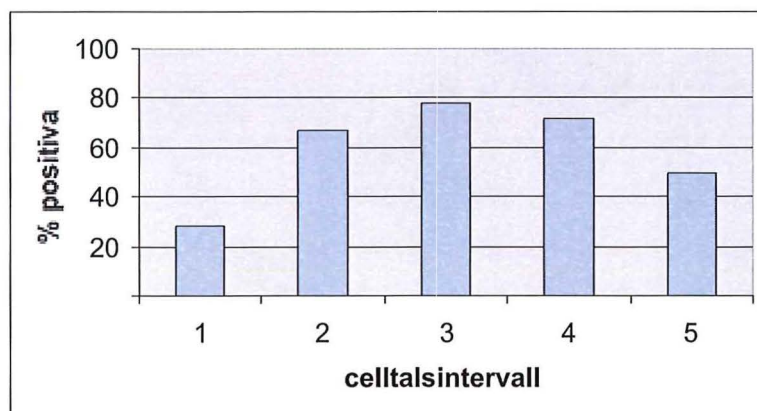
positiva prover i de olika celltalsklasserna. Andelen positiva prover var högst i celltalsgrupp 3, dvs i klassen 2-300 000 celler/ml. I celltalsgrupp 1, dvs <100 000 celler/ml, var 28 procent av proverna positiva.

Diskussion

Resultaten från undersökningen visar att sensitiviteten och specificiteten hos testet var låg, men var bättre när individuella juverdelar analyserades jämfört med samlingsprov från juver. Bland prover med känd förekomst av *S aureus*-infektion var andelen falskt negativa större i samlingsprovsanalysen, vilket tyder på en utspädningseffekt. Även bland

juverdelproverna fanns falskt negativa prover. Eftersom det tar ca en till två veckor innan antikroppar bildas efter en infektion, skulle detta kunna förklaras av att infektionen var relativt ny. De utvalda korna hade dock långvarigt (≥ 3 månader) förhöjda celltal, varför detta inte är en trolig orsak till resultatet.

I beräkningen av specificitet och sensitivitet grupperades proverna i bakteriologiskt *S aureus*-positiva respektive -negativa. Bland proverna utan specifik bakteriologisk växt finns en möjlighet att en del av dessa härstammar från juverdelar/juver med *S aureus*-infektion. Av 28 juverdelprover med bakteriologiskt negativt resultat men förhöjt ATP, dvs subklinisk mastit, var 16 (57 %) ELISA-positiva och två tveksamma. Det är inte orimligt att anta att dessa prover verkligen härstammar från *S aureus*-infekterade juverdelar/juver. Vad som talar emot detta är att dessa kor var bakteriologiskt negativa vid två tillfällen med en månads mellanrum och vid odling av både MASTISTRIP och mjölkkrör. Cirka hälften (55 %) av juverdelproverna med växt av andra juverpatogener var emellertid också ELISA-positiva medan endast två (9 %) av 23 bakteriologiskt negativa prover med lågt ATP var positiva i ELISA-testet. Bland samlingsproverna var dock en större andel (38 %) av den senare kategorin ELISA-positiva.



Figur 3. Andel (%) *S aureus*-ELISApositiva prov av tankmjölkprover (n=18/grupp) med olika celltal (1: <100 000, 2: 1-200 000, 3: 2-300 000, 4: 3-400 000, 5: >400 000 celler/ml).

Sensitiviteten och specificiteten har rapporterats vara ganska hög i andra studier (5, 6) men sämre resultat har också rapporterats (3, 12).

Ingen korrelation mellan celltal och ELISA-resultat

Det fanns ingen korrelation mellan celltal och ELISA-resultat när det gäller tankmjölksproverna. *S aureus* är det vanligaste bakteriefyndet i samband med både subkliniska och kliniska mastiter i Sverige (9, 10) och celltalet är ett relativt gott mått på juverhälsan, åtminstone på andelen kor med subkliniska mastiter. En ökande infektionsfrekvens med *S aureus* i besättningen, och därmed ökande antikroppstitrar, förväntades sammanhånga med ökat celltal. I denna undersökning återfanns dock den högsta andelen positiva prover (78 %) i celltalskategorin 2–300 000 celler/ml medan 28 procent och 50 procent av proverna i lägsta respektive högsta celltalsintervallet var positiva. Det faktiska juverhälsoläget och infektionspanoramats i de besättningar vars tankmjölk undersöktes är inte känt.

Fabrikanten av ELISA-testet anger att *S aureus*-infektion i en juverdel ökar antikroppstitern i övriga juverdelar hos den kon. De anger därför att ett prov inte kan användas för att identifiera

individuella infekterade juverdelar. I denna studie kom dock alla bakteriologiskt *S aureus*-negativa prover från kor vilka var bakteriologiskt negativa för *S aureus* i alla juverdelar. I flertalet fall var korna dessutom undersökta bakteriologiskt och befunda *S aureus*-negativa vid två tillfällen.

Ökad permeabilitet mellan blod och mjölk

Man har också rapporterat att *S aureus*-antikroppar kan utsöndras i mjölken hos kor på grund av en infektion med *S aureus* i någon annan kroppsdel eller på grund av en tidigare, nu avläkt, juverinfektion (6). En risk för detta finns hos kor upp till 30 dagar efter kalvning eller hos kor som producerar mindre än 14 kg mjölk per dag (2). Runt kalvning och sinläggning är nämligen genomsläpligheten mellan blod och mjölk högre, vilket resulterar i ett ökat inflöde av immunglobuliner till juvret (4, 11). Dessa faktorer kan ha påverkat resultatet även i denna studie och ge en möjlig förklaring till den höga andelen positiva prover även i tankmjölksprover med det lägsta celltalet.

I samband med alla typer av mastit ökar dessutom permeabiliteten mellan blod och mjölk i varierande grad, varför *S aureus*-antikroppar från cirkulationen

kan läcka in i juvret även vid juverinfektioner/mastiter orsakade av andra agens än *S aureus*. Detta skulle kunna förklara varför andelen ELISA-positiva prover var så hög bland prover med annan juverinfektion.

Inte ett lämpligt test

Som nämndes inledningsvis är det viktigt att kunna identifiera *S aureus*-infekterade kor för att göra det möjligt att åtgärda dem på lämpligt sätt. Ett idealt test ska med stor säkerhet kunna identifiera *S aureus*-positiva alternativt negativa kor, helst på juvernivå för att möjliggöra analys av samlingsprov. Resultaten från denna studie visar att en alltför stor andel bakteriologiskt *S aureus*-positiva prov är falskt negativa i ELISA-testet. Resultaten tyder också på att en relativt stor andel av de prover som var bakteriologiskt *S aureus*-negativa var, med stor sannolikhet, falskt positiva i ELISA-testet. Utifrån dessa resultat anses inte detta ELISA-test vara lämpligt för diagnostik av *S aureus*-mastit under svenska förhållanden.

Summary

Testing a new method for detection of Staphylococcus aureus mastitis in dairy COWS

The purpose of the presented study was to evaluate a, for Swedish conditions, new method to diagnose udder infections with *Staphylococcus aureus* in Swedish dairy cows. *S aureus* is the most common udder pathogen and can cause different types of mastitis. Today, bacteriological examination of milk samples in combination with measurement of the somatic cell count (SCC) is used to diagnose the infection. During subclinical *S aureus* mastitis, the number of bacteria excreted in milk can be low during certain periods. Thus, a milk sample can be bacteriologically false negative. In USA, a test for detection of antibodies against *S aureus* in milk using ELISA-technique is commercially available. However, this test



Resultaten från denna studie visar att en alltför stor andel bakteriologiskt *S aureus*-positiva prov är falskt negativa i ELISA-testet. Foto: Bengt Ekberg.

has not been evaluated under Swedish conditions.

In this study, udder quarter milk samples and composite milk samples from udders/cows with or without *S aureus* infection were identified by repeated bacteriological examinations. Moreover, bulk milk samples of different SCC classes were analysed. The results showed that the numbers of false positive and false negative samples, using the ELISA-test, were both too high. Thus, this test is not considered suitable for Swedish conditions.

Tack

Författarna vill tacka Charlotte Hallén Sandgren, Lolita Nilsson och Eva Liljekvist för tillgång till mjölkprover samt framtagning av resultat från den bakteriologiska undersökningen.

Referenser

1. Aarestrup FM, Wegener HC, Jensen NE, Jonsson O, Myllys V, Thorberg BM, Waage S & Rosdahl VT. A study of phage- and ribotype patterns of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in the Nordic countries. *Acta Vet Scand*, 1997, 38, 243-252.
2. Adams DS, McDonald JS, Hancock D & McGuire TC. *Staphylococcus aureus* antigens reactive with milk immunoglobulin G of naturally infected dairy cows. *J Clin Microbiol*, 1988, 26, 1175-1180.
3. Bartlett PC, Erskine RJ, Gaston P, Sears PM & Houdjik HW. Enzyme-linked immunosorbent assay and microbiologic culture for diagnosis of *Staphylococcus aureus* intramammary infection in cows. *J Food Prot*, 1996, 59, 6-10.
4. Brandon MR, Watson DL & Lascelles AK. The mechanism of transfer of immunoglobulin into mammary secretion of cows. *Aust J Exp Biol Med Sci*, 1971, 49, 613-623.
5. El-Rashidy AA, Fox LK & Gay JM. Diagnosis of *Staphylococcus aureus* intramammary infection by detection of specific antibody titer in milk. *J Dairy Sci*, 1992, 75, 1430-1435.
6. Gay JM & Fox LK. *Staphylococcus aureus* detection: Where does the Staph-Ab test fit? *Proc Nat Mastitis Council 32nd Ann Mtg*, 1993, 12-18.
7. Grove TM & Jones GM. Use of an enzyme-linked immunosorbent assay to monitor the control of *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Dairy Sci*, 1992, 75, 423-434.
8. Hallén Sandgren C. Behandlingsresultatet vid systemisk eller lokal antibiotikaterapi av bovin subklinisk mastit under pågående laktation samt utvärdering av en metod för fältförsök inom problemområdet mastit baserat på ett flexibelt dataprogram. Slutrapport Dnr 109/94, Stiftelsen Lantbruksforskning, Stockholm, 1999, 1-29.
9. Nilsson L, Franklin A & Funke H. Antimicrobial drug susceptibility of bovine udder pathogens in Sweden. *Proceedings, Society for Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine*, Chester, England, 1997.
10. Svensk Mjolk. Djurhälsovård 1999/2000 - Redogörelse för husdjursorganisationens djurhälsovård, Eskilstuna, 2000.
11. Watson DL, Brandon MR & Lascelles AK. Concentrations of immunoglobulin in mammary secretion of ruminants during involution with particular reference to selective transfer of

IgG1. *Aust J Exp Biol Med Sci*- 1972, 50, 535-539.

12. Watts JL, Owens WE, Ray CH & Washburn PJ. Evaluation of the ProStaph I® test for detection of *Staphylococcus aureus* intramammary infections in dairy cattle. *Agri-Practice*, 1992, 13, 31-34.

*Docent, statsveterinär, adjungerad professor Karin Persson Waller, Avdelningen för idisslar- och svinsjukdomar, Statens Veterinärmedicinska Anstalt, 751 89 Uppsala och Institutionen för obstetrik och gynekologi Sveriges Lantbruksuniversitet, Box 7039, 750 07 Uppsala.
Biomedicinsk analytiker Maria Persson, Avdelningen för idisslar- och svinsjukdomar, Statens Veterinärmedicinska Anstalt, 751 89 Uppsala.



DITT LABORATORIEVAL

Kliniskt mikrobiologiskt laboratorium.
Ackrediterade laboratorie-diagnoser.
Vi utför även Livsmedelsanalyser.

www.mybac-vettech.se

Västertorpsvägen 135, Box 96, 129 22 Hägersten.
Telefon: 08 55 635 625. Telefax: 08 449 46 56.
E.mail: vet@mybac-vettech.se.

Kollegialt Nätverk - veterinärer stödjer veterinärer

Ett självständigt nätverk bestående av veterinärer som på ideell grund står till förfogande för kolleger som behöver en samsalspartner när livet känns komplicerat. Vi lyssnar och ger stöd efter bästa förmåga till kolleger med personliga problem med anknytning till yrket eller som av annan anledning sviktar socialt, psykiskt eller fysiskt.

Syftet med det Kollegiala Nätverket är att veterinärer enkelt och snabbt ska kunna få stöd av en medmänniska som samtidigt är väl förtrogen med veterinärens livsvillkor. Anledningen till att ta kontakt kan till exempel vara ohälsa, stress, privata problem och kriser, utbrändhet, mobbing, hot eller anmälan för felbehandling.

Tveka inte att utnyttja det Kollegiala Nätverket om du behöver någon att tala med.

Nätverkets medlemmar:

Namn	Ort	Telefon	E-post
Sten Berggren	Trosa	0156-136 84	
Gunnar Bergsten	Vallentuna	08-512 403 50	
Karina Burlin	Umeå	090-12 06 83	karina.burlin@kommunicera.umea.se
Eva v Celsing	Eskilstuna	016-292 93, 291 03	
Anne-Marie Dalin	Knivsta	018-38 11 03	anne-marie.dalin@og.slu.se
Erik Kjellgren	Arboga	0589-169 78, 192 80	kjellgren.erik@swipnet.se
Herbert Lundström	Vänersborg	0521-660 99	herbert@gotanet.se

