



Institutnavn: Institut for Veterinær- og Husdyrvidenskab

Kandidatspeciale i Veterinærmedicin

Søren Koggersbøl Skadborg, blf516

Mads Dalgaard Skytte, mnv484

En gennemgang og vurdering af den praktiserende kvægdyrlæges redskaber til håndtering af B-streptokoksmittede besætninger.

Vejleder: Carsten Enevoldsen

Afleveret den: 27. januar 2018

Afdelingsnavn: Institut for Veterinær- og Husdyrvidenskab
Sektion for Production, Nutrition and Health

Forfatter(e): Søren Koggersbøl Skadborg
Mads Dalgaard Skytte

Titel : En gennemgang og vurdering af den praktiserende kvægdyrlæges redskaber
til håndtering af B-streptokoksmittede besætninger

Vejleder: Carsten Enevoldsen
Professor
Institut for Veterinær- og Husdyrvidenskab
Sektion for Production, Nutrition and Health
Grønnegårdsvej 2
1870 Frederiksberg C

Afleveret den: 27. januar 2018

Indholdsfortegnelse

Sammendrag	5
English abstract	6
Tak	8
Oversigt over brugte forkortelser	9
Formål.....	10
Besætning	10
Malkning.....	10
Rengøring.....	11
Yverbetændelser.....	11
B-streptokokker.....	11
Goldningsrutine.....	13
Definition af status "B-streptokokker: smittet"	13
<i>Streptococcus agalactiae</i>	13
Lovgivning.....	13
Påvisning på ko-niveau.....	14
Påvisning på tankmælk.....	16
Konsekvens af status "B-streptokokker: smittet"	19
Lovgivning.....	19
Human sundhed.....	19
Besætnings sundhed.....	20
Produktionstab.....	23
Metoder til håndtering af status "B-streptokokker: Smittet"	24
Hygiejne.....	25
Opdeling:.....	26
Behandling:.....	27
Udsætning.....	28
Værktøjer til beslutningsstøtte.....	28
Opsummering	28
Anbefaling til ejer af casebesætningen.....	32
En generel statistisk model til besætnings specifik estimering af statistiske sammenhænge mellem typiske forløbsdata i en malkekobesætning	33
Datagrundlaget for vores modeleksempel.....	33

Modelkontrol	36
Modelopbygning og modeloptimering	38
Diskussion	41
Konklusion:	45
Overlevelse af Strep. agalactiae i sengebundsmateriale.....	46
Introduktion	46
Materialer og Metode	46
Statistik	49
Resultater	51
Diskussion	54
Konklusion	57
BILAG	58

Sammendrag

Hvert år stemples ca. 6% af danske mælkeproducenter landet over som positive for mastitisbakterien *Streptococcus agalactiae* oftest benævnt B-streptokok (fremover forkortet til SA). En status som smittet med SA fremgår på forsiden af den pågældende besætnings offentligt tilgængelige data i CHR udskrift (www.chr.fvst.dk). SA er omfattet af bekendtgørelse om overvågning af mastitis, og status som SA-smittet har konsekvenser for den pågældende besætning. Besætningens dyrlæge skal derfor kunne rådgive ejeren i denne situation.

Med en praktiserende kvægdyrlæge som målgruppe for denne opgave beskriver vi alment tilgængelige viden om, hvad CHR-register status "B-streptokok: smittet" omfatter, herunder definition, konsekvenser, samt grundlag for og metoder til håndtering af SA-smitte i en konkret besætning. Beskrivelsen tager udgangspunkt i en konkret vestjysk besætning med Automatisk malkesystem (AMS) med status "B-streptokok: smittet". Ud fra vores tolkning af restriktioner ved SA-smitte i bekendtgørelsen om SA, er disse restriktioner kun en adfærdsbegrænsning for besætningsejeren, hvis vedkommende ønsker at deltage i samlinger med andre køer, hvor malkning kan finde sted.

Smittet status tildeles på baggrund af et positivt testresultat i en leverandørmælkeprøve. Et positivt resultat skal bekræftes med opfølgende tests, hvilket ikke gælder for et negativt resultat.

Vi gennemgår alment kendte metoder til håndtering af SA-forekomst og præsenterer det mest relevante løsningsforslag for den konkrete besætning, vi har arbejdet med. Dette gøres for at imitere den situation, som en lokal praktiserende kvægdyrlæge står overfor (lokal evidens). På dette grundlag vurderer vi, at de praktiske rammer i besætningen sandsynligvis ikke gør forsøg på udryddelse rentabelt.

Dyrlægen vil ofte stå med den udfordring, at der ikke foreligger praktisk anvendelig generel viden om betydningen af en given faktor (fx yverinfektion med SA) for fx ydelse og celletal. Da der manuelt og automatisk kan opsamles store datamængder i malkekobesætninger, kan det være muligt at gennemføre multivariable statistiske analyser af besætningens egne data. På baggrund af data fra Kvægdatabase giver vi et eksempel på en sådan besætnings-specifik analyse der kan tilpasses flere problemstillinger (fx forhøjet celletal eller ledningsevne). Modeleksemplet er en *random-coefficient normalfordelings regressionsmodel*, der har til formål at estimere statistiske sammenhænge mellem SA og mælkeydelse (på i Energi-Korrigeret Mælk, EKM) i besætningen. Med udgangspunkt i modeleksemplet argumenterer vi for, at prøvetagning til PCR-testning af SA kan ske på et mere hensigtsmæssigt tidspunkt vha. monitoreringsmetoder allerede brugt på gården.

De nuværende anbefalinger for sanering og håndtering af SA i besætningerne bygger på en antagelse om, at SA-bakterien kun findes i yveret hos inficerede køer, og dermed at miljøet ikke udgør et muligt reservoir. En nylig udgivet videnskabelig artikel stiller imidlertid spørgsmålstegn ved denne antagelse. Hvis antagelsen

om, at SA ikke kan overleve i andre omgivelser end mælk og yver er forkert bør de anbefalede tiltag til håndtering af og forsøg på udryddelse af SA revurderes.

Der foreligger kun meget sparsom viden om SA-overlevelse og -vækst i strøelse og staldmiljø i øvrigt. Ny viden om SA-overlevelse i miljømateriale kan fremskaffes ved opsætning af systematiske laboratorieforsøg til belysning af overlevelse/vækst af SA i forskelligt materiale fra kostalde ved forskellige temperaturer. Som en art pilotforsøg til udvikling af en sådan laboratorieopsætning planlagde og udførte vi et eksperimentelt laboratorieforsøg, hvor overlevelse af SA i imiteret sengebundsmateriale (halm tilblandet fæces og mælk) kan estimeres. Vha. en *random-coefficient Poisson-regressionsmodel* viste vi et fald for SA i sengebundsmaterialet på over 5 dage og estimerede med ekstrapolation med modellen en overlevelsestid på op mod 100 dage. Pilotforsøget indikerede, at det er nødvendigt at kontrollere for potentielt systematisk forstyrrende faktorer med indflydelse på variationen i tælleletal på agarplader (mediumtype (blod, eller to forskellige selektive medier) og hvilken prøveudtager, som havde håndteret prøverne). Den valgte statistiske model tillod også håndtering af tilfældige effekter i forekomst af SA i tidsperioden.

English abstract

Every year, around 6 % of danish dairy producers all over the country are branded as test positive for the mastitis bacterium *Streptococcus agalactiae* often referred to as B-streptococci (hereafter abbreviated as SA). The status as infected by SA is publicly displayed on the front page of the CHR-register (www.chr.fvst.dk), for the herd in question. Monitoring of SA is according Danish legislation and the status as SA-infected has consequences for the herd in question. Therefore it is imperative that the affiliated herd veterinarian is able to offer counselling with regard to this matter.

This paper is aimed at the practising herd veterinarian, as we describe the readily available knowledge surrounding the CHR-register status: "B-streptococci: infected", including definition, consequences, basis for and methods for managing SA-infection in a specific herd. This description is based on a specific herd in western jutland with an automatic milking system (AMS), with status "B-streptococci: infected". Based on our interpretation of the legislation regarding SA, these restrictions are only a limitation for the herd owner, if he or she wishes to bring cattle to gatherings with other cattle, where milking might take place.

Infected status is assigned to herds based on results from tests on bulk tank milk samples. A positive result must be confirmed, with subsequent tests this condition does not apply to a negative result.

We review methods for the management of SA-occurrence and present in our opinion the best method for case herd. We do this to mimic the situation a local practicing herd veterinarian faces (local evidence). It is our assessment that the practical framework in the herd prevents an attempt on eradication from being profitable.

The veterinarian is often faced with the challenge, that applicable general knowledge of the effects of a given factor (e.g. udder infection with SA) on e.g. yield and cell count is not available. In a dairy cow herd there is potential for manual or automated collection of large quantities of data, which facilitate, multivariable statistical analysis of specific herd data.

Using data from The Cattle Database we give an example of such a herd specific analysis, that can be adjusted to match several scenarios (e.g. elevated cell counts or increase in electrical conductivity). The model example is a *random-coefficient normal distribution regression model* designed to estimate statistical relationships between SA and milk yield (measured in Energy Corrected Milk, ECM) in the herd. Based on this model example we argue that sampling milk for PCR-testing can be done at more appropriate time. This time can be determined by use of monitoring that is already taking place in the herd.

The current recommendations for eradication and management of SA in herd, is based on the assumption that the SA-bacteria is confined to the udder of infected cows, and that the environment is a negligible reservoir. However, a recently published scientific paper questions this assumption. If the assumption, that SA cannot survive in other settings than milk and udder, is wrong, then the recommendations for management and eradication of SA should be reevaluated.

There exist only scarce amounts of knowledge on SA's survival and growth in bedding and barn environment. New knowledge on SA-survival in the environment can be procured, by designing a systematic laboratory experiment to shed light on the survival or growth of SA in different materials from cattle sheds, at different temperatures. As a kind of pilot experiment for the development of such a study design, we planned and executed an experimental laboratory setup, for the estimation of SA-survival in imitated used bedding material (chopped straw mixed with milk and cow manure).

Through use of a *random-coefficient poisson-regression model* we show a reduction of SA in the bedding material over five days and by extrapolation with the model we estimate a survival of up to 100 days. The pilot experiments results indicate the necessity of controlling for potential systemic disturbing factors influencing the plate-count on agar plates (medium type (blood or two different selective media) and which researcher handled the samples). The chosen statistical model also allowed for modeling of random effects in the presence of SA in the time period.

Tak

Først og fremmest vil vi gerne takke Carsten Enevoldsen som gennem hele forløbet har været en engageret og kompetent vejleder. Desuden vil vi også gerne takke Line Svennesen Dorte Bay Lastein; Besætningsejeren og Familie Karl Pedersen Ilka Klaas, Besætningsdyrlægen Jørgen Katholm, , Katja Kristensen, Lærke Astrup, , Yasser Mahmmoud, Signe Skadborg, Bjarne Bjerg, Louise Pilegaard

Oversigt over brugte forkortelser

AMS	Automatisk Malkesystemet
B-streptokokker	<i>Streptococcus agalactiae</i>
CFU	Colony Forming Units
Ct	Cycle Threshold
DMS	DMS dyreregistering
NMC	National Mastitis Council
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Puls Felt Gel Elektroforese
SA	<i>Streptococcus agalactiae</i>
SAU	<i>Staphylococcus aureus</i>
SOP	Standard Operating Procedure
YKTR	Ydelseskontrollen

Formål

Med de praktiserende kvægdyrlæger som målgruppe, skal denne opgave beskrive og vurdere den alment tilgængelige viden om, hvad CHR-register status "B-streptokok: smittet" omfatter, herunder definition, konsekvenser, samt grundlag for og metoder til håndtering af smitte med *Streptococcus agalactiae* (herefter omtalt som SA eller B-streptokok) i en konkret besætning. Vi anvendte en 'evidenspyramide' (Bilag 1) beskrevet af Lastein¹ som grundlag for vores vurdering af anvendeligheden af de foreliggende informationer og anbefalinger (evidens). Beskrivelsen tager udgangspunkt i en konkret vestjysk besætning med automatisk malkesystem (AMS) med status "B-streptokok: smittet".

Besætning

Besætningen som danner rammer for dette speciale ligger nær Ølgod i Vestjylland. Den daglige drift varetages af besætningsejeren, konen og sønnen. Per 5. december 2017 er 188 køer, 210 kvier og 15 handyr i besætningen. Siden 6. maj 2009 har besætningen været på Salmonella Dublin niveau 1 og er B-streptokokker: smittet. Besætningen har indgået rådgivningsaftale med en nærliggende dyrlæge praksis. Besætningen udgøres af tre stalde, hvoraf to har adresse på hovedgården omkring Ølgod. Første stald huser lakterende og præparturiente køer (malkestald) og anden stald huser kvier, ældre kalve og nogle af gold-køerne (kviestald). Mellem kviestald og malkestald står enkelthytter med yngre kalve, samt fælleshytter med ældre kalve. Den tredje stald ligger 400 m fra hovedgården, hvor resten af goldkøerne holdes i en stald med åben gavl.

Malkning

Tre Lely Astronaut A3 malkerobotter (Lely Holdings, Maasluis, Holland), anskaffet i 2006, er installeret i malkestalden. Køer i anden paritet og ældre har adgang til to robotter, mens første paritetskøer kan tilgå én robot.

Hver morgen skiftes der filter i robotten, og der renses med en børste i den kobling, hvor filtret isættes. Pattekopper og robotarm spules med spuleslange hver morgen, og ved samme lejlighed undersøges pattekopperne. To gange ugentligt indsæbes pattekopper og robotarm med sæbeskum (Astri-LIN, Lely), som virker i 5 minutter før det spules af. Over to år serviceres robotterne fem gange, selvom der i logbogen ses hyppigere besøg fra Lely-medarbejdere.

De hyppigst brugte måledata fra robotterne er ledningsevne i mælken og ydelse. Der er sat en grænse for ledningsevne på ≥ 100 som udløser en alarm for yverbetændelse, hvis den overskrides.

Ledningsevnen kan måles på kirtelniveau. Derudover anvendes Heat-time® til aktivitetsmåling, som aflæses hver morgen.

Malkerobotterne er indstillet til at give køerne adgang med seks timers intervaller. Afgoldning foregår efter et fastsat program for den enkelte ko: 10 dage før afgoldning nedsættes den tildelte mængde kraftfoder og malkeintervallet stiger til 12 timer.

Køerne i malkestalden går på spaltegulv, og i sengebåsene ligger madrasser som strøs med soltørret kalk og savsmuld, blandet i forholdet 1:1. Besætningsejeren synes, at køerne ser renere ud, end før hans skiftede til kalk og savsmuld.

Rengøring

Foderbordet tømmes dagligt, og foderrester genbruges til kalve over seks måneder. Vandtrug efterses dagligt, og renses hvis de vurderes beskidte, og to gange ugentligt rengøres de med børste.

Robotskrabere holder spaltearealet rent, bortset fra i mellemgange, foran foderbordet og foran malkerobotten. Gødning og våd strøelse skræbes ned hver morgen og der tilføjes ny strøelse.

Yverbetændelser

Ejer og sønnen har oplyst at behandling igangsættes, hvis der måles en ledningsevne ≥ 100 , eller hvis det vurderes, at koen har et højt celletal. Der er ikke fastsat nogen grænse for, hvornår celletallet dømmes at være for højt.

Der behandles med Carepen® vet. (benzylpenicillin procain) intramammært en gang dagligt i to dage, Penovet® vet. (benzylpenicillin) 50 ml en gang dagligt i fire dage samt Loxicom® (meloxicam) 15 ml en gang.

Akut yverbetændelse behandles med Trimlac® vet. en gang dagligt (sulfadiazin, trimethoprim) i tre dage; Tribissen® Vet. 24% (sulfadiazin, trimethoprim) 50 ml i tre dage en gang dagligt, og Metacam® (meloxicam) 15 ml i tre dage, 1 gang dagligt. Besætningsejeren har ikke en klar definition på akut yverbetændelse, og der fremgår heller ingen definition i DMS dyreregistrering (DMS). Ligeledes er der ikke angivet vejledning til administration af medicinen til dyrene på DMS. Hvis behandlingen ikke virker, eller hvis koen fortsat står med et højt celletal, som vurderes at stamme fra en enkelt kirtel, gøres koen trepattet.

B-streptokokker

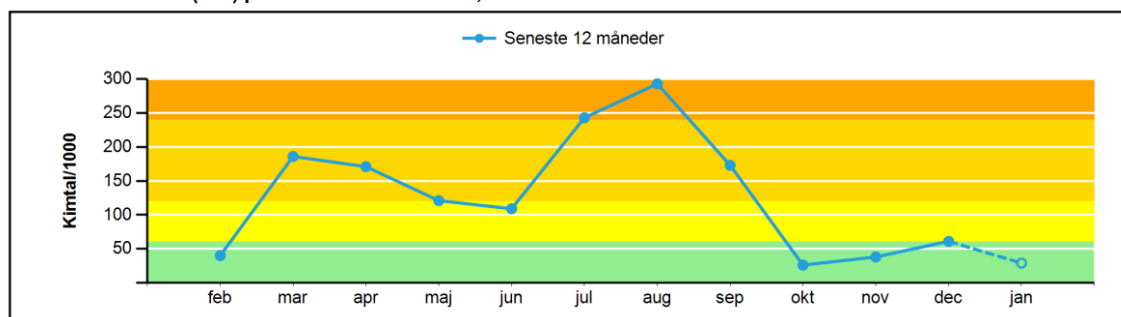
Besætningen har været opført i B-streptokok-registeret i mange år, efter besætningsejeren vurdering: siden midt 1980'erne. Siden 2012 har besætningen deltaget i forskellige

forskningsprojekter på grund af perioder med for høje kimtall i den leverede mælk, kombineret med smittet-status. I forbindelse med dette, er familien på gården også blevet testet for SA i svælget, hvor et af de tre familiemedlemmer blev testet positiv. Det blev ikke oplyst hvilket familiemedlem. Besætningsejeren oplyser, at besætningen har været forsøgt at genvinde smitte-fri-status to gange uden vedvarende effekt.

Besætningen blev inddraget i dette specialeprojekt, fordi tankmælkskimtallet i foråret 2017 igen steg til uacceptable niveauer (Se figur 1). Besætningsejeren mistede en del penge i den forbindelse. Fokus er lagt på SA, fordi en tilknyttet mælke kvalitetsrådgiver ikke kunne sandsynliggøre andre større problemer.

Ved to kimtalsbesøg fra en anden mælkekvalitetsrådgiver i slut september og start oktober 2017, blev der opdaget to fejl i malke robotens vaskeprocesser. Én af vaskeprocesserne opretholdte ikke tilstrækkelig høj temperatur, tilstrækkelig længe. Desuden fandt man, at det anvendte rengøringsmiddel havde overskredet holdbarhedsdatoen. Efterfølgende er nyt rengøringsmiddel indkøbt, og mængden af vand brugt ved vask øget. Det har medført, at kimtallet er faldet til et acceptabelt niveau igen. Desuden blev der angivet forslag til ændring i rengøringsrutinen, se bilag nr. 2. ²

Geometrisk kimalt (IBC) pr. måned i leveret mælk, seneste 12 måneder



Betydning for mælkepris:

- Geometrisk kimalt med højeste fradrag (over 480)
- Geometrisk kimalt med fradrag (240 - 480)
- Geometrisk kimalt uden tillæg/fradrag (120 - 240)
- Geometrisk kimalt med nedsat tillæg (60 - 120)
- Geometrisk kimalt med højeste tillæg (0 - 60)

Bemærk: Data for de enkelte leverancer kan ses ved at holde musen over kurvens punkter.

Figur 1: Udtræk fra DMS d. 25. januar 2018. Figuren illustrerer at kimtallet i perioden marts til september 2017, ligger i kategorierne for nedsat tillæg, uden tillæg eller fradrag, samt med fradrag.

Besætningsejeren udvælger på baggrund af celletal fra ydelseskontrollen, om det er nødvendigt at teste et dyr for SA. Udvælgelsen kan også ske på baggrund af målt ledningsevne. Vi har ikke været i stand til at identificere de præcise udpegningskriterier. Hvis en ko testes positiv for SA, vurderes denne status i sammenhæng med ydelse og udseende af yver, for at beslutte om den

skal forblive i besætningen. En ko som i forvejen er indstillet til slagt på længere sigt, sendes til slagt.

Udover denne indsats og omhyggelig rengøring tages der ikke andre forholdsregler for at minimere forekomsten af SA.

Goldningsrutine

Inden afgoldning tilstræbes udført Polymerase Chain Reaction (PCR)-test på alle køer, og på baggrund af testresultatet behandles køer med Benestermycin® vet. (benethaminpenicillin, penethamathydroiodid, framycetinsulfat) intramammært, og patteåbningen forsegles med Noroseal (bismuthsubnitrat). Ejeren oplever ikke problemer med yverbetændelse i goldperioden. D. 22. januar 2018 er der registreret 125 goldbehandlinger og 119 patteforseglinger i DMS dyreregistrering i løbet af de seneste 12 mdr.

Mælkeprøver, taget med henblik på PCR-test for SA, er udtaget ved ydelseskontrollen. Denne proces beskrives senere.

Definition af status "B-streptokokker: smittet"

Streptococcus agalactiae

SA er en gram positiv kok, der ofte vokser i mælk og kan give anledning til mastitis hos kvæg. SA er en non-motil, ikke sporedannende bakterie. Den kan under dyrkning identificeres ved CAMP reaktion³. SA producerer et ekstracellulært protein, CAMP-faktor, som under tilstedeværelse β -toxin fra *Staphylococcus aureus* (SAU) under dyrkning på blodagarplader, resulterer i områder med fuldstændig opklaring, såkaldt dobbelt-hæmolyse. På blodagar ses SA som små, grå til semiptransperante kolonier, omgivet af en zone af streptokok β -hæmolyse.

SA er katalase negativ, ikke syrefast og fermenterer ikke æskulin⁴.

Lovgivning

I Danmark er det lovpåkrævet, at mejerier overvåger deres mælkeleverende besætninger for tilstedeværelse af SA i den leverede mælk. Det kan enten være på baggrund af tankmælksprøver eller enkeltko-prøver. En besætning betegnes som smittet med B-streptokokker, hvis en leverandørmælkeprøve og mindst en af to efterfølgende prøver testes positive. Det kan også ske ved at en enkeltko-prøve testes positiv.

En besætning kan genvinde smitte-fri-status igen, ved at fire leverandørmælkeprøver med mindst 30 dages interval testes negative. Alternativt kan smitte-fri-status gives, hvis enkeltkirtelprøver fra alle køer i besætningen taget på samme dag, testes negative. Køer, behandlet med antibiotika mindre end fire uger før enkeltkirtelprøven er taget, skal genprøves før smitte-fri-status kan gives.^{5,6} Af lovteksten fremgår det kun, at prøverne skal analyseres på et laboratorium godkendt af Fødevarestyrelsen. Eurofins Steins Laboratorium (Vejen, Danmark) oplyser ved henvendelse, at testen har været udført med Mastit 4 PCR testkit (DNA Diagnostic A/S, Risskov, Danmark) siden 2015.

Påvisning på ko-niveau

Prøvetagning

Manuel prøvetagning af mælkeprøver bør indledes med at aftørre yveret med en tør klud for at fjerne synligt snavs. Herefter udmalkes lidt mælk. Inden prøvetagning bør pattespidsen aftørres med en alkoholvædet serviet, indtil servietten ikke er synlig beskidt. At iføre sig handsker og dyppe patten i bakteriedræbende pattedyp reducerer kontaminationsrisikoen yderligere.

Når prøven opsamles bør prøveglasets vinkles, og man skal undgå kontakt mellem prøveglas og pattespids. Hvis man ikke kan foretage PCR-analyse eller dyrkning umiddelbart efter udtagning af prøven, bør den opbevares på is, nedkøles til 4 grader eller fryses, indtil analyse er muligt.⁷

I forbindelse med ydelseskontrollen (YKTR) i besætninger med Lely robot anvendes en Lely Shuttle-B til prøvetagning, som tilsluttes malkerobotten. Teknikeren transporterer prøverne i kølevogne fra gårdene til Eurofins Steins Laboratorium, hvor de straks stilles på kølerum og analyseres indenfor et par timer. Hvert prøveglas er forsynet med en strekkode, som er koblet sammen med koens nummer. Vi havde svært ved at vurdere, hvor lang tid der går, fra prøven er taget, til den stilles på køl. Desuden vurderer vi, at der går noget tid, fra prøven er overført til prøveglasset, inden der sættes låg på prøven^{8,9}.

I et forsøg med påvisning af SA i to besætninger med Lely malkerobotter, blev malkerobotten undersøgt for SA efter malkning af en inficeret ko og imellem malkning af tre efterfølgende ikke-inficerede køer. Her kunne man finde bakterien i robotens glasudskillere efter malkning af op til tre ikke-inficerede køer. Det kan indikere, at prøver udtaget til PCR ved ydelseskontrol kan føre til falsk positive resultater¹⁰

Et studie undersøgte fire danske Holstein besætninger med konventionelt malkesystem og kendt historik om SA. På dag for ydelseskontrol blev omkring halvdelen af køerne inden påsætning af malkekopper udsat for forsøgsbehandling, som bestod i rensning af patterne efter forskrift for udtagning af steril mælkeprøve (n=411). Dette var i tillæg til de normale malkerutiner, som bestod af aftørring af patter med individuel klud, men uden brug af pattedyp før malkning. Malkerutinerne var forholdsvis ens for alle fire besætninger. Tilbageværende køerne fik ikke afsprittet patterne (n=383). Prøverne efterfølgende udtaget i forbindelse med YKTR blev undersøgt med Pathoproof Mastitis PCR assay (Finnzymes Oy, Espoo, Finland) i Eurofins Steins Laboratorium. Forsøgsbehandlings indflydelse, på sandsynligheden for at blive vurderet testpositiv, blev bedømt ved forskellig Ct-værdier (<40, ≤37 og ≤34).

Man fandt kun en statistisk sikker ($p=0,02$) forskel af prøvebehandlingen, ved analyse med cut-off værdi på ≤37; odds for at være positiv, hvis prøvebehandling var udført, var 1,6 gange større end odds for at være positiv, hvis prøvebehandling ikke var udført. Dette er modsat af, hvad forfatterne havde forventet. Forfatterne formodede at prævalensen af positive prøver i analysen med lavt cut-off-værdi (≤34) har været for lav til at vise effekten af forsøgsbehandling.

På baggrund af forskellige cut-off-værdier (Ct<40, ≤37 og ≤34) værdi fandt man følgende besætningsprævalenser af SA 37%, 29% og 16%.

Man fandt en korrelation mellem testresultaterne for køer, som har efterfulgt hinanden i prøvetagnings rækkefølge, hvilket kan indikere overslæb.¹¹

Testning

Argumenter for at anvende PCR-test i stedet for dyrkning er bl.a. at PCR- analysen tager kortere tid (Pathoproof 3-4 timer), er potentielt objektiv identifikation af bakterier, giver muligheden for at detektere væksthæmmede eller døde bakterier, samt giver muligheden for at teste for tilstedeværelse resistensgener.

Pathoproof kan anvendes til analyse af friske eller præserverede mælkeprøver uden behov for prækultur. Den kan detektere SA samt 10 andre bakterie-isolater og β -lactamase resistensgenet "blaZ".

Pathoproof analysen blev udført på bakterie-isolater hentet fra både kommercielle og non-kommercielle kultursamlinger, som stammer fra mælkeprøver, husdyr- eller humane prøver. Isolaterne var blevet identificeret efter National Mastitis Council (NMC)-standarder, når de stammede fra mælkeprøver.

De fandt at, for alle analyser foretaget på isolater som stammede fra mælkeprøver, havde Pathoproof en specificitet og sensitivitet 100%. Af de total 643 isolater identificerede Pathoproof 634 isolater korrekt. SA var ikke mellem de inkorrekt identificerede isolater. 32 SA-isolater blev korrekt identificeret, alle oprindeligt fra mælkeprøver fra køer med kliniske mastitis. Da isolaterne stammede fra forskellige samlinger, fremgår definitionen af klinisk mastitis ikke.¹²

Koskinen et al. (2010) testede kirtelmælksprøver med dyrkning og Pathoproof PCR. Ud af 780 prøver fra køer med klinisk mastitis én testede positiv for SA ved begge metoder. Af 46 prøver fra subkliniske mastitiskøer blev alle fundet negative for SA både ved begge metoder. Ved celletal i prøven >250.000 celler/ml blev den kategoriseret som subklinisk mastitis. Prøver med celletal under 75.000 celler/ml blev kategoriseret som klinisk raske (n=132). I disse prøver fandt de ingen SA ved nogen af metoderne. Prøver med celletal mellem 75.000 og 250.000 celler/ml blev ekskluderet pga. inkonklusiv mastitis status (n=42).

Dyrkning blev foretaget på blodæskulinagar efter NMC og prøver med over tre arter blev tolket som kontaminede. Ud af 180 prøver negative på baggrund af dyrkning blev 136 fundet positive med PCR, hvoraf to var SA.

Forfatterne henviser til andre studier om håndtering af prøven kan have effekt på udfaldet af dyrkning. Fx fandt man de højeste antal SA CFU ved dyrkning på prøver, som havde været frosset. Ved dyrkningsresultater med tre eller flere arter tolkes prøven kontamineret og der anbefales at tage en ny prøve. Hvis dette princip videreføres til PCR-testning vil det medføre en stigning af omprøvninger, da antallet af prøver med identifikation af 3 eller arter stiger.

Dette kan man håndtere ved at sætte en lavere Ct-som grænseværdi. Fx reduceres antallet af prøver med 3 eller flere arter fra 137 til seks ved at ændre detektionsgrænsen til Ct-værdi \leq 30. Dette vil dog nedsætte sensitiviteten, hvilket kan have betydning for detektionen af SA.¹³

Påvisning på tankmælk

Prøvetagning

I en artikel fra 2003, beskriver Andersen et al. prøvetagning af tankmælk til undersøgelse for tilstedeværelse SA. Selve prøveopsamlingen foretages under afhentning af mælk, hvor mælkeslangen fra tankbilen tilkobles "Spentrup automatic sampling system" (Mark IV, Spentrup Machine works, Spentrup, Danmark). Først skylles 30 L mælk igennem mælkeslangen, hvorefter en

90 ml mælkeprøve overføres til en plastikbeholder og opbevares på is, mens det transporteres til laboratorium.¹⁴

I 2010 beskriver Katholm prøvetagning af tankmælk med VM OVP valve (VM Tarm A/S, Tarm, Danmark). Nu bliver først 30 til 40 L mælk skyllet igennem mælkeslangen inden der tages prøver. 40 prøver à 1,5 ml mælk opsamles med et interval, som afhænger af mængden af mælk, som skal afhentes. I alt 60 ml prøve opsamles.¹⁵

Overslæb

I et studie som omfattede 100 malkebesætning, fik hver besætning taget i alt syv tankmælksprøver med to ugers mellemrum. Prøverne blev testet med en metode godkendt i dansk lovgivning. Ud af disse prøver blev 29 prøver fra 15 besætninger undersøgt ved at sammenligne polymorfismer i længden af rRNA restriktions fragmenter. I tre besætninger fandt man et sammenfald i ribotype, samt et højere Colony Forming Units (CFU) tankmælksprøver i besætningen, som havde fået udtaget prøve umiddelbart inden. Dette tolkede forfatterne, som muligt tegn på krydskontaminering.¹⁴

Testning

Påvisning af bakterier i tankmælk kan være udtryk for bakterier i køernes yver eller kontaminering fra miljøet. For bakterier som SA, hvor det inficerede yver betragtes som det eneste reservoir, er påvisning i tankmælk en stærk indikation på infektion i besætningen under denne antagelse¹⁶

I et review beskriver Godkin et al. (1993) forskellige prøvetagningsintervaller, og sammenholder det med bakteriologisk dyrknings evne til at genfinde besætninger med i forvejen kendt smittet status. Ved at analysere to tankmælksprøver taget med én uges mellemrum, udpeges 39% af besætninger med i forvejen kendt smittet status korrekt. Hvis der til gengæld tages fire tankmælksprøver med én uges mellemrum, findes 100% af smittede besætninger positive på minimum én af prøverne. Gentagne målinger vil medføre en højere sensitivitet, og føre til at inficerede besætninger ikke fejlagtigt erklæres negative. Samtidig vil en øget frekvens af prøvetagning bidrage til, at besætninger der fejlagtigt er testet positive genvinder smitte-fri-status.¹⁶

Den lave sensitivitet bekræftes imidlertid ikke af Riekerink et al. (2009), der undersøgte sensitivitet for dyrkning af SA fra tankmælksprøver sammenholdt med kirtelprøver. Undersøgelsen blev foretaget i 50 danske besætninger, hvor der for nyligt var fundet SA. De observerede god sammenhæng mellem dyrkning fra tankmælksprøver og fund af bakterien på kirtelniveau. De

rapporterer en sensitivitet på 98% (95% KI: 89 – 100 %). Det fremgår ikke hvor høje prævalenser der observeres på baggrund af kirtelprøverne, og besætningerne er udvalgt på baggrund af kendt "B-streptokok-smittet" status. Riekerink formoder derfor, at besætningerne havde en større procentandel af inficerede dyr, end besætninger hvor der ikke er fundet SA i tankmælk.¹⁷

I 1986 undersøgte Gonzarles et al. sammenhængen mellem dyrkningsresultater fra tankmælksprøver og fra poolede enkeltko-prøver. De finder en korrelation på 0,7 mellem antallet af SA fundet i tankmælksprøver(CFU/ml) og antallet af køer fundet positive ved dyrkning af de poolede enkeltko-prøver. I besætninger med en SA prævalens under 7 % detekteres bakterien ikke ved dyrkning af tankmælksprøver.¹⁸

I et studie testede man tankmælksprøver vha. dyrkning og Mastit 4A i 51 besætninger i Tyskland. Prøver blev taget fra 1,615 køer og 6,335 kirtler. Mælkeprøver blev taget under malkning efter tyske anbefalinger. 0,25 ml af alle kirtelprøverne fra én ko blev overført til en ny steril beholder, denne prøve benævnes en enkeltko-prøve. 0,2 ml fra hver enkeltko-prøve fra alle besætningens køer blev samlet til én prøve, betegnet som en besætningsprøve. Der blev fremstillet to besætningsprøver pr. besætning.

Køer med klinisk mastitis, i behandling eller 5 dage post partum blev ikke inkluderet.

Tankmælksprøver (2 stk) blev taget med sterile engangssprøjter efter malkning og 5 minutters omrøring af tanken, og efterfølgende transporteret til laboratoriet indenfor 48 timer i nedkølet tilstand. Enkeltko- og tankmælksprøver blev dyrket på æskulin blodagar med β -toxin fra SAU samt opformeret i glucose-broth i 18-24 timer. Broth blev udpladet og inkuberet i 1 dag før inspektion. Detektionsgrænsen for dyrkning var 100 CFU/ml. Dyrkning var positiv for SA ved fund af én bekræftet koloni og mistænkte kolonier blev bekræftet vha. CAMP-reaktion, æskulin-hydrolyse-test og testet for lancefieldgruppe.

Mastit4A PCR på tankmælk og besætningsprøver blev foretaget uden forudgående opformering.

Prøven blev betragtet som positiv ved Ct-værdi ≤ 37 .

Besætningerne blev betragtet som positiv for et bestemt patogen ved en bestemt analysemetode, hvis mindst én af tankmælksprøverne eller besætningsprøver var positiv for bakterien, eller én af enkeltko-prøverne var positiv for den pågældende bakterie.

Besætningerne blev betragtet som negativ for et bestemt patogen ved en bestemt analysemetode, hvis begge tankmælksprøver eller besætningsprøver var negative, eller alle enkeltko-prøver var negative. Sensitivitet og specificitet blev udregnet på besætningsniveau, med dyrkning af enkeltko-prøve som standard.

Kun i én besætning detekterede man SA i prøver fra tankmælk, besætnings-mælkeprøver og på dyrkning af enkeltko-prøver. I denne besætning var begge tankmælksprøver og besætningsprøver positive på PCR. Bakterien blev også fundet ved dyrkning af tankmælk og enkeltko-prøver. Den er ikke blevet fundet på tankmælk hverken vha. dyrkning eller PCR, hvis den ikke blev fundet på enkeltko-prøver.

Fordi negative besætninger ikke er anført i artiklen, antager vi på baggrund af måden negative besætninger defineres på, at de resterende besætninger var fri for SA.

Der blev desuden testet for tilstedeværelse af SAU, *Strep. uberis* og *Strep. dysgalactiae*. Enkeltko-prøver blev brugt som udgangspunkt for at udregne sensitivitet (Se) og specificitet (Sp) for tankmælksprøver testet med Mastit4 og dyrkning. For dyrkning lå Se imellem 0,0 og 33,3 mens Sp for alle bakterier var 100. For PCR lå Se mellem 78,8 og 87,5 men Sp lå mellem 77,8 66,7.¹⁹

Konsekvens af status "B-streptokokker: smittet"

Lovgivning

Når en besætning er registreret som smittet med SA, må køer fra denne besætning ikke medbringes til dyrskuer eller andre samlinger, hvor malkning kan finde sted. Desuden skal besætningens status meddeles til alle, der kommer i kontakt med besætning.⁵ Dette er en ændring fra tidligere hvor besætninger med smittet status heller ikke måtte sælge eller overdrage køer til levebrug.²⁰

Besætningens status offentliggøres i CHR-registret (www.chr.fvst.dk). Det er tilladt at sælge køer fra en besætning med positiv B-streptokok-status, og det vil fremgå af sundhedsdokumentet ved salg. Den sælgende besætnings B-streptokok-status får ikke indflydelse på den indkøbende besætnings B-streptokok-status.⁶

Human sundhed

SA bæres asymptomatisk hos omkring 30 % af den voksne befolkning^{21,22}

SA er en hyppig årsag til neonatal sepsis i udviklede lande. Den største risikofaktor for SA - neonatal sepsis er maternal kolonisering med SA i GI-kanalen eller i genitaler²³

I USA rapporteres mellem 4,1 og 7,2 tilfælde pr. 100.000 ikke-gravide voksne. Sygdomsraten stiger med alder. Størstedelen af tilfælde rammer patienter, der i forvejen lider af andre sygdomme, bl.a. diabetes mellitus som udgør 20-25% af voksne, ikke-gravide med SA sygdom. Raske individer kan også smittes og udvikle de samme kliniske symptomer.

De kliniske manifestationer er især infektion af hud og bløde væv. Desuden kan SA være involveret i bakteriæmi, pneumoni, urosepsis, septisk arthritis og osteomyelitis. Mere sjældent ses endocarditis, meningitis, peritonitis og IV kateter infektion.

Infektionerne er følsomme overfor penicillin G, ampicillin og andre semisyntetiske penicilliner. Resistens mod clindamycin og erythromycin ses hyppigere end før.²⁴

Besætningssundhed

Smitteveje

Ko til ko

Pattekanalen er den eneste indgangsport til yverkirtelvævet for SA, og det primære tidspunkt for smitte er derfor malkning.²⁵

Et studie udført i to besætninger med Lely robotter viste, at levende SA kan findes på overflade i malkerobotten op til tre malkninger efter malkning af en inficeret ko. Ti overflader blev undersøgt efter en protokol, hvor en inficeret ko blev malket, og derefter blev der taget prøver efter hver malkning af de tre efterfølgende køer (en prøve-sekvens). I alt 9 prøve-sekvenser blev udført fordelt på de to besætninger, i alt 460 prøver. De overflader med den største proportion af positive prøver var munden af pattegummi (22,0 %), børste-1 (20,0 %), dybt i pattegummi (18,0 %), laser-hovedet (18,0%) og toppen af børste-cap (16,7%). Prøverne blev inkuberet i Todd Hewitt broth med selektivt supplement i 12 timer før udpladning på Modificeret Edwards Medium.¹⁰

Ved hjælp af ribotypning undersøgte Jensen et al. (1996) forskellige stammer af SA, isoleret fra 11 besætninger og 16 uafhængige, raske humane bærere. De fandt at stammer fra samme besætning tilhørte samme ribotype, uanset hvilken serotype stammerne tilhørte. Stammer fra forskellige besætninger tilhørte forskellige ribotyper. Undersøgelsen viste at nogle ribotyper var til stede i både materialet fra besætningerne og hos de uafhængige humane bærere. Det fremgår dog ikke hvor mange. Stammerne fra besætningerne omfattede også to tonsillære isolater fra besætningsmedarbejdere. Disse stammer var af identisk ribotype som isolater fra mælkeprøver i samme besætning.²⁶

Ko til mand til ko

Farre et al. (2017) har undersøgt ligheden af SA-typer hos køer og ansatte i otte positive besætninger. 30 køer fra hver besætning fik taget mælkeprøver samt rektal- og vaginalsvaber.

Alle medarbejdere på gårdene blev testet oralt og rektalt, kvindelige medarbejdere blev tillige testet vaginalt (i alt 42 prøver). Prøverne blev dyrket på CHROMagar StrepB (CHROMagar 4, Paris, Frankrig), inden identifikation ved hjælp af MALDI-TOF. Alle stammer blev serotyperet og inddelt efter puls-felt-gel-elektroforese (PFGE). Udvalgte stammer blev hel-genom-sekventeret. SA blev fundet hos 21 % af kørerne, hovedsageligt fra mælkeprøver, hvor koncentrationen varierede fra 0 til over 10^6 CFU/ml. Antallet af positive mælkeprøver i den enkelte besætning lå mellem to og 20. I to besætninger fandtes fire rektale og fire vaginale prøver positive.

Blandt medarbejdere var andelen af test-positive personer 45 %.

Undersøgelse med hel-genom-sekventering og PFGE afslørede, at nogle stammer forekom både hos køer og medarbejdere.²⁷

Katholm et al. undersøgte i 2009 handelsmønstre hos puljen af besætninger smittet med SA (n=233). 24 af disse havde ikke indkøbt dyr siden 2000. 17 af disse var i perioden 1991-2000 ikke fundet inficeret. 104 besætninger havde købt dyr fra ikke-inficerede besætninger. 105 besætninger havde købt dyr fra inficerede besætninger, hvoraf 43 besætninger havde samdrift, så handlen kunne repræsentere flytninger af egne dyr. Forfatterne vurderer, at disse fund tyder på, at human smitte spiller en rolle i spredning af bakterien.²⁸

Jensen (1982) undersøgte forskellen mellem infektion med SA af human og bovin oprindelse. I et studie med i alt 12 køer i to forsøgsgrupper (hvoraf seks blev fulgt over længere tid), blev kørerne hver inficeret i to kirtler med enten en human eller bovin stamme af SA.

Inokulumstørrelse var mellem 79 og 27500 CFU (Vi har udregnet en median på 4085 CFU). Den humane stamme var isoleret fra en vaginal prøve, og den bovine stamme var isoleret fra en kirtel inficeret subklinisk i tre måneder. Begge stammer var β -hæmolytiske og CAMP-positive, men af forskellig serotype: hhv. Ic og III. Bekræftelse af infektion blev bestemt på baggrund af dyrkning på æskulin-blodagar, suppleret med gruppe-præcipitation hvor det blev dømt nødvendigt. En positiv diagnose blev defineret som demonstration af SA og et celletal over 300.000 celler/ml.

Efter 14 timer udskilte alle kirtler bakterien og 38 timer efter havde alle en positiv B-streptokok mastitis diagnose. Otte kirtler inficerede med humane stammer havde positiv diagnose allerede ved 14 timer.

Smerte og hævelse var til stede efter 14 timer, og sekretorisk ændringer i mælken var tydelige efter 22 timer hos alle køer.

Den humane stamme inducerede en kropstemperatur $41,2^{\circ}\text{C}$ hos 3 køer, mens den bovine stamme inducerede højst $40,5^{\circ}\text{C}$ i kropstemperatur, som kun blev målt i én ko. Køer smittet med den bovine stamme havde i gennemsnit et geometrisk celletal på 2,4 mio. celler/ml og 65 % af kirtlerne udskilte

mere end 10.000 bakterier/ml. Kun 8 % udskilte mindre end 1000 bakterier/ml. For køer smittet med den humane stamme måltet geometrisk gennemsnitscelletal til 2,1 mio. celler/ml, og 23 % af kirtler udskilte over 10.000 bakterier/ml og 39 % udskilte under 1000 bakterier/ml.

Infektionen varede i 105 dage for 5/6 kirtler inficeret med den bovine stamme. 2/6 kirtler inficeret med human stamme forblev inficeret i samme periode.

Ydelsestab fandtes ved at sammenligne ydelsen i de inficerede kirtler med ydelsen i de ikke-inficerede kirtler hos hver ko. Man fandt stor variation i ydelsestab (mellem 12 og 70 %), som i gennemsnit var 43 % i human-inficerede kirtler og 30 % i bovin-inficerede kirtler.²⁹

Ekspérimentel infektion af køer med humane SA-stammer er også beskrevet af Van den Heever et al. (1980). 6 køer (2 jersey og 4 Friesere) blev inokuleret med seks forskellige humane SA isolater af ukendt oprindelse. Syv dage før infektion testede de kørerne for bakterier i mælk og celletal. Celletallet lå mellem $81 \cdot 10^3$ celler/ml og $561 \cdot 10^3$ celler/ml. Alle køer var negative på dyrkning, bortset fra én ko på én kirtel hvor man fandt hæmolytiske SAU (celletal= $561 \cdot 10^3$ celler/ml) Kørerne blev inficeret ved injektion af 1-2 ml suspension af SA i steril bufferet normal saltvand svarende til 10-30 CFU. Injektion foregik både 6 timer før malkning og 6 timer efter malkning. Én ko blev inficeret, ved at indføre en steril bomuldstampon påført én dråbe med SA i saltvand (estimeret til 5 CFU) og lade den sidde 6 timer før malkning. Kørerne blev inficeret i én kirtel, bortset fra én af frieserene, som blev inficeret i to kirtler. På dagen for infektion lå celletallet mellem $745 \cdot 10^3$ celler/ml og $725 \cdot 10^3$ celler/ml, alle bortset fra en ko (Hæmolytisk SAU celletal= $710 \cdot 10^3$ celler/ml) var negativ på dyrkning.

Indenfor testperiodens to dage, blev SA genfundet i seks af syv kirtler. De positive kirtler steg til et celletal imellem $5 \cdot 10^6$ og $33 \cdot 10^6$ celler/ml. Alle dyrknings-positive køer havde kliniske tegn med sero-purolent sekretion, rødme og hævelse. Tre af de dyrknings positive køer udviste systemisk reaktion. I koen med to inficerede kirtler fremdyrkede man en blandingsinfektion af SA og Hæmolytisk SAU i den ene kirtel på forsøgsdag to. I en anden ko fik man negativt dyrkningssvar ved forsøgets afslutning og ingen tegn på mastitis.³⁰

Miljø

Jørgensen et al. (2016) undersøgte i et longitudinelt studie forekomsten af SA i fire AMS besætninger. Besætningerne blev udvalgt på baggrund af positive PCR-resultater på tankmælksprøver og besøgt fire gange hver. Antallet af køer i besætningerne lå mellem 56-75.

Dyrkning af mælkeprøver foregik på blodagar tilsat udpladet med SAU. kolonier med CAMP-reaktion blev verificeret som SA med Lancefield gruppe B agglutination.

Svabere blev opformeret i Todd Hewitt med tilsat Streptococcus selektivt supplement (COBA, Oxoid). Efter opformering blev de udstrøget på modificeret Edwards Medium med 2% erythrocytter og 2% β -toxin-filtrat.

Ved otte af de i alt 16 besøg tog man prøver fra tankmælk, og kirtelmælksprøver som blev samlet til prøver på enkeltko-niveau. Ved tre besøg var enkeltko-prøver fra besætningerne negative, og samtidig med negative tankmælksprøve. Ved fire besøg var enkeltko-prøver fra besætningerne positive, og samtidig med positiv tankmælksprøve. Ved et besøg fandt de én positiv enkeltko-prøve, samtidig med negativ tankmælksprøve.

43 af 860 rektalsvabere var positive. En besætning havde 0 positive rektalsvabere. 3 ud af 285 vaginalsvabere fandtes positiv. 1 af 93 rektalsvabere og 2 af 52 svælgsvabere fra mælkefodrede kalve fandtes positive.

Af i alt 470 miljøsvabere indsamlet i de fire besætninger var hhv. 25,3% ; 3%; 44,4% og 0% fundet positive.³¹

Produktionstab

Køer i tidligt stadie af en klinisk mastitis infektion forårsaget af SA kan udskille op imod 10^8 CFU/ml. Hvis en sådan ko malkes med kan denne ene ko ifølge Guterbock et al. 1984, hæve tank-kimtalet med 100.000 CFU/ml i en besætning med 1000 køer, der alle har samme ydelse.³² Den økonomiske effekt(tab/byrde) af mastitis veksler mellem lande, regioner og besætninger. Derfor bør udregninger af tab baseres på den konkrete situation. Forskellige aspekter bidrager i varierende grad. Nedsat mælkeproduktion, frasorteret mælk, nedsat pris pga. dårlig mælke kvalitet, udgifter til medicin og dyrlæge, øget arbejdstid og udsætning af dyr påvirker størrelsen af tabet.

Nedsat mælkeproduktion er en mindre åbenlys omkostning end andre. Men et mastitistilfælde kan påvirke på indeværende og efterfølgende laktationer. Tabet kan måske reduceres som følge af besparelse pga. mindre foderindtag.

Frasorteret mælk udgør et dobbelt problem, da det repræsenterer et tab både fra den tabte indtjening og udgifterne til foder. Tabet kan dog begrænses hvis mælken bruges til fodring af kalve.

Mælkekvalitet kan vurderes på baggrund af bakterieantal, celletal og medicinrester i den leverede mælk. På baggrund af grænseværdier for de enkelte faktorer kan der fratages tillæg eller pålægges fradrag på mælkeprisen.

Udgifter til medicin og dyrlæge er ret håndgribelige og umiddelbare udgifter.

Arbejdstid er sværere at inddrage i udregning af tab, især hvis et mastitis tilfælde tager tid fra andre gøremål på gården, eller mindsker landmandens fritid. Her afhænger det af hvordan landmanden værdsætter sin tid. Det er lettere, hvis man kan udregne en brugt arbejdstid til en fastsat timeløn.

Omkostninger ved udsætning er også sammensat af natur. Tabet består i forskellen ydelse, der er mellem det udsatte dyr og det indsatte erstatningsdyr, samt prisen for enten at opfostre egne kvier eller at indkøbe kvier. Ud fra et ydelsesaspekt er det bedre at behandle dyr og beholde dem, men denne tilgang skal vurderes i forhold ved at nedsætte sygdomsprævalensen gennem udsætning.³³

Østergaard et al. (2005) præsenterede opbygningen af SimHerd IV-modellen, og på baggrund af denne estimerede de indflydelsen af SA på ydelse og celletal. Stigningen i celletal pga. et moderat, klinisk mastitistilfælde forårsaget af SA ifht. en identisk ko uden sygdom, er estimeret til forskellige tidspunkter: I ugen for sygdomsudbruddet er estimeret $1,77 \cdot 10^6$ celler/ml, ugen efter er estimeret 373.000 celler/ml. Tre uger efter er estimeret 154.000 celler/ml. Herefter forventes det celletal at falde med 1000 celler/dag.

Ydelsesreduktionen i procent pga. et moderat, klinisk mastitistilfælde forårsaget af SA ifht. en identisk ko uden sygdom, er estimeret til 16 % i ugen for sygdomsudbrud.

Dette skal lægges oven i en ydelsesreduktion på ca. 3 % sfa. nedsat foderindtag i ugen for sygdomsudbrud.³⁴

Metoder til håndtering af status "B-streptokokker: Smittet"

For at vurdere hvor højt de enkelte studiers konklusioner skal vægtes i de nedenstående anbefalinger, har vi anvendt en "evidenspyramide" beskrevet af Lastein, se bilag 2 Pyramiden er et hierarki over hvilke metodologier som er bedst til at udlede generel viden om årsag-effekt sammenhænge. Vi har forsøgt at placere vores kilder i pyramiden og på den måde vurdere hvordan de skal vægtes i forhold til hinanden¹

Udvidet diagnostik

I robotbesætninger med Lely A3, kan der tilkøbes diagnostiske registreringer. I casebesætningens robot er følgende data tilgængeligt ved hver malkning: Følgende er indsat fra Mail korrespondance med Lely :

"Ledeevne på kirtel niveau

Farve indikation - (mælkens farve sammenlignet til "hvid" mælk,) afvigelse kan nævnes som, Mastitis, Colostrum, Abnorm, Unormal, vandigt.

Så kan der vises "ydelses trend, T4C forventer at ydelsen stiger hverdag i perioden 0-30 dek.

Ydelses fald giver sig selv.

MT - malketid / kirtel

DMT - død malketid / kirtel

Temperatur på mælken - lidt påvirkelig af rumtemperatur. (mail korrespondance med Jens simonsen Lely) Yderligere er der mulighed for tilkøb MQC-C modul til estimering af celletal ved hver malkning." ⁴⁶

I et studie fortaget i tre besætninger med hver to Lely A3 robotter, undersøges overensstemmelsen mellem beregnede celletal, fra celletalindikator, MQC-C, i forhold til laboratoriemålt celletal. De finder en korrelations koefficient mellem beregnede celletal og laboratorie celletal på 0,47⁴⁷ Hovinen et al.(2011) vurderer i et review, anvendeligheden af ledningsevne som diagnostisk redskab til detektion af både subkliniske og kliniske mastitis tilfælde. De finder at sensitiviteten for ledningsevnen, som diagnostisk værktøj til at detektere subkliniske mastitis tilfælde, (celletal ≥ 200.000 celler/ml) til at være mellem 5% og 18% procent, afhængig af hvilket AMS system der anvendes. Til detektion er kliniske tilfælde (celletal $\geq 1.000.000$ celler/ml) er sensitiviteten beskrevet til at være mellem 9 og 43%.⁴³

På baggrund af ovenforstående, vurderer vi derfor ikke ledningsevnen eller celletal indikator alene kan anvendes til udpegning af køer med mastitis, men hvis det er muligt at etablere et process - forløbplot på ko niveau, kan udsving i ledningsevne måske anvendes som metode til detektion af køer inficerede med SA. ³⁵

Hygiejne

Hovinen et al. (2011) beskriver i et review forskelle mellem konventionelle malkesystemer og automatiske malkesystemer for yversundheden, samt hvilke udfordringer der er forbundet med AMS og hygiejne. De undersøger bl.a. om der findes indikationer i litteraturen på at rengøring af yver inden malkning udføres tilfredsstillende i AMS. De finder at det i de AMS besætninger hvor det fungerer dårligst, at op i mod en 1/3 del af yverrengøringen inden malkning ikke udføres tilfredsstillende. Tilfredsstillende vurderes i forhold til manuel patterengøring, hvor der efter endt rengøring, ideelt set ikke bør være nogen synlige rester af skidt, er rengøring i AMS systemer generelt af betydelig dårligere kvalitet.⁴³

Som en del af et studie udført af Henriksen et al. blev Lely malkebotter i to besætninger testet for tilstedeværelse af SA før og efter manuel og automatisk vask. Manuel vask med skum fremstod mere effektiv end manuel vask med vand iblandet klorin. Den automatiske vask mellem malkninger var tilsyneladende ikke særlig effektiv, siden SA hyppigt kunne genfindes

imellem malkninger af ikke-inficerede dyr. Dog syntes rengøring med damp mere effektivt end rengøring med vand.¹⁰

På landbrugsinfo.dk kan man finde en række videoer med råd til at forbedre mælke kvalitet. bl.a., hvordan man holder et lav celletal. Her anbefales, det at vaske følgende dele af Lely robotten morgen og aften: arm, dækplade (over og underside), børstearm og pattekopper. Det anbefales at bruge skum og børste.

Malkerobottens børster bør skiftes jævnlige, og ved højt celletal dagligt. Efter afmontering vaskes, desinficeres og tørres børsterne. Laserskærmen bør morgen og aften aftørres med en klud påført Lely ASTRI-TDS.

Indstillingen af pattespray afhænger af det anvendte middel, og bør tilpasses så der hænger en dråbe fra alle pletter.

Hvis man også vil have fokus på at holde kimtal lavt, anbefales det også at have fokus på nedenstående. Systemvask af robotten tre gange dagligt. Inden denne vask skal mælkefilter skiftes, hvor filterfjeder og filterhus vaskes med børste og vand. Man bør dagligt kontrollere vaskevandets start- og sluttemperatur, hvor sluttemperatur skal være over 73 grader C i min. 2 minutter. Inspicér glasudskiller for belægninger under og efter vask, ved brug af en kraftig lygte.

Efter vask af mælkekøletank bør denne inspiceres for renlighed og belægninger. Tankens studs bør også inspiceres, anvend en kraftig lygte.

SEGES foreslår at til procedurene formuleres som en række Standard Operating Procedures (SOP), så man øger sandsynligheden for en konsekvent udførelse.⁴⁸

Lely har udgivet en liste med en række kontrolpunkter kontrolpunkter for vedligeholdelse.⁴⁹

Som et tillæg til SOP foreslår vi, at man holder en logbog, hvor udførelse af SOP'er registreres.

På den måde kan man gå tilbage og se, om der har været brist i hygiejnerutinerne, fx hvis der forekommer perioder med ændringer i celletal eller kimtal i tankmælk.

Opdeling:

I B-streptokok positive besætninger, udgør inficerede dyr et reservoir for smittespredning. Derfor er en ofte anvendt teknik, til at minimere risikoen for smitte mellem dyr, at malke køer uden tegn på infektion først, derefter køer med ukendt sygdom historie, en gruppe med forhøjet celletal, og til sidst kronisk inficerede dyr. Derved minimeres risikoen for transmission af SA mellem køer.^{26,44,36}

Den teknik er i midlertidig vanskelig at anvende i besætninger med AMS, hvor køer selv vælger,

hvornår de vil malkes og dermed malkekækkfølgen. Det kræver derfor at smittede og usmittede dyr benytter forskellige maskiner.

I casebesætningen er malkestalden delt op i to afsnit: første-laktationskøerne er i et afsnit med adgang til én malkebot. Ældre pariteter er blandet i det andet afsnit med adgang til to robotter. En opdeling af de ældre pariteters afsnit forekommer omstændig. Det vil betyde et mindsket foderbord og en ringere udnyttelse af den ene robots malkekapacitet.

Man kan opnå opdeling af de lakterende køer, hvis man indsætter de smittede køer i afsnittet med en malkebot, og resten af køerne i afsnittet med to malkebotter. Ved denne opdeling vil man ikke kunne tage hensyn til pariteter og førsteparitetskøer vil gå sammen med køer af ældre paritet.

Et studie undersøgte effekten af at lade første paritetskøer gå i samme afsnit som anden og senere paritetskøer. Her sammenlignede man to identiske afsnit med DeLaval-robotmalkesystem, to vandtrug og 28 foderpladser som hver husede 50 køer. I det ene afsnit (afsnit PP) gik kun første paritetskøer, mens sammensætningen af andet afsnit (afsnit PM) var 30% første paritet og 70% multiparitetskøer. Begge afsnit var delt i et område med dybstrøelse og et med betonbund.

Forsøget blev startet én måned efter at køerne blev sat sammen og forløb over 10 mdr.

Foderindtag målt i total dry matter intake var PM=18,7 kg/d og PP=18,1kg/d (SE+- 0,9 kg/d) og ydelsen PM=25,9 kg/d og PP=25,6 kg/d (SE+- 0,8kg/d).⁵⁰

Phillips et al (2001) undersøgte effekten af at blande første paritetskøer med multipare køer. De opstillede tre grupper á 16 dyr: én (MU) med 50% af hver første paritetskøer og multipare køer, én(U) kun med første paritetskøer og én(M) kun med ældre køer. Køerne blev holdt på mark, roteret mellem marker dagligt og malket to gange dagligt. Den første uge efter dannelsen af grupperne havde MU-gruppe 3% lavere ydelse end M- og U-gruppen, og seks uger efter 1% mindre ydelse. I løbet af forsøget steg U-gruppen let i ydelse, mens M- og MU-gruppen faldt i ydelse med samme hastighed. I MU-gruppen faldt førsteparitets- og ældre køer i ydelse med samme hastighed.⁵¹

Behandling:

Der observeres forsat god effekt af behandling med antibiotika ved behandling af infektioner forårsaget af SA og antibiotikafølsomheden er forsat relativt høj. Det anbefales af Keefe, at der udføres rutinemæssig goldkobehandling af besætninger, der er smittet med b-streptokokker.

Behandling i laktationen kan overvejes, og behandlingen bør foretages på baggrund af bakteriologisk undersøgelse, PCR-test eller dyrkning, af en mælkeprøve fra den pågældende ko.^{26,52}

Benedsgård (2012) anbefaler ikke at anvende prøver fra ydelseskontrollen, hvis man mistænker at mere end 5% af køerne i besætningener inficerede med SA. Da der ved YKTR er reelt overslæb, typisk størst i AMS besætninger. Et eventuelt overslæb kan derfor medføre, at positive køer skal testes om efterfølgende. Fremfor anvendelse af YKTR prøver anbefaler Benedsgård (2012), som et relativt billigt alternativ at indsende enkelt ko prøver til Eurofins Steins laboratorium hvor de først vil kunne testes i poolede prøver, og hvis der efterfølgende observeres en reaktion, testes på ko niveau for at identificere eventuelle positive køer.⁴⁴

Udsætning

Edmondson beskriver at udsætning af køer med forhøjet celletal, uden at forsøge at behandle dem, blot fjerner symptomet på infektionen i besætningen, og dermed ikke udgør et reelt værktøj håndterer en eventuel etablering af infektion i besætning. Dog foreslår han, at udsætning i robot besætninger bør foregå tidligere end i malkebesætninger med konventionelt malkesystem, da det i AMS systemer er vanskeligere at minimere smitten mellem inficerede dyr³⁶.

Værktøjer til beslutningsstøtte

Det er vigtigt at tage hensyn til besætningens økonomi, når der skal formuleres anbefalinger og løsningsforslag. Der findes værktøjer, som den praktiserende kvægdyrlæge kan anvende for at konkretisere de økonomiske konsekvenser af de løsningsforslag, som dyrlægen påtænker, fx beslutningstræer og SIMherd (SIMherd A/S). Vi har ikke prioriteret analyse af disse værktøjer i vores opgave. Vi foreslår, at man som besætningsdyrlæge overvejer at inddrage dem vurderingen af løsningsforslag og anbefalinger.

Opsummering

Baseret på ovenstående gennemgang af videnskabelig litteratur, traditioner og udsagn fra eksperter i mastitisbekæmpelse, giver vi i det følgende afsnit, en helhedsorienteret sammenfatning af disse informationer til at vurdere anvendeligheden, af besætningsdyrlægens potentielle redskaber til håndtering af status "B-streptokok: smittet". Gennemgangen er prioriteret efter et løst skøn over indsatsens omkostninger.

Gør ingenting:

Fordi den eneste lovmæssige begrænsninger er udelukkelse fra dyrskuer, og ikke som tidligere forbud mod salg til levebrug er incitamentet til at udrydde bakterien fra besætningen mindsket. Status som smittet er offentliggjort i CHR-registret og vil fremgå af sundhedsdokumenter ved salg af levende dyr. Vi har ikke set opgørelser over, hvorvidt dette er en hindring for salg.

Bakterien er beskrevet som potentielt zoonotisk, og selvom den kan give ophav til alvorlig sygdom, er den også beskrevet som kommensal-flora hos omkring 30% af den voksne befolkning. Vi anbefaler at man i forbindelse med doplysningspligten, nævner at B-streptokokker kan udgøre en risiko for nyfødte børn. Kvinder som er eller påtænker at blive gravide, og som opholder sig i B-streptokok smittede besætninger, bør informere egen læge om dette. Vores kilder på dette område er review-studier, så vi har ikke mulighed for at vurdere styrken af den oprindelige evidens. De oplysninger vi præsenterer, giver os ikke anledning til at mene at B-streptokok er af betydelig human sundhedsfare.

Inden beslutningen træffes bør man have fremskaffet besætningsspecifikke estimater om, hvorvidt B-streptokok-smittet status har økonomisk betydning for den pågældende besætning. Et redskab til dette præsenteres i senere afsnit.

Skærpet opmærksomhed omkring minimering af overførsel af B-streptokokker til personale, familie og gæster på gården

Litteraturgennemgangen viser at der er indikation for at bovine SA kan overføres til mennesker, om end ikke stærk videnskabelig evidens, hverken lokal eller generel. Vi vurderer at indsatsen forbundet med at minimere risikoen for overførsel er i tråd med almindelig god hygiejne og derfor af minimal omkostning. Vi anbefaler håndvask før og efter toiletbesøg under ophold i staldene, og inden stalden forlades. Undgå at drikke rå tankmælk for at minimere risiko for spredning til GI-kanalen.

Gæster anbefales at iføre sig skiftetøj og afvaskeligt fodtøj. Gæster bør skifte tøj og vaske hænder inden de forlader besætningen. Vi anbefaler håndvask efter senere håndtering af beskidt tøj.

Opstramning på alle gængse alment accepterede rutiner omkring malkning, malkeanlæg, staldhygiejne.

Vores kilder er review og ekspertudtalelser, og derfor ikke stærk videnskabelig evidens. I robotbesætninger anbefaler vi, at man som minimum lever op til producentens anbefalinger, og gerne SEGES anbefalinger for god robohygiejne som beskrevet ovenfor

Vi vurderer, at det er en god ide, at man laver en Standard Operating Procedure (SOP), så man kan øge sandsynligheden for at være konsekvent med rengøringsprocedurerne. Som tillæg kan man føre logbog, så man kan spore brister i procedurer senere. Lely har opstillet en SOP i deres brugsvejledning.³⁷ Det er muligt at konsultere uvildige mælke kvalitetsrådgivere fra SEGES, som kan inspicere besætningens malkeudstyr og give forslag til forbedring til malkehygiejnen og rengøringsrutinen.

Organiser hyppigere tankmælksundersøgelser for SA for at verificere udpegningen eller følge udviklingen af infektion på besætningsniveau.

Rent lovgivningsmæssigt skal fire tankmælksprøver taget med 30 dages mellemrum testes negativ, før negativ status kan genvindes. Mastit4A-PCR testen udført på tankmælksprøver udpeger de samme positive og negative SA-besætninger som dyrkning på enkeltko niveau dog kun én positive besætning. Mastit4A-PCR test har, vurderet på baggrund af andre yverpatogener, en højere sensitivitet end dyrkning på tankmælk, men en lavere specificitet.

Ved at tage hyppigere prøver kan man skabe sig et overblik over variation i mængden af SA i tankmælk, hvilket fx kan estimeres vha. PCR. Ved at etablere en baseline af Ct-værdier, kan man estimere et gennemsnitsniveau med tilhørende usikkerhed. Krogh?

Ved hjælp af gennemsnitskurven kan man lettere og hurtigere identificere en reel ændring i mængden af bakterier i tanken. Her er det vigtigt, at notere sig at det kun er køer, som malkes med, der bidrager til Ct-værdien i tankmælk.

En ændring vil være anledning til at kontrollere evt. SOPs, tilkalde kvalitetsrådgivere, eller forsøge at identificere udskillende køer.

Risikobaseret udpegnings af enkeltkøer til enkeltko-diagnostik af SA -infektion mhp. antibiotikabehandling eller udsætning

Edmondson³⁶ anbefaler udvælgelse køer med højt celletal over gentagne målinger til at være testkandidater. Når en ko er udvalgt kan man med California Mastitis Test (CMT) udvælge en enkelt kirtel, som der tages prøve fra. Når celletal tolkes, skal man indregne en variation i celletallet på omkring 10%.

Har man begrænsede midler kan man hos Eurofins Steins bede om at få analyseret flere enkeltko-prøver som en samleprøve. Hvis samleprøven er positiv, testes alle enkeltkøer der har bidraget til samleprøven.⁴⁴

Vi anbefaler, at man udtager prøver manuelt efter praksis for udtagelse af sterile mælkeprøver og undgår brug ydelseskontrol, da der findes tegn på at overslæb forekommer, både i besætning med AMS og konventionelt malkesystem.^{10,11}

Antibiotikabehandling af alle køer ved goldning

Der rapporteres om gode erfaringer af rutinemæssig goldbehandling²⁶

I Danmark er det kun tilladt at antibiotikabehandle køer inden goldning, hvis der forlægger positivt prøvesvar om tilstedeværelse af mastitispatoget indenfor 42 dage inden goldning.⁵⁴ Dette redskab anbefales derfor ikke.

Selektiv goldbehandling baseret på dyrkning eller PCR før goldning

Hvis man ønsker at goldbehandle indenfor ovenstående rammer, anbefaler vi at prøver udtages manuelt efter aseptisk, for at mindske risiko for forurening og overslæb. Vi har ikke i dette speciale, vurderet litteratur der omhandler identifikation køer til testning inden

Enkeltko-diagnostik af alle køer i besætningen med henblik på at isolere B-streptokok-køer og behandle disse med antibiotika

Behandling af goldkøer er mest effektiv, hvis de efter kælvning holdes adskilt fra potentielt smittede køer. Der rapporteres om god følsomhed overfor simple penicilliner og effekt af antibiotikabehandling mod SA.^{26,53} Ved diagnostik på enkeltko-niveau bør man så snart testresultatet foreligger, adskille positive og negative køer for at begrænse spredning af bakterien mellem besætningens dyr.

Gennemgribende mikrobiologiske analyser af køer, miljøprøver samt potentielle humane smitekilder mhp. smittebeskyttelse og selektiv behandling/udsætning.

Antagelsen om, at opdeling mellem inficerede og ikke inficerede dyr er tilstrækkeligt for at stoppe spredning af infektion, bygger på formodningen om, at hverken miljø eller medarbejdere udgør relevante smitekilder. Denne meget omfattende måde at håndtere status som smittet, er efter vores bedste overbevisning kun relevant, hvis der gentagne gange ikke ses effekt af de tidligere omtalte redskaber til at eliminere infektion fra besætning.

Vores information om SAs tilstedeværelse i miljøet stammer fra én videnskabelig artikel. Studiet var designet som observationsstudie. Studiet beskriver SA i miljøet, men undersøger ikke oprindelsen af disse bakterier. Da samme studie finder SA rekalt og i mælk hos køer, kan der stille spørgsmålstejn ved, om fund af SA i miljøet blot er et udtryk for kontinuerlig udskillelse fra køer til miljøet. Yderligere studier er nødvendig for at belyse hvorvidt SA kan overleve i miljøet. Vi

giver i et afsnit nedenfor, et eksempel på en eksperimentiel opsætning til at belyse denne problemstilling.

Anbefaling til ejer af casebesætningen

Vi blev tilkoblet case-besætningen, fordi den længe har stået opført i B-streptokok-registret, og fordi ejeren over sommeren 2017 havde oplevet en stigning tankmælkskimtal forbundet med et stort økonomisk tab. *Se figur 1*

På baggrund af et kimtalsbesøg forbedrede man robotens vaskeprocedure og udskiftede for gammelt vaskemiddel, hvilket drastisk sænkede tankkimtallet.

Ved vores besøg i besætningen fik vi indtryk af, at ejeren mest opfattede B-streptokokker som et problem, hvis det gik ud over mælkeprisen sfa. for højt kim- og eller celletal.

Ud fra en statistisk analyse af SA effekt på mælkeydelsen, der gennemgås i et særskilt afsnit herunder, kunne vi ikke sandsynliggøre, at SA havde en substantiel indflydelse, som er handlingskrævende. Vi argumenterer for, at monitorering af ledningsevne og PCR-teste køer som viser reelle udsving, kan foretage analysen på et mere korrekt grundlag.

Vores anbefaling til besætningsejeren er, at følge mælke kvalitetsrådgiverens råd (bilag 2), og oprette SOP'er som kan bidrage til at disse råd efterleves konsekvent. Hvis besætningsejeren er interesseret i at få et større indblik i niveauet af SA i tankmælk, foreslår vi, at han udtager tankmælksprøver, med en uges interval, til PCR-testning for SA. Med dette indblik kan han vurdere om et fald i Ct-værdi for SA er reelt, eller et udtryk for naturlig variation. Hvis han vurderer at faldet er reelt, kan han sammenligne det med udsving i celletal eller kimtal for at få en indikation på om årsagen er øget infektion blandt køer eller et problem med hygiejnen i malkesystemet.

Med udgangspunkt i litteraturen omhandlende human sundhed, anbefaler vi besætningsejeren, at der udvises god håndhygiejne, når stalden forlades. Hvis der færdes kvinder i besætningen, som er gravide, eller påtænker at blive det, bør de oplyse egen læge om besøg i B-streptokok smittet besætning.

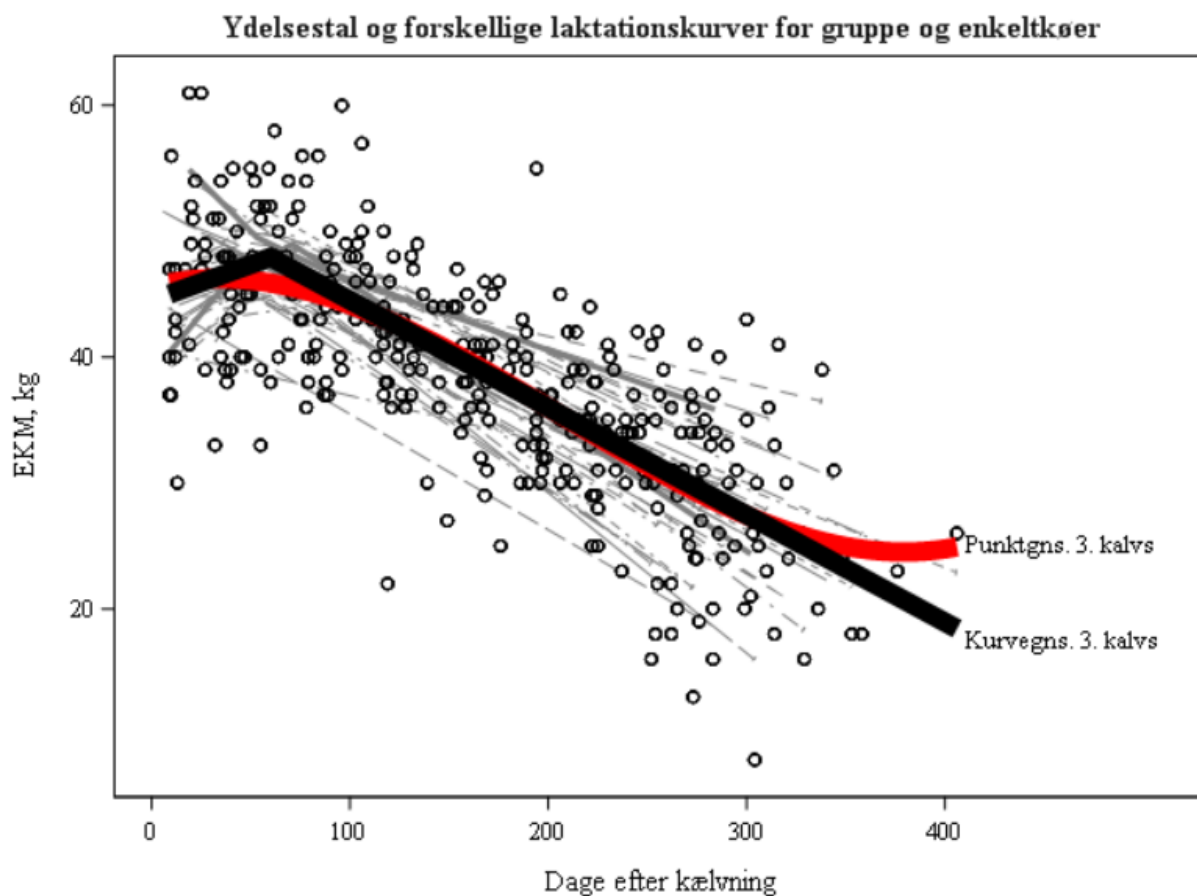
En generel statistisk model til besætnings-specifik estimering af statistiske sammenhænge mellem typiske forløbsdata i en malkekobesætning

Dyrlægen vil ofte stå med den udfordring, at der ikke findes praktisk anvendelig generel viden om betydningen af en given faktor (fx yverinfektion med SA) for fx ydelse og celletal. Da der manuelt og automatisk kan opsamles store datamængder i malkekobesætninger, er det muligt at gennemføre multivariable statistiske analyser af besætningens egne data. På baggrund af data fra Kvægdatabasen giver vi et eksempel på en sådan besætnings-specifik analyse, der kan tilpasses til flere problemstillinger (fx forhøjet celletal eller ledningsevne). Modeleksemplet er en *random-coefficient normalfordelings-regressionsmodel*, der har til formål at estimere statistiske sammenhænge mellem SA og mælkeydelse (målt i Energi-Korrigeret Mælk, EKM) i case-besætningen. Med udgangspunkt i modeleksemplet argumenterer vi for, at prøvetagning til PCR-testning af SA kan ske på et mere hensigtsmæssigt tidspunkt vha. monitoreringsmetoder allerede brugt på gården.

Datagrundlaget for vores modeleksempel

For at beskrive de data, vi anvender, tager vi udgangspunkt i figur 2, der er et væsentligt output fra vores statistiske analyse. På diagrammets Y-akse er mælkeydelse defineret som energikorrigeret mælk (EKM) målt ved en given ydelseskontrol (YKTR), hvor der typisk foreligger 11 målinger per ko per år. EKM er defineret ved følgende formel:

$$\text{kg EKM} = (\text{kg mælk} \times (383 \times \text{fedt\%} + 242 \times \text{protein\%} + 780,8))/3140$$



Figur 2: på x-aksen ses dek efter kælvning, y-aksen ydelse i EKM. De enkelte punkter er enkelte målinger fra ydelseskontrollen og de tynde grå linjer udgør ydelsesforløb og hver en enkelt ko. Den fede linje viser forløbet for gennemsnitslaktation for gruppen.

På Figur 2, X-aksen viser vi antal dage efter kælvning ved de enkelte køers YKTR. Diagrammet indeholder kun data fra tredjekalvs, eller højere, køer i case-besætningen. Data er afgrænset til en periode, hvor vi havde PCR-test ved næsten alle goldninger. Datapunkterne i diagrammet kommer altså alle fra køer, der har gennemført laktation indtil goldningen med tilhørende PCR-test, som kan tilvælges via YKTR. Da der er flere målinger af EKM per ko, er vores data såkaldte forløbsdata ('longitudinelle'). Vi kunne have dannet et tilsvarende diagram med log(celletal), ledningsevne målinger, aktivitetsmålinger m.fl. på Y-aksen. Diagrammet eksemplificerer derfor en generel problemstilling for kodata fra en besætning.

I diagrammet har vi indlagt en fed rød kurve, der på ethvert tidspunkt efter kælvning repræsenterer gennemsnittet af Y-værdier. I mange standardopgørelser anvendes en kurve som den røde linje til at beskrive laktationskurvens form (acceleration, toppunkt og persistens). Dette kan være stærkt misvisende, hvilket er eksemplificeret ved det sidste datapunkt fra en enkelt ko yderst til højre. En mere korrekt beskrivelse af vore data er de grå tynde linjer, der repræsenterer kurveforløb for de enkelte køer. Den fede tykke linje er det endelige gennemsnit af kurveforløbet for enkeltkøer.

De enkelte datapunkter, de tynde linjer for enkeltkøer og den fede sorte gennemsnitskurve kan formuleres matematisk med følgende modelfunktion:

$$EKM_{ij} = \beta_{0j}DEK_{un60ij} + \beta_{1j} + \beta_{2j}DEK_{60ij} + \varepsilon_{ij} \text{ (model 1)}$$

Hvor:

$$\beta_{0j} \sim \beta_0 + \mu_{0j}$$

$$\beta_{1j} \sim \beta_1 + \mu_{1j}$$

$$\beta_{2j} \sim \beta_2 + \mu_{2j}$$

Covarians matrix (model 1)

$$\begin{bmatrix} \mu_{0j} \\ \mu_{1j} \\ \mu_{2j} \end{bmatrix} \sim N(0, \Omega_{\mu}): \Omega_{\mu} \begin{bmatrix} \sigma^2_{\mu 0} & & \\ \sigma^2_{\mu 01} & \sigma^2_{\mu 1} & \\ \sigma^2_{\mu 02} & \sigma^2_{\mu 12} & \sigma^2_{\mu 2} \end{bmatrix}$$

$$\begin{bmatrix} \varepsilon_{ij} \end{bmatrix} \sim N(0, \Omega_{\varepsilon_{ij}}): \Omega_{\varepsilon_{ij}} \begin{bmatrix} \sigma^2_{\varepsilon} \end{bmatrix}$$

Tolkningen af denne matematiske model er som følger:

DEKun60 har værdier for dage efter kælvning (DEK), når de er under 60 (se bilag 3). DEK60 har værdierne for DEK når de er 60 og derover (se bilag 4). β_1 er værdien for EKM, hvor den fede sorte kurve 'knækker'. β_0 , er hældningen på den sorte kurve før knækket, og β_2 er hældningen efter knækket. μ_{0j} , μ_{1j} og μ_{2j} er udtryk for afvigelsen fra den fede sorte linje i de grå tynde linjer for enkeltkøerne. Subscriptet j udtrykker en tilfældig ko, mens subscriptet i udtrykker en måling på en tilfældig YKTR-dag. Helt præcist er μ udtryk for varians. Da standardafvigelsen er lig kvadratroden af varians, så vil $\sqrt{\mu_{1j}}$ være standardafvigelsen på de grå kurvers afvigelse fra den fede kurve på knækpunktet. Dermed vil ca. 95% af de grå linjers knæk ligge i intervallet sort knækpunkt $\pm 2 \times \sqrt{\mu_{1j}}$. Tilsvarende er $\sqrt{\mu_{0j}}$ standardafvigelsen for de grå linjers hældninger β_0 , på den sorte kurve før knækket. Ca. 95% af de grå linjer vil have en hældning før knækket, som ligger i intervallet sort linje $\pm 2 \times \sqrt{\mu_{0j}}$. β_2 er hældningen for den sorte kurve efter knækket og med standardafvigelsen $\sqrt{\mu_{2j}}$, vil 95% af de grå kurver have en hældning som ligger i intervallet sort linje $\pm 2 \times \sqrt{\mu_{2j}}$. ε_{ij} angiver forskellen mellem den estimerede værdi på den enkelte kos grå linje og værdien af den faktiske måling, til samme tidspunkt målt i dage efter kælvning

Antagelserne for denne model er at residualerne, ε er normalfordelte omkring 0 med en varians (som angivet under model 1). Desuden antager vi varianshomogenitet. Vi kan ikke umiddelbart antage at residualerne er uafhængige. Målinger som stammer fra samme ko vil have mere tilfælles med hinanden end med målinger fra andre køer. Desuden vil målinger fra samme ko, som er taget tidsmæssigt tæt på hinanden have mere tilfælles end med målinger fra samme ko, som er taget tidsmæssigt længere fra

hinanden. Målinger fra YKTR nr. 7 og 8 vil have mere tilfælles end målinger fra YKTR nr. 1 og 8, selvom de alle stammer fra samme ko. Denne afhængighed mellem målinger håndteres ved at tillade *random intercepts* og *coefficients*, samt at undersøge kovariansen mellem disse.

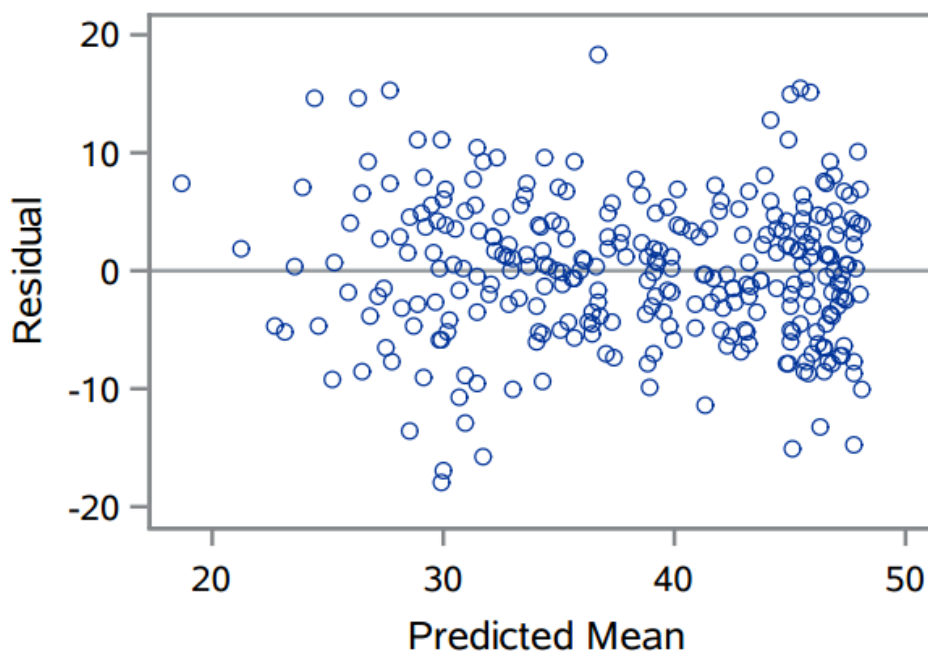
Modellen analyseres med PROC MIXED fra SAS University Edition Version 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) ved brug af følgende programkode:

```
Proc mixed data=ekm method=reml plots=all;  
Model EKM = DEKun60 DEK60 / solution type3 influence;  
Random int DEKun60 DEK60 / subject=ko type=un; gcorr  
Run;
```

Modelkontrol

Vi har foretaget modelkontrol på ovenstående ved hjælp af option statements i PROC MIXED: "plots=all" som option til PROC MIXED-statement og "influence" som option til model-statement. "Plots=all"-statementet giver tre grafiske fremstilling af residualer:

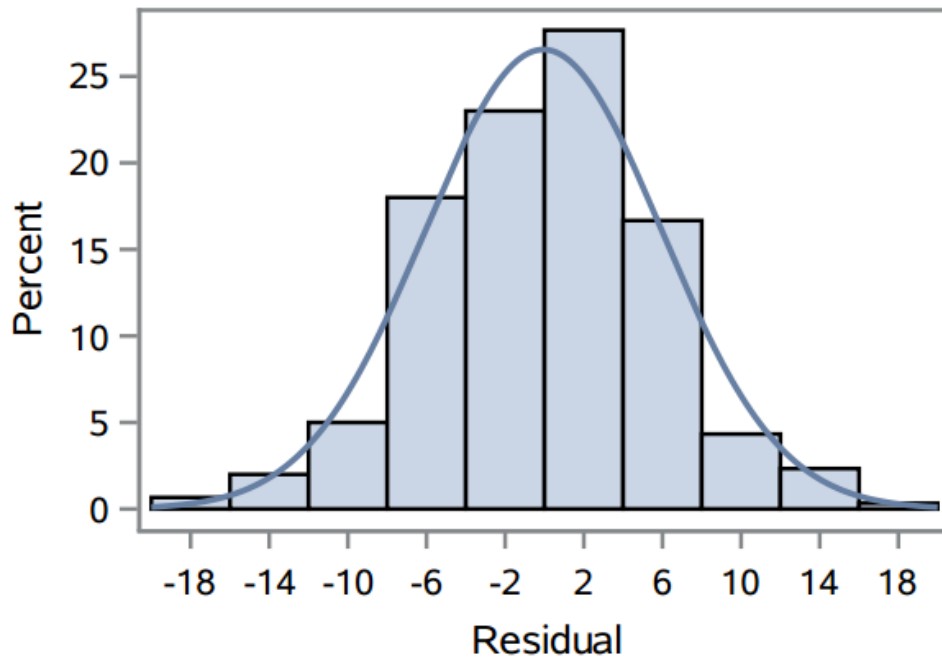
overfor prædikterede gennemsnitsværdier



Figur 3: fordeling af residualerne omkring nul. Vi forventer at se et forløb som et bånd omkring nul. Der ses tendens til timeglas facon

I dette plot forventer vi at se et "bånd" af cirkler fordelt omkring 0. Der ses let timeglasform, at residualerne ligger tættere på 0 omkring prædikterede værdier på mellem 35 og 40.

som histogram med tilhørende normalfordelingskurve

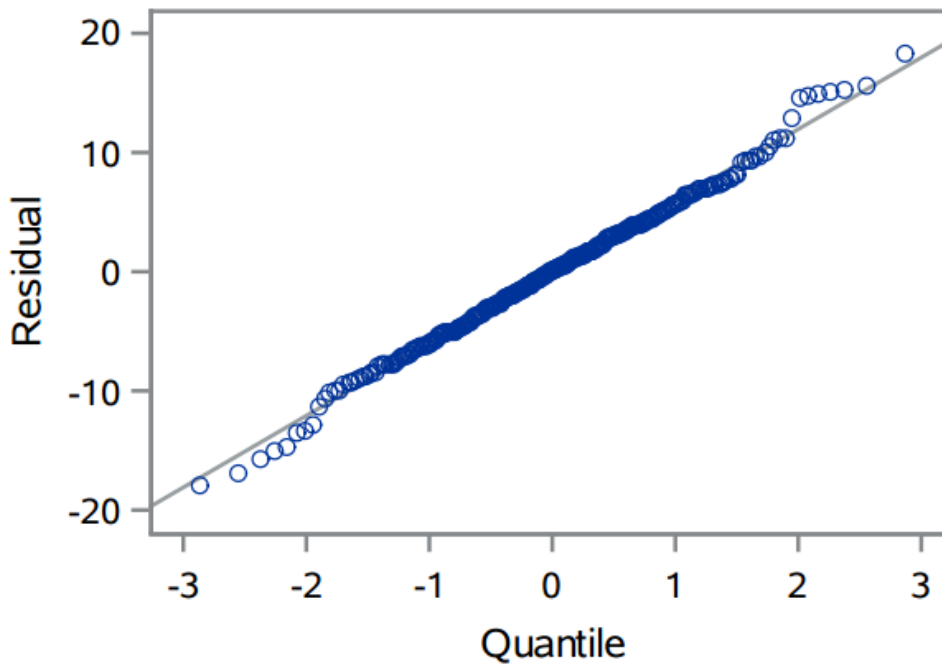


Figur 4 Histogram over fordeling af residualer og samt deres tilnærmelse til normalfordeling.

Histogram af residualer for modellen

Her ser man, at fordelingen af residualerne ikke helt følger normalfordelingskurven.

overfor de teoretiske kvantiler i en normalfordeling. (Q-Q plot)



Figur 5 Q-Q plot af residualerne illustrer tilnærmelse til normalfordeling (illustreret ved linjen)

Vurderingen af figur 5 skal holdes op imod perfekt normalfordelte data ville ligge præcis oven i linjen, men man ser at i yderpunkterne afviger residualerne fra linjen.

Vi vurderer, at der ikke er markante afvigelser i residualernes fordeling fra normalfordeling, men i predicted means- og Q-Q plottet er der indikation på at der er nogle få punkter afviger fra modelantagelsen.

Når "influence"-statementet tilføjes som option til model-statementet, analyserer SAS modellen gentagne gange, og hver gang udlades en observation. Ud fra disse test beregnes forskellige "influence diagnostics", så man kan vurdere hver observations indflydelse på regressionsanalysen.

En af disse "influence diagnostics", som både tager højde for leverage(et ekstraordinært "træk" i estimator) og outliers(om en observation befinder sig langt fra en normalfordeling på Y-aksen).

I bilag 5 ses en fordeling af DFFIT, hvor man se at der er meget få observationer, som har en DFFITS-værdi over 0,2 eller under -0,2.

Disse observationer har vi identificeret og undersøgt yderligere i DMS dyreregistrering for eventuel sygdomshistorie, der kan sandsynliggøre, at den har en ekstrem værdi. Desuden har vi vurderet, om der er tegn på, at det er en fejlregistrering.

Det har ikke vist sig at være tilfældet, og derfor medtages observationerne i analysen. Havde observationerne kunne udelades havde data passet bedre på antagelsen om normalfordelte residualer.

Ved denne gennemgang af potentielt suspekte residualer lagde vi mærke til at ko nr. 2782, 2925, 2938,2949, 2972 figurerer i datasættet i to forskellige pariteter. I det analysen først foretages på ko-niveau, vil tilstedeværelsen af 2 laktationer for samme ko i datasættet medføre, at de prædikterede laktationskurver for ovenstående køer vil være baseret på en anden forudsætning end laktationskurver fra de resterende køer. For at sikre uafhængighed mellem residualerne elimineres disse køer fra analysen, og dermed data for begge laktationer. Alternativt kunne problemet være løst ved at omskrive SAS koden til at analysere de to laktationer for den samme ko separat.

Modelopbygning og modeloptimering

Ct-værdien fra PCR-testen ved goldning i modellen som variabelen "aga_ct". Da der kun foreligger en test per ko har variabelen subscriptet *j*. For at gøre tolkning mere intuitivt defineres $aga_ct=40 - (Ct\text{-værdi})$. Herved vil større værdier korrespondere til et mere positivt testresultat.

Der er under dataopsamlingsperioden ved YKTR anvendt to forskellige PCR-tests. Henholdsvis Pathoproof og Mastit4 til testning af køer inden afgoldning. Dette skift i testtype håndteres ved hjælp af variabelen "Testtype". Ved PCR analyse af mælkeprøverne fra YKTR er Mastit4 PCR-testkit anvendt på prøver analyseret før 11. juli 2017, og Pathoproof PCR Assay er anvendt efter denne dato.

Vi kontrollerer også for somatisk celletal, hvor de enkelte celletal måles i celler/ml. Hver måling divideres med 1000 og transformeres ved brug af \log_{10} , hvorved får vi variabelen $\log_{10}\text{SCC}$. Celletalsmålingerne er fortaget for hver enkelt ko, ved hver enkelt YKTR og har derfor subscriptet *ij*.

Vi foretager modeloptimeringen som en stepwise selection³⁸ ud fra model 1 som tilføjes testtype, *aga_ct* og $\log_{10}\text{SCC}$. Variablenes indflydelse på modellen vurderes ud fra p-værdien i SAS outputtet "Type III tests of fixed effects" i SAS-outputtet (ikke medtaget). Variabelen X med den højeste p-værdi vurderes for effekt på EKM. Hvis vi vurderer, at variabel X har ringe indflydelse på EKM, testes den for interaktion med andre variable. Disse interaktioner vurderes på baggrund af p-værdi og indflydelse på EKM. Desuden vurderer vi om modellen med interaktionsleddet har en markant ændret AIC ift. modellen uden interaktionsleddet³⁹ Hvis der ikke er argumenter for at beholde interaktioner mellem variabel X og andre variable i modellen, kan variabel X nu ekskluderes fra modellen.

Når modellen beregnes fremkommer en AIC værdi. Denne værdi kan hjælpe til at vurdere hvilken af to modeller beskriver data bedst. Modellen med den laveste værdi har det bedste fit⁴⁰ Derefter søges det bedst mulige fit for modellen ved at fjerne enkelte led, og derefter at prøve modellen igen.

På baggrund af indledende analyser af modellen er vi kommet frem til nedenstående model med det bedste AIC-fit. *aga_ct* udgik fra modellen under den oprindelige modeloptimering, men er medtaget for at vise effekten af SA, hvilket er vores primære interesse i denne analyse.

Modellen analyseres med PROC MIXED med følgende programkode:

Proc mixed data=ekm method=reml plots=all;

Model EKM = DEKun60 DEK60 $\log_{10}\text{SCC}$ $\log_{10}\text{SCC}$ *DEKun60 *aga_ct* / solution type3 influence;

Random int DEKun60 DEK60 / subject=ko type=un gcorr;

Run;

Resultater

Nedenstående tabel 1 er en del af SAS-outputtet fra ovenstående PROC MIXED.

Solution for Fixed Effects					
Effect	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr > t
Intercept	52.0109	1.4935	24	34.83	<.0001
dekun60	-10.4002	7.9989	25	-1.30	0.2054
dek60	-19.0902	1.8250	25	-10.46	<.0001
$\log_{10}\text{SCC}$	-1.7138	0.6598	151	-2.60	0.0103
dekun60* $\log_{10}\text{SCC}$	9.9033	5.0342	151	1.97	0.0510
<i>aga_ct</i>	-0.1641	0.1096	151	-1.50	0.1366

Tabel 1: Her fremkommer estimatet for de enkelte variable i søjlen "estimate". I søjlen "Pr>|t|" fremgår p-værdien for en t-test på at få det givne estimat, under nulhypotesen af at estimatet er 0.

Data fra 26 køer indgår i analysen, i alt 231 observationer, hvor højst 11 observationer tilhører en enkelt ko. Ydelseskontrollen måler i gennemsnit en ydelse på 39 kg EKM (SD 9 kg EKM), og log10SCC er i gennemsnit 2 (SD 1).

I Null model likelihood ratio testet, opstilles vores model inkl. tilfældige effekter af acceleration, topydelse og persistens overfor en null model hvor tilfældige effekter ikke indgår.⁴¹ $\chi^2=42$ og $p<0,0001$.

Kovariansparameter estimerer	Varians	Standard afvigelse ($\sigma_{\mu x}$)
Acceleration(acc) $\sigma^2_{\mu 0}$	74	9
Topydelse (top) $\sigma^2_{\mu 1}$	11	3
Persistens (per) $\sigma^2_{\mu 2}$	52	7
Residual σ^2_{ϵ}	18	4
	covarianser	
acc-top $\sigma^2_{\mu 01}$	12	
Top-per $\sigma^2_{\mu 12}$	-16	
Acc-per $\sigma^2_{\mu 02}$	-45	

Tabel 2: fremgår estimerne for variansen og standardafvigelsen af den enkelte kos. Nederste del af af tabellen viser kovariansen

I tabel 2 ses estimerne for variansen og standardafvigelsen af den enkelte kos, altså estimerne tilhørende ovenstående kovariansmatrix for model 4.

Med disse estimater kan man udregne korrelationen mellem parametre vha. Følgende formel

$$\rho_{xy} = \frac{\text{cov}(x,y)}{s_x * s_y}$$

Hvor cov(x,y) er covarians estimatet for to variable og s_x og s_y angiver standardafvigelsen for den enkelte variabel. Disse udregnes vha. SAS PROC MIXED med option "gcorr" og fremgår af tabellen nedenfor.

Korrelation imellem "random effects"

	acceleration	topydelse	persistens
acceleration	1,0		
topydelse	0,42	1,0	
persistens	-0,70	-0,69	1,0

Tabel 3 Korrelationsmatricen som viser, at der med stigende acceleration stiger topydelsen og med stigende topydelse ses ringere persistens.

Diskussion

Af tabel 1 Solutions for fixed effect ser man at køer i tredje+ paritet i gennemsnit yder omkring 52 kg EKM ved 60 dage efter kælvning. Over perioden 8-60 DEK er ændringen i EKM i samspil med Log10SCC, hvilket komplicerer tolkning Illustreres grafisk nedenfor, og efter dag 60 falder de ca. 19 kg EKM indtil dag 305.

For hver trin aga_ct stiger, falder laktationskurvens niveau med 0,16 kg EKM. Det betyder en niveauforskel på lige under 2 kg EKM mellem laktationer for køer med en forskel på 10 i Ct-værdi. Af de 26 køer i analysen er det kun 25%, som har aga_ct på over 10 svarende til en Ct-værdi på under 30. Sammenholder man dette med figuren (prædikterede laktationskurver på ko-niveau) ser man at der er en variation i ydelsesniveau på omkring 10 kg. Sammenholdt med den tilfældige restvariation er en effekt på under 2 kg ikke betydelig.

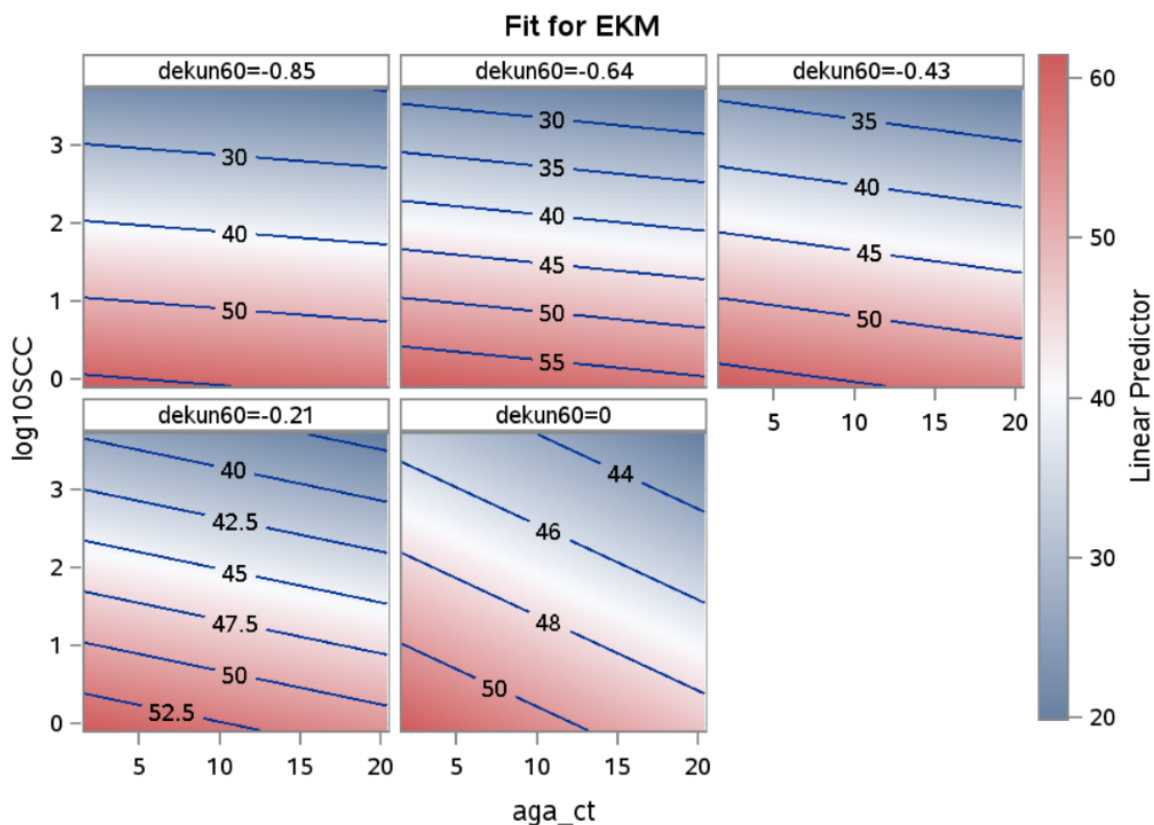
Estimatet for aga_ct har en tilhørende p-værdi på 0,14 og under modeloptimeringen blev den elimineret fra modellen på baggrund af AIC-optimering.

På den baggrund konkluderer vi, at aga_ct ikke har en substantiel effekt på ydelsen i EKM.

Effekten af testtype vurderes under modeloptimeringen, som ikke betydende for effekten af aga_ct og den er derfor ikke med i den endelige model. Rattenborg et al. søgte i 2015 at belyse eventuelle forskelle mellem de to forskellige PCR-kits og fandt, at der til detektion af SA i tankmælksprøver, er moderat til høj overensstemmelse mellem de to testtyper⁴² Dette stemmer overens med vores resultater.

Estimatet for log10SCC kan ikke tolkes direkte med pga. Vekselvirkning med dekun60, vises grafisk nedenfor. Estimatet har en tilhørende lav p-værdi (0,01) og inklusion af variabelen medførte et bedre model ud fra AIC, hvorfor Log10SCC er bibeholdt i modellen.

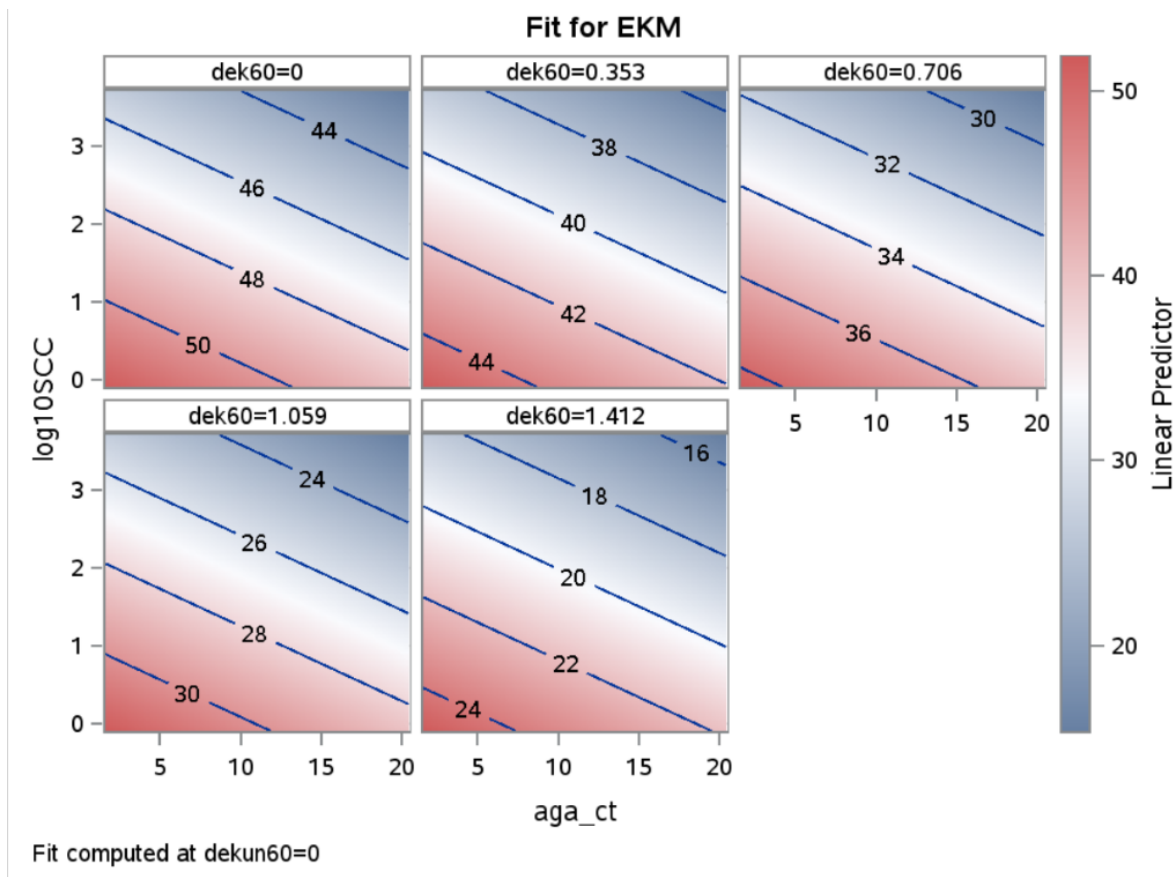
Figur 6 viser vekselvirkning mellem dekun60 og log10SCC, da forholdet mellem niveaulinjerne ændrer sig over perioden DEKun60. Ydelsestabt hver 10-foldsændring i celletal bliver mindre jo tættere på topydelsen man estimerer.



Fit computed at dek60=0

Figur 6 ydelse vist i forhold til log10SCC, aga_ct og forskellige tidspunkter fa DEKun60.

Vi fandt ikke vekselvirkning mellem log10SCC og DEK60 Det illustreres på figur 7 nedenfor, hvor man se det samme ydelsestab for hver 10-foldsændring i celletal for forskellige værdier af dek60, samtidig med at niveaulinjerne for ydelse ikke ændre niveau her.



Figur 7: Plot af ydelse ud fra log10SCC, aga_ct og DEK60. Der ses samme ændring i ydelse afhængig af log10SCC og aga_ct, for alle tidspunk for DEK60

Da null model likelihood ratio test for inklusion af intercept, dekun60 og de60 som random effect i modellen giver en høj χ^2 -værdi (42) og tilhørende lav p-værdi ($<0,0001$) konkluderer vi at det er rimeligt at inkludere variablene dekun60, intercept og de60 (acceleration, topydelse og persistens) som random effects i modellen.⁴³

I bilag 6 ses residualplots for model 4. Man ser fortsat residualer som afviger fra normalfordelingen. Dette kan skyldes, at vi ikke har ekskluderet tidligere omtalte observationer med stor numerisk DFFITS værdi.

PCR-test taget inden goldning var tilgængelige i besætningen, men tidspunktet for PCR-test er ikke det mest optimale. Vi kender ikke infektionstidspunktet, og derfor kan hver test-resultat teoretisk repræsentere en infektion som har stået på i hele laktationen eller som er opstået dagen før udtagning af prøve. Derfor vil det være mere hensigtsmæssigt, hvis man identificere infektionstidspunktet.

Besætningens malkerobotter kan måle ledningsevne ved malkning på kirtelniveau. Vi foreslår at disse data anvendes til at etablere et normalniveau og -variation for den enkelte kos ledningsevne. Dette vil tilsvare et procesforløbplot som Krogh beskriver³⁵ Ved hjælp af sådan et plot kan man nu identificere reelle ændringer i ledningsevne, eller tegn på skift i niveau for ledningsevnen. Sådanne køer vil være kandidater til at teste for SA med PCR. Herved kan infektionstidspunktet måske identificeres mere

nøjagtigt. Disse informationer kan inkluderes i modellen. Ledningsevne er ikke en ideel metode, da den har dårlig korrelation med somatisk celletal⁴⁴ Men den er let tilgængelige og kræver ikke yderligere omfattende investeringer.

Vi anbefaler at mælkeprøverne til PCR-test udtages manuelt efter principper for aseptisk prøveudtagning.⁴⁵ Henriksen et al. fandt SA i robottens glasudskiller imellem malkninger af op til tre ikke-SA-inficerede køer, efter at en SA-inficeret ko var malket. Det kan indikere, at prøver udtaget til PCR ved ydelseskontrol kan føre til falsk positive resultater.¹⁰

Analysen foretages ikke på efterfølgende laktation, da der forventes effekt af goldbehandling, som foretages på baggrund af de PCR-testresultaterne på gården. Der rapporteres forsat om høj følsomhed for penicillin behandling på SA infektion⁴⁶ Havde udregningen været foretaget på den efterfølgende laktation, kunne det have bidraget til en anden effekt af et positivt testresultat, afhængig af hvor stor en andel af dyr som havde kroniske forandringer i yveret. Det er beskrevet, at SA kan forårsage fibrosering af yvervæv og derved permanent nedsat ydelse ved kroniske infektioner⁷ Østergaard et al. fastsatte andelen af SA sygdomstilfælde med permanente forandringer til 10% (Stochastic model of mastitis control).

Ct-værdien anvendes derfor til at vurdere effekten i indeværende laktation. Dette bygger på antagelse om at SA er en lavgradig, kronisk infektion, med lav selvhelbredelsesrate. Østergaard et al. (2005) fastsatte andelen af milde og moderate tilfælde til hhv. 40 og 50% af kliniske SA tilfælde.³⁴

Besætningsejeren udtaler selv at han behandler køer, der opnår ledningsevne på over 100 i løbet af laktationen. Den fremgangsmåde kan gøre at inficerede dyr behandles under laktationen og derfor tester negativt umiddelbart inden afgoldning. Ved sent infektionstidspunkt vil effekten af SA infektionen, bidrage i mindre grad til gennemsnitsydelsen i EKM.

Da analysen kun foretages på køer der når frem til goldning er der en mulig selektionsbias i data. I det køer med tilfælde klinisk SA mastitis kan være sat ud i løbet af laktationen og vil dermed ikke bidrage til modellen. Havde PCR resultater været tilgængelige fra tidligere i laktationen ville disse kunne tilpasses modellen.

De PCR-test, der anvendes i forbindelse med afgoldningen, giver også resultater for en række af andre mikroorganismer, som ikke er inddraget i ovenstående analyse.

Konklusion:

Vi har demonstreret vurdering af datagrundlag, modelopsætning, modelvalidering med identifikation af afvigende observationer, tolkning af modeloutput samt vurdering og konklusion på baggrund af denne tolkning. Vi konkluderer på baggrund af modellen for 3+ paritetskøer og det forhåndenværende datagrundlag, at det ikke er sandsynligt, at SA har indflydelse på ydelsen i gruppen af 3+ paritetskøer. Havde der været Ct-værdier tilgængelig fra tidligere i laktationen, kunne disse inddrages i modellen i stedet.

Overlevelse af *Strep. agalactiae* i sengebundsmateriale

Introduktion

Jørgensen et al. (2016) viste at SA kunne dyrkes fra miljøprøver taget i flere forskellige malkekuvbesætninger³¹. Der er indikation på at SA findes i miljøet i kvægbesætninger, men den tilgængelige viden omkring SA overlevelse i miljøet er begrænset. Det er relevant at vide hvor lang tid bakterien kan overleve, fordi der sjældent praktiseres "all-in all-out" ved flytning af dyr i kvægbesætninger.

Vi forslår en metode til et eksperimentelt setup af laboratorieundersøgelse af SA-overlevelse i én slags imiteret sengebundsmateriale. Denne metode kan danne grundlag for mere omfattende undersøgelser med inklusion af flere forskellige faktorer, som kan påvirke SA-overlevelsestiden.

Formålet med denne undersøgelse er, at demonstrere vores oplæg til forsøgsdesign, og at undersøge udviklingen af antallet af SA-bakterien over fem dage, under et enkelt sæt af forudsætninger.

Materialer og Metode

Materialer anvendt til imiteret brugt sengebundsmateriale: Snittet byghalm (af ukendt oprindelse), kofæces, (opsamlet i en besætning med negativ status for B-streptokokker), Milsan UHT sødmælk (produceret af DMK GMBH Tyskland) samt to metalspande med tætsluttende låg.

Med dette valg af materialer har vi minimeret risikoen for kontamination af forsøgsmaterialet med SA.

Materialer anvendt til dyrkning:

Brain heart infusion (BD 241830): BBL: hjerne, hjerte infusion 8,0 - enzymfordøjet dyrevæv 5,0 - enzymfordøjet casein 16,0 – glucose 2,0 – NaCl 5,0 – dinatrium hydrogen fosfat 2,5 – agar 13,5 gram, 52 gram til 1 ltr.

PBS: kalium dihydrogen fosfat 18,536 gr, natrium hydrogen fosfat dodecahydrat 166,1 gr.

Natriumchlorid 489,0 gr til 60 liter.

Blod agar: C-agar tilsat 5 % kalveblod

Strep. selektivt medium 1: M1257 (HiMedia Laboratories, by, land): enzymfordøjet dyrevæv (Pepton A) 10,0 kødekstrakt 5,0 natrium chlorid 5,0 æsculin 1,0 thalliumsulfat 0,333 crystal violet 0,0013 agar 13,0 alle opgivet i gram pr Liter. 34,34 gram pulver opløses i 940 ml vand og tilsættes 60 defibrineret blod og 25 ml staphylococcus β -toxin.

Strep. selektivt medium 2: CM0027(Oxoid, Thermo Fischer Scientific Inc., Roskilde, Danmark): Lab-lemco kødekstrakt pulver (Oxoid) 10,0 - pepton 10,0 - æsculin 1,0 - natriumchlorid 5,0 - krystal violet 0,0013 - thalliumsulfat 0,33 - agar 15,0 gram pr liter, 41 gram pulver opblandes i 930 ml ionbyttet vand og tilsættes 50 ml kvægblod og 20 ml β -toxin filtrat.

Tørstofindholdet af halm og fæces blev bestemt ved tørring af 100 grams fæcesprøver (n=3) og 25 grams halmprøver (n=2) i en mini ovn (model TO18DH, WASC0) ved 100 grader. Prøverne blev vejlet hver time, og når prøverne ikke viste vægttab ved tre på hinanden følgende vejninger, blev vægten noteret. Tørstofindholdet i fæces blev bestemt til 14% og tørstofindholdet i halm til 80%. Tørstofindholdet for mælk blev ikke undersøgt. Vi tilstræbte at fæces udgjorde 7 % af tørstofindholdet i spanden inden mælk blev tilsat⁴⁷. Der anvendtes halv så meget mælk (i gram) som fæces (Volker Krømker ikke udgivet⁴⁸). De to spande indeholdt som udgangspunkt hver 500 gram prøvemateriale, fordelt på 304 gram halm, 130,7 gram fæces og 65,35 gram mælk.

Fæces, halm og mælk blev blandet manuelt. Efter blanding fremstod prøvematerialet, visuelt vurderet, som brugt sengebundsmateriale, der kan findes i en almindelig kvægbesætning med halmstrøelse. Spandene blev herefter autoklaveret og stod efterfølgende uforstyrret under låg i tre dage ved stuetemperatur, for at give mulighed for at vurdere om der forekom bakterievækst forud for forsøgsstart.

En over-night culture(ON-kultur) blev fremstillet ved podning af 10 ml brain heart infusion bouillon med en mængde SA renkultur med et volumen, på størrelse med et knappenålshoved. Inden inokulation af prøvematerialet blev ON-kulturen fortyndet ad to omgange, både med en faktor 10^5 og faktor 10^6 . 0,01 ml fra hver fortynding blev udsået på både blodagar og HiMedia medium for at kontrollere koncentration og evne til at vokse på streptokok-selektivt medie.

Inden forsøgets start udtog vi hver især én 10 grams prøve fra hver spand, i alt fire prøver. Hver af disse prøver blev tilblandet 90 ml Phosphate buffered saline (PBS) og stomachet ved 230 rounds per minute (rpm) i 2 minutter. Et volumen på 0,01 ml, svarende til en øjepodenål, af væsken fra hver prøve blev derefter udsået på blodagar. Dette blev gjort for at teste for bakterievækst.

Den ønskede bakteriekoncentration i spanden var 10^6 CFU pr. gram prøvemateriale. Den forventede koncentration af en ON-kultur er $5 \cdot 10^8$ CFU/ml. Efter udtagning af kontrolprøverne indeholdt hver spand 480 gram prøvemateriale, hvorfor den tilsatte mængde af ON-kultur i hver spand blev fastsat til 0,96 ml. For at lette fordelingen af ON-kulturen i spanden, blev de 0,96 ml ON-kultur opblandet i 4 ml PBS. Vi forsøgte at sprede ON-kulturen i spanden ved at løfte prøvemateriale før tilsætning af ON-kultur, samt at blande prøvematerialet. Efter fordeling af bakteriekulturen, blev spandene sat i inkubator og inkuberet ved 15°C ; en temperatur valgt for at repræsentere et typisk skønnet døgn gennemsnit i juli og august.⁴⁹

På hver test dag, tog vi hver især tre prøver fra hver spand, med metalpincet, der inden prøveudtagning var rengjort i 70% ethanol. Prøverne bestod hver af 10 gram prøvemateriale, udvejet i en stomacher-bag. De 10 gram prøvemateriale blev efterfølgende tilsat 90 ml PBS. Posen med indhold stomachede vi i 2 minutter ved 230 rpm, og den henstod derefter for at bundfælde i minimum 2 minutter. 10 gram prøvemateriale med 90ml PBS udgjorde den første 10-folds (10^{-1}) fortynding.

Forsøget forløb over fem dage. Testdagene er benævnt 0-4, hvor testdag 0 (bilag 7) ligger 24 timer efter inokulation af spandene.

Vi fremstillede yderligere tre 10-folds fortyndinger (10^{-2} , 10^{-3} og 10^{-4}), og fra hver fortynding udsåede vi to blodagarplader og to agarplader med streptokok selektivt medium ca. 0,01 ml fortynding med øjepodenål. Det modificerede streptokok selektive medium kom fra to leverandører: hhv. HiMedia Laboratories (HiMedia Medium) eller fra Oxoid, Thermo Fischer (Oxoid Medium).

Som følge af problemer i forsyningsafdeling blev der fremstillet en utilstrækkelig mængde af agar-plader. Dette medførte skift mellem de selektive medier ad to omgange: på test dag 0 anvendte vi HiMedia, test dag 1 (bilag 8) og 2 (bilag 9+10) blev Oxoid medium anvendt. På testdag 3 (bilag 11), anvendte vi overvejende Oxoid, men for to prøver blev 10^{-4} fortyndningen udsået på HiMedia medium. På testdag 4 anvendtes kun HiMedia medium, men 10^{-4} -fortynding blev ikke udsået på selektivt medium for nogen af prøverne. (bilag 12)

Derudover bevirkede det manglende antal plader, at vi fra midten af testdag 2 samt under testdag 3 og testdag 4, blev nødt til at udstryge to gange på hver plade med selektivt medium. Hver agarplade med selektivt medium indeholdt dermed to observationer. Agar-pladerne blev inkuberet ved 37°C i 48 timer, hvorefter vi inspicerede dem for vækst. På blod-agar talte vi beta-hæmolytiske, semitransperante-gråhvide kolonier og på selektive agar-plader talte vi kolonier voksende overfladen.

Statistik

Til den statistiske analyse anvendes mixed poisson model med *random coefficients*. Vores datasæt består af følgende variable:

CFU48 = tælletal for en agarplade efter 48 timers inkubation.

Dag = antager værdierne 0,1,2,3,4 og afspejler dage for prøveudtagelse.

Bucket = Hvilken af de to, i forsøget anvendte spande.

Researcher = prøveudtager og angiver hvem der har udtaget prøver

Subsam = Tilfældigt udtaget prøver fra hver af spandene.

pctype = udtryk for hvilket medium prøver er dyrket på. Blodager = 1, HiMedia medium = 2 og oxiod medium = 3

pcat = Et udtryk for om observationerne kommer fra en plade med enkelt eller dobbelt udsåning.

pcat antager værdien 1 når der ikke forekommer dobbelt udsåning, og værdien 2 når der er foretaget dobbelt udsåning.

Tælletal på agerplader kan antages at være poisson-fordelte. I SAS-proceduren PROC GLIMMIX kan man specificeres, at den bagvedliggende fordeling er Poisson. Karakteristisk for Poisson er at variansen stiger med den målte værdi, hvilket ville være et markant brud på den centrale forudsætning for en normalfordelingsmodel. Desuden undgår vi, den ulovlige prædiktions af negative værdier, der vil forekomme via en lineær model.

PROC GLIMMIX foretager som udgangspunkt en ln-transformation af data^{50,51}

Resultatet af modeloptimering fremgår af SAS-programkoden nedenfor, som den analyseres med:

```
proc glimmix data=dil10 method=quad plots=all;  
class pctype bucket researcher subsample_no subjekt;  
model CFU48 = pctype researcher dag / solution htype=3 dist=poisson link=log ;  
random int dag / subject=subjekt type=un;  
covtest GLM;  
run;
```

I denne kode er 'subjekt' defineret som en kombination af subsam, researcher, bucket og pctype.

Den formelle beskrivelse af denne multilevel model, med *random coefficients* er som følger:

CFU48_{ij} ~ Poisson (π_{ij})

$$\ln(\pi_{ij}) = \beta_{0j} + \beta_{1j}\text{dag}_{ij} + \beta_{2}\text{ptype}1_j + \beta_{3}\text{ptype}2_j + \beta_{4}\text{researcher}1_j \quad (\text{model 2})$$

$$\beta_{0j} \sim \beta_0 + \mu_{0j}$$

$$\beta_{1j} \sim \beta_1 + \mu_{1j}$$

Covarians matrix

$$\begin{bmatrix} \mu_{0j} \\ \mu_{1j} \end{bmatrix} \sim N(0, \Omega\mu): \Omega\mu \begin{bmatrix} \sigma^2_{\mu 0} \\ \sigma^2_{\mu 01} \quad \sigma^2_{\mu 1} \end{bmatrix}$$

$$\text{Var}(\text{CFU48}_{ij}|\pi_{ij}) = \pi_{ij}$$

Ved ‘Poisson (π_{ij})’ forstås at den observerede aflæsning af antal kolonier er fordelt som en underliggende (ikke observerbar) Poisson-fordeling med π_{ij} som gennemsnitsforekomst (‘rate’). Subskript i (level 1) er udtryk for aflæsningsdagen (0-4) og subskript j (level 2) er udtryk for subjekt. Denne model er dermed analog til eksemplet med analyse af daglig EKM. Y-variablen er nu $\ln(\pi_{ij})$. β_0 udtrykker det overordnede gennemsnit af $\ln(\text{CFU})$ ved dag 0 (fixed effect, intercept). μ_{0j} udtrykker variansen af de tilfældige afvigelser af de enkelte subjekter fra β_0 . Som ved modellen af EKM udtrykker β_1 den gennemsnitlige hældning af en retlinjet sammenhæng (fixed effekt) mellem $\ln(\pi_{ij})$ og dag. Med μ_{1j} tillader vi estimation af forskellige hældninger for hvert subjekt. For de tilfældige effekter (‘**random** int dag’ I SAS-koden) antager vi, at de er normalfordelte og vi estimerer en kovarians ($\text{cov}_{\text{int,dag}} = -0,063$). I modsætning til ydelsesmodellen giver det ikke mening at beregne residualer, fordi variansen er bestemt af π_{ij} . På subjekt-niveau (j) estimeres forskellen mellem ptype=1 og ptype=3 (β_2), forskellen mellem ptype=2 og ptype=3 (β_3) samt forskellen mellem researcher=1 og researcher=2 (β_4). pcat indgår ikke i den fittede model. Dette forklares under diskussionsafsnittet.

Vi vurderer modelfit ud fra AIC som beskrevet under afsnit under laktationskurve analyserne, og modeloptimering foretages ud fra vurdering af variabelnes indflydelse på CFU48, som det er beskrevet i samme afsnit

Resultater

Udsåning af den fortyndede ON-kultur fra 10^{-5} -fortydingen resulterede i 26 CFU på blodagar og 9 CFU på HiMedia medium, mens udsåning af 10^{-6} -fortydingen resulterede i 2 CFU på blodagar og 4 CFU på HiMedia medium. Koncentrationen af SA i ON-Kultur udregnet på baggrund af 10^{-5} -fortydingen på blodagar er $2,6 \cdot 10^8$ CFU/ml ($1,618 \cdot 10^8 - 3,582 \cdot 10^8$: 95% konfidensinterval), hvilket er 52 % af den forventede koncentration på $5 \cdot 10^8$ CFU/ml. Koncentrationen af SA i sengebundsmaterialet er reelt $5,2 \cdot 10^5$ CFU/Gram (95% KI $3,236 \cdot 10^5 - 7,164 \cdot 10^5$) i stedet for de forventede 10^6 CFU/Gram.

Efter autoklavering og før inokulation blev spandene henstillet ved stuetemperatur i to dage, hvorefter vi hver især udtog én prøve pr. spand, som blev fortyndet og udstrøget på blodagar, i alt fire plader. To af pladerne var positive for vækst, men på den ene plade, var den fremvoksede koloni meget lille. På den anden plade var der vækst i dybden af agaren, uden at der var skader på agaren.

Vi noterede ikke forekomst af forurenede plader, hvis ikke forureningen påvirkede muligheden for at tælle kolonier med SA morfologi. Vi vurderede at tre plader var kontamineret i en sådan grad, at vi ikke kun tælle CFU for SA. Vores indtryk er, at et meget begrænset antal plader har været kontamineret med enkelt-kolonier, som ikke har påvirket tælling af SA-kolonier.

PROC GLIMMIX angiver estimerne i ln-transformerede værdier, så kan foretages ved at udregne det transformerede estimat opløftet i e .

$$\text{estimat} = e^{\ln(\text{estimat})}$$

Tilbagetransformering er udført ved hjælp af PROC PLM SAS procedure, som kan prædikere værdier for de forskellige niveauer af ptype og researcher for givne testdage med tilhørende konfidensintervaller. Resultaterne er opført som Least square means, estimeret med PROC PLM.

Tabel	Udregnet ved dag=0	
	estimat	95 % konfidensinterval
p _{type} =1	86	72– 103
p _{type} =2	65	54 – 78
p _{type} =3	74	62 – 89

Tabel 4 estimer for forskellige niveauer af ptype med tilhørende konfidensintervaller ved forsøgsstart

Tabel	Udregnet ved dag=0	
	estimat	95 % konfidensinterval
Researcher=1	84	72 - 99
Researcher=2	66	56 - 78

Tabel 5 estimater med tilhørende konfidensintervaller for researcher ved forsøgsstart

For at omregne estimatet til koncentrationen af bakterier i spandene (bakterier/gram), ganges med 10^3 .

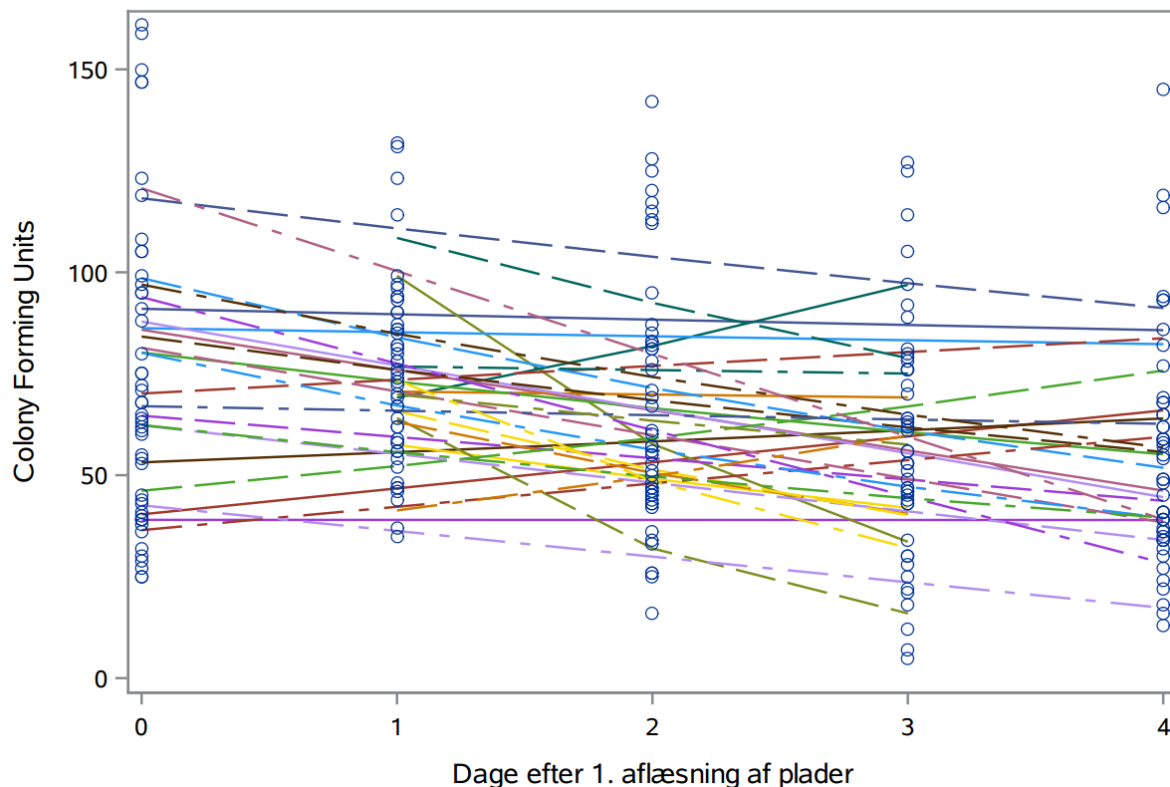
Tabel – forskelle i niveau	Estimat CFU	P-værdi af t-test
Blodagar – Oxoid	12	0,12
Blodagar – HiMedia	21	0,0044
Oxoid – HiMedia	9	0,17

Tabel 6 estimater forskelle i niveau mellem de forskellige typer af medier

Tabellen viser niveauforskellen mellem medie-typer i tælletal beregnet med PROC PLM baseret på resultater fremkommet i PROC GLIMMIX. Baseret på type 3 test, solution for fixed effects samt størrelsen af forskellen, vurderer vi at kun forskellen mellem blodagar og HiMedia medium er substantiel.

PROC PLM anvendes til at prædiktere CFU48 med tilhørende 95%-konfidensintervaller for dag 8, 20 40 og 100. Dette gør vi for at få indtryk af hvor lang tid vi kan forvente at genfinde SA i prøvematerialet. Ved dag 40 (41 dage efter inokulation) er gennemsnittet for CFU48 for samtlige niveauer af ptype og researcher under detektionsgrænsen på 1 CFU. Disse estimater er behæftet med stor usikkerhed, for eksempel ligger estimatet for ptype1 med 95% sandsynlighed mellem 0,07 og 9,15 CFU pr. plade, svarende til en forskel på mellem 70 og 9150 CFU/ g i det oprindeligt prøvemateriale. Ved dag 100 ligger estimatet for ptype1 med 95% sandsynlighed under 0,4 CFU pr. plade. Altså omkring 100 dage efter inokulation af prøvematerialet kan spandene indeholde <1000 CFU/gram. Lignende brede konfidensintervaller observeres for ptype2 og ptype3, samt researcher1 og researcher2.

Observerede CFU-værdier sammen med prædikerede forløb gennem 5 dage



Figur 8 viser forløbet for hver af de 36 kombinationer indgår i forsøget

Figur 8 illustrerer udviklingen af bakterieantallet for de forskellige 'subjekter'. Man ser at de har forskellige kurveforløb, og at højere CFU ved dag 0 overordnet hænger sammen med et fald i CFU over forsøgsperioden. Den stærke, negative korrelation mellem intercept og hældningskoefficient (dag), betyder at jo større tælleantal der findes på testdag 0, jo hurtigere falder CFU-antallet.

0,07 og 0,4 CFU pr. plade er i praksis det samme som et tælleantal på 0, men da modellen er udregnet på ln-transformerede data, vil estimaterne ikke komme under nul ved tilbagetransformation. Da ekstrapolation med modellen frem mod et tidspunkt for nul-vækst er behæftet med stor usikkerhed, skal resultatet tolkes reserveret, men er en beregning af overlevelsestiden for SA reelt uden værdi.

Covarians-parametrene er et udtryk for variansen for subsamples ifht. det udregnede gennemsnit for intercept og hældningskoefficient.

Covarians parameter	estimat	Standard error	Ca. 95% konfidensinterval
intercept	0,16	0,043	0,074 til 0,25
intercept, dag	-0,063	0,018	-0,099 til -0,027
dag	0,035	0,0094	0,016 til 0,051

Tabel 7 Varians og kovarians parametre for de to random effects.

Ud fra formel for ρ , som anført i afsnittet om laktationskurver, kan man udregne korrelationen, ρ , mellem intercept og hældning. ρ estimeres til -0,84, hvilket tolkes som en stærk negativ korrelation mellem intercept og dag. Altså jo højere startværdi, des stejlere kurveforløb.

I PROC GLIMMIX udregnes *null model likelihood ratio test* med tilhørende p-værdi i for covarians parametrene, hvor nul-hypotesen er modellen uden covariansparametre. Resultaterne er $\chi^2=901,61$ og $p<0,0001$.

Diskussion

Spandene bliver inokuleret til en koncentration på $5,2 \cdot 10^5$ CFU/gram (95%-KI: $3,2 \cdot 10^5$ - $7,1 \cdot 10^5$). På testdag 0 finder vi på blodagar et gennemsnitligt tælletal på 86 CFU/gram (95% KI: 72 – 103) svarende til $8,6 \cdot 10^4$ CFU/gram i spandene.

Vi udregner reduktion i bakterieantal fra inokulation til første testdag (dag = 0), og observerer en ændring i CFU48 på -434 (95% KI -221 til -644). Dette estimat er forbundet med stor usikkerhed fordi inokulationskoncentrationen er bestemt ud fra én stikprøve. Men det er en indikation på at reduktion af SA-antallet ikke forløber lineært fra inokulation til test dag 4.

Vi observerer en meget større reduktion af bakterier de første 24 timer i forhold den reduktion i CFU48 der observeres fra testdag 0-4, hvor observationerne med rimelighed kan beskrives med et lineært forløb på ln skala. Efter testdag 4 har vi ikke data til at estimere hældningskoefficienten, men pga. det lineære (ln-skala) forløb dag 0-4, er det vores bedste bud at ekstrapolere lineært på ln-skala.

Chodkowski (1949) har undersøgt overlevelse af SA i forskellige materialer under forskellige forhold. Han fandt, at bakterien kan overleve 18 dage i strå og 27 dage i gødning ved 8° C i

køleskab. Materialerne blev autoklaveret og inokuleret ved oplødning i broth-kultur med 4000 CFU/ml. I en anden forsøgsdel blev prøver inficeret med både broth og naturlig inficeret mælk ($2 \cdot 10^6$ SA og $8 \cdot 10^4$ hæmolytiske staphylocokker) og stillet i en stald, hvor temperaturen varierede mellem 3 og 15° C. Her overlevede SA 24 eller 15 dage i gødning inficeret med hhv. broth eller mælk. Under samme forhold overlevede bakterien 14 eller 21 dage i strå inficeret med hhv. broth eller mælk. Hvis prøverne blev opbevaret i køleskab (ukendt temperatur) kunne S. ag findes helt indtil 105 dage i både gødning og strå inficeret med mælk. Prøverne blev undersøgt ved at materiale blev overført til broth og inkuberet 20 t ved 37° C. Herefter blev en loopfuld broth strøget ud på blodplader. Forsøget blev stoppet når flere udtagninger af materiale viste negativ dyrkning. Ved overlevelsen efter 105 dage stoppede forsøget fordi det ikke var mere prøvemateriale tilbage i prøvebeholderen.

Man skal notere sig at Chodkowski's forsøg benytter sig af opformering i bouillon inden dyrkning, hvilket øger chancen for at detekterer små antal bakterier. I vores forsøg opformerer vi ikke inden dyrkning, og pga. vores fortyndingsprocedure kan vi kun detektere ned til 1000 CFU/gr.⁵²

Da vi designede forsøgsopstillingen, blev fortyndingerne, som skulle anvendes til udsåning, bestemt på baggrund af en forventning om, i hvilken koncentration det ville være muligt at genfinde SA. De fire fortyndinger anvendt i forsøget ville derfor kunne anvendes, hvis der ikke skete reduktion, eller eventuelt opformering. Samtidig vil det være muligt at tælle en kraftig reduktion af bakterieantallet over tid.

Ved kvantificering af bakterier anbefales det at antallet af kolonier på den optalte agar-plade ligger mellem 25 og 250.⁵³

Når slutmodellen testes på datasættet for 10^{-2} fortynding observeres en ændret effekt af variabelen researcher for modellen. Da der i 10^{-2} fortyndingen er færre kolonier pr plade, kan en mulig forklaring være at det er større enighed imellem personerne der tæller kolonierne, og derved bliver effekten på CFU48 mindre. Da CFU48 for begge fortyndinger er et udtryk for overlevelsen af SA og at den statistiske model ikke kan anvendes på tværs af fortyndingerne kan være et udtryk for en mindre robust model. Det skaber usikkerhed omkring modellens anvendelighed til at beskrive generelle henfald af SA under laboratorie forhold.

Den observerede effekt af researcher på 10^{-1} fortyndingen kan derudover måske også forklares med, at ingen af prøveudtagerne i forsøget ikke har stor rutine i laboratoriearbejde og derfor samtidig ikke standardiserede arbejdsgang i forbindelse med udtagning af prøvemateriale og fortynding af

prøverne. Hvis forsøget skulle gentages kunne denne effekt måske elimineres, hvis prøveudtagningen foretages af rutineret laboratoriepersonale.

pcat er ikke en variabel som var planlagt fra forsøgets start, men er opstillet for at undersøge om der er effekt af at observationer deler plade. Fordi opdelingen ikke er foretaget konsekvent på alle plader, og fordi de to niveauer af pcat kan betragtes som underkategorier af observationer fra de selektive medier har vi forsøgt at modellere basismodellen, hvor pcat er "nestet" i ptype.

Pcat forekommer for kun for de selektive agarplader og først tages i brug på testdag 2 for spand 2. Derfor kan pcat bidrage til forklaringen af den variation, der fremkommer som følge af pladetype, dag og i mild grad også spand. Det medfører i forbindelse med modeloptimering at interaktionsled hvor pcat indgår, konsekvent øger model-fittet vurderet ud fra en lavere AIC, samtidig med at disse interaktionsled har meget lave p-værdier. Dette fører til en mere kompleks model, hvilket er strid med ønsket om at anvende den mest simple model til beskrivelse af data.

Ved at lade pcat udgå af modellen kan vi ikke vurdere en eventuel effekt af dobbelt udtrykning på plader. Vi formoder at sådan en effekt kunne være tilstede ved højt CFU48, da kortere afstand imellem hver koloni, gør det sværere at tælle. Men vi ved ikke hvordan dette påvirker vores estimat for SA-overlevelse.

I forsøget anvender vi to fabrikater af streptokok selektivt medium som indeholder ingredienser, der hæmmer eller forhindrer vækst af andre mikroorganismer. Vi ser en effekten af ptype; at de selektive medium har et lavere gennemsnits CFU48 end blodagar. Vi formoder at de ingredienser som hæmmer vækst af andre mikroorganismer, også hæmmer væksten af svækkede SA. Da prøvematerialet anvendt i forsøget er sengebundsmateriale som er autoklaveret, og efterfølgende inokuleret med renkultur af SA, er det ikke nødvendigt med selektivt medium. Vi inkluderede dem i forsøget, som sikkerhedsforanstaltning, hvis vores sengebundsmateriale i løbet af forsøget skulle blive kraftigt kontamineret.

Det er relativt få (N=3) af blodagarpladerne, som er så kontaminerede at optælling af SA ikke kan lade sig gøre. Dette til trods for der i forsøget ikke er anvendt streng steril teknik.

Blodagarplader har i gennemsnit det højeste tælleantal efterfulgt af Oxoid medium, og HiMedia medium har gennemsnitligt det laveste tælleantal. Forskellen er ca. 21 CFU imellem blodagar og HiMedia medium. Der er forskel i opskriften på Oxoid og HiMedia medium, hvilket måske kan give anledning til at forskellen mellem blodagar og HiMedia medium er signifikant. Da extrapolation udover testdag 4 er behæftet med stor usikkerhed, er det også svært at vurdere hvordan forskellen mellem medier vil påvirke estimatet for overlevelsen.

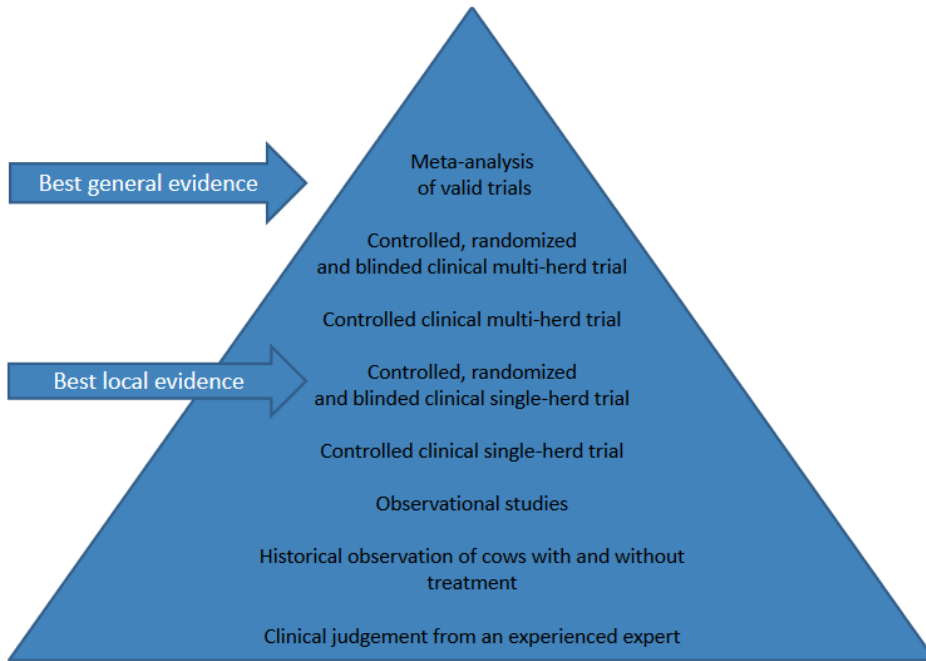
Morfologien for den anvendte type af SA, hvor kolonier på blodagar, udviser den let genkendelige β -hæmolyse gør det let at vurdere, om kolonier er SA eller kontamination. Ved tvivl kan kolonier testes ved latex-agglutinations test. Det er derfor vores vurdering at der i et eventuelt andet forsøg godt udelukkende kan anvendes blodplader, så længe sengebundsmaterialet autoklaveres først.

Konklusion

Vi genfinder SA 5 dage efter inokulation i autoklaveret sengebundsmateriale, tilblandet fæces og mælk. Faktorerne researcher og ptype synes at have indflydelse på det observerede antal kolonier, men ikke på hastigheden for reduktion. Variationen spændene imellem bidrager tilsyneladende ikke med betydelig variation i antallet af optalte kolonier. Fremskrivningen af forventede tællinger indikerer at bakterien stadig ville kunne genfindes i prøvematerialet op til omkring 100 dage efter inokulation, men estimatet er behæftet med stor usikkerhed.

Bilag

Bilag 1: Evidens pyramide af Lastein¹



Evidens pyramiden: Forskellige metoder stigende i evne til at skabe bedst evidens til at forklare årsag effekt.



Dato:
6. oktober 2017

Kimtalsbesøg - den 26. september og 2. oktober

Formålet med besøget var at anvise og rådgive om de forhold, som er årsagen til det forhøjede kimalt i mælken samt give forslag til at opnå et lavere kimalt.

Konklusion

- Det nuværende indhold af B-streptokokker bør ikke give anledning til forhøjet kimalt.
- Der er blevet anvendt en tromle med klorholdigt alkalisk kemi som er for gammel til silotanken. Ved første besøg blev der bestilt en dunk med Delaval Super for at få en hurtig effekt og for at fjerne eventuelle belægninger.
- Sluttemperaturen lå for lavt målt ved buffertanken. Efterfølgende er levelpinde hævet på 2 af robotterne, så vandmængden er øget.
- Kimaltet er efterfølgende faldet markant til ca. 5.000.
- Der blev ved andet besøg udtaget mælkeprøver til kimaltanalyse. Prøve 1+2 fra tankbil lå på 7.000 og prøve 3+4 fra mælken fra buffertanken efter flytning til silo-tank lå på 4.000 og 5.000.

Forslag til tiltag

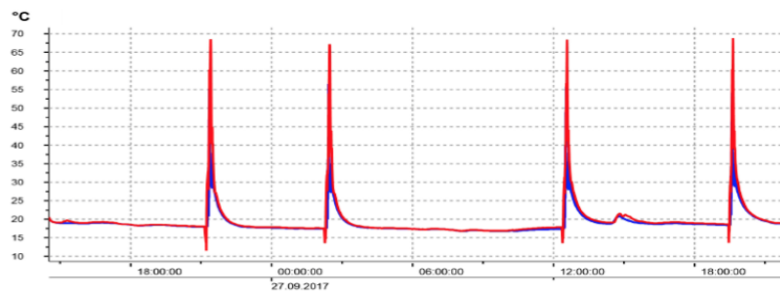
- Hav præcis 8 timer mellem hovedvaske på robotter.
- Skift filter 2 gange i døgnet.
- Hold fokus på god hygiejne omkring robotter. Brug skum og have gode daglige rutiner her.
- Sørg for at alle pattegummi slutter tæt til vaskekopper ved vask.



Tromlen med alkalisk rengøringsmiddel til køletanken er for gammel. Udløbsdato 8. måned 2016. Effekten af klor vil derfor ikke være til stede længere.



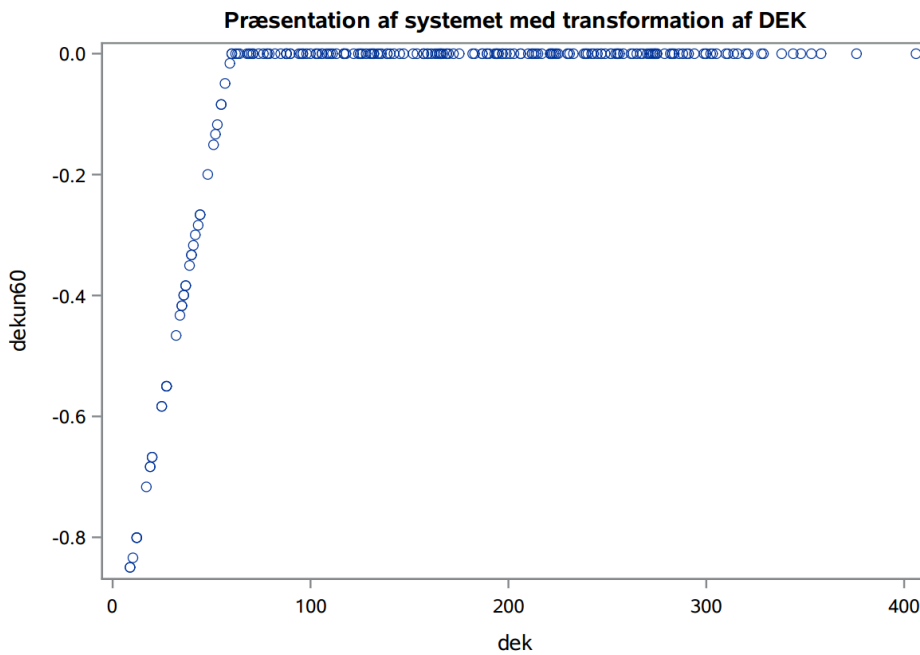
Belægning i top af udløb til køletanken



Sluttemperaturer fra robotter målt efter buffertanken. De bør ligge over 70 grader i minimum 3 minutter.

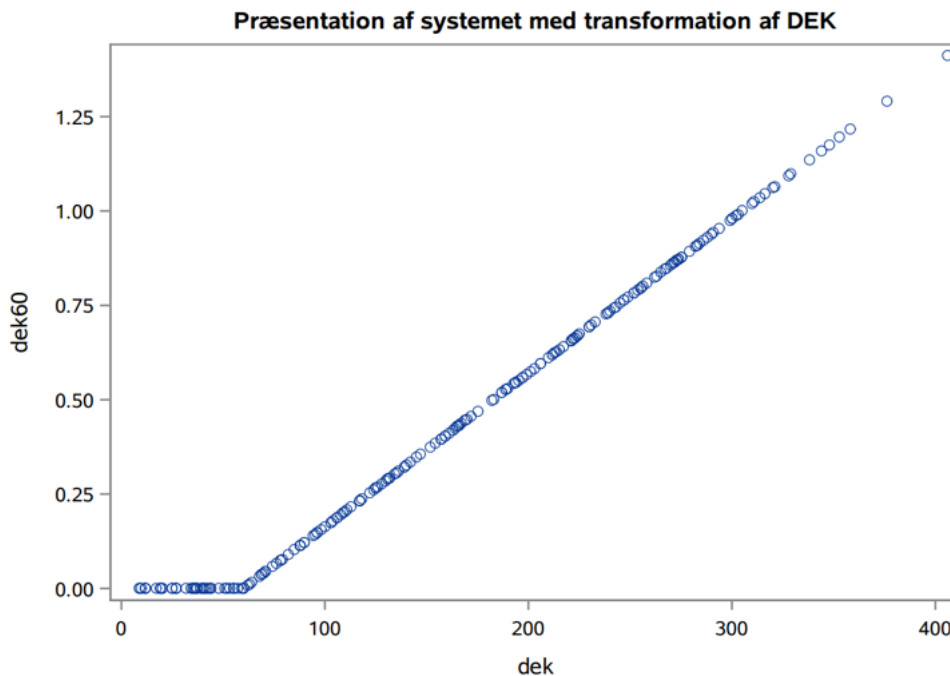
Temperaturer på målt på robotterne var i orden og lå over 80 grader på alle tre robotter.

Bilag 3



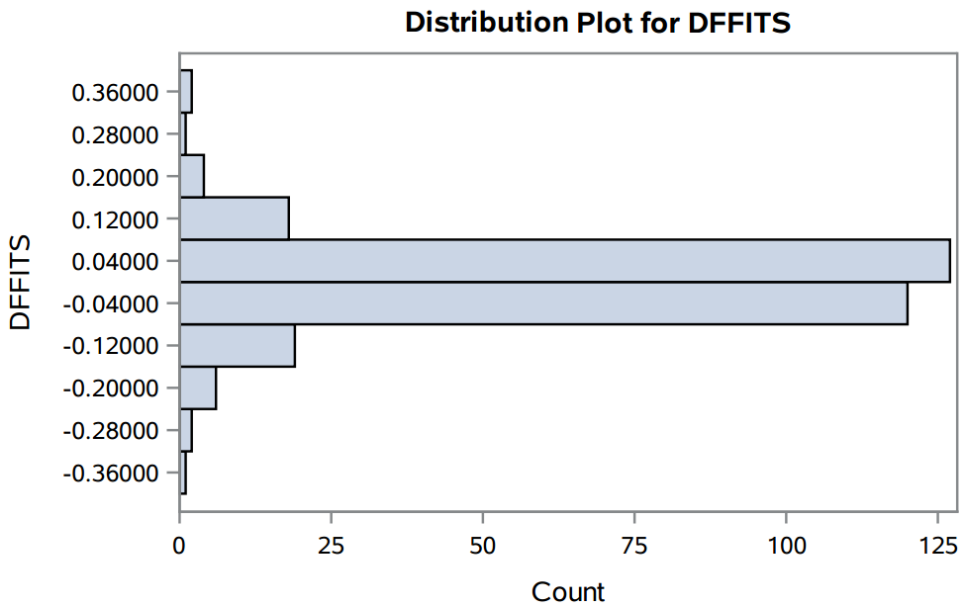
Værdierne for DEKun60 som funktion af Dage efter kælvning. Mellem dek 8 og dek 60 antager dekun60 værdier mellem -0,87 og 0.

Bilag 4



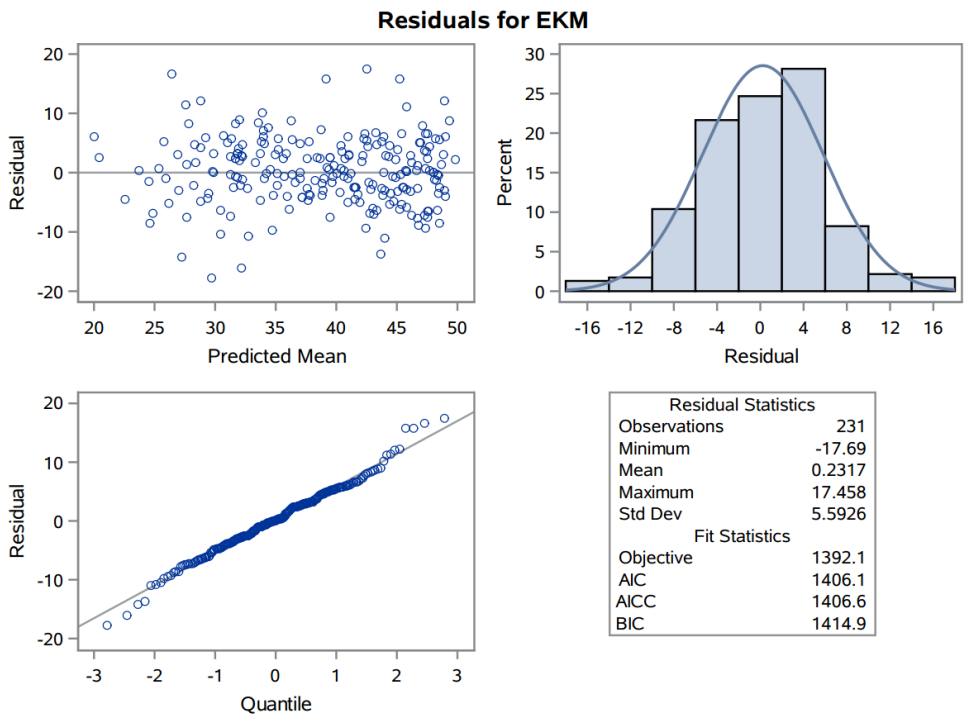
Forløbet for dek60 som funktion af dek. Dek antager værdier mellem 0 og 1 inden for en laktation på 305 dage.

Bilag 5



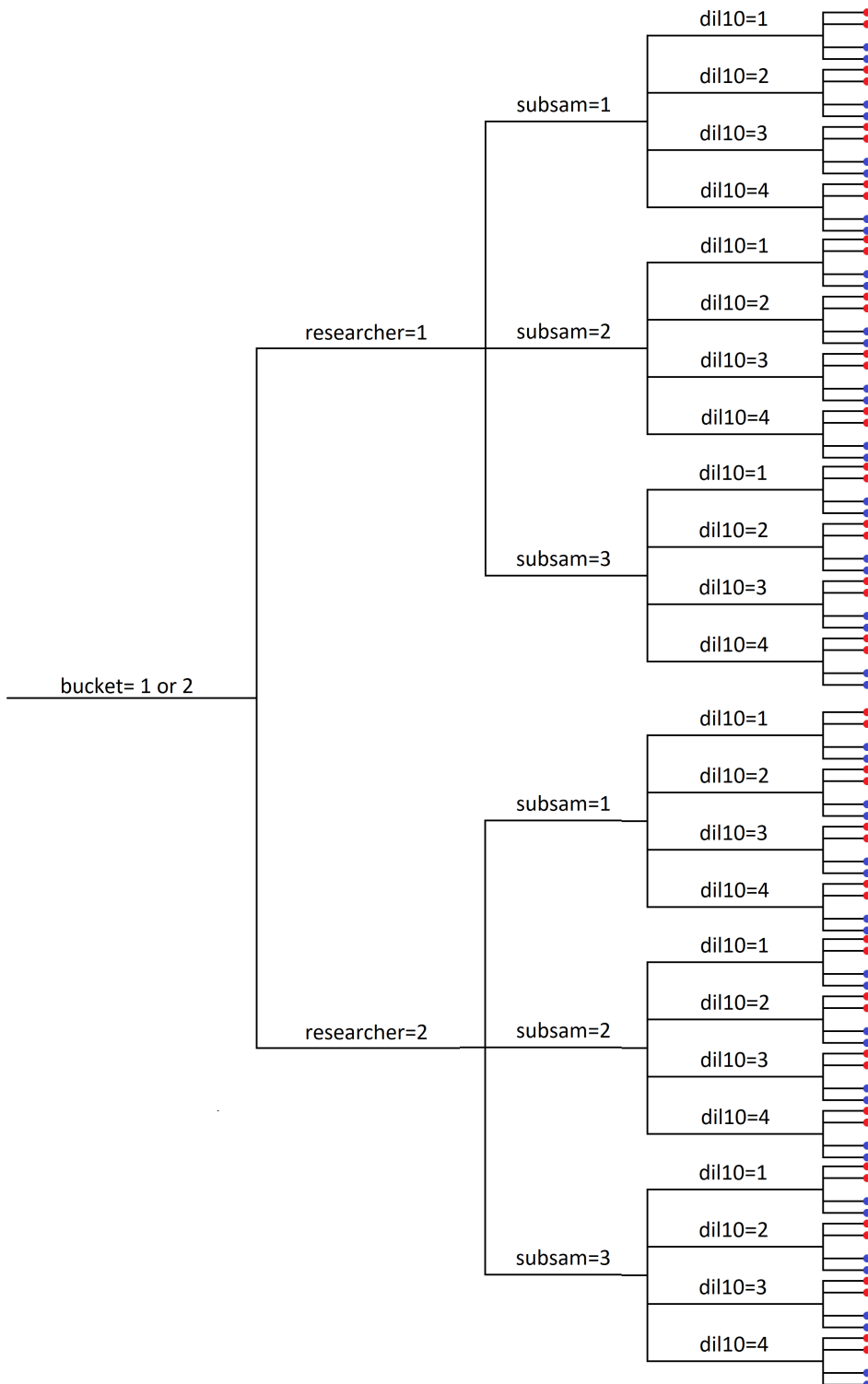
Fordeling af DFFITS værdi, der observeres få værdier i fordelings ekstremiteter.

Bilag 6



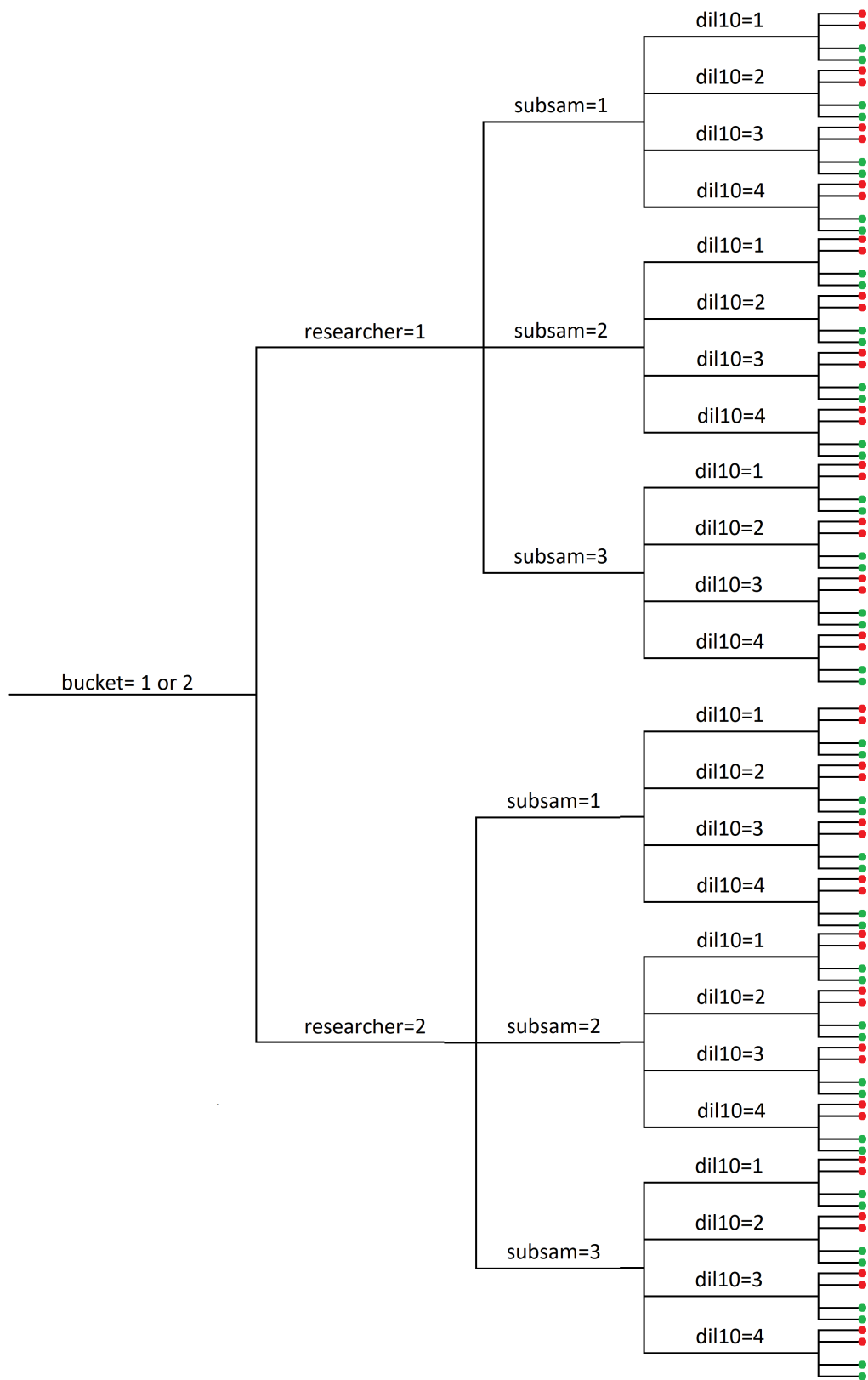
Forskellige Residual plot fra model 4, Det observeres forsat timeglasform af residualerne plottede mod de prædikterede gennemsnitsværdier. Histogrammet burde følge normalfordelingskurven bedre, der ses let forskydning mod højre. For Q-Q plottet afviger residualerne også i ekstremiteterne.

Bilag 7 -12 viser forsøgs set up under prøvetagningsperiode. De bedskrevet plade problemer er forsøgt illustreret ved Rød = blod, Blå = HiMedia og Grøn = Oxoid medium. Med mindre andet er angivet i figuren er set-uppet ens for begge spande. Dil10= 1-4 er for alle dagene et udtryk hvilken fortynding der er udsået. Der er kun foretaget analyse på dil10 = 1
 Bilag 7 :Forsøgsdag = 0



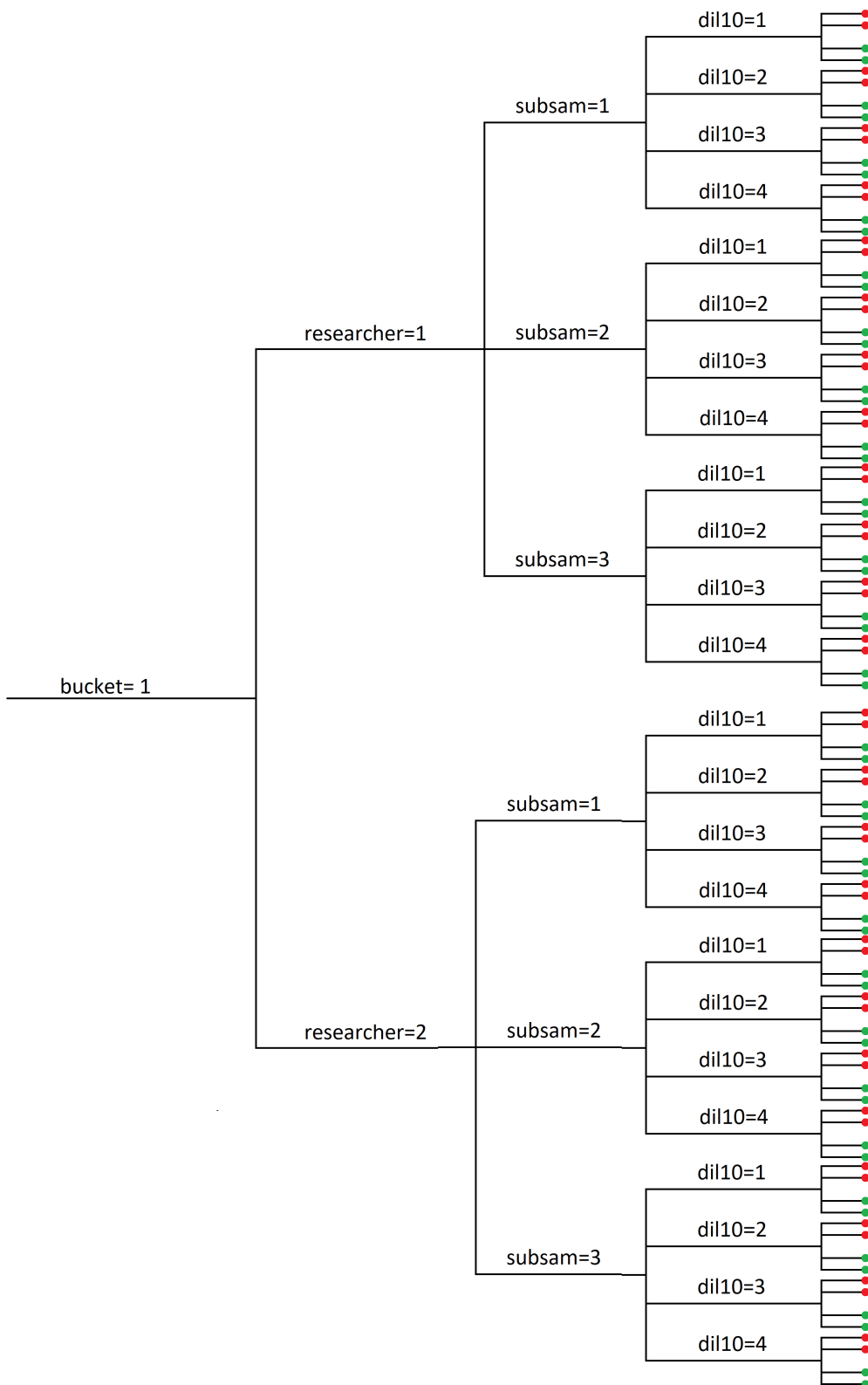
Bilag 8

Forsøgsdag = 1. Pladeskift til Oxoid



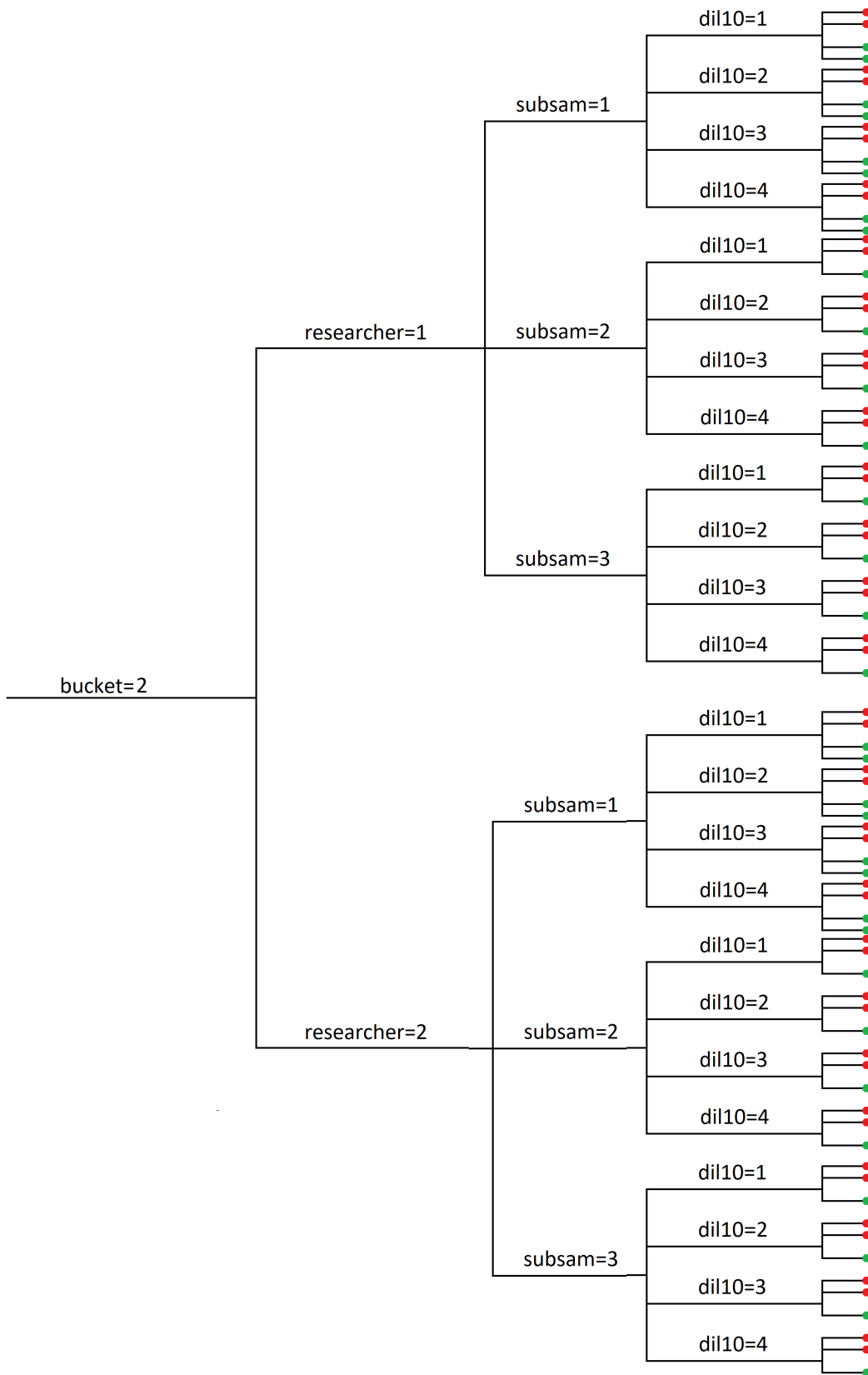
Bilag 9

Forsøgsdag 2 bucket 1

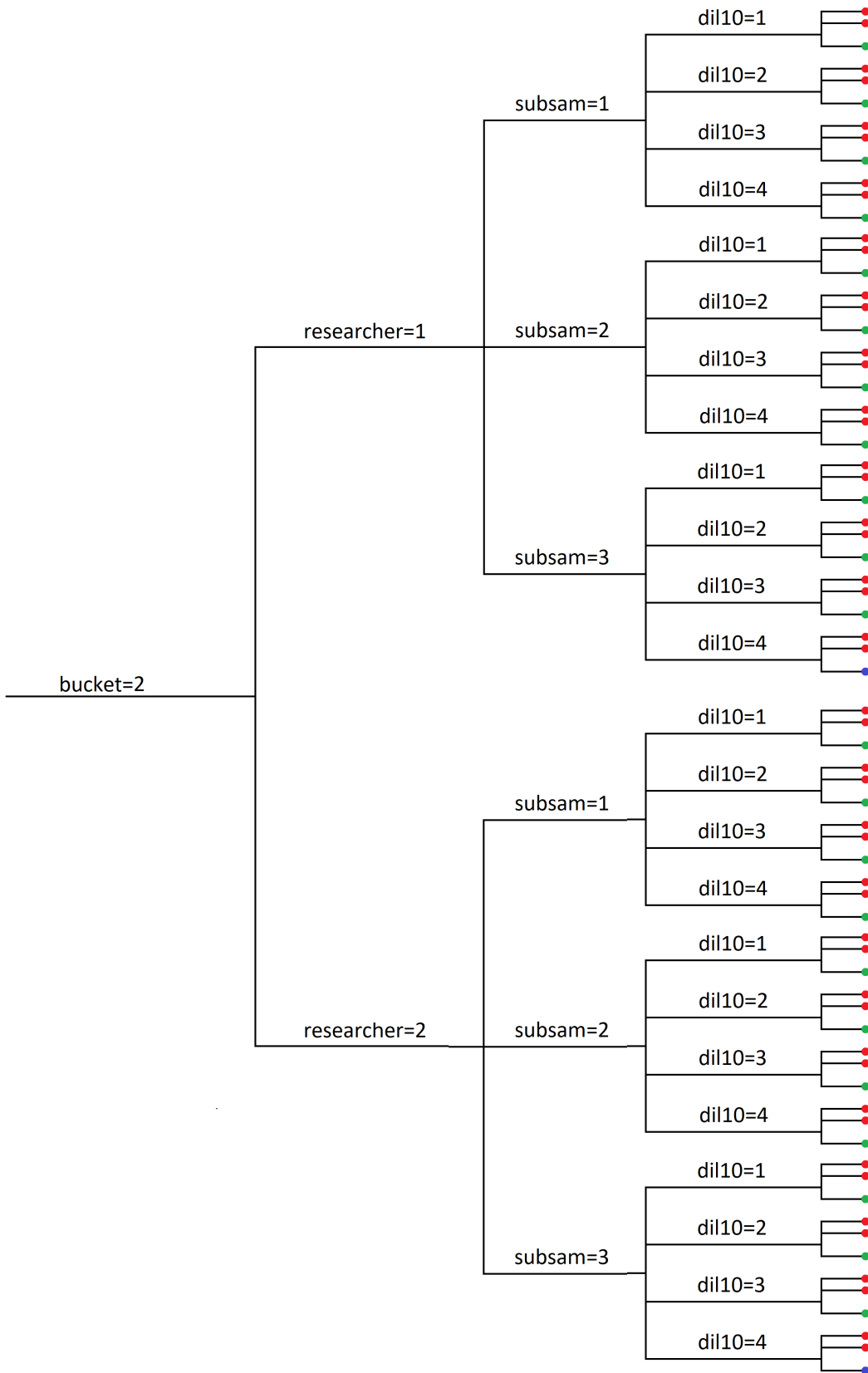


Bilag 10

Forsøgsdag 2, bucket 2 Første dag med 2 observationer på enkelt plade

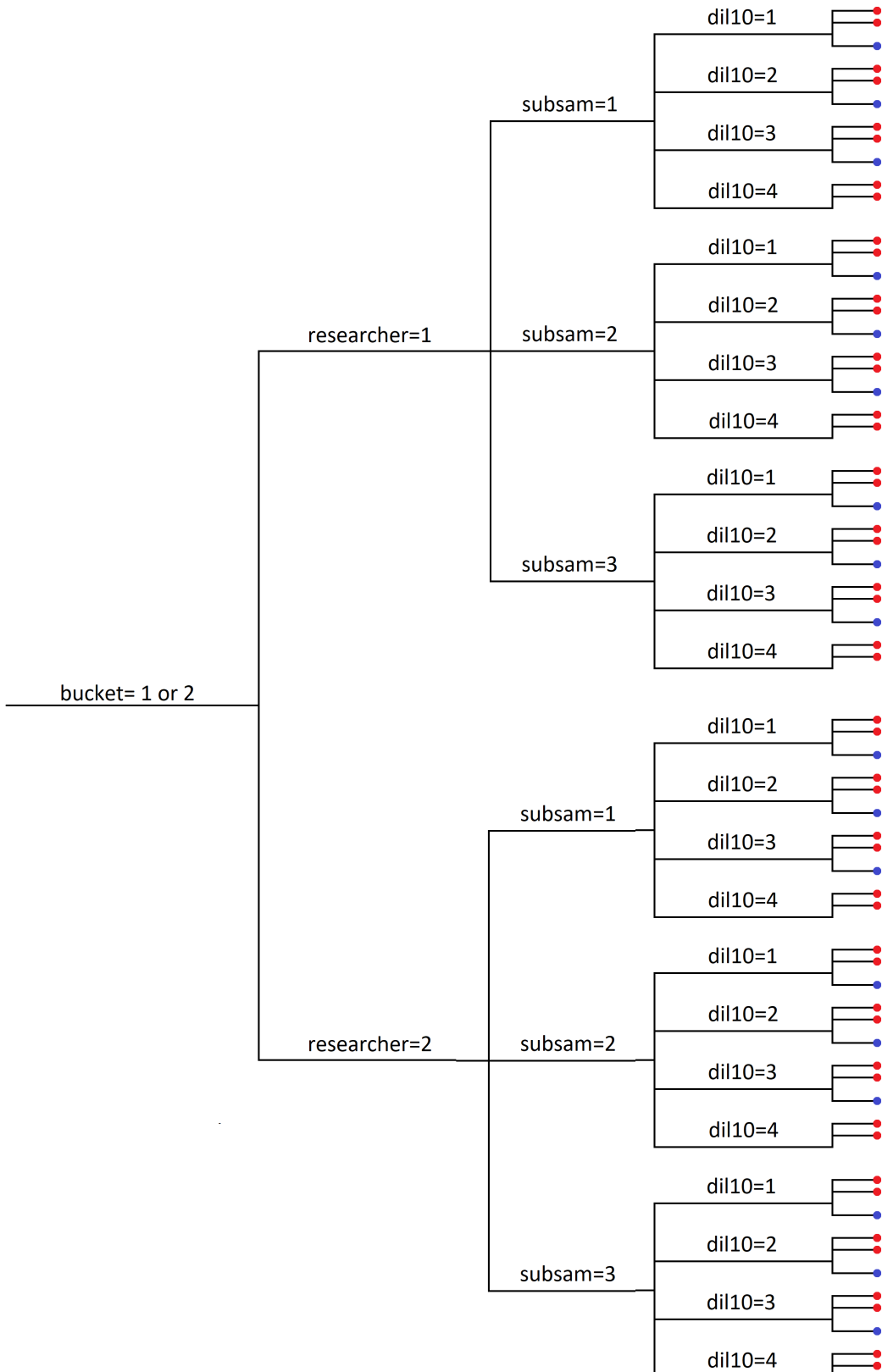


Bilag 11 Forsøgsdag 3



Bilag 12

Forsøgsdag 4 Her udgår dil10=4 på selektivt media, og selektiv dyrkning foretages nu på Himedia igen.



Referencer

1. Lastein D. Herd-specific Randomized Trials -an approach for Effect Evaluation in a Dairy Herd Health Management Program Herd-specific Randomized Trials – an approach for Effect Evaluation in a Dairy Herd Health Management Program.
[http://www.vpr.kvl.dk/dokumentation/Dorte Bay Lastein_PhD_nov_2012.pdf](http://www.vpr.kvl.dk/dokumentation/Dorte%20Bay%20Lastein_PhD_nov_2012.pdf).
2. Katholm J. Katholm, J. 2017 Personlig kommunikation, Market Development Manager, DNA Diagnostic A/S Risskov, DANmark. Tlf: +45 40417396, mail:ik@dna-diagnostic.com.
3. Christie K, Atkins N, Munch-Petersen E. A NOTE ON A LYTIC PHENOMENON SHOWN BY GROUP B STREPTOCOCCI. *Aust J Exp Biol Med Sci.* 1944;22(3):197. doi:10.1038/icb.1944.26.
4. Quinn PJ (Patrick J., Markey BK (Bryan K., Leonard FC, FitzPatrick ES, Fanning S, Hartigan PJ. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease.*
5. Willeberg P. BEK nr. 225 af 17/03/2005 Bekendtgørelse om overvågning af mastitis. www.retsinformation.dk. <https://www.retsinformation.dk/Forms/R0710.aspx?id=31455>. Published 2005. Accessed October 27, 2017.
6. Anonymous. VEJ nr 9339 af 01/01/2005 Vejledning om B-streptokok mastitis hos kvæg. www.retsinformation.dk. <https://www.retsinformation.dk/Forms/R0710.aspx?id=31489>. Published 2005. Accessed October 27, 2017.
7. Smith B. *Large Animal Internal Medicine 4th Ed.* Mosby Elsevier; 2014.
8. Hansen OK. RYK videoer. <https://www.landbrugsinfo.dk/Kvaeg/RYK/Sider/RYK%0A-%0AVideoer.aspx%0A#>. Published 2011. Accessed January 23, 2018.
9. Lauritsen U. AMS sampling in Denmark. <https://www.landbrugsinfo.dk/Kvaeg/RYK/Sider/AMSSamplinginDenmark.aspx%0A>. Published 2014. Accessed January 23, 2018.
10. Henriksen SL, Bennedsgaard TW, Klaas IC. Detection of Reservoirs of Strep. agalactiae in Automatic Milking Systems. In: *NMC Annual Meeting Proceedings.* ; 2017:105-106.
11. Mahmmoud YS, Mweu MM, Nielsen SS, Katholm J, Klaas IC. Effect of carryover and presampling procedures on the results of real-time PCR used for diagnosis of bovine intramammary infections with Streptococcus agalactiae at routine milk recordings. *Prev Vet Med.* 2014;113(4):512-521. doi:10.1016/J.PREVETMED.2014.01.002.
12. Koskinen MT, Holopainen J, Pyörälä S, et al. Analytical specificity and sensitivity of a real-time polymerase chain reaction assay for identification of bovine mastitis pathogens.

- J Dairy Sci.* 2009;92(3):952-959. doi:10.3168/JDS.2008-1549.
13. Koskinen MT, Wellenberg GJ, Sampimon OC, et al. Field comparison of real-time polymerase chain reaction and bacterial culture for identification of bovine mastitis bacteria. *J Dairy Sci.* 2010;93(12):5707-5715. doi:10.3168/JDS.2010-3167.
 14. Andersen HJ, Pedersen LH, Aarestrup FM, Chriél M. Evaluation of the Surveillance Program of Streptococcus agalactiae in Danish Dairy Herds. *J Dairy Sci.* 2003;86(4):1233-1239. doi:10.3168/JDS.S0022-0302(03)73707-2.
 15. Katholm J. Streptococcus agalactiae - an increasing problem in Scandinavia. In: *Nordic Dairy Association's Committee for Milk Quality, Mastitis Symposym.* ; 2010:1-12.
 16. Godkin MA, Leslie KE. Culture of bulk tank milk as a mastitis screening test: A brief review. *Can Vet J = La Rev Vet Can.* 1993;34(10):601-605.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17424304>. Accessed October 27, 2017.
 17. Riekerink RGMO. COMPARISON OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS AND STREPTOCOCCUS AGALACTIAE CULTURE RESULTS FROM BULK MILK AND QUARTER SAMPLES. In: *NMC Annual Meeting Proceedings.* ; 2009:168-169.
 18. Gonzalez RN, Jasper DE, Bushnell RB, Farver TB. Relationship between mastitis pathogen numbers in bulk tank milk and bovine udder infections in California dairy herds. *J Am Vet Med Assoc.* 1986;189(4):442-445.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3531123>. Accessed October 27, 2017.
 19. Soltau JB, Einax E, Klengel K, et al. Within-herd prevalence thresholds for herd-level detection of mastitis pathogens using multiplex real-time PCR in bulk tank milk samples. *J Dairy Sci.* 2017;100(10):8287-8295. doi:http://dx.doi.org/10.3168/jds.2016-12385.
 20. BEK nr 246 af 22/04/1999 Bekendtgørelse om bekæmpelse af mastitis.
<https://www.retsinformation.dk/Forms/R0710.aspx?id=6621>. Accessed January 23, 2018.
 21. Bergseng H, Bevanger L, Rygg M, Bergh K. Real-time PCR targeting the sip gene for detection of group B streptococcus colonization in pregnant women at delivery. *J Med Microbiol.* 2007;56(2):223-228. doi:10.1099/jmm.0.46731-0.
 22. van der Mee-Marquet N, Fourny L, Arnault L, et al. Molecular characterization of human-colonizing Streptococcus agalactiae strains isolated from throat, skin, anal margin, and genital body sites. *J Clin Microbiol.* 2008;46(9):2906-2911. doi:10.1128/JCM.00421-08.
 23. Le Doare K, Heath PT. An overview of global GBS epidemiology. *Vaccine.* 2013;31:D7-D12. doi:10.1016/J.VACCINE.2013.01.009.
 24. Farley MM, Strasbaugh LJ. Group B Streptococcal Disease in Nonpregnant Adults. *Clin Infect Dis.* 2001;33(4):556-561. doi:10.1086/322696.

25. Keefe G. Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2012;28(2):203-216. doi:10.1016/j.cvfa.2012.03.010.
26. Jensen NE, Aarestrup FM. Epidemiological Aspects of Group B Streptococci of Bovine and Human Origin. *Epidemiol Infect.* 1996;117:417-422. doi:10.2307/3864584.
27. Farre M, Klaas IC, Skov Sørensen UB. Transmission of Group B streptococci between Herd Employees and Dairy Cows. In: *NMC Annual Meeting Proceedings.* ; 2017:129-130.
28. Katholm J, Rattenborg E. Overvågning af B-streptokok infektion i danske malkekvægsbesætninger. *Dansk Veterinærtidsskrift.* 2009;(19):24-31.
29. Jensen NE. Experimental bovine group-B streptococcal mastitis induced by strain of human and bovine origin. *Scand J Vet Sci.* 1982;34:441-450.
30. Van den Heever LW, Giesecke WH. Experimental induction of bovine mastitis with human strain of group B streptococci (*Streptococcus agalactiae*). *J S Afr Vet Assoc.* 1980;51(2):107-109.
31. Jørgensen HJ, Nordstoga AB, Sviland S, et al. *Streptococcus agalactiae* in the environment of bovine dairy herds - rewriting the textbooks? *Vet Microbiol.* 2016;184:64-72. doi:10.1016/j.vetmic.2015.12.014.
32. Guterbock WM, Blackmer PE. Veterinary Interpretation of Bulk-Tank Milk. *Vet Clin North Am Large Anim Pract.* 1984;6(2).
33. Hogeveen E by H. Mastitis in dairy production current knowledge and future solutions. In: Hogeveen H, ed. ; 2005:41-52.
34. Østergaard S, Chagunda MGG, Friggens NC, Bennedsgaard TW, Klaas IC. A Stochastic Model Simulating Pathogen-Specific Mastitis Control in a Dairy Herd. *J Dairy Sci.* 2005;88(12):4243-4257. doi:10.3168/JDS.S0022-0302(05)73111-8.
35. Krogh MA. Management of Data for Health Performance Measurement in the Dairy Herd. 2012. http://www.vpr.kvl.dk/dokumentation/Thesis_LC2468_08jun2012.pdf. Accessed January 23, 2018.
36. Edmondson, P., UdderWise Ltd, Somerset, Storbritannien tlf 00 44 7971 268 527. ECBHM Webinar - Practical management of contagious mastitis. 2018. <https://www.udderwise.co.uk/contact>.
37. Anonymous. Astronaut A3 malkerobot betjeningsvejledning D-H001.0609DA. http://www.lelynet.com/_layouts/15/document/TechDocHandler.aspx?name=D-A001DA_-.pdf&mode=view.
38. Houe H, Ersbøll AK., Toft N. *Introduction to Veterinary Epidemiology.* Biofolia; 2004.

39. Murtaugh PA. In defense of P values. *Ecology*. 2014;95(3):611-617. doi:10.1890/13-0590.1.
40. Akaike H. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans Automat Contr*. 1974;19(6):716-723. doi:10.1109/TAC.1974.1100705.
41. SAS Institute Inc. PROC MIXED: Default Output :: SAS/STAT(R) 9.2 User's Guide, Second Edition.
https://support.sas.com/documentation/cdl/en/statug/63033/HTML/default/viewer.htm#statug_mixed_sect025.htm. Accessed January 23, 2018.
42. Rattenborg E, Paulrud C.O, Jensen S.K.S, Katholm J. Bulk Tank Milk surveillance for contagious mastitis pathogens : Comparison of two commercial Real time PCT test kits. In: *NMC Annual Meeting Proceedings* . ; 2015:215-216.
43. Rumsey D J. How to Interpret a Correlation Coefficient r - dummies.
<http://www.dummies.com/education/math/statistics/how-to-interpret-a-correlation-coefficient-r/>. Accessed January 23, 2018.
44. Hovinen M, Pyörälä S. Invited review: Udder health of dairy cows in automatic milking. *J Dairy Sci*. 2011;94(2):547-562. doi:10.3168/jds.2010-3556.
45. Bennedsgaard TW. PCR og B-streptokokker. In: *Sikring Af Sunde Og Sygdomsfri Dyr I Kvægbruget - Nye Vilkår, Nye Tilgange*. ; 2012:6-7.
46. Keefe GP. Streptococcus agalactiae mastitis: a review. *Can Vet J = La Rev Vet Can*. 1997;38(7):429-437. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9220132>. Accessed October 27, 2017.
47. Magnusson M, Svensson B, Kolstrup C, Christiansson A. Bacillus cereus in free-stall bedding. *J Dairy Sci*. 2007;90(12):5473-5482. doi:10.3168/jds.2007-0284.
48. Krömker V. Microbiological aspects of bedding materials, teat skin, teat canal and mastitis. 2017.
49. anonym. Klimanormaler. <http://www.dmi.dk/vejr/arkiver/normaler-og-ekstremer/klimanormaler-dk/>. Accessed January 23, 2018.
50. SAS institute inc. PROC GLIMMIX: Model Options :: SAS/STAT(R) 9.2 User's Guide, Second Edition.
https://support.sas.com/documentation/cdl/en/statug/63033/HTML/default/viewer.htm#statug_glimmix_a0000001411.htm. Accessed January 23, 2018.
51. SAS institute inc. Functions and CALL Routines: LOG Function - 9.2.
<http://support.sas.com/documentation/cdl/en/lrdict/64316/HTML/default/viewer.htm#a000245909.htm>. Accessed January 23, 2018.

52. Chodkowski A. The Distribution of Str. Agalactiae Outside the Bovine Udder and its Survival. *J Comp Pathol Ther.* 1949;59:275-283. doi:10.1016/S0368-1742(49)80025-7.
53. Montville TJ, Matthews KR. *Food Microbiology: An Introduction, Second Edition.*; 2008.