

Afrapportering vedr. undersøgelse af *E. coli*-isolater

Materialer:

I projektet blev der indsamlet formodede *E. coli*-mælkeprøver, samt mælkeprøver der voldte diagnostiske problemer. Mælkeprøverne blev indsamlet fra 4 kvægpraksis. Indsamlingsperioden var fra 23. maj til 2. oktober 2018.

I alt blev der indsamlet 356 mælkeprøver.

Mælkeprøverne var fra 70 forskellige CHR-numre.

Hvert CHR-nummer bidrog med 1 – 29 mælkeprøver, med et gennemsnitligt bidrag på 5 mælkeprøver pr. besætning.

De 356 mælkeprøver stammede fra 325 køer. Heraf bidrog 30 køer med mere end én mælkeprøve. Ingen køer bidrog med mere end 2 mælkeprøver.

De 356 mælkeprøver var fordelt på 252 enkeltkirtelprøver og 104 prøver sammensat af mælk fra flere kirtler eller med uoplyst kirtelantal.

De 356 mælkeprøver var fordelt på 129 prøver oplyst som akut yverbetændelse og 227 mælkeprøver med anden eller uspecificeret diagnose – herunder fx goldprøve, celletalsko, nykælver og yverbetændelse uden angivelse af status (akut/kronisk/genbehandling samt subklinisk).

Metoder:

Alle mælkeprøver er opbevaret på frost fra dyrlægen stillede sin diagnose til laboratorieundersøgelsen på DTU.

Alle mælkeprøver blev på DTU optøet ved stuetemperatur, blandet (vendt i hånden), og udsået med 100 µl/plade med drigalski-spatel.

Der blev udsået på blodagar med kalveblod.

Pladerne blev inkuberet i 48 t ved 37 °C.

Pladerne blev aflæst ved 24 og 48 t.

Ved aflæsning blev der foretaget undersøgelse for:

- Renhed (antal bakterietyper, hvor mere end 2 bakterietyper/plade defineres som forurenede mælkeprøve)

- Total CFU (Kun for prøver med 1 eller to bakterietyper)

Efter aflæsning blev der foretaget MALDI-tof identifikation på alle mælkeprøver med 1 eller 2 typer bakterier i.

Mikrobiologi:

Ud af 356 mælkeprøver var 70 indsendt med diagnosen *E. coli*.

Af de 70 *E. coli* diagnoser var 62 sandt positive (89%) og 8 var falsk positive (11%).

De 8 falsk positive var fejldiagnosticerede prøver med hhv.:

Korrekt diagnose	Antal mælkeprøver
<i>S. aureus</i>	2
<i>C. freundii</i>	2
<i>S. dysgalactiae</i>	1
<i>S. sciuri</i>	1
<i>O. antrophii</i> (Ochrobacter)	1
<i>S. proteamaculans</i> (Serratia).	1

Altså 4 diagnoser med forkert Gram-status.

Der blev indsendt 286 mælkeprøver med anden diagnose end *E. coli*.

Af de 286 mælkeprøver blev der fundet 25 falsk negative *E. coli* (9%). OBS dette udgør dog ikke den sande værdi for falsk negative, idet den sande prævalens af *E. coli* i de 70 CHR-numre er ukendt. Altså en pseudoparameter. De falsk-negative siger derfor udelukkende noget om, hvor stor en andel af de mælkeprøver der voldte diagnostiske problemer der indeholdt *E. coli*!

De 25 falsk negative var fejldiagnosticerede prøver med hhv.:

Korrekt diagnose	Antal mælkeprøver
<i>S. aureus</i>	8
<i>S. uberis</i>	5
<i>S. dysgalactiae</i>	5
<i>Klebsiella</i> spp.	5
<i>S. agalactiae</i>	2

Altså 20 diagnoser med forkert Gram-status.

Genetik:

Opgørelse af det samlede gen-materiale i de 70 *E. coli*-isolater viser, at der er mange forskellige isolater, altså at coli-populationen er særdeles heterogen. Således er der mindst en unik *E. coli* i hver CHR. Data peger derfor på, at der kan være genetiske forskelle som medfører, at coli-mastitis ikke opfører sig ens klinisk fra tilfælde til tilfælde og/eller at vaccine kan beskytte varierende mod forskellige *E. coli*-isolater.

DTU har arkiveret data-sættet til eventuel senere brug, og metoderne klar til at undersøge dette for SEGES, men arbejdet forudsætter løn til en specialmedarbejder og DTU afventer derfor svar på om dette kan finansieres i en forlængelse af projektet.

Diskussion:

Da det ikke vides nøjagtigt, hvordan de indsendende dyrlæger har selekteret de formodede coli-mælkeprøver de indsendte, kan dataet ikke give en "prævalens" i streng forstand. Derimod må studiet fortolkes som indikativt/hypotesegenererende.

Tilsvarende må der tages endnu større forbehold for fortolkningen af prøverne der voldte diagnostiske problemer, idet inklusions-/eksklusionskriterierne for disse prøver slet ikke er definerede.

Studiet viste en faldende frekvens af falsk positive *E. coli* mælkeprøver i løbet af studieperioden. Det kan tænkes, at dette afspejler, at de indsendende dyrlæger har gjort sig diagnostiske erfaringer af de svar de har fået under vejs, og dermed er blevet bedre til at identificere coli – eller at de blot er blevet mere selektive i hvad de sendte til DTU... Dette er dog ren spekulation, idet der ikke er data til at eftervise det – der er indsendt pr klinik, så jeg ved ikke, om tendensen afspejler bedre diagnostik fra én dyrlæge over tid, eller indsendelser fra forskellige dyrlæger pr. klinik.

Konklusion:

- Der er stor interesse for at indsende mælkeprøver der volder diagnostiske problemer.
- Af de mælkeprøver der diagnosticeres som *E. coli* i de deltagende kvægpraksis er 11 % falsk positive, altså diagnoser hvor en ko fejlagtigt diagnosticeres som coli-positiv.
- I de deltagende kvægpraksis udgjorde *E. coli* 9% af de mælkeprøver som voldte diagnostiske problemer, med forbehold for at det indsendte data ikke nødvendigvis er repræsentativt.
- Blandt de mælkeprøver som volder diagnostiske problemer, er en væsentlig del af forklaringen at *E. coli* fejldiagnosticeres, at der ikke identificeres korrekt Gram-status, - altså at dyrlægen undlader basale trin i sin diagnostik.
- Studiet skal epidemiologisk fortolkes med store forbehold, idet samplingen kan være selekteret af indsenderne.
- Samlet viser studiet dermed en væsentlig forekomst af fejldiagnoser i dyrlægernes arbejde med *E. coli*, men selve forekomsten af *E. coli* kan ikke estimeres på baggrund af studiet.
- Det er nødvendigt at undersøges data-sættet genetisk for at konkludere på, om forskellige *E. coli*-isolater kan gøre koen mere eller mindre syg og hvor stor effekt, der kan forventes overfor de enkelte isolater ved vaccination. DTU afventer svar fra SEGES på om disse analyser ønskes inddraget i studiet. Materialet er klargjort til analyserne på DTU og kræver derfor ikke yderligere

driftsmidler, men analyserne vil forudsætte løntimer udover de på nuværende tidspunkt bevilligede.