

# Utaretulehdusnäytteiden analyysitulosten tuloksista ja tulkinnasta

joulukuu 2011, Laura Kulkas Valio Oy

Valion Aluelaboratoriot ottivat 1.2.2010 käyttöön uuden geeniteknologisen, PCR (Polymerase Chain Reaction) analyysimenetelmän utaretulehdusnäyteanalytiikassa. Menetelmällä kyetään löytämään 99,9 % aikaisemmin käytössä olevalla viljelymenetelmällä löydettävistä bakteerityypeistä. Myös stafylokokkien penisilliiniresistenssi voidaan diagnosoida. Menetelmä on suomalaisen Finnzymes OY:n kehittämä (osa amerikkalaista Thermofisher yritystä).

## PCR-menetelmän etuja

1. PCR- menetelmä on nopeampi kuin viljelymenetelmä: PCR 4 tuntia << >> viljely 24 - 48 tuntia.
2. PCR- näyte ei vaadi kylmäkuljetusta, jos näytteet lähetetään säilöntätabletin sisält. putkiloissa.
3. Bronopol- säilöntäaine tai maidon antibioottijäämät eivät haittaa PCR- analyysin teko, eli hoidossa olevasta eläimestä voi ottaa näytteen. Tästä voi olla hyötyä erityisesti suurten tilojen näytteenotossa. (Perinteinen viljely ei onnistu, jos näyte on säilötty tai maidossa on antibioottia).
4. PCR- menetelmällä löydetään n. 40 % enemmän aiheuttajabakteereja kuin viljelymenetelmällä eli "ei-löydöstä" -tulosten määrä vähenee.

Taulukko 1. Vuonna 2009 ja 2010 (11kk) ei-löydöstä tulokset Valio Aluelaboratorioissa

Menetelmä	Näytteiden %-osuus joissa ei-löydöstä
Viljely v. 2009	28
PCR v. 2010	12

5. Geeniteknologiaan perustuvalla menetelmällä on paljon jatkokehitysmahdollisuuksia.

PCR-tulokset siirtyvät Valmaan heti, kun ne ovat valmistuneet. Tulokset voi saada myös tekstiviesteinä kännykkään (VALMAssa pitää olla silloin kännykkähälytys päällä UT-tulosten osalta).

PCR menetelmä on erittäin herkkä, mikä selittää monien näyteanalyysien tulosten runsautta. Laimennussarjatutkimuksessa on todettu, että PCR menetelmä on noin 100 000 kertaa herkempi kuin aikaisemmin käytetty viljelymenetelmä *S.agalactiae* suhteen.

## Koska maitonäyte kannattaa ottaa

Utaretulehdusmaitonäyte/-näytteitä kannattaa ottaa esimerkiksi silloin kun ...

1. harkitsee antibioottihoidon tarpeellisuutta
2. miettii tietyn lehmän teurastuskohtaloa
3. haluaa eläimen tarkistaa paranemisen
4. karjan utaretulehdustyypin varmentamiseksi (tärkeää ennaltaehkäisyyn suunnittelua varten)
5. *S.agalactiae* saneerauksen toteuttamiseksi
6. *S.aureus* ja *S.agalactiae* lehmien karsimiseksi kun lehmiä siirretään uuteen pihattoon tai uuteen lypsyrobotiikkoon
7. ostoeläimen utareen tarkistamiseksi

## Näytteiden otto käsin

Mihin otetaan ja miten lähetetään?

Näytteet otetaan maitoautoista tai osuuskunnan myymälöistä saataviin ut-näyteputkiin eli ns. sormipulloihin. Näissä putkissa lähetettyjen näytteiden käsittely on laboratoriossa helpompaa. Postin kautta lähetettäessä putkissa pitää olla säilöntäainetabletti. Maitoauton mukana lähetettäessä näytteet ja saatteet on hyvä pakata muovipussiin. Putkeen kirjoitetaan vedenkestävällä tussilla lehmän nimi / korvanumero ja vedin (oe, ot, ve, vt). Postin kautta lähetettäessä on käytettävä musta-kelta postituslaatikkoa, joita on saatavilla osk:n myymälöistä. Postin ohjeiden mukaan laboratorionäytteitä **ei saa** lähettää postitse kirjekuussa.

Miten näytteet kulkeutuvat laboratorioon?

Näytteet kulkevat maitoauton mukana laboratorioon Lapinlahdelle tai kuriirikuljetuksella Valion toimipisteistä Seinäjoelle. Seinäjoella kaikki Ut-näytteet analysoidaan niiden laboratorioon saapumispäivän aikana, myös lauantaina. Kuriirit kulkevat myös pe-la välisenä yönä. Tulokset kirjataan Valmaan sitä mukaan kun ne valmistuvat. Viestin voi saada myös kännykkään.

## Maitonäytteen oikea ottotapa – puhtaus ennen kaikkea!

Maitonäyte otetaan pääsääntöisesti juuri ennen lypsyä alkusuihkeiden jälkeen, kun maito on laskeutunut. Vetimen pää puhdistetaan 3 kertaa desinfektioaineella ja vedinsuihkeita otetaan reilusti joka puhdistuskerran välillä. Näytteenoton puhtaus vaikuttaa tuloksiin paljon, koska testimenetelmän herkkyystä johtuen analyysituloksissa on usein myös kontaminantteja eli bakteereita, joita on tullut vedinkanavasta ja vetimestä iholta. Myös vetimien päiden haavaumien ja nirhamien bakteerikasvustot voivat kontaminoida maitonäytteen. Lantaisten vetimien päiden puhdistaminen aivan puhtaaksi näyttää käytännössä olevan vaikeaa ja tuloksissa on helposti lannassa esiintyviä bakteereita. Jopa omista sormista saattaa välittyä bakteereita näytteeseen, joten sormien on oltava erittäin puhtaat näytettä otettaessa. Hyvä olisi käyttää puhtaita kertakäyttökäsineitä joka lehmän näytteenotossa.

## Näytteiden otto automaattisella näytteenottolaitteella

Automaattisilla näytteenottolaitteilla otettuja lehmätason (karjatarkkailu)näytteitä voi hyödyntää *Streptococcus agalactiae* saneerauksissa, koska näitä bakteereita ei tule esiintyä lainkaan. Lievää kontaminaatiota tapahtuu kuitenkin lypsy-yksikön välityksellä, joten positiivisten lehmien tuloksien varmistaminen on hyvä tehdä käsipelillä. Parhaiten menetelmä sopii silloin, kun *S.agalactiae* lehmiä on enää vähän tai ei ollenkaan jolloin kontaminaatoriskikin on pieni. Isoissa karjoissa automatisoitu näytteenotto on kuitenkin niin suuri etu työmäärää ajatellen, että se puoltaa paikkaansa tietyn mainituin reunaehdoin. Muiden bakteerien osalta lehmätason näytteet ovat yleensä liian epätarkkoja ja tulosten tulkinta on yleensä vaikeaa verrattuna neljännestason käsin otettuihin näytteisiin.

## Mitä tuloksista voi nähdä?

Näytteenottolaitteistolla otetuissa lehmätason näytteissä näkee erittäin hyvin karjan vetimien päiden ongelmat (ongelmia lypsyssä tai lypsykoneessa) eli paljon *A.pyogenes*, *KNS*, *S.aureus* ja/tai *S. dysgalactiae* bakteeri löydöksiä. Vetimien päiden ongelmat näkyvät toki hyvin myös silmämääräisesti! Pihton kiinteään lantakäytävän lantakolan reistailu näkyi erittäin selvästi enterokokkien, *S.marsescens*, Klebsiella ja *E.coli* esiintyminä eli ympäristökontaminantteina eräällä koetilalla. Löydöksistä on kuitenkin mahdotonta varmasti sanoa, mikä on jonkin tietyn neljänneksen utaretulehduksen aiheuttajabakteeri. Utareen kliininen tila (yleensä selvä kliininen tulehdus) antavat parhaan viitteen siitä ovatko edellä mainitut bakteerit aiheuttajana. Erittäin terveistä ja puhtaista karjoista on ilmeisesti mahdollista saada lähinnä utareen tilaa edustavia näytteitä.

Yhdellä yli 50-lehmän koetilallamme tilanne on ollut tällainen! Tilan neljänneksen näytteistä löytyi vain joitakin KNS ja *S.dysgalactiae* neljänneksiä. Karjan tankkimaidon solulukku pyöri noin 50 000 – 80 000 solua/ml tasolla jatkuvasti.

Lehmätason maitonäytteiden utaretulehdusbakteerianalyysituloksista voi saada kuvan karjan olosuhteista, utaretulehdusongelman tyypistä sekä *S.agalactiae* ja mahdollisesti *S.aureus* kantajista, mutta esimerkiksi antibiootihoidon suunnittelua varten tulokset ovat yleensä liian epätarkkoja. Kun otetaan huomioon PCR testin hinta, ei koko karjan lehmätason näytteitä tällöin kannata tehdä rutiininomaisesti. Tiettyihin saneeraustilanteisiin menetelmä sopii kuitenkin hyvin. Säännöllinen solutestaus (koko karja vähintään kerran kuukaudessa) ja epäilyttävän korkean soluluvun omaavien lehmien solettavien neljänneksen maidon bakteerianalytiikka on edelleen järkevää.

### PCR tulosten tulkinta

Tulkittaessa utaretulehdusmaitonäytteen PCR analyysitulosta on hyvä ymmärtää asiaa ja käyttää järkeä! Neljänneksen solumäärä on aina syytä ottaa huomioon. Ainoastaan kohonnut solutulos viittaa todelliseen utaretulehdukseen. Samassa neljänneksessä voi olla yksi tai useampi utaretulehduksen aiheuttajabakteeri samaan aikaan. Mutta kaikki neljänneksestä otetusta maitonäytteestä löydetty bakteerit eivät ole neljänneksen utaretulehduksen aiheuttajia. Viitettä todellisesta aiheuttajasta saa sarakkeista Eristetyn bakteerin määrä ja Bakteerin %-osuus. Mitä useampi + on Eristetyn bakteerin määrä sarakkeessa bakteerin kohdalla, sitä todennäköisempää on, että kyseinen bakteeri aiheuttaa utaretulehdusta neljänneksessä. Jos Bakteerin %-osuus sarakkeessa on korkea prosenttiluku, vahvistuu käsitys aiheuttajabakteerista.

Kun mietitään, mitä neljännekselle/lehmälle tulisi tehdä, on hyvä muistaa, ettei kaikkia utaretulehduksia kannata hoitaa antibiooteilla, ainakaan lypsykaudella.

### Bakteerit

Taulukko 1. Valion aluelaboratorioiden bakteeritulosten vertailu, vuodet 2009 ja 2010 (11 kk)

Bakteeri	kpl v. 2009	Osuus löydöksistä	Osuus näytteistä, joissa löydös	kpl v. 2010	Osuus löydöksistä	Osuus näytteistä, joissa löydös
<b>Tartunnalliset</b>						
<i>A.pyogenes/P.indolicus</i>	1447	2,5	2,8	8478	6,7	11,3
<i>Corynebacterium spp/C.bovis</i>	1939	3,3	3,7	17865	14,2	23,8
<i>S.aureus</i>	13540	23,3	25,8	17332	13,8	23,1
<i>Str.agalactiae</i>	386	0,7	0,7	899	0,7	1,2
<b>Tart. &amp; ymp.peräiset</b>						
KNS	15988	27,5	30,5	40479	32,2	53,8
<i>Str.dysgalactiae</i>	7768	13,3	14,8	13934	11,1	18,5
<i>Str.uberis</i>	9147	15,7	17,4	14384	11,4	19,1
<b>Ympäristöperäiset</b>						
<i>E.coli</i>	2949	5,1	5,6	5981	4,8	8,0
<i>Enterococcus</i>	1250	2,1	2,4	4672	3,7	6,2
Klebsiella	433	0,7	0,8	1323	1,1	1,8
<i>S.marsescens</i>	55	0,1	0,1	347	0,3	0,5

Punainen = selvästi lisääntynyt / Sininen = lievästi lisääntynyt / Keltainen = vähentynyt

Kun tarkastellaan vuosien 2009 ja 2010 (11 kk) tuloksia huomataan, että **A.pyogenes/P.indolicus** ja **C.bovis** löytymät ovat selvästi lisääntyneet. A.pyogenesten aiheuttamat kliiniset tapaukset eivät kuitenkaan ole lisääntyneet, joten uudella menetelmällä löydetään enemmän iholta ja limakalvoilta peräisin olevia bakteereja. Myös makuuparsien pinnoilla esiintyy näitä yllättävän paljon ja niiden alkuperä on tällöin todennäköisesti myös lehmien iho ja limakalvot (erityisesti haavaumat, kohtuvalu- tus jne.). A.pyogenes esiintymien lisääntyminen on uusi havainto, eikä sille ole mitään muuta selitystä, kuin PCR menetelmän herkkyys. Sama koskee C.bovis esiintymiä. Kaikki löydökset eivät johdu C.bovis utaretulehduksista, vaan usein bakteerit ovat peräisin vedinkanavasta. C.bovista ei taas esiin- ny juuri lainkaan parsien pinnoilla, mikä osaltaan on mielenkiintoinen havainto.

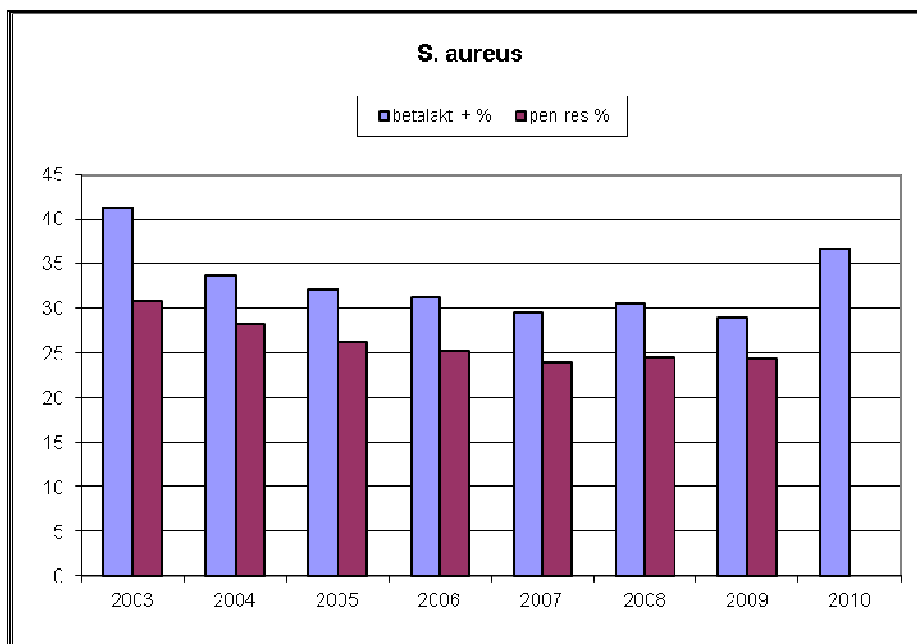
Ainoa bakteri, jonka esiintyminen on vähentynyt, on **S.aureus**, mikä on tosi ilahduttavaa. S.aureusta esiintyy utaretulehduksissa ja haavoissa merkittäviä määriä, eikä sitä pidetä ihon ja limakalvon nor- maalina runsaana asukkina. Tämä selittää sen, ettei PCR tekniikalla löydy pieniä määriä monista näytteistä. Parsien pinnoilla S.aureusta esiintyy tuskin lainkaan.

**KNS** bakteerilöydökset ovat myös lisääntyneet, vaikka mitään näyttöä varsinaisten KNS utaretuleh- dusten lisääntymisestä ei ole. Monet KNS kannat ovat ihon normaaleja asukkeja, joten tulos ei ole yllättävä. Parsien pinnoilta löytyy aina KNS bakteereja. Jotkut ovat todennäköisesti peräisin lehmistä, mutta nykytiedon mukaan jotkut KNS alalajit myös kasvavat ja lisääntyvät parsissa.

Myös **S.dysgalactiae** ja **S.uberis** viihtyvät ja lisääntyvät sekä lehmässä että ympäristössä. Näiden bak- teerien esiintyminen lisääntyy todennäköisesti kun siirrytään pihatoihin ja lisätään kuivutusta. Ympäristöperäisten bakteerien esiintyminen on hieman lisääntynyt, mitä selittää PCR tekniikan herkkyys. Pienikin lika kontaminaatio näytteenoton yhteydessä (usein todennäköisesti vedinaukosta) näkyy herkästi tuloksissa. **E.colia** löytyy aina parsista, **Klebsiellaa** erityisesti kosteiden navetoiden parsista.

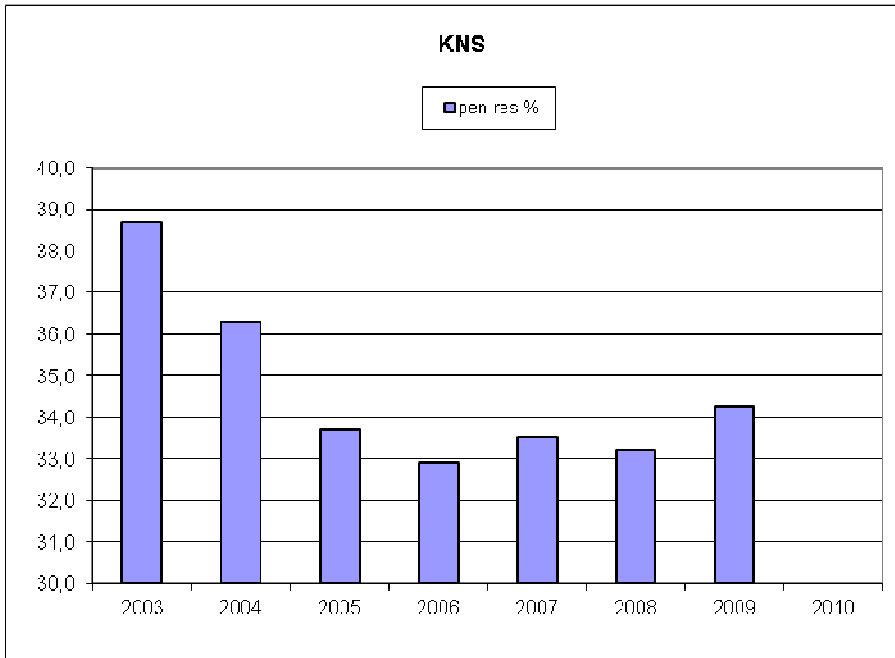
### Stafylokokkien betalaktamaasi analyysi eli penisilliiniresistenssin esiintyminen

**Taulukko 2.** Penisilliiniresistenttien ja betalaktamaasi positiivisten S.aureus kantojen prosentuaalinen osuus kaikista kannoista vuosina 2003- 2009 (kahdella eri menetelmällä) ja vuonna 2010 (11 kk) uu- della PCR menetelmällä (mittaa betalaktamaasigeenin läsnäoloa).



Aikaisemmin käytössä olleen viljelymenetelmän yhteydessä mitattiin S.aureuksien penisilliiniresistenssiä tietyllä agardiffusiomenetelmällä ja myös betalaktamasigeenin läsnäoloa. Täten saatiin kahdenlaisia tuloksia kuten taulukko 2 osoittaa.

**Taulukko 3.** KNS bakteerien betalaktamaasi positiivisuus vuosina 2003 -2010



KNS bakteerien suhteen on mitattu vain betalaktamasigeenin läsnäoloa, mutta koska testimenetelmä on vaihtunut, nähdään pientä eroa tuloksissa.

PCR menetelmä testaa stafylokokkikantojen betalaktamaasigeenin läsnäoloa perintöaineksessa eli genotyyppiä. Se ei mittaa geenin toiminnassa oloa käytännön elämässä eli fenotyyppiä kuten agardiffusiomentelmä.

Bakteeri	2009, fenotyypin määrittäminen	2010 (11 kk) geenin määrittäminen
KNS		32,50
S.aureus		39,20