

Projektrapport

AP1- Sammenhæng mellem celletal, kimtal og variation i Ct værdi på PCR

Projekt: 105083 Sikker diagnostik i B-streptokokbesætninger

Ansvarlig	MAVB
Oprettet	17-12-2025
Side	1 af 10

Projektrapport - Sammenhæng mellem celletal, kimtal, andel smittede køer og variation i Ct-værdi på PCR for B-streptokokker

Denne rapport indeholder resultater fra projektet Sikker diagnostik i B-streptokokbesætninger, specifikt relateret til arbejdsplan 1. Projektet er støttet af Mælkeafgiftsfonden. Resultaterne vedrører analyse af sammenhængen mellem celletal, kimtal, andel smittede køer med *Streptococcus Agalctiae* (B-streptokokker) i besætningen, samt tankmålingens Ct-værdi i forhold til B-streptokokker.

Konklusion

- Der er ingen sammenhæng mellem leveret mælkemængde og Ct-værdien på tankmælksprøven.
- Der er ingen signifikant effekt af den grupperede Ct-værdi på leveret mælkemængde og derfor heller ikke nogen indikation af at Ct-værdien afhænger af tankvolumen.
- Der er en sammenhæng mellem andelen af smittede køer i besætningen og Ct-værdien af tankmælksprøven. Når der er over 10 % af køerne i besætningen der er inficeret, så er Ct-værdien signifikant lavere, end hvis der er 0 % eller mellem 1-5 % inficerede køer.

Der er en sammenhæng mellem andel af smittede køer i besætningen og tankmælakens kimtal. Er andelen af besætningen der er smittet over 5 % er der et signifikant højere kimtal end hvis andelen er lavere. Dog hvis analysen foretages uden en ekstrem (dog plausibel) værdi, så er det kun gruppen af besætninger med mellem 5 og 10 % inficerede køer der er signifikant forskellig i forhold til gruppen med 0 % inficerede køer.

Baggrund

Tilstedeværelse af B-streptokokker i tankmælk er blevet overvåget siden 1954 med varierende interval mellem prøveudtagning. Fra 2012 overgik analysemetoden fra bakteriologisk dyrkning til PCR-metoden til detektion af B-streptokokker. I 2017 blev forekomst og incidens af B-streptokokker overvåget ved 2 årlige tankmælksprøver. På daværende tidspunkt kunne skift af status fra fri til smittet, ske ved fund af B-streptokokker i tankmælk eller ved indgang af dyr i besætningen som enten kom fra en smittet besætning eller fra en udstationering hvor dyret har gået sammen med dyr fra en smittet besætning. Siden medio 2021 er overvågningen udvidet til også at inkludere påvisning af B-streptokokker i individprøver, analyseret enten ved PCR-metoden typisk fra goldkopprøver, eller fra individprøver fra køer med subklinisk eller klinisk mastitis, analyseret ved bakteriologisk dyrkning.

Fund af B-streptokokker i yvervævet er forbundet med subklinisk mastitis, forringelse af mælke kvaliteten og mælkeproduktionen. Derudover er B-streptokokker en zoonose. Infektion med B-streptokokker kan derfor have stor betydning for landmandens økonomi og koens velfærd. Derudover har fund af B-streptokokker i en besætning yderligere konsekvenser i form af restriktioner på flytning af dyr mellem smittede og fri besætninger, samt udstationering eller udstilling af dyr på dyrskuer. Når først en besætning er inficeret med B-streptokokker kan patogenet være svært at slippe af med igen. Det kræver en grundig sanering af besætningen, hvilket både er tidskrævende og forbundet med store omkostninger.

Det er derfor altafgørende at tilstedeværelse af B-streptokokker er sikkert bestemt, både i forhold til opdagelse af patogenet, men også i relation til kontrol med eller sanering for B-streptokokker. På nuværende tidspunkt beror fund af B-streptokokker på de halvårige tankmælksprøver samt på fund af B-streptokokker i dyrkninger fra mælkeprøver udtaget fra køer med klinisk mastitis, eller fra PCR

analyser af mælkeprøver udtaget ved goldning. I takt med at besætningerne er blevet større, betyder det også at volumen på mælketanken også er stigende. Det vil i teorien medføre en stigende fortyndingseffekt i forhold til fund af de patogener der eventuelt er i mælken. Bekymringen går således på om metoden til overvågning af B-streptokokker er udfordret at denne problemstilling. Det forventes af afhænge både af hvor stor en andel af besætningen som er inficeret med B-streptokokker, men også af hvor stor besætningen er og deraf afledt, hvor stor mælkemængde der udtages en prøve fra. Derudover er der behov for at belyse de udfordringer der er forbundet med mælkens kvalitet i relation til hvor stor en andel af køerne der er smittet.

Formålet med analyserne udført i arbejdsplan 1 er følgende:

- At undersøge om variationen i Ct-værdien på PCR-prøven som bliver udtaget ved den halvårslige udtagning af tankmælksprøver, afhænger af besætningsstørrelse/leveret mælkemængde.
- At undersøge sammenhæng mellem niveau af smittede køer i besætningen og Ct-værdien af tankmælksprøven.
- At undersøge sammenhængen mellem Ct-værdien af tankmælksprøven og celletal, kimtal, samt om det afhænger af andelen af køer smittet med B-streptokokker.

Data

Analyserne med ovenstående formål er udført på data udtrukket fra Kvægdatabasen. I medio 2021 trådte en ny bekendtgørelse i kraft, som medfører at fund af B-streptokokker i enkeltdyrprøver, enten fundet ved dyrkning af mælkeprøver udtaget fra køer med klinisk mastitis, eller fund af B-streptokokker fundet ved PCR analyse af mælkeprøver udtaget ved goldning, at besætningen status skifter fra Fri til Smittet, såfremt besætningen ikke allerede er smittet med B-streptokokker. Derfor er der valgt at fokusere på data fra perioden 1. juli 2021 frem til 1. april 2025. Følgende indgår i datasættet.

- Besætninger der har været smittet i perioden – også gerne med opstart før 1. juni 2021.
- I perioden fra besætningen opgøres det hvor mange individprøver der er udtaget pr. år. Og her kan en ko kun tælle med én gang pr. år ud fra devisen om at der kun bliver udtaget prøver ved goldning. Formålet er her at optælle hvor stor en andel af besætningen hvor der udtages individprøver. Vi er interesseret i at den andel er så høj som mulig, idet vi ellers risikerer at kigge på besætninger hvor der ikke udtages prøver fra køer med høje celletal (de kan behandles i forvejen) og som dermed godt kan være køerne der står med en B-strep infektion. Derfor er cut-off værdien sat til at 60% af besætningen som minimum skal være testet med PCR ved goldning.
- Optællingen af andel af inficerede goldkopprøver sker efter den halvårslige tankmælksprøve, således at koen der eventuelt er smittet forventes at være mælkeleverende på det tidspunkt hvor tankmælksprøven er udtaget.

Datasteps kronologisk

- Udtræk af statusskift og her tages besætninger med som har skiftet til status smittet enten efter 1. juni 2021 eller som på et tidspunkt i perioden fra 1. juni 2021 har været i status smittet. Der kan være nogle besætninger som har et kort statusskifte. Besætninger som har påbegyndt status efter besætningens ophør er taget ud af data.
- Data på statusskift sammenkobles med data fra goldkopprøver, og herefter kobles dette med data på antal årskøer, for at kunne fastlægge hvor stor en andel af besætningens køer som har fået udtaget en goldkopprøve. Kun besætninger med minimum 60 procent af køerne hvor der findes en goldkopprøve på medtages videre i datagrundlaget.
- Data kobles med resultater fra tankmælksovervågningen, samt med data fra leverancerne til mejerierne på hhv. mælkemængde, celletal og kimtal.

Tabel 1 viser overblik over data til analyserne.

Tabel 1. overblik over data for analyser på sammenhæng mellem Ct-værdi og mælkeparametre

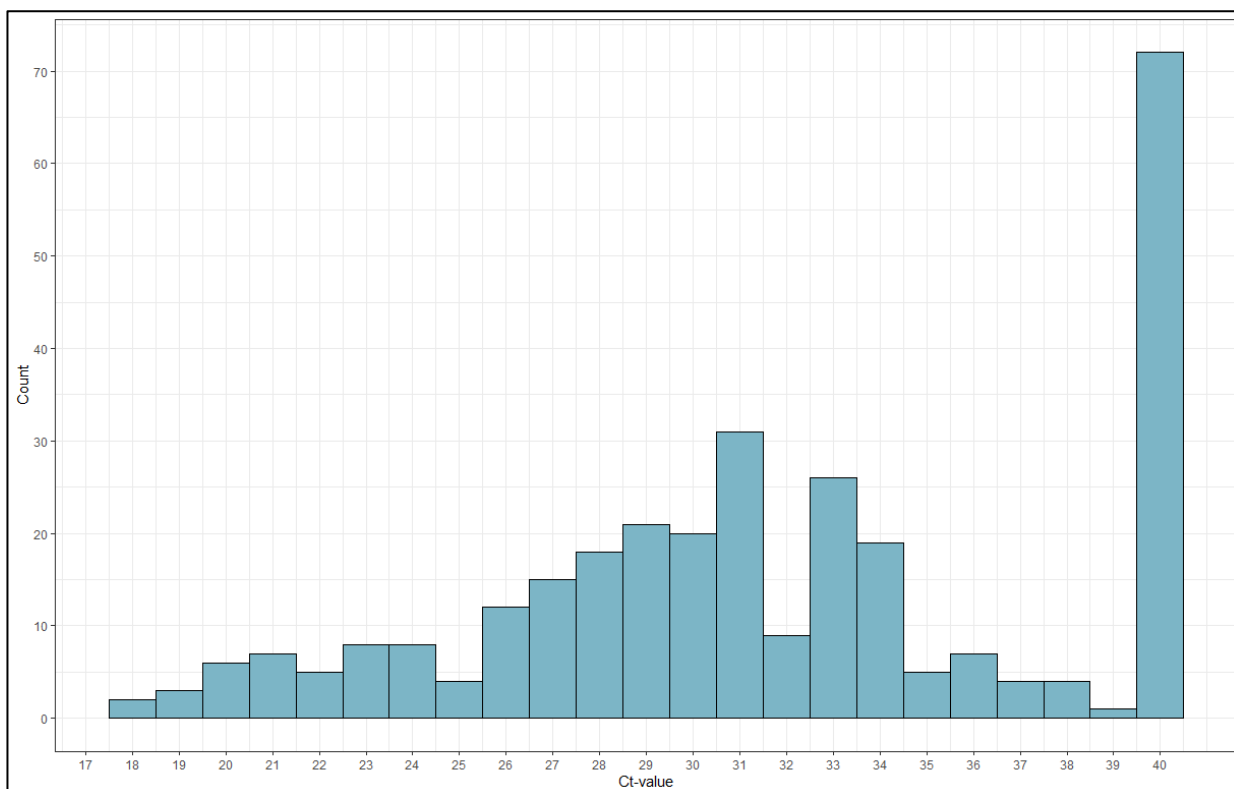
	N	N CHRNR	Gennemsnit	SD	Minimum	Maksimum
Ct-værdi	307	52	31,8	6,0	18	40
Mælk leveret, kg	307	52	16.881	7.938	1.859	37.669
Kimtal, CFU	307	52	14.523	19.502	3000	245.000
Celletal	307	52	180.028	56.640	65.000	392.000

Resultater

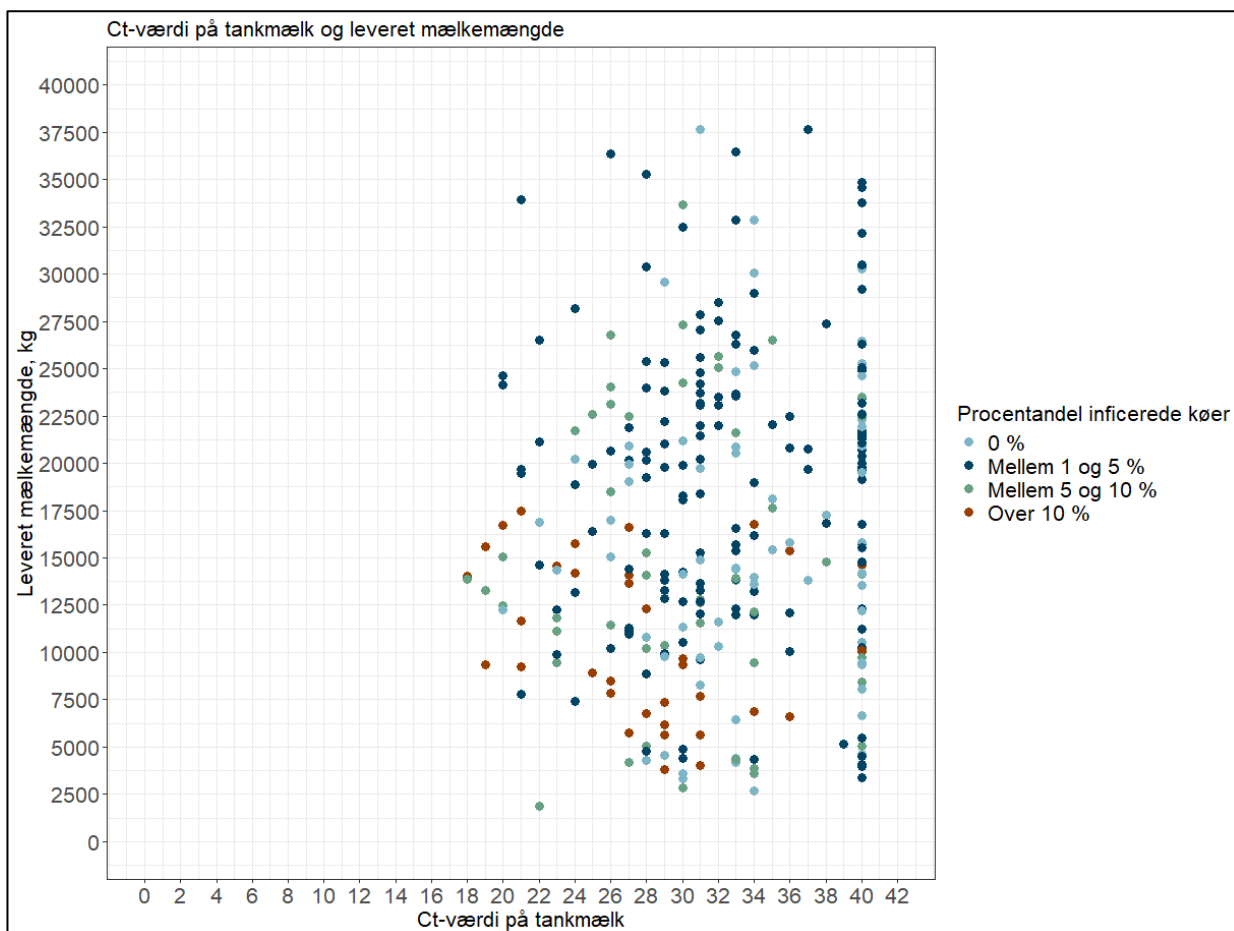
Sammenhæng mellem Ct-værdi i tankmælk og leveret mælkemængde

Nedenstående figurer og tabeller viser resultater fra analysen af om der er sammenhæng mellem leveret mælkemængde, dvs. tankvolumen og Ct-værdien for PCR-prøven for B-streptokokker fra den halvårige afprøvning. Denne sammenhæng undersøges med det formål at finde ud af om en større mælkemængde gør det sværere at finde B-streptokokker grundet en fortyndingseffekt, og dermed at større mælkemængder er ensbetydende med en højere Ct-værdi. Som tidligere beskrevet er data for denne analyse udelukkende fra smittede besætninger – dvs. besætninger som af den ene eller anden årsag er fundet smittet med B-streptokokker. Det udelukker dog ikke at tankmælksprøvens Ct-værdi kan være 40, ensbetydende med intet fund af B-streptokokker, hvilket da også udgør ca. 23 % af tankmælksprøverne. Figur 1 viser fordelingen af udfald på Ct-værdien for tankmælksprøven. For 37 % af de besætninger som indgår i analysen, er der kun fundet tankmælksprøver med en Ct-værdi på 40. Der er derfor i analysen foretaget både en analyse med og uden Ct-værdier på 40.

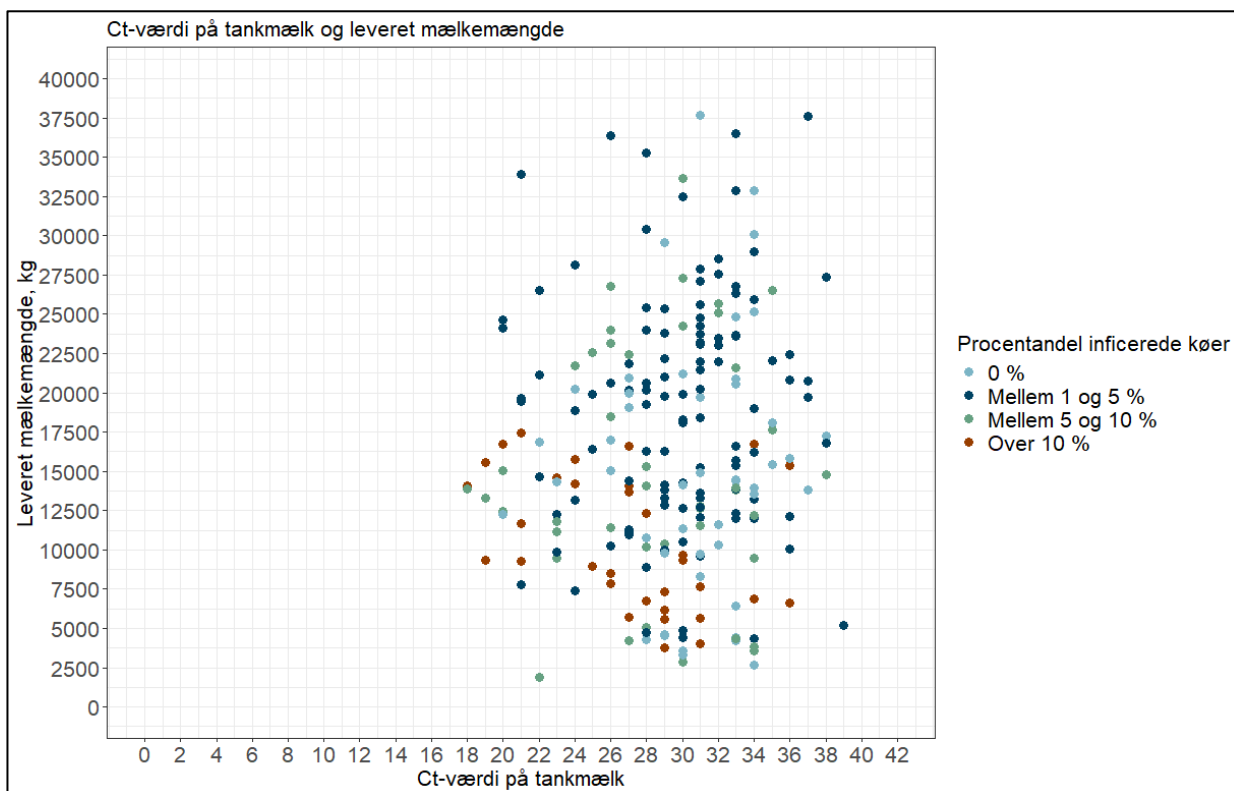
Figur 2. viser Ct-værdien på tankmælksmålingen set i forhold til leveret mælkemængde i kg mælk. Her ses at der for tankmælksprøver med en Ct-værdi på 40 ikke er en klar sammenhæng med leveret mælkemængde. Det kan skyldes at en del af de besætninger som har en Ct-værdi på 40 på tankmælksmålingen reelt set ikke er smittet, men blot ikke er blevet testet fri for B-streptokokker ved f.eks. 4 på hinanden efterfølgende tankmælksprøver med 30-45 dages mellemrum. Hvor stor en del dette mulige udfald vedrører er ikke klarlagt i nærværende analyse. Men ser man bort fra denne usikkerhed, så ser det ikke ud til at der er en sammenhæng mellem leveret mælkemængde og Ct-værdien på tankmælksprøven. Heller ikke hvis der ses bort fra tankmælksprøver med en Ct-værdi på 40 (se figur 3)



Figur 1. Fordelingen af Ct-værdi udfald



Figur 2. Ct-værdien for tankmælksprøven sammenholdt med leveret mælkemængde. Farvekoderne angiver hvor stor en procentdel af goldkopprøverne der er fundet inficeret med B-streptokokker.



Figur 3. Ct-værdien for tankmælksprøven sammenholdt med leveret mælkemængde på besætninger hvor Ct-værdien er under 40. Farvekoderne angiver hvor stor en procentdel af goldkopprøverne der er fundet inficeret med B-streptokokker.

Der er foretaget en statistisk analyse af sammenhængen mellem Ct-værdien i tankmælksmålingen og leveret mælkemængde. Dog er fordelingen af udfald på Ct-værdien noget skæv fordel (se figur 1) og derfor er der i første omgang foretaget en simpel statistisk analyse med Ct-værdien som respons af leveret mælkemængde og periodeeffekt, samt med besætningsnummer som tilfældig effekt.

$$\text{Ct-værdi} \sim \text{Leveret mælkemængde (i 1000)} + \text{periode} + (1|\text{CHNR})$$

Analysen er foretaget både med og uden tankmælksprøver hvor Ct-værdien er 40, for at undersøge effekten af den skæve fordeling. Resultaterne fra begge analyser viste at der ikke var nogen sammenhæng mellem Ct-værdi på tankmælksprøven og leveret mælkemængde (Tabel 1). Der var ingen effekt af periode, hhv. forår og efterår.

Tabel 1. Modelestimater for analyse af sammenhæng mellem Ct-værdi på tankmælk og leveret mælkemængde.

	Parameter	Estimat	Std. error	P-værdi
Med Ct-værdi på 40	Intercept	30,65	1,15	0,1398
	Kg mælk leveret (i 1000)	0,089	0,059	
Uden Ct-værdi på 40	Intercept	28,80	0,89	0,3129
	Kg mælk leveret (i 1000)	0,049	0,048	

For at undgå den skæve fordeling af Ct-værdierne er der ligeledes foretaget en analyse hvor responset er leveret mælkemængde som respons af Ct-værdien grupperet i 5 grupper, hhv. Ct-værdi 40, Ct-værdi 35-39, Ct-værdi 30-34, Ct-værdi 25-29 og Ct-værdi under 25, samt effekt af periode og besætningsnummer som tilfældig effekt.

$$\text{Leveret mælkemængde} \sim \text{Ct-værdi gruppe} + \text{periode} + (1|\text{CHNR})$$

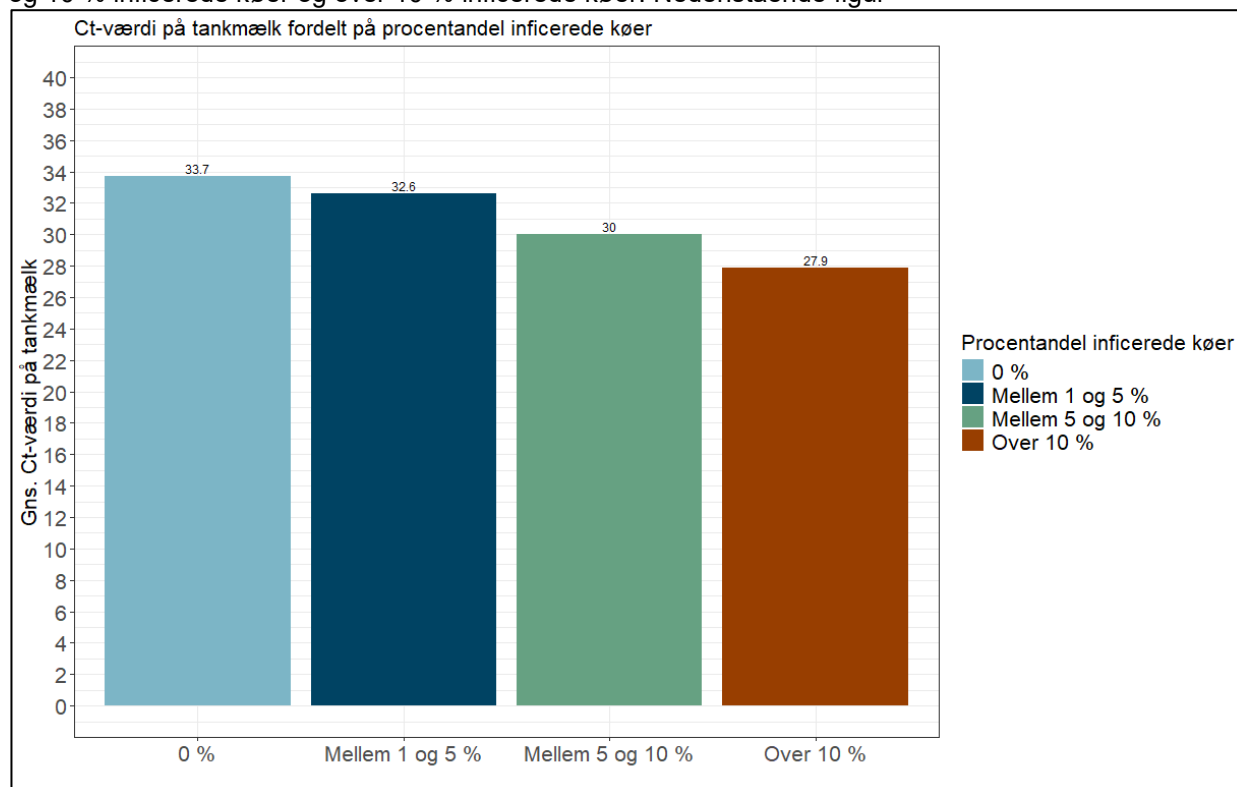
Tabel 2. Modelestimater (mindste kvadraters gennemsnit) for analyse af sammenhæng mellem leveret mælkemængde og Ct-værdien af tankmælksprøven grupperet.

Parameter	Estimat	P-værdi
Ct-værdi 40	17.007 [14.716:19.297]	0,7273
Ct-værdi 35-39	16.877 [14.312:19.442]	
Ct-værdi 30-34	16.321 [14.088:18.554]	
Ct-værdi 25-29	16.401 [14.102:18.700]	
Ct-værdi under 25	16.111 [13.685:18.537]	

Der var ikke nogen signifikant effekt af den grupperede Ct-værdi på leveret mælkemængde og derfor heller ikke nogen indikation af at Ct-værdien afhænger af hvor stor tankvolumen er. Og der ser derfor ikke ud til at være stor risiko for at en stor tankvolumen kan betyde at B-streptokokker ikke bliver fundet i tanken. Dog kan det ikke udelukkes, til trods for at datasættet er filtreret ned på besætninger og perioder hvor det formodes at der minimum er et smittet dyr i besætningen, at der i perioden hvor tankmælksprøven bliver udtaget at der ikke findes smittede dyr i besætningen. Der er under alle omstændigheder en stor del af tankmælksprøverne hvor Ct-værdien er 40, ensbetydende med at der ikke er fundet B-streptokokker i besætningen. Og det udfald findes på besætninger både med store og små leverede mælkemængder. Dette kan sandsynligvis tilskrives det cykliske udskillelsesmønster i B-streptokokker.

Sammenhæng mellem andel smittede og Ct-værdien på tankmælk

Jævnfør ovenstående resultater er det værd at undersøge om andelen af dyr smittet med B-streptokokker i besætningen på prøvetidspunktet, har indflydelse på Ct-værdien på tankmælksprøven. Til det formål er der på prøvetidspunktet for tankmælksprøven gjort op hvor mange smittede dyr der er i besætningen ud fra resultater fra enkelttyrsprøver fra PCR-analyser af ydelseskontrolprøver. Parameteren er opdelt i 4 grupper, hhv. 0 % inficerede køer, mellem 1 og 5 % inficerede køer, mellem 5 og 10 % inficerede køer og over 10 % inficerede køer. Nedenstående figur



Figur 4. Gennemsnitlig Ct-værdi for besætninger med hhv. 0 %, 1-5 % 5-10 % eller over 10 % dyr inficeret med B-streptokokker i besætningen.

På figur 4 ses det at der ved stigende andel inficerede dyr i besætningen er ensbetydende med en lavere Ct-værdi på tankmælken. Der er foretaget en statistisk analyse af dette, hvor responset er Ct-værdien på tankmælksprøven, procentandel inficerede dyr (hhv. 0 % smittede dyr, mellem 1 og 5 % smittede dyr, mellem 5 og 10 % smittede dyr og over 10 % smittede dyr) og periode (forår/efterår) er systematiske effekter, mens besætning indgår som tilfældig effekt.

$$\text{Ct-værdi} \sim \text{Procentandel inficerede køer} + \text{periode} + (1 \mid \text{CHRR})$$

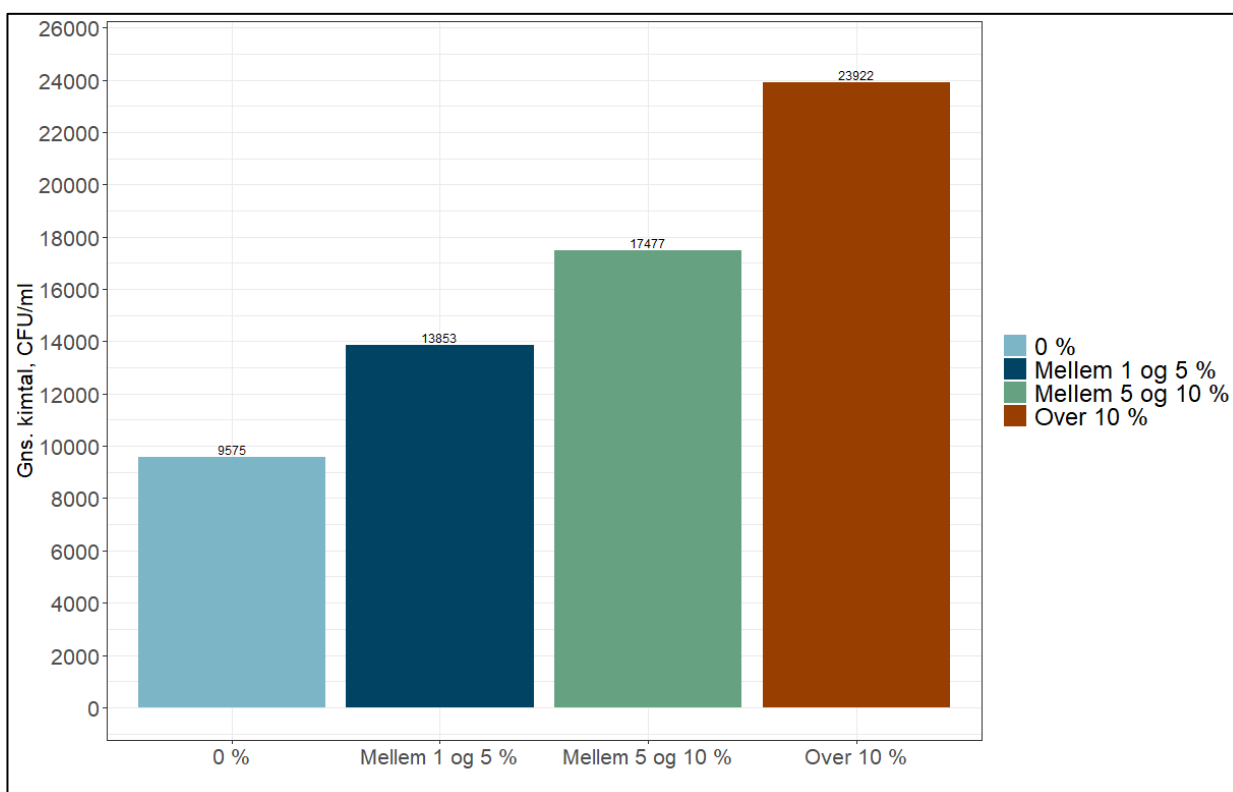
Tabel 3. Modelestimater (mindste kvadraters gennemsnit) for analyse af sammenhæng mellem Ct-værdien af tankmælksprøven og andel køer inficeret med B-streptokokker på prøvetidspunktet.

Parameter	Estimat	P-værdi
0 % inficerede køer	33,0 [31,4:34,6]	0,0093
Mellem 1 og 5 % inficerede køer	32,5 [31,2:33,8]	
Mellem 5 og 10 % inficerede køer	31,9 [30,1:33,6]	
Over 10 % inficerede køer	28,7 [26,4:31,0]	

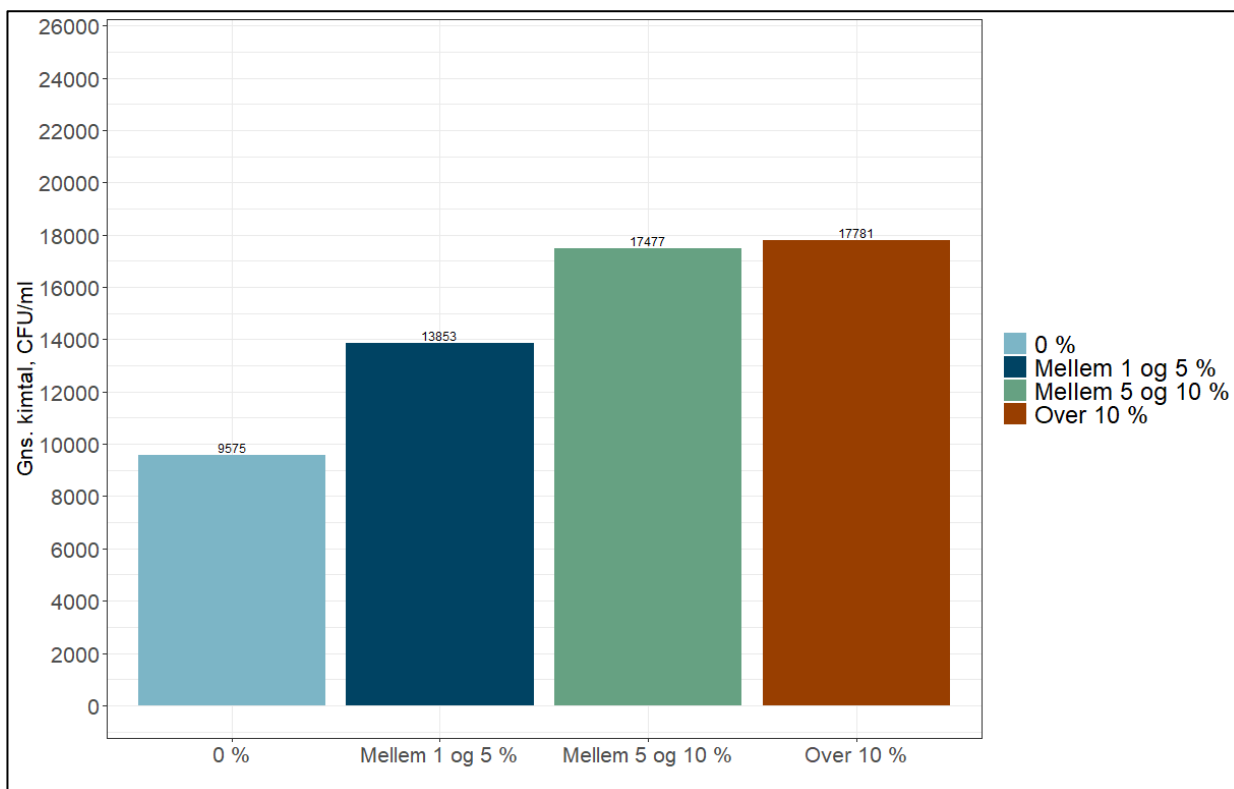
Resultaterne af analysen viser at når der er over 10 % af køerne i besætningen der er inficeret, så er Ct-værdien signifikant lavere, end hvis der er 0 % eller mellem 1-5 % inficerede køer. Så jo flere smittede dyr, jo større er sandsynligheden for at Ct-værdien er lav, ensbetydende med at jo flere køer der udskiller B-streptokokker, jo lettere er det at finde det i tankmælken.

Kim- og celletal på tankniveau og andel smittede

Nedenstående viser resultaterne fra en analyse hvor sammenhængen mellem besætningernes kim- og celletal og andel inficerede køer i besætningen er undersøgt. Formålet er at undersøge om flere inficerede dyr har indvirkning på mælkekvaliteten.



Figur 5. Gennemsnitlig kimal som gennemsnit indenfor den uge hvor Ct-værdien for B-streptokokker i tankmælk er målt for besætninger med hhv. 0 %, 1-5 % 5-10 % eller over 10 % dyr inficeret med B-streptokokker i besætningen.



Figur 6. Gennemsnitlig kimal som gennemsnit indenfor den uge hvor Ct-værdien for B-streptokokker i tankmælk er målt for besætninger med hhv. 0 %, 1-5 % 5-10 % eller over 10 % dyr inficeret med B-streptokokker i besætningen. Her er besætning med kimal indenfor en uge på 245.000 filtreret fra.

Figur 5 viser det gennemsnitlige kimal målt som CFU/ml for den uge hvor den halvårige tankmælksprøve er udtaget. Her indgår en besætning som har en meget høj kimalsmåling, som befinder sig i gruppen med over 10 % inficerede køer. På figur 6 indgår kimalsmålingen fra denne besætning ikke. Som det ses, har den enkelte måling betydning for størrelsen af det gennemsnitlige kimal i gruppen med over 10 % inficerede køer. Målingen forventes at være repræsentativ idet besætningens kimal i målingerne indenfor en kort tidsperiode også er høje.

Uanset om målingen indgår eller ej, så sker der en numerisk stigning i kimaltallet med stigende andel inficerede køer i besætningen. Der er foretaget en statistisk analyse af effekten af andel inficerede køer i besætningen på kimaltallet målt i tankmælken. I analysen udgør responset det gennemsnitlige kimal for den uge hvor den halvårige tankmælksprøve er udtaget, procentandel inficerede dyr (hhv. 0 % smittede dyr, mellem 1 og 5 % smittede dyr, mellem 5 og 10 % smittede dyr og over 10 % smittede dyr) og periode (forår/efterår) er systematiske effekter, mens besætning indgår som tilfældig effekt. Af hensyn til modelfit er kimaltallet logtransformeret, hvilket betyder at tilbagetransformationen af estimerne er nonlinear. Derfor kan de estimerede værdier fra modellen afvige fra de beregnede gennemsnit. Men analysen siger noget om, hvorvidt der er signifikant forskel mellem grupperingen af andel inficerede i besætningen. Og i den forbindelse er et optimalt fit af modellen vigtigt – derfor logtransformationen.

$$\text{Kimal (logtransformeret)} \sim \text{Procentandel inficerede køer} + \text{periode} + (1 \mid \text{CHNR})$$

Tabel 4 viser mindste kvadraters gennemsnit og tilhørende konfidensintervaller for effekten af andel inficerede køer i besætningen – her indgår den høje kimalsmåling. Som resultaterne viser, er der signifikant højere kimal i besætninger hvor andelen af inficerede køer er mellem 5-10 % i forhold til 0 % inficerede køer og hvor andelen af inficerede køer er over 10 % i forhold til 0 %. Her angiver bogstaverne om der er signifikant forskel i forhold til gruppen med 0 % inficerede køer.

Tabel 4. Modelestimater (mindste kvadraters gennemsnit) for analyse af sammenhæng mellem kimtal i tankmælk og andel køer inficeret med B-streptokokker på prøvetidspunktet. Høj kimtalsmåling fra enkelt besætning indgår.

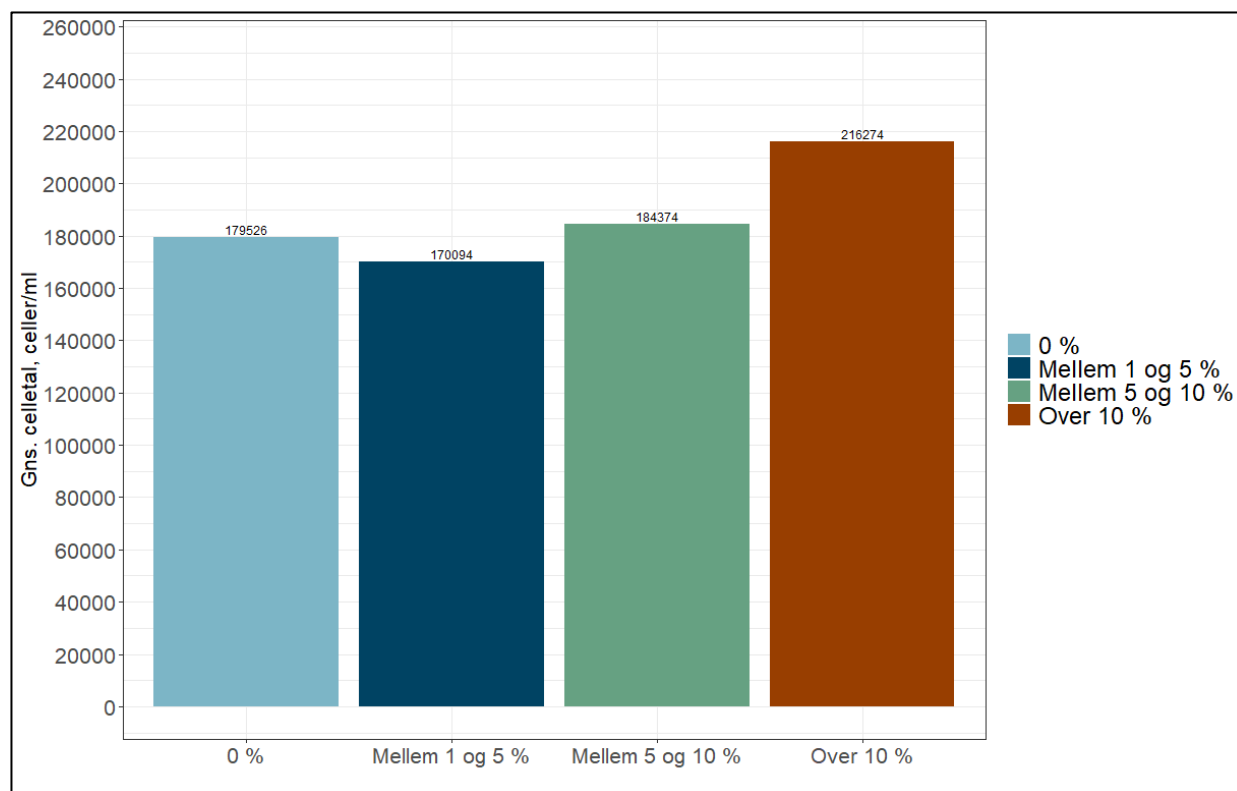
Parameter	Estimat	P-værdi
0 % inficerede køer	8085 [6580:9934] ^a	0,030
Mellem 1 og 5 % inficerede køer	9971 [8545:11635] ^a	
Mellem 5 og 10 % inficerede køer	11651 [9206:14746] ^b	
Over 10 % inficerede køer	12508 [9269:16880] ^b	

Hvis den ekstreme værdi ikke indgår i data, så er det kun gruppen af besætninger med mellem 5 og 10 % inficerede køer der er signifikant forskellig i forhold til gruppen med 0 % inficerede køer.

Celletal og andel smittede

Nedenstående viser resultaterne fra en analyse hvor sammenhængen mellem besætningernes celletal og andel inficerede køer i besætningen er undersøgt. Formålet er at undersøge om flere inficerede dyr har indvirkning på mælke kvaliteten.

Figur 7 viser det gennemsnitlige celletal målt som celler/ml for den uge hvor den halvårige tankmælksprøve er udtaget.



Figur 7. Gennemsnitlig celletal som gennemsnit indenfor den uge hvor Ct-værdien for B-streptokokker i tankmælk er målt for besætninger med hhv. 0 %, 1-5 % 5-10 % eller over 10 % dyr inficeret med B-streptokokker i besætningen.

Der sker der en numerisk stigning i celletallet i hvert fald for gruppen af besætninger der har mere end 10 % af inficerede køer i besætningen. Der er foretaget en statistisk analyse af effekten af andel inficerede køer i besætningen på celletallet målt i tankmælken. I analysen udgør responset det gennemsnitlige celletal for den uge hvor den halvårige tankmælksprøve er udtaget, procentandel inficerede dyr (hhv. 0 % smittede dyr, mellem 1 og 5 % smittede dyr, mellem 5 og 10 % smittede dyr og over 10 % smittede dyr) og periode (forår/efterår) er systematiske effekter, mens besætning indgår som tilfældig effekt.

$$\text{Celletal} \sim \text{Procentandel inficerede køer} + \text{periode} + (1 \mid \text{CHNR})$$

Tabel 5 viser mindste kvadraters gennemsnit og tilhørende konfidensintervaller for effekten af andel inficerede køer i besætningen på celletallet. Som resultaterne viser, er der ikke signifikant effekt på celletal i besætninger hvor andelen er højere end 0 % inficerede køer.

Tabel 5. Modelestimer (mindste kvadraters gennemsnit) for analyse af sammenhæng mellem celletal i tankmælk og andel køer inficeret med B-streptokokker på prøvetidspunktet.

Parameter	Estimat	P-værdi
0 % inficerede køer	182.320 [166.571:198.069] ^a	0,235
Mellem 1 og 5 % inficerede køer	175.094 [161.425:188.763] ^a	
Mellem 5 og 10 % inficerede køer	187.170 [170.237:204.104] ^a	
Over 10 % inficerede køer	171.552 [150.232:192.873] ^a	