

Evaluatie van Petrifilm™ *on-farm*-diagnostiek voor klinische mastitis

Project 10.80.109

Januari 2010

Auteurs:

Dr. R.G.M. Olde Riekerink, rundveedierenarts
Dr. T.J.G.M. Lam, projectleider Uiergezondheidscentrum Nederland
Mevr. Ing. V.J. Boelens-Eerland, projectassistente

In opdracht van: LTO Noord

Inhoudsopgave

INHOUDSOPGAVE	2
SAMENVATTING	3
INLEIDING	4
MATERIAAL EN METHODEN	5
BEDRIJVEN.....	5
MELKMONSTERS.....	5
PETRIFILM.....	5
PROTOCOL.....	6
<i>Monstername</i>	6
<i>Inzetten en incuberen melkmonsters</i>	6
<i>Aflezen</i>	6
INTERPRETATIE RESULTATEN.....	6
CONTROLE PETRIFILM.....	7
BACTERIOLOGISCH ONDERZOEK BIJ HET GD-LAB.....	7
RESULTATEN EN DISCUSSIE	8
ENQUÊTE.....	8
<i>Gebruiksgemak</i>	8
<i>Problemen</i>	8
AFLEZEN PETRIFILMS.....	9
<i>Algemene resultaten</i>	9
<i>Diagnostiek: veehouder en GD-lab</i>	11
Directe overeenkomst veehouder – GD-lab.....	11
Verschillen tussen veehouders.....	13
Verbetering bij gebruik blauwe schijf op STX platen.....	14
Kwaliteit aflezen, vergelijking aflezen tussen veehouder en GD-medewerker.....	14
Kwaliteit petrifilm, vergelijking aflezen tussen GD-medewerker en GD-lab BO.....	15
Overzicht.....	16
CONCLUSIES	17
LITERATUUR	17

Samenvatting

Inleiding

Mastitis is de duurste infectieuze ziekte op een melkveebedrijf en om die reden zijn er verschillende controleprogramma's ontwikkeld. In vrijwel ieder van die controleprogramma's komt de identificatie van mastitiskiemen als een belangrijk onderdeel naar voren. Isolatie en identificatie van mastitiskiemen is in de beheersing en verbetering van uiergezondheid op een melkveebedrijf van cruciaal belang voor een effectieve bestrijding van die kiemen.

Doel

Het doel van dit onderzoek is:

- 1) bepalen of de Petrifilm in minimaal 70% van de gevallen van klinische mastitis de kiem kan identificeren die de mastitis waarschijnlijk heeft veroorzaakt (binnen de theoretische mogelijkheden van de Petrifilm);
- 2) bepalen of het werken met de Petrifilm praktisch uitvoerbaar is;
- 3) bepalen tegen welke problemen de deelnemers het meest aan lopen bij het gebruik van de Petrifilm.

Studieopzet

In totaal werden 30 bedrijven geselecteerd. De studie duurde van 18 augustus 2008 tot 1 september 2009. Veehouders werd gevraagd om gedurende de studieperiode melkmonsters te nemen van iedere koe met een milde klinische mastitis tot een maximum van 20 gevallen. Alle veehouders kregen ook een enquête met vragen over de test en hun ervaringen. Veehouders zetten de Petrifilms zelf in na persoonlijke begeleiding door vertegenwoordigers van 3M, de leverancier van de Petrifilms. Na interpretatie werden de Petrifilms en de melkmonsters opgestuurd naar GD waar een GD-medewerker de Petrifilms nogmaals aflas en interpreteerde en hetzelfde melkmonster volgens de normale methode ingezet werd. Vervolgens werden de resultaten tussen de veehouder, de GD medewerker en het GD-lab met elkaar vergeleken. In totaal hebben 28 veehouders 1 of meerdere melkmonsters ingestuurd en zijn in totaal 319 monsters verwerkt.

Resultaten en conclusies

1. Diagnostiek met behulp van een microbiel diagnostische test, de Petrifilm, uitgevoerd door de veehouder met melkmonsters van koeien met een milde klinische mastitis levert vergeleken met conventioneel bacteriologisch onderzoek onvoldoende correcte diagnoses op om in de praktijk toegepast te worden. Het percentage overeenkomstige diagnoses was 43%, ruim onder de gestelde 70%. Beperking tot alleen gram-bepaling en / of uitgevoerd door iemand met meer routine en laboratoriumervaring verbeterde het percentage overeenkomstige diagnoses, maar kon niet de 70% halen. De Petrifilm, op zichzelf een goed bewezen methode, is op deze wijze ingezet en uitgevoerd niet geschikt als snel diagnostisch hulpmiddel bij milde klinische mastitis op melkveebedrijven.
2. De Petrifilmtest en methode zijn goed praktisch uitvoerbaar en werd als geheel met een 7+ gewaardeerd door de deelnemende veehouders.
3. De omslachtigheid van de test werd als problematisch ervaren, met als kanttekening dat de administratie van deze proef daar aan bijgedragen heeft. Door enkele veehouders werd een tekort aan begeleiding / kwaliteit van de gebruiksaanwijzing en eigen routineopbouw als problematisch ervaren, ondanks intensieve begeleiding binnen het project.

Inleiding

Mastitis is de duurste infectieuze ziekte op een melkveebedrijf en om die reden zijn er verschillende controleprogramma's ontwikkeld. In vrijwel ieder van die controleprogramma's komt de identificatie van mastitiskiemen als een belangrijk onderdeel naar voren. Identificatie van mastitiskiemen is in de beheersing en verbetering van uiergezondheid op een melkveebedrijf cruciaal voor een effectieve bestrijding van die kiemen. Een goed systeem waarbij alle melkmonsters worden onderzocht kost relatief veel geld en de uitslag laat lang op zich wachten door de lange doorlooptijden in het gebruikelijke bacteriologisch onderzoek. Door deze lange doorlooptijden kan er geen therapiekeuze gemaakt worden op basis van de veroorzakende kiem, omdat immers met de behandeling gestart moet worden voordat de uitslag bekend is, om een grotere genezingskans te bewerkstelligen en dierwelzijn niet te benadelen.

Bovendien moeten melkmonsters gekoeld naar een laboratorium gestuurd worden via de post of via een koerier en lopen daarom een groter risico dat er zaken mis gaan en de uitkomst van het bacteriologisch onderzoek niet te interpreteren is.

Er is daarom een behoefte aan een snelle en goedkope diagnostische test om te bepalen welke kiem klinische mastitis veroorzaakt, een test die op de boerderij uitgevoerd kan worden. In de Verenigde Staten wordt al langer gebruik gemaakt van diagnostiek op de boerderij, vooral op grote bedrijven omdat het onderhouden en in stand houden van een klein laboratorium op grotere bedrijven gemakkelijker uit te voeren is. In Noord-Amerika was al beschreven dat dit soort testen bruikbaar zouden kunnen zijn in het maken van behandelbeslissingen voor klinische mastitis (Silva et al., 2004). Neeser en anderen (2006) lieten zien dat het gebruik van diagnostiek op de boerderij in combinatie met een behandelprotocol het antibioticagebruik in grote mate kan verminderen en dat daardoor minder melk weggegooid hoefde te worden waardoor de kosten per mastitisgeval omlaag gingen (Silva et al., 2004).

De Petrifilms van 3M zijn een geschikte kandidaat als mastitisdiagnosticum op de boerderij. De Petrifilms zijn opgebouwd uit een kartonnen kaartje met daarop (selectieve) media die op hun beurt weer bedekt zijn met een doorzichtig folie. De Petrifilms zijn compact en langere tijd houdbaar buiten de koelkast wat ze zeer aantrekkelijk voor gebruik op een boerderij maakt.

Het doel van dit onderzoek is:

- 1) bepalen of de Petrifilm in minimaal 70% van de gevallen klinische mastitis de kiem kan identificeren die de mastitis waarschijnlijk heeft veroorzaakt (binnen de theoretische mogelijkheden van de Petrifilm);
- 2) bepalen of het werken met de Petrifilm praktisch uitvoerbaar is;
- 3) bepalen tegen welke problemen de deelnemers het meest aan lopen bij het gebruik van de Petrifilm.

Materiaal en methoden

Bedrijven

In totaal werden 30 bedrijven geselecteerd die zich konden aanmelden voor deelname aan de proef na advertenties en artikeltjes in nationale agrarische bladen. Deelnemers moesten een bijdrage leveren voor de aanschaf van materialen, waaronder een kleine incubator. De studie duurde van 18 augustus 2008 tot 1 september 2009. Naast, dat de deelnemers een uitgebreide handleiding ontvingen, werden ze ook voor 3 bijeenkomsten uitgenodigd, de eerste 2 waren instructiebijeenkomsten en tijdens de laatste werden ervaringen uitgewisseld en de resultaten gepresenteerd. Bovendien kregen de deelnemers persoonlijke begeleiding door medewerkers van 3M in de vorm van 1 of 2 bezoeken op hun bedrijf.

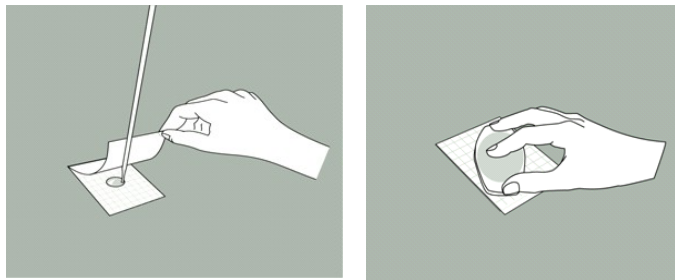
Melkmonsters

Veehouders werd gevraagd om een melkmonster te nemen van iedere koe die een milde klinische mastitis had gedurende de studieperiode totdat het maximaal totale aantal melkmonsters (20) was bereikt. Klinische mastitis was gedefinieerd als een uierontsteking waarbij de melk en/of het uier waarneembaar afwijkend is. Milde klinische mastitis als een klinische mastitis waarbij de koe niet ziek is (i.e. koorts, verminderde eetlust)

Petrifilm

Voor deze proef werd gebruik gemaakt van 4 typen Petrifilm:

- 1) *Rapid Coliform Count* (RCC). Deze platen zijn selectief voor coliformen. Coliformen worden gedefinieerd als gramnegatieve staafjes die zuur en gas produceren door fermentatie van lactose. Als kolonies op de Petrifilm RCC plaat groeien en zuur produceren verandert de pH indicator in de plaat van roodoranje naar geel wat wijst op een mogelijke aanwezigheid van coliformen. Gas rond de kolonies bevestigt de aanwezigheid van coliformen.
- 2) *Aerobic Count* (AC). Deze platen laten alle aerobe bacteriën groeien. Het aflezen wordt vereenvoudigd door een indicator die de kolonies rood kleurt.
- 3) *Staph Express* (STX). Het chromogene, gemodificeerde Baird-Parker medium in de plaat is selectief en onderscheidend voor *Staphylococcus aureus*. De *Staph. aureus* verschijnen op de plaat als roodvioletten kolonies. Er kunnen ook andere kolonies dan roodvioletten aanwezig zijn op de plaat. In dat geval dient een bijgeleverde blauwe schijf gebruikt te worden. Als er na het gebruik van de blauwe schijf roze zones om de kolonies verschijnen, mogen deze geteld worden als *Staph. aureus*.
- 4) *Selective Escherichia coli* (SEC). Deze platen zijn voor de selectieve bepaling van *E. coli*. Ongeveer 97% van de *E. coli*-stammen produceren β -glucuronidase dat reageert met een kleurindicator in de plaat waardoor donkergroene tot blauwgroene kolonies ontstaan.



Figuur 1. Het enten van Petrifilms

Protocol

Monstername

Deelnemende veehouders zijn geïnstrueerd om melkmonsters te nemen volgens door het Uiergezondheidscentrum Nederland (UGCN) voorgeschreven protocollen (<http://www.ugcn.nl>).

Inzetten en incuberen melkmonsters

Van het melkmonster wordt één ml opgezogen met een pasteurse pipet en toegevoegd aan 9 ml verdunningsvloeistof. Deze vloeistof wordt goed gemengd waarna 1 ml op elk van de 4 petrifilmplaatjes wordt gepipetteerd (Fig. 1). Vervolgens wordt de folie teruggeplaatst en wordt de vloeistof met een bijgeleverde glazen schijf evenredig over de voedingsbodem verspreid.

Alle Petrifilms worden 24 uur geïncubeerd in een stoof bij een temperatuur van 35°C.

Voor de interpretatie van de STX-plaat wordt een blauwe schijf toegevoegd en wordt de plaat met deze schijf nog eens 3 uur bij 35°C geïncubeerd.

Aflezen

Voor het aflezen van de Petrifilm plaatjes is door 3M instructiemateriaal geleverd.

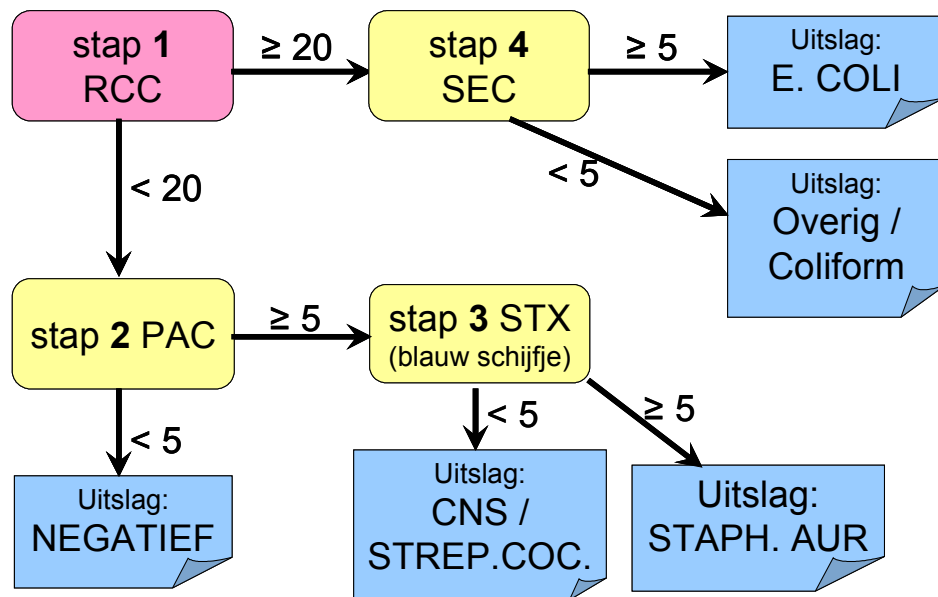
Interpretatie resultaten

Voor de interpretatie van de resultaten is een interpretatiestappenplan opgesteld (Fig. 2).

Stap 1. Op de RCC-plaat wordt bepaald of er 20 of meer kolonies aanwezig zijn. Als er 20 of meer kolonies aanwezig zijn, is er sprake van een gram-negatieve infectie. De *cut-off* van 20 kolonies is gekozen naar analogie van McCarron et al. (2009), die beschreven heeft dat bij deze *cut-off* de hoogste sensitiviteit en specificiteit van de test bereikt kon worden. Indien minder dan 20 kolonies gevonden worden op de RCC plaat, is er sprake van geen groei of een gram-positieve infectie.

Stap 2. De AC wordt gebruikt om niet-selectieve groei vast te stellen. In deze stap is er al geconstateerd dat er geen coliforme groei aanwezig is, dus als er bacteriën groeien op deze plaat, zijn het gram-positieve bacteriën. De *cut-off*-waarde van deze plaat ligt bij 5 kolonies (McCarron et al., 2009): Als er minder dan 5 kolonies gevonden worden, wordt het monster als “geen groei” beoordeeld, ongeacht de uitkomsten van SEC en STX.

Stap 3. De STX schijf wordt pas beoordeeld als de RCC plaat minder dan 20 kolonies laat groeien en de bacterie dus niet gram-negatief is en de algemene plaat wél groei laat zien (5 of meer kolonies) zodat de bacterie vrij zeker gram-positief moet zijn.



Figuur 2. Interpretatieschema. Zie voor afkortingen en uitleg de tekst.

De meest voorkomende veroorzakers van klinische mastitis zijn stafylokokken en streptokokken. Door gebruik te maken van de STX plaat kan *Staphylococcus aureus* geïdentificeerd worden. De *cut-off*-waarde is in analogie met de PAC-plaat vastgesteld op 5 kolonies of meer.

Stap 4. De SEC-plaat wordt pas beoordeeld als blijkt dat in het mastitismelkmonster een coliforme kiem zit (RCC-plaat 20 of meer kolonies). Als de groei op deze plaat 5 of meer kolonies is, is de bacterie een *E. coli*. De *cut-off*-waarde is vastgesteld in analogie met de PAC-plaat.

Controle Petrifilm

Nadat de veehouder de Petrifilm heeft geïnterpreteerd, dienden de 4 Petrifilms en het melkmonster dat gekoeld bewaard is gebleven, met bijgeleverde transportmaterialen door middel van een nachtelijke koerier naar het GD laboratorium getransporteerd te worden. Het melkmonster werd na aankomst ingezet als een routinemelkmonster en de Petrifilms werden opgeslagen in een koelkast om vervolgens binnen 2 dagen door een medewerker van GD afgelezen en geïnterpreteerd te worden volgens dezelfde instructies als die voor de veehouders. De GD-medewerker wist ten tijde van het aflezen van de Petrifilms niet wat de uitslag van het conventionele bacteriologische onderzoek zou worden.

Bacteriologisch onderzoek bij het GD-lab

Bacteriologisch onderzoek wordt bij de GD uitgevoerd zoals dat staat beschreven in de richtlijnen van de National Mastitis Council (Hogan et al., 1999). GD-labresultaten werden vertaald naar één van de 5 uitslagen zoals die uit de test met de Petrifilm kunnen komen. Hiervoor werden alle gram-positieve kiemen, niet zijnde stafylokokken of streptokokken ondergebracht in de categorie “CNS / STREPS” evenals menginfecties met alleen gram-positieve kiemen. Gram-negatieve kiemen, niet zijnde *E. coli* werden “Overige coliformen” genoemd evenals menginfecties waar minstens een gram-negatieve kiem in voorkwam.

Resultaten en discussie

Enquête

Gebruiksgemak

Voor de onderdelen “het inzetten van de Petrifilm”, “Het aflezen van de Petrifilms” en “Het interpreteren van de uitkomsten” werd op een schaal van 1 tot 4, zeer eenvoudig tot zeer lastig met 2,5 als middelste waarde, gemiddeld per onderdeel 2,0, 2,5 en 2,3 gescoord. Voor de Petrifilm *als geheel* werd 2,2 gescoord. Dit betekent dat de Petrifilm over het algemeen meer als eenvoudig dan als lastig beoordeeld wordt. Gemiddeld was er per monster 22 minuten nodig om het monster in te zetten en af te lezen, variërend van 7 tot 65 minuten. Slechts 25% van de veehouders gaf aan dat melkmonsters van alle mastitisgevallen ingezet zijn. Van de overige 75% werd de reden “het kwam niet uit” het meest gegeven. Veehouders gaven gemiddeld een 7,1 voor de Petrifilm testopzet als geheel.

Het gebruiksgemak van de Petrifilm is dus redelijk goed te noemen. Het principe en de procedures worden over het algemeen niet als ingewikkeld of lastig ervaren.

Problemen

In de enquête is gevraagd naar problemen, verbeteringen en suggesties. Als gevolg daarvan ontstaat een lijst van problemen, met het gevaar dat een negatief beeld ontstaat. Positieve reacties zijn hierin logischerwijs niet meegenomen. Van de genoemde problemen is de omslachtigheid van de procedure met Petrifilm de meest genoemde (Tabel 1). Enkele veehouders leken niet voldoende zelfvertrouwen te hebben met betrekking tot de test, ze noemden een tekort aan begeleiding, onvoldoende duidelijke gebruiksaanwijzing en te weinig routineopbouw als oorzaken daarvan (Tabel 1). De behoefte aan meer begeleiding werd ook op de laatste veehouderbijeenkomst naar voren gebracht.

Tabel 1 Overzicht van genoemde problemen in een enquête over het gebruik van de Petrifilms (27 ingevulde enquêtes).

Probleem	Frequentie genoemd
Te veel gedoe, te omslachtig	8
Niet voor alle mastitis gebruiken	3
Begeleiding / gebruiksaanwijzing niet voldoende	3
Te weinig routineopbouw	3
Uitslag niet bruikbaar genoeg	2
Kleurenblind	1
Geen onderscheid CNS en streptokokken	1
Verpakking is niet per setje	1
Verkeerde enveloppen ontvangen	1
Onhandige protocolopzet (afleestijd 24 uur = onhandig)	1

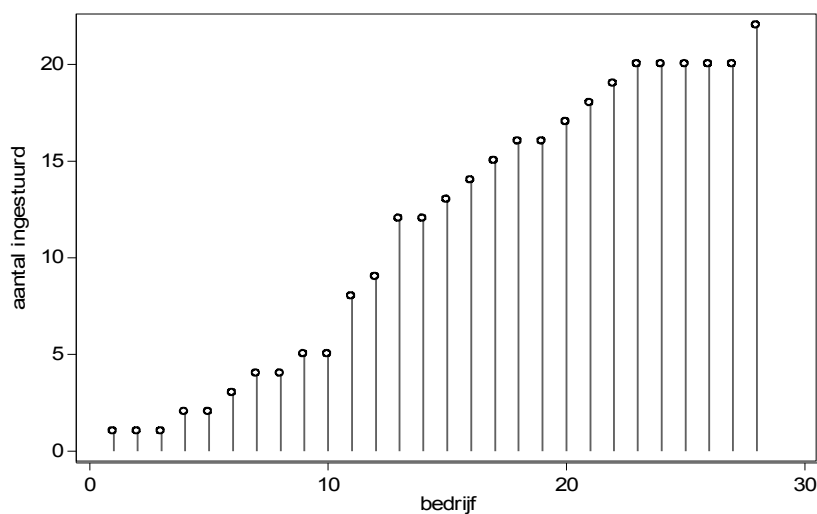
De behoefte aan meer begeleiding bleef bestaan ondanks de intensieve begeleiding die veehouders hebben gehad: 2x instructiebijeenkomsten, een uitgebreide handleiding en één-op-één begeleiding van een vertegenwoordiger van 3M. Veehouders hebben over het algemeen geen opleiding gehad in laboratoriumdiagnostiek. Basishandelingen en basisprincipes van hygiënisch werken met laboratorium- en diagnostisch materiaal is een onmisbaar onderdeel van de begeleiding en gebruiksaanwijzing van de Petrifilm. Een aantal veehouders heeft

aangegeven dat ze de gehele procedure te omslachtig hebben ervaren. Dat het oordeel naar “omslachtig” neigt heeft ook te maken met de proefopzet waarbij extra geadmistreerd moest worden en het melkmonster en de Petrifilms naar de GD gestuurd moesten worden.

Aflezen Petrifilms

Algemene resultaten

In totaal hebben 28 bedrijven één of meerdere melkmonsters met Petrifilms ingestuurd wat resulteerde in 319 analyseerbare inzendingen. Het aantal inzendingen per bedrijf was gemiddeld 11,4 variërend van 1 tot 22 (Fig. 3).

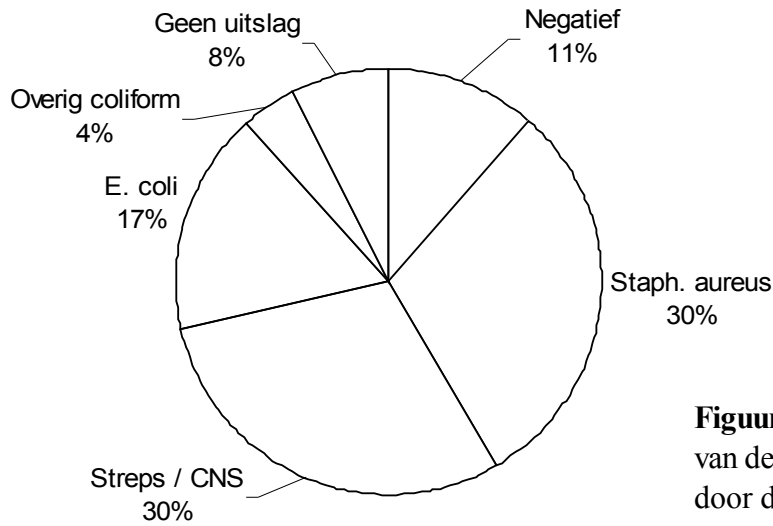


Figuur 3 Aantal ingestuurde en analyseerbare monsters per bedrijf

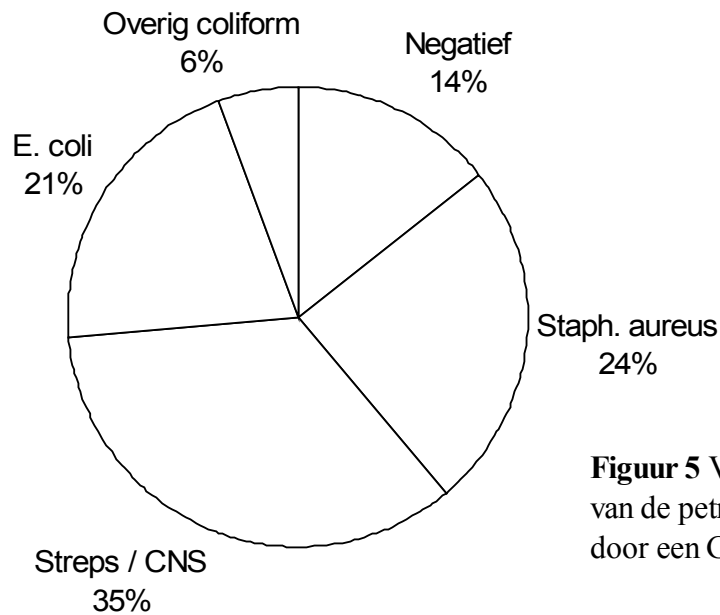
In de uitslagen van de veehouders kwamen stafylokokken en streptokokken het meest voor (60%) (Fig. 4).

Dezelfde petrifilms lieten, afgelezen door een GD-medewerker, een vergelijkbaar patroon zien. Het belangrijkste verschil is dat de GD-medewerker altijd tot een uitslag is gekomen (Fig. 5).

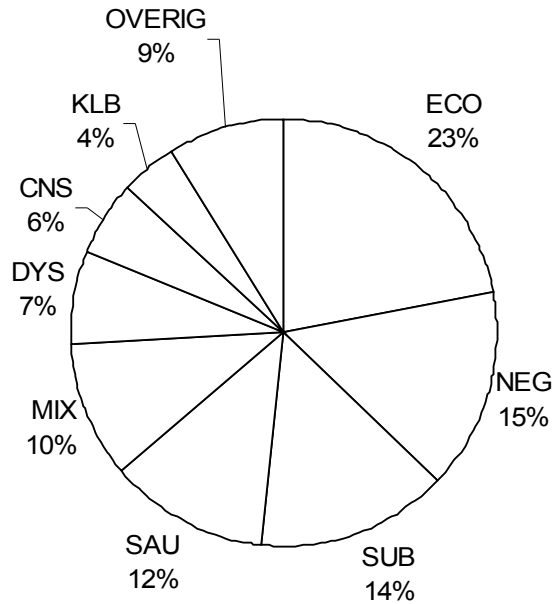
Verdeling gekweekte kiemen door bacteriologisch onderzoek (BO) bij de Gezondheidsdienst voor Dieren (GD) laat zien dat *E. coli* en “geen groei” de meest voorkomende diagnoses zijn (Fig. 6).



Figuur 4 Verdeling uitslagen van de petrifilms uitgevoerd door de veehouders.



Figuur 5 Verdeling uitslagen van de petrifilms uitgevoerd door een GD-medewerker



Figuur 6 Uitkomsten bacteriologisch onderzoek bij de GD (n=319).

Diagnostiek: veehouder en GD-lab

Directe overeenkomst veehouder – GD-lab

Directe vergelijking (uitslag veehouder met GD-BO labbepaling laat zien dat er $(10+29+52+41+5)/319 = 42,9\%$ correcte diagnoses (Tabel 2). Dit is ruim onder de gestelde 70% correcte diagnoses. Kappa 0,35. Het gebruik van de Petrifilm waarbij 5 mogelijke diagnostische uitkomsten mogelijk zijn is dus te foutgevoelig om betrouwbaar ingezet te kunnen worden.

Tabel 2 Verdeling diagnoses tussen veehouder en GD laboratorium. (**Dikgedrukt** zijn overeenkomstige diagnoses)

Diagnose veehouder	GD-lab (diagnose volgens stappenplan)					Total
	NEG	SAU	STR/CNS	ECO	OVR	
NEG	10	3	13	5	5	36
SAU	17	29	35	6	10	97
STR/CNS	14	7	52	11	11	95
ECO	3	2	3	41	5	54
OVR	2	2	3	1	5	13
XXX	3	2	8	10	1	24
Total	49	45	114	74	37	319

Toelichting bij de tabel:

Dikgedrukt = dezelfde diagnose

NEG = geen bacteriegroei van mastitisbacteriën

SAU = *Staphylococcus aureus*

STR / CNS = Streptokokken en coagulase-negatieve stafylokokken

ECO = *Escherichia coli*

OVR = Overige coliforme bacteriën

XXX = Veehouder kwam niet tot een diagnose

Als de gram-positieven^a en gram-negatieven als groepen worden geanalyseerd, komt er een enigszins positiever beeld uit, namelijk $(10+123+52)/319 = 58,0\%$ correcte diagnoses (Tabel 3). Hoewel de resultaten verbeteren door de diagnostische uitkomsten breder te laten zijn, de onderverdeling binnen de coliforme^b en de gram-positieve bacteriën valt weg, is het percentage correcte diagnoses nog steeds onder de gestelde 70% en is de Petrifilm op het niveau van de gram-bepaling ontoereikend.

Tabel 3 Verdeling gram-bepalingen tussen veehouder en GD laboratorium.

Diagnose veehouder	GD-lab gram-bepaling			Total
	NEG	G-pos	G-neg	
NEG	10	16	10	36
G-pos	31	123	38	192
G-neg	5	10	52	67
XXX	3	10	11	24
Total	49	159	111	319

Toelichting bij de tabel:

Dikgedrukt = dezelfde diagnose

NEG = geen bacteriegroei van mastitisbacteriën

XXX = Veehouder kwam niet tot een diagnose

G-neg = Gram-negatief; G-pos = Gram-positief

Om te testen of het verschil veroorzaakt werd doordat veehouders moet leren werken met de test, hebben we van iedere veehouder de eerste 3 bepalingen niet meegeteld en deze beschouwd als oefenbepalingen. Dit betekent dat er de volgende analyse gegevens van 22 veehouders en 243 ingestuurde monsters worden gebruikt. Er is in deze analyse een lichte verbetering te zien in de overeenkomst tussen veehouders uitkomsten en het GD-lab uitkomsten (Tabel 4). Hetzelfde geldt als de eerste 5 bepalingen niet worden meegenomen, echter op het niveau van de Gram-bepaling werd er geen verbetering geconstateerd. Er treedt hier een geringe bias op die de verbetering mogelijk groter laat lijken omdat in de 3 vergelijkingen niet dezelfde groep veehouders met elkaar worden vergeleken.

Tabel 4 Overzicht *agreement* en *kappa*^c tussen de diagnose van de veehouder en GD-lab BO

Type analyse	Alles	Vanaf 4 ^e test	Vanaf 6 ^e test
Aantal veehouders	28	22	18
Aantal monsters	319	243	201
Alles (<i>agreement</i>)	42,9%	45,7%	47,3%
Alles (<i>kappa</i>)	0,28	0,30	0,31
Op basis van Gram (<i>agreement</i>)	58,0%	58,0%	59,2%
Op basis van Gram (<i>kappa</i>)	0,31	0,30	0,31

^a Gramkleuring is een onderscheidende kleuring tussen 2 groepen bacteriën, namelijk de gram-positieve en gram-negatieve bacteriën. Mastitiskiemmen die binnen de gram-positieve groep vallen zijn onder andere de stafylokokken en streptokokken, kiemen die binnen de gram-negatieve groep vallen zijn onder andere *Escherichia coli* en *Klebsiella* spp.

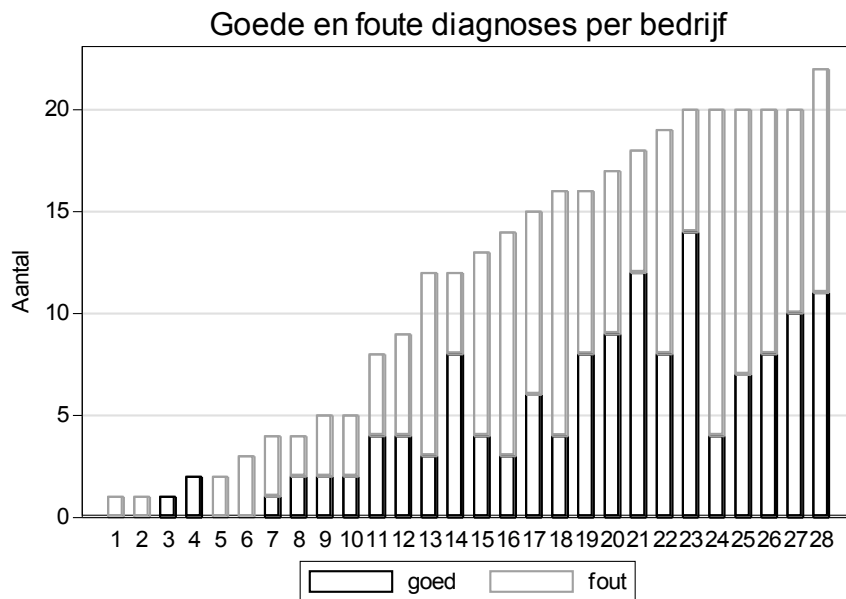
^b Coliforme bacteriën zijn onder andere *Escherichia coli* en *Klebsiella* spp. Deze groep is altijd gram-negatief en zijn meestal omgevingsgebonden kiemen die bijvoorbeeld ongevoelig zijn voor behandeling met penicilline-achtige antibiotica.

^c *Kappa* is de *agreement beyond chance*. De *agreement by chance alone* van bijvoorbeeld 2 onafhankelijke dobbelstenen is $1/6 = 17\%$, de *kappa* daarvan is echter 0. Interpretatie van *kappa*: <0 = slecht; $0-0,2$ = nauwelijks; $0,21-0,4$ = matig; $0,41-0,6$ = redelijk; $0,61-0,8$ = goed; $0,81-1$ = uitstekend (Dohoo et al., 2003).

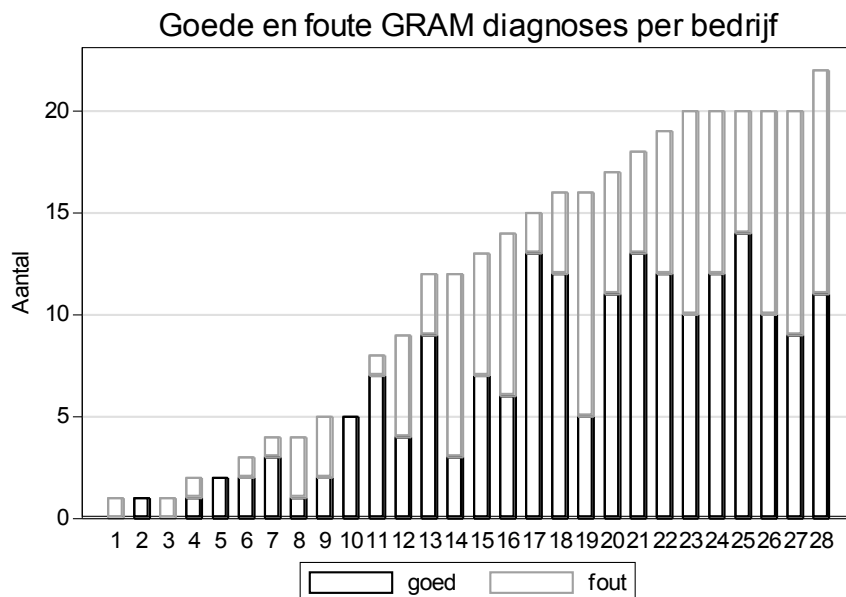
Verschillen tussen veehouders

Naast grote verschillen tussen aantallen inzendingen, variërend van 1 tot 22 inzendingen, was er geen verband aantoonbaar tussen veehouders, hoeveelheid inzendingen en kwaliteit van de diagnoses (Fig. 7). Als de verschillen uitgesprokener zouden zijn geweest, had dat een nadere analyse gerechtvaardigd waarbij de eigenschappen van de bedrijven of veehouders worden meegenomen.

Op Gram-niveau was hetzelfde beeld te zien, een enkele veehouder presteerde goed (bijvoorbeeld bedrijf nr. 17) of wat minder goed (bijvoorbeeld bedrijf nr. 19) (Fig. 8). Ook hier geldt dat als de verschillen uitgesprokener zouden zijn geweest, een nadere analyse gerechtvaardigd had waarbij de eigenschappen van de bedrijven of veehouders worden meegenomen



Figuur 7 Verdeling goede en foute diagnoses



Figuur 8 Verdeling goed en foute diagnoses op Gram-niveau

Verbetering bij gebruik blauwe schijf op STX platen

Tijdens de 2^e bijeenkomst in januari 2009 is door de projectbegeleiding aan alle deelnemers geadviseerd om bij gebruik van STX plaat altijd de blauwe schijf in te zetten omdat er verwarring en discussie ontstond over de interpretatie van de STX schijven. Differentiatie van *Staph. aureus* in de groep van gram-positieve bacteriën voor en na het “verplicht” stellen van gebruik van de blauwe schijf liet zien dat er binnen de groep gram-positieve bacteriën een duidelijke verbetering was van 41% overeenkomst naar 60% overeenkomst (*kappa* van 0.13 naar 0.30), een significant verschil ($P = 0.02$), maar nog steeds een matige *kappa*. Aangezien dit op het totale aantal testen slechts een gering aantal betrof, zijn geen analyses op de gehele dataset uitgevoerd.

Kwaliteit aflezen, vergelijking aflezen tussen veehouder en GD-medewerker

Vergelijking tussen het aflezen van de veehouder en de GD-medewerker van dezelfde petrifilmplaatjes, levert een redelijke overeenkomst van 63% op met een *kappa* van 0,52 (redelijke overeenkomst; Tabel 5).

Tabel 5 Verdeling diagnoses tussen veehouder en GD-medewerker voor het aflezen van de Petrifilms.

Diagnose GD-medewerker	Diagnose veehouder						Total
	NEG	SAU	STR/CNS	ECO	OVR	XXX	
NEG	27	7	9	0	1	2	46
SAU	0	54	13	1	3	7	78
STR/CNS	8	24	66	3	2	8	111
ECO	0	7	4	48	0	7	66
OVR	1	5	3	2	7	0	18
XXX	0	0	0	0	0	0	0
Total	36	97	95	54	13	24	319

Toelichting bij de tabel:

Dikgedrukt = dezelfde diagnose

NEG = geen bacteriegroei van mastitisbacteriën; SAU = *Staphylococcus aureus*

STR / CNS = Streptokokken en coagulase-negatieve stafylokokken

ECO = *Escherichia coli*; OVR = Overige coliforme bacteriën

XXX = Veehouder kwam niet tot een diagnose

Als de gram-positieve en gram-negatieve groepen worden geanalyseerd, komt er een enigszins positiever beeld uit, namelijk 76% correcte diagnoses (Tabel 6) met een kappawaarde van 0,57 (redelijke overeenkomst).

Tabel 6 Verdeling gram-bepalingen tussen veehouder en GD-medewerker.

Diagnose GD-medewerker	Diagnose veehouder			XXX	Total
	NEG	G-pos	G-neg		
NEG	27	16	1	2	46
G-pos	8	157	9	15	189
G-neg	1	19	57	7	84
XXX	0	0	0	0	0
Total	36	192	67	24	319

Toelichting bij de tabel:

Dikgedrukt = dezelfde diagnose

NEG = geen bacteriegroei van mastitisbacteriën

XXX = Veehouder kwam niet tot een diagnose

G-neg = Gram-negatief; G-pos = Gram-positief

Aangezien de overeenkomst tussen het aflezen van de Petrifilms van de veehouder en de GD-medewerker beter is dan tussen de veehouder en het GD-lab of de GD-medewerker en het GD-lab, is dat een aanwijzing dat ergens in het traject van monster-nemen tot het moment van aflezen verstoringen optreden die een verkeerde interpretatie van de test tot gevolg hebben. Immers zowel de veehouder als de GD-medewerker hebben hetzelfde Petrifilmplaatje grotendeels op dezelfde manier afgelezen en geïnterpreteerd, maar konden niet tot de diagnose komen die het GD-lab had. We hadden al gemeld dat in eerder Canadees onderzoek de kwaliteit van de Petrifilm onder laboratoriumomstandigheden uitermate goed is (McCarron et al., 2009). Mogelijke oorzaken zijn bijvoorbeeld niet aseptisch genomen melkmonsters waardoor contaminatie ontstaat of de condities waaronder de Petrifilms worden ingezet zijn niet hygienisch genoeg voor laboratoriumbepalingen. Te denken valt aan hoge concentraties stof en bacteriën in in lucht en op werkoppervlaktes in bijvoorbeeld werkkantoren en bijkeukens. Hier wordt nadrukkelijk niet bedoeld dat er vuil werd gewerkt maar dat er hogere eisen worden gesteld aan de omstandigheden voor een gevoelige laboratoriumbepaling.

Kwaliteit petrifilm, vergelijking aflezen tussen GD-medewerker en GD-lab BO

Vergelijking in het aflezen tussen de GD-medewerker en het GD-lab, levert een overeenkomst van 53% op met een kappa van 0,38 (matig; Tabel 7). De GD-medewerker had een significant ($p = 0.01$) betere score dan de veehouder (43%) voor deze bepaling.

Tabel 7 Verdeling diagnoses tussen GD-medewerker en GD-lab BO.

Diagnose GD-mede- werker	GD-lab (diagnose volgens stapplan)					OVR	Total
	NEG	SAU	STR/CNS	ECO			
NEG	14	1	18	5	8	46	
SAU	12	30	28	3	5	78	
STR/CNS	16	8	64	13	10	111	
ECO	3	4	3	51	5	66	
OVR	4	2	1	2	9	18	
Total	49	45	114	74	37	319	

Toelichting bij de tabel:

Dikgedrukt = dezelfde diagnose

NEG = geen bacteriegroei van mastitisbacteriën; SAU = *Staphylococcus aureus*

STR / CNS = Streptokokken en coagulase-negatieve stafylokokken

ECO = *Escherichia coli*; OVR = Overige coliforme bacteriën

XXX = Veehouder kwam niet tot een diagnose

Als de gram-positieve en gram-negatieven als groepen worden geanalyseerd, komt er een enigszins positiever beeld uit, namelijk 66% correcte diagnoses (Tabel 8) met een *kappa* van 0,43, redelijk. De GD-medewerker heeft ook hier een significant ($p = 0.03$) betere score dan de veehouder voor de gram-bepaling (58%).

Tabel 8 Verdeling gram-bepalingen tussen GD-medewerker en GD-lab.

Diagnose GD-medewerker	GD-lab gram-bepaling			Total
	NEG	G-pos	G-neg	
NEG	14	19	13	46
G-pos	28	130	31	189
G-neg	7	10	67	84
Total	49	159	111	319

Toelichting bij de tabel:**Dikgedrukt** = dezelfde diagnose

NEG = geen bacteriegroei van mastitisbacteriën

G-neg = Gram-negatief; G-pos = Gram-positief

Uit het verschil tussen de uitkomsten van de veehouder en de GD-medewerker ten opzichte van het GD-lab kan men afleiden dat het aflezen en interpreteren van de Petrifilms voor een deel de discrepantie tussen de veehouder-Petrifilm uitslag en de GD BO uitslag verklaart. Immers, de GD-medewerker, die meer routine en laboratoriumervaring heeft dan de meeste veehouders, komt met het aflezen van de Petrifilms dichter bij de uitslagen van het GD-lab dan de veehouder. Alhoewel er nog verschillen kunnen ontstaan tussen het aflezen door de veehouder en het aflezen van de GD-medewerker omdat er meestal nog één tot enkele dagen tussen het tijdstip van aflezen kan zitten, was de verwachting niet dat er zoveel verandering in de Petrifilms zou optreden tijdens het transport en opslag dat dit verschil kan verklaren.

Overzicht

In Tabel 9 zijn de verschillende uitkomsten zoals die hiervoor besproken zijn overzichtelijk bij elkaar geplaatst.

Tabel 9 Overzicht van alle vergelijkingen

Vergelijking	Type	Overeenkomst (%)	Kappa	Interpretatie ²
Veehouder BO ¹	Alles	43	0,28	matig
Veehouder GD-medewerker	Alles	63	0,52	redelijk
GD-medewerker BO	Alles	53	0,38	matig
Veehouder BO	Gram-niveau	58	0,31	matig
Veehouder GD-medewerker	Gram-niveau	76	0,57	redelijk
GD-medewerker BO	Gram-niveau	66	0,43	redelijk

¹BO = Bacteriologisch Onderzoek door het GD-lab²Interpretatie van *kappa*: <0 = slecht; 0-0,2 = nauwelijks; 0,21-0,4 = matig; 0,41-0,6 = redelijk; 0,61-0,8 = goed; 0,81-1 = uitstekend (Dohoo et al., 2003).

Conclusies

1. Diagnostiek met behulp van een microbiële diagnostische test, de Petrifilm, uitgevoerd door de veehouder met melkmonsters van koeien met een milde klinische mastitis levert vergeleken met conventioneel bacteriologisch onderzoek onvoldoende correcte diagnoses op om in de praktijk toegepast te worden. Het percentage overeenkomstige diagnoses was 43%, ruim onder de gestelde 70%. Beperking tot alleen Gram-bepaling en / of uitgevoerd door iemand met meer routine en laboratoriumervaring verbeterde het percentage overeenkomstige diagnoses, maar kon niet de 70% halen. De Petrifilm, op zichzelf een goed bewezen methode, is op deze wijze ingezet en uitgevoerd niet geschikt als snel diagnostisch hulpmiddel bij milde klinische mastitis op melkveebedrijven.
2. De Petrifilmtest en methode zijn goed praktisch uitvoerbaar en werd als geheel met een 7+ gewaardeerd door de deelnemende veehouders.
3. De omslachtigheid van de test werd als problematisch ervaren, met als kanttekening dat de administratie van deze proef daar aan bijgedragen heeft. Door enkele veehouders werd een tekort aan begeleiding /kwaliteit van de gebruiksaanwijzing en routineopbouw als problematisch ervaren ondanks de intensieve begeleiding binnen het project.

Literatuur

- Dohoo, I. R., W. Martin, and H. Stryhn. 2003. *Veterinary Epidemiologic Research*. 1:
- Hogan, J. S., R. N. Gonzalez, R. J. Harmon, S. C. Nickerson, S. P. Oliver, J. W. Pankey, and K. L. Smith. 1999. *Laboratory Handbook on Bovine Mastitis*.
- McCarron, J. L., G. P. Keefe, S. L. McKenna, I. R. Dohoo, and D. E. Poole. 2009. Laboratory evaluation of 3M Petrifilms and University of Minnesota Bi-plates as potential on-farm tests for clinical mastitis. *J. Dairy Sci.* 92:2297-2305.
- Neeser, N. L., W. D. Hueston, S. M. Godden, and R. F. Bey. 2006. Evaluation of the use of an on-farm system for bacteriologic culture of milk from cows with low-grade mastitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 228:254-260.
- Silva, B., D. Caraviello, A. Rodrigues, and P. Ruegg. 2004. Use of Petrifilm(TM) for Mastitis Diagnosis and Treatment Protocols. 52-59.