

## Summary

A research study of the most common bacterial cause of mastitis was carried out in the environment of Arusha in Tanzania. In total, there has been taken 49 milk samples of cows from 19 different farms. After cooling of the samples, a California Mastitis Test was performed to determine a high somatic cell count and therefore (subclinical) mastitis. Because of local conditions, freezing of all samples was needed for culturing bacteria. In this research study the most mastitis pathogens proved to be contagious. Of all this bacteria, *Staphylococcus spp.* seems to be the most common bacterial cause of mastitis. However, there has been only taken one sample of each cow and there were many barriers to carry out a reliable research. Therefore, the outcome of this research should be strongly questioned.

## Samenvatting

Dit artikel bevat een onderzoek naar de meest voorkomende mastitisverwekkers in de omgeving van Arusha in Tanzania. In totaal zijn er 49 koeien onderzocht op 26 verschillende boerderijen. Hiervoor zijn melkmonsters genomen, waarop na koeling een California Mastitis Test uitgevoerd is ter bepaling van de aanwezigheid van een hoog somatisch celgetal en dus (subklinische) mastitis. Wegens lokale omstandigheden zijn de bacteriekweken na invriezen gedaan.

Uit dit onderzoek blijken de meeste mastitisverwekkers koegebonden te zijn, met daarvan *Staphylococcus spp.* als meest voorkomende verwekker. Echter, er is van iedere koe maar 1 monster genomen en er waren vele belemmeringen voor het uitvoeren van een betrouwbaar onderzoek. Hierdoor moet de uitkomst van dit onderzoek sterk in twijfel getrokken worden.

## Inleiding

Mastitis is een veel voorkomend probleem bij melkvee, dat tot een lagere melkproductie leidt. Zo ook bij de koeien van de kleine boeren in Tanzania.<sup>1,2</sup>

In Tanzania vormt melkproductie in veel gevallen 70% van het inkomen voor een huishouden.<sup>3</sup> Om deze reden is het belangrijk om de boeren te steunen, zodat de werkgelegenheid kan worden vergroot en de agrarische ontwikkeling bevordert, en op die manier aan de groeiende vraag naar melk kan worden voldaan.

Aangezien melk een belangrijke bron van inkomsten is voor deze mensen, zouden zij gebaat zijn bij een hogere melkproductie en dus een verminderde prevalentie van mastitis. Deze prevalentie kan omlaag worden gebracht door preventieve maatregelen te nemen en gericht te behandelen tegen de meest voorkomende verwekkers van mastitis. Hiervoor moeten natuurlijk eerst de meest voorkomende verwekkers bekend zijn.

*Welke bacteriën zijn de meest voorkomende veroorzakers van mastitis bij het melkvee in de omgeving van Arusha in Tanzania?*

## Materiaal & methoden

De runderpopulatie die gebruikt is voor dit onderzoek bestaat uit thuisgehouden melkvee. Hiervoor is er bij 26 huishoudens langs gegaan die elk gemiddeld 2 melkgevende koeien bezaten (49 melkgevende koeien in totaal, verdeeld over 26 boerderijen; gem. 1.9). Deze huishoudens waren bevriend met medewerkers van het CVL Arusha (Central Veterinary Laboratory) en zijn dus niet random gekozen uit de totaal aanwezige huishoudens in de omgeving. De lokaal gehouden koeien zijn kruisingen van een van de lokale rassen (Zebu, Boran, Uncole, Masaai, Sukuma) met veelal een Holstein Friesian, een Jersey of een Ayrshire koe.

De onderzoeksvraag van dit onderzoek luidt dan ook:

Het onderzoek bestond uit twee delen, namelijk de monsternamen in het veld en de verwerking van de monsters in het laboratorium.

#### Veldwerk

Het veldwerk bestond uit het nemen van melkmonsters. Om deze aseptisch te nemen werd de monsternamen zo uitgevoerd als beschreven in *Laboratory Handbook on Bovine Mastitis*. Hiervoor werden de speenpunten schoon gemaakt met watten en 70% ethylalcohol. Na twee stralen melk op de grond te hebben gespoten werd er  $\pm 5$  ml. melk opgevangen in een monsterbuisje, welke onder een hoek van  $\pm 45^\circ$  werd gehouden. Het dopje werd met de opening naar de grond toe vastgehouden. Dit alles om de monsters zo aseptisch mogelijk te nemen.

Voor ieder kwartier werd een apart monster genomen, welke werden genummerd op boerderij en op koe (#1.2 staat dus voor koe 2 van boerderij 1). Er is een aparte lijst bijgehouden, waarop de boerderijen en de koeien genummerd werden, om verwisseling van de monsters te voorkomen. Op ieder buisje werd genoteerd welk kwartier het betrof: 'RR' staat voor 'Right Rear', 'RF' voor 'Right Front', 'LR' voor 'Left Rear' en 'LF' voor 'Left Front'. Na de monsternamen van 1 koe, dus 4 kwartieren, werden de 4 monsterbuisjes bij elkaar gebonden meteen elastiekje en bewaard in een koelbox met bevroren koelementen.

#### Laboratoriumwerk

Op de in de koelbox vervoerde melkmonsters werd dezelfde dag een California Mastitis Test (CMT) uitgevoerd in het laboratorium van het CVL in Arusha. Hiervoor werd de CMT-plaat telkens met de steel naar de onderzoekers toegelegd en werden telkens dezelfde bakjes voor een kwartier gebruikt, om verwarring van de uitslagen te voorkomen. Uit de monsterbuisjes werd een beetje secretum in een CMT-plaat gegoten en dit werd 1:1 vermengd met CMT-vloeistof.

Vervolgens werd de uitslag afgelezen en ingedeeld in negatief (-), zwak positief (+), positief (++) of sterk positief (+++). De sterkteverschillen zijn bepaald aan de hand van een informatiefolder van het UGCN (Uier Gezondheidscentrum Nederland).<sup>5</sup>

Na het uitvoeren van een CMT werd de CMT-plaat afgewassen met leidingwater en goed drooggewreven met een tissue, om vervolgens weer een nieuwe CMT uit te voeren.

Na het uitvoeren van de CMT's zijn de monsters weer bij elkaar gebonden met een elastiekje en ingevroren. Vervolgens zijn ze bevroren naar Dar Es Salaam vervoerd, waar het bacteriologisch onderzoek is uitgevoerd.

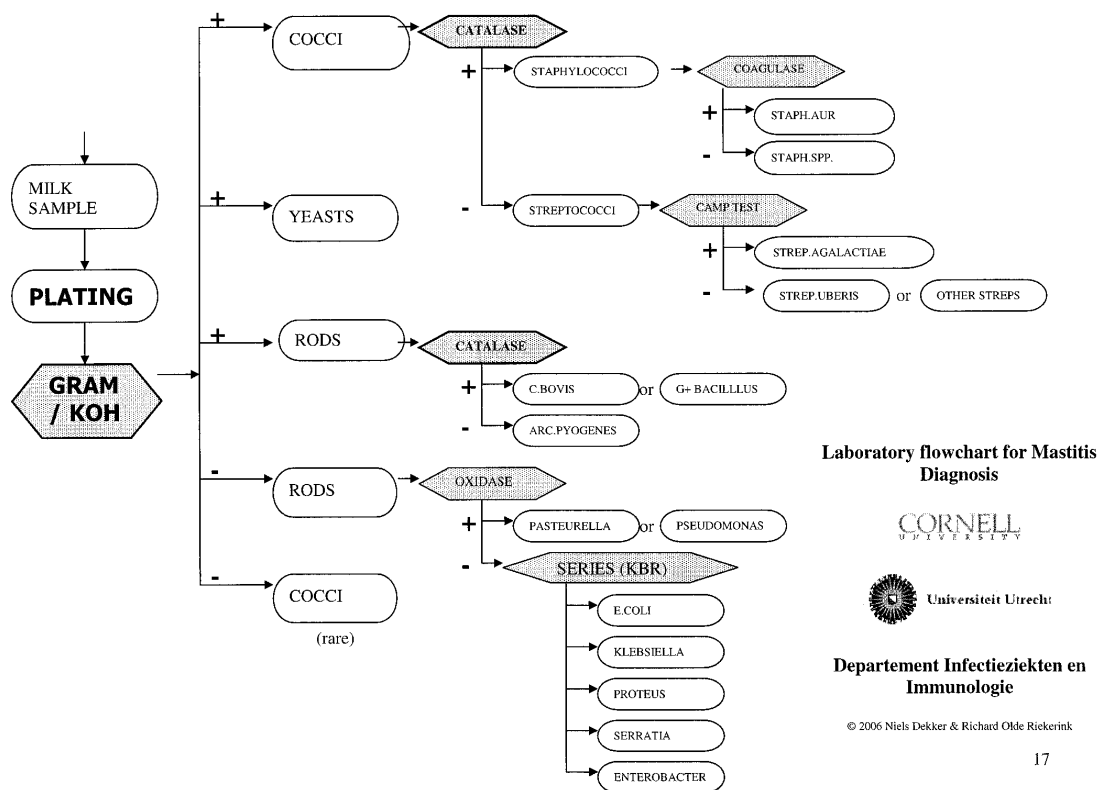
Het bacteriologisch onderzoek werd uitgevoerd op MacConkey en Bloedagar voedingsbodems. Deze werden in het laboratorium zelf gemaakt.

Voor het maken van de bloedagarplaten werd er gebruik gemaakt van 'Tryptone Soya Agar', dat in poedervorm conform de handleiding aan werd gemaakt en vervolgens werd vermengd met schapebloed.<sup>6</sup>

Ook voor de MacConkeyplaten werd er gebruik gemaakt van een basispoeder. Voor de aanmaak werd in een Erlenmeyer 60 gram basispoeder vermengd met 300 ml gedestilleerd water. Vervolgens werd dit aan de kook gebracht, waarna het voor 15 minuten in een autoclaaf van 121 °C werd gesteriliseerd. Tot slot werd de Erlenmeyer afgekoeld in een warmwaterbad van 47 °C. Hierna werden de platen gegoten.

Als leidraad voor de werkwijze van het bacteriologisch onderzoek is er gebruik gemaakt van een handleiding van de faculteit Diergeneeskunde, welke schematisch is weergegeven in figuur 1.<sup>7</sup>

Ten eerste zijn de melkmonsters uit de vriezer gehaald en ontdooid. In de tussentijd werden de bloedagar-, en de MacConkeyplaten in tweeën gedeeld en met een watervaste stift gemerkt. Met een entoog werden de melkmonsters



Figuur 1: Schematische weergave voor bacteriologisch onderzoek van mastitis melk uit een handleiding van de faculteit Diergeneeskunde te Utrecht.<sup>7</sup>

overeenkomstig de markering op de platen geënt. Van ieder melkmonster werd een kweek ingezet op zowel een bloedagar-, als een MacConkeyplaat. Wanneer een nieuw melkmonster werd gebruikt werd het entooog eerst in de vlam van de brander ontsmet. Bij het opendraaien van de monsterbuisjes werd erop gelet dat de buis zo kort mogelijk open bleef en dat de dopjes met de opening naar beneden gericht tussen de vingers werden gehouden. Na deze handeling werden alle melkmonsters weer opnieuw ingevroren. Alle geënte platen werden 24 uur in de broedstov bewaard. Van de platen waarop significante groei plaats vond werd van de betreffende kolonies een gramkleuring gemaakt. Hierbij waren er enkele uitzonderingen:

- Indien er van hetzelfde monster wel groei plaats vond op de MacConkey en niet op de bloedagar werd het monster geëxcludeerd.
- Bacteriën die zich op meerdere platen presenteren als contaminanten (d.w.z. dat dezelfde kolonies zowel binnen als buiten de geïnculeerde plaatsen groeien) worden niet gekleurd. Hierbij werden kolonies van verschillende melkmonsters die, optisch sterk op elkaar leken, over één kam geschoren.
- Gecontamineerde platen (d.w.z. meer dan 3 verschillende kolonies op een plaat) werden niet nogmaals gekweekt. Op kolonies van verschillende melkmonsters, die dezelfde

verschijningsvorm hadden, werd veelal niet apart een Gramkleuring gedaan.. Er werd bij voorbaat aangenomen dat het hierbij om dezelfde bacteriesoort ging. Dit gebeurde naar aanleiding van het oordeel van de mogelijk ervaren laborant

De platen zonder significante groei of helemaal geen groei werden nogmaals 24 uur in de broedstoof geplaatst. Deze significantie werd ook bepaald naar het oordeel van de lokale laborant. Zowel na een incubatie van 24 uur als na 48 uur werden van alle platen de kolonies bekeken, omschreven en genoteerd. Hierbij is, voor de beoordeling van de semikwantitatieve telling van de hoeveelheid kolonies, gebruik gemaakt van dezelfde ordegrottes als het VMDC (Veterinair Microbiologisch Diagnostisch Centrum) te Utrecht toe past ( zie tabel 1). Na 48 uur zijn er Gramkleuringen gemaakt van de platen, waarop alsnog significante groei werd bevonden. Soms moest hiervoor eerst een subcultuur worden ingezet.

De platen die na 48 uur incubatie nog niet significant werden bevonden, werden vervolgens nog eens 24 uur in de broedstoof geplaatst. Na een totale incubatietijd van 72 uur werden deze allen nog steeds niet significant bevonden en zijn vervolgens geëxcludeerd.

De Gramkleuringen zijn conform de handleiding in 'Mikrobiologisch Onderzoek van Levensmiddelen' blz. 38 gemaakt, met daarop enkele uitzonderingen:

- De overmaat aan kristalviolet op het voorwerpglas werd weggespoeld met lugol's iodine in plaats van leidingwater.
- Na het wegspoelen van de lugol's iodine werd het preparaat direct bedekt met

aceton en deze werd er direct weer afgespoeld met leidingwater.

- In plaats van een safranine-oplossing is er carbol fuchsine gebruikt welke na 20 seconden werd afgespoeld met leidingwater.
- Het preparaat werd aan de lucht gedroogd in plaats van met filtreerpapier.

De Gramkleuringen werden onder een lichtmicroscopie bekeken en beoordeeld als: Gram positieve cocci, staven of gisten, of als Gram negatieve staven of cocci. Vervolgens werden via bovenstaand schema de bacteriesoorten gedefinieerd (zie figuur 1). Indien er twijfel was over de uitkomst van de Gramkleuring werden voor de zekerheid nadere testen gedaan. Overigens had men in het laboratorium niet de beschikking over een Korte Bonte Rij (KBR) en is in plaats hiervan gebruik gemaakt van de IMViCtest.

De volgende testen zijn conform de bijbehorende bronnen uitgevoerd, tenzij anders vermeld:

- Catalasetest:  
Hierbij werd eerst de waterstofperoxide en daarna de kolonie op het voorwerpglaasje aangebracht met een ijzerbevattend entoog.<sup>8,20</sup>
- Oxidasetest.<sup>8</sup>
- Coagulasetest:  
Geheel anders uitgevoerd dan in bron 8. Op een voorwerpglas werd een druppel normal saline 0,8% gelegd, hierin werd een kolonie uitgesmeerd en vervolgens werd er een druppel konijnenplasma toegevoegd. Het voorwerpglas werd gezwenkt tussen duim en wijsvinger. Hierna werd er gelet op het ontstaan van stolsels.<sup>8</sup>
- CAMPtest.<sup>8</sup>

- IMViCtest:  
Na toevoeging van de koloniën aan de IMViCmedia zijn de flesjes slechts 1 uur geïncubeerd bij 37 °C. Bij de Indole zijn een paar druppels Kovacs reagens toegevoegd, waarna het flesje is gezwenkt. Ook de Vogues Proskauer is gezwenkt na toevoeging van de reagentia. Het testresultaat is na 20 minuten afgelezen.  
Bij het medium Citraat werd een positief testresultaat toegekend indien de vloeistof troebel was. Bij een heldere vloeistof werd een negatief resultaat toegekend.<sup>9,21</sup>

### Resultaten

Tabel 2 geeft een indruk van de leefomstandigheden van het onderzochte melkvee.

Vervolgens geeft Tabel 3 geeft een indruk van de kweken van het bacteriologisch onderzoek. Een groot aandeel (37%) van de kweken bevatte een mengcultuur of contaminanten.

In tabel 4 is dan te vinden welke micro-organismen er specifiek zijn gevonden, met *Staphylococcus spp.* als meest voorkomende verwekker.

In tabel 5 ziet u de betrouwbaarheidsintervallen van de infecties per koe en per kwartier. Een betrouwbaarheidsinterval geeft de waarden weer waarbinnen in 95% van de gevallen, de werkelijke waarde van het populatiegemiddelde zou vallen. Er is te zien dat de betrouwbaarheidsintervallen niet erg breed zijn, hieruit valt te concluderen dat het proefgemiddelde dichtbij het ware populatiegemiddelde ligt.

Tabel 6 laat zien dat de meest voorkomende mastitisverwekkers koegebonden zijn

Tabel 7.1 met de bijbehorende figuur 2, geeft weer dat de uitslag van de bacteriekweek sterk is gecorreleerd met de uitslag van de CMT-test.

In tabel 7.2 is de Chi-kwadraat-test hiervan gedaan. Aangezien de P-waarde klein genoeg is (<0,05) wordt de hypothese dat de variabelen onafhankelijk van elkaar zijn, verworpen. De kweekuitslag heeft dus invloed op de CMT-uitslag: er is een significant verband tussen de uitkomst van de bacteriekweek en of een CMT positief of negatief is. Een positieve bacteriekweek geeft een positieve CMT-uitslag.

De odds van een positieve CMT was 2,32 keer hoger bij een positieve bacteriekweek dan bij een negatieve (tabel 7.3).<sup>10,11</sup>

Tabel 8.1 a & b en de bijbehorende figuur 3 geeft weer dat *Staphylococcus spp.* de meest voorkomende bacterie is in zowel de voorste als de achterste kwartieren. 59,2% van de bacteriën bevindt zich in de voorste kwartieren en 40,8% in de achterste. Er is geen verband aangetoond tussen de kwartieren en een bacteriële besmetting (tabel 8.2).<sup>10,11</sup>

### Discussie

#### Monstername

Aseptische monstername was vrijwel onmogelijk door de volgende omstandigheden:

- De koeien werden veelal onder onhygiënische omstandigheden gehouden, waardoor het uier regelmatig besmeurd was. Wegens gebrek aan materiaal was het niet mogelijk om het uier eerst te wassen en voor te behandelen met een droge doek.
- Het weg melken van de eerste stralen voor de ontsmetting van de speenpunten was niet

mogelijk, omdat de uiers vrijwel leeg waren. Monstername vond namelijk plaats bij pas gemolken koeien of zoogkoeien.

- De speenpunten konden niet goed schoongemaakt worden met alcohol. Deels door het eerst genoemde punt en deels wegens economische omstandigheden: er was hiervoor niet genoeg materiaal beschikbaar gesteld. Zo moesten op de eerste 12 boerderijen per koe alle speenpunten met één watje met alcohol worden schoongemaakt en ontsmet.
- Omdat niet overal de gelegenheid tot het wassen van de handen aanwezig was, is er veelal niet met schone handen gemonsterd.
- Wegens de hoge bevuiling van de koeien was de kans groot dat het buisje werd gecontamineerd met vuil bij beweging van de koe.
- Nieuwe monstername was onmogelijk, omdat er met moeite 5 ml. melk uit een kwartier was te trekken.
- Wanneer een speen, na ontsmetting, door trappen of de staart weer bevuild werd, was er onvoldoende materiaal om deze opnieuw te ontsmetten.

Normaal gesproken vind monstername plaats zoals beschreven in bron 4, 12 en 17, zodat er zo min mogelijk contaminatie plaats vindt. In dit geval heeft de manier van monstername zeer waarschijnlijk een hoog aandeel aan contaminatie tot gevolg gehad.<sup>4,12,17</sup>

#### Laboratoriumwerk

##### *Menselijke hantering*

Het uitvoeren van de CMT-test kan leiden tot verschillende interpretaties.

Hierbij is namelijk op het zicht de melk en de CMT-vloeistof 1:1 vermengd, waardoor er het dus onmogelijk was om altijd in precieze verhoudingen te werken. Het is denkbaar dat daardoor afwijkingen in de resultaten ontstaan wegens een hogere verdunning. De resultaten van de CMT's zijn wel telkens door dezelfde personen afgelezen, maar er was soms enige discussie over het toekennen van een graad. Zo kan een positief monster ten onrechte als zwak positief zijn beoordeeld of andersom. Er is geprobeerd om de grenzen duidelijk af te bakenen, maar het blijft een menselijke beoordeling.<sup>18</sup>

Regelmatig is aan het onderzoek richting gegeven door het oordeel van de lokale laboratoriummedewerker. Zo werd de significantie van de groei door deze persoon bepaald, de uitkomsten van de gramkleuring en werden de koloniën op uiterlijk gediagnosticeerd. Dit oordeel wordt als enigszins subjectief gezien.

##### *Materiaal*

Invriezen kan leiden tot een verminderde detectie van *Nocardia spp.* en *E. coli*. Beide bacteriesoorten zijn ook niet gevonden in dit onderzoek. Alle testen zijn gedaan op melk die ingevroren is geweest, mogelijk heeft dit geleid tot vals negatieve resultaten omtrent het vinden van *Nocardia spp.* en *E. coli*.<sup>22</sup>

De groei van contaminanten op de platen, buiten de entstrepen wijst erop dat er niet steriel gewerkt kon worden in het laboratorium. Het is dus mogelijk dat de gevonden koloniën ontstaan zijn door contaminatie na de monstername.

Tijdens de werkzaamheden viel regelmatig de stroom uit. Tijdens het bebroeden van de platen kan dit ook

gebeurd zijn. Platen die na 72 uur bebroeden als niet significant zijn beoordeeld, vanwege een lage groei, hadden bij een constante temperatuur wellicht wel significant kunnen zijn.

De oxidasetest is vanaf monster 19.1 uitgevoerd op strips welke houdbaar waren tot en met november 1992. Hiervoor is deze uitgevoerd met filtreerpapier, zoals beschreven in bron 8. Enkel monster 1.6 is nogmaals gecontroleerd met een strip. Opvallend was dat dit monster bij het gebruik van filtreerpapier negatief was, maar bij gebruik van de strip positief. Hieruit kunnen twee mogelijke conclusies worden getrokken. Of de monsters tot aan 19.1 waren allen vals negatief. Of de testresultaten van de strips geven een valse uitkomst wegens een verlopen houdbaarheid.

Over het algemeen is het gebruik van strips betrouwbaarder wegens een verminderde kans op vals positieve reacties. Deze betrouwbaarheid van de strips had getest kunnen worden aan de hand van een controleproef, zoals vermeld in Microbiologisch Onderzoek van Levensmiddelen. Dit is echter niet gebeurd, waardoor de enige conclusie kan zijn dat alle uitkomsten van de oxidasetesten geheel onbetrouwbaar zijn.<sup>8</sup>

#### *Gebruik van de methodieken*

Het vervaardigen van een MacConkeyplaat uit een basis MacConkeypoeder is niet conform de handleiding gegaan. Normaal wordt er gebruik gemaakt van een verhouding van 51,5 gram poeder op 1 liter water. Door het gebruik van 60 gram poeder op 300 ml water is deze verhouding volledig verstoord.

Zowel bij het maken van de MacConkey- als de bloedagar is het mengsel na sterilisatie in de autoclaaf door middel van een warmwaterbad van 47 °C afgekoeld. Deze handeling

wordt niet in alle handleidingen vermeldt. Echter in 'Microbiologisch Onderzoek van Levensmiddelen' wordt er wel over gesproken om de vloeistoffen af te koelen tot circa 48 °C. Daarom wordt deze handeling niet als van invloed op de verdere testresultaten geacht.<sup>6,8,19</sup>

Wegens het grote aantal afwijkingen van de standaardprocedure voor het maken van een Gramkleuring (blz. 38 'Microbiologisch Onderzoek van Levensmiddelen') wordt deze ook als onbetrouwbaar geacht. Daarnaast is het meerdere malen voorgekomen dat de laborant vermeldde dat de kleuring niet goed was en wat het microscopisch beeld dan wel had moeten zijn. De uitkomsten van de Gramkleuringen zouden dan ook in twijfel getrokken moeten worden.<sup>8</sup>

Hetzelfde geldt voor de uitvoering van de coagulasetest. Ook hierbij zijn de afwijkingen van de standaardprocedure zo groot dat ook deze uitkomsten sterk in twijfel getrokken moeten worden.<sup>8</sup>

De catalasetest is onbetrouwbaar wegens de werkvolgorde en het gebruik van een ijzerbevattend entoog. In 'Microbiologisch Onderzoek van Levensmiddelen' blz. 47 wordt eerst de kolonie op het voorwerpglas aangebracht, deze wordt vervolgens bedekt met enkele druppels waterstofperoxide. Ook in bron 20 wordt deze volgorde geprefereerd in verband met het ontstaan van vals positieven, wanneer de volgorde om wordt gedraaid. De kans op het ontstaan van vals positieven bij een omgekeerde volgorde wordt ook nog eens vergroot door het gebruik van een ijzerbevattend entoog. Zeer waarschijnlijk zijn er dus vals positieve resultaten waargenomen.<sup>8,20</sup>

Voor het gebruik van de CAMPtest wordt in bron 8 als medium een

bloedagar op basis van runderbloed gebruikt, terwijl er in dit onderzoek gebruik is gemaakt van schapenbloed. Aangezien beide bloedbronnen afkomstig zijn van herkauwers wordt dit als nauwelijks van invloed op de testresultaten geacht.<sup>8</sup>

Het slechts 1 uur incuberen bij 37 °C van de IMViCflesjes, na het toevoegen van de koloniën, kan mogelijk leiden tot vals negatieve resultaten. Volgens bron 9 hoort deze incubatie 24-48 uur te gebeuren. Dit kan mogelijk vals negatieve resultaten geven, door het onvoldoende aanwezig zijn van bacteriën.

De resultaten van de Indole-test zijn mogelijk vals negatief, omdat er slechts een paar druppels Kovacs reagens zijn toegevoegd, terwijl er in bron 9 wordt gesproken over het toevoegen van 20 druppels. Mogelijk leidt dit tot een onvoldoende zichtbare kleuromslag, waardoor resultaten vals negatief kunnen zijn.

Ook is het flesje gezwenkt na toevoeging van het reagens. In bron 9 wordt er niet over deze handeling gesproken. In bron 21 wordt er wel met intervallen gezwenkt, gedurende 10-15 min. Volgens deze bron is dit zelfs nodig voor het ontstaan van een diep rode kleur. Daarom achten wij deze handeling niet als van invloed op het testresultaat.

De Vogues Proskauer hebben is vrijwel hetzelfde uitgevoerd als beschreven in bron 9. Enkel is de vloeistof gezwenkt na het toevoegen van de reagentia, hier wordt in de genoemde bron niet over gesproken. Ook is het testresultaat pas na 20 minuten afgelezen, terwijl dit in bron 9 al na enkele minuten wordt gedaan. Bron 21 spreekt echter over het zwenken van de buisjes gedurende 30 seconden. En het vervolgens 15 tot 30 minuten wachten met het aflezen van het testresultaat, om de reactie volledig

te laten volbrengen. Daarom wordt de uitvoering van de Vogues Proskauer als juist geacht en niet van invloed op de testresultaten.

Bij de Citraat-test is er voor de toekenning van het testresultaat gekeken naar de helderheid van het medium. In bron 9 wordt er bij de Citraat-test gekeken naar bacteriegroei in het medium en een verandering in de kleur van het medium voor een positief resultaat. Een blauwe verkleuring van het medium staat voor een positief testresultaat en een groene kleur voor een negatief resultaat. Vanwege de grote afwijking met de in dit onderzoek gebruikte methode, worden de uitkomsten van de citraat-test als onbetrouwbaar beschouwd.

De uiteindelijke determinatie aan de hand van de IMViCtest vindt plaats door een combinatie van de uitzonderlijke testuitkomsten. Aangezien deze niet altijd betrouwbaar worden geacht, is de determinatie aan de hand van de IMViCtest ook niet betrouwbaar.<sup>9,21</sup>

#### Overig

Volgens de National Mastitis Council zijn 25% tot 40% van alle klinische monsters negatief bij het kweken, hetgeen kan wijzen op vals negatieven bij dit onderzoek.<sup>23</sup>

Verder zijn de diagnoses gesteld op de uitkomst van onderzoek van een enkel monster in plaats van meerdere monsters per koe. Hierdoor is er niet te zeggen of het ware populatiegemiddelde wel in het berekende betrouwbaarheidsinterval ligt en is ook de uitkomst van het onderzoek minder betrouwbaar.<sup>10,11,24</sup> uitkomst van het onderzoek minder betrouwbaar.<sup>24</sup>

#### **Conclusie**

*Staphylococcus spp.* is de meest voorkomende mastitisverwekker in



zowel de voorste als de achterste kwartieren van de uiers van de koeien in de omgeving van Arusha. Ook zijn de meest voorkomende bacteriën koegebonden. Er is echter geen verband aangetoond tussen de plaats van de kwartieren (voor of achter) en het voorkomen van een bacteriële besmetting.

Met deze bevindingen kunnen er gerichte preventieve maatregelen genomen worden ter voorkoming van koegebonden besmettingen. Ware het niet dat de onderzoeksresultaten onbetrouwbaar zijn, vanwege de vele beperkingen tijdens de uitvoering van dit onderzoek zoals te lezen is in bovenstaande discussie. Voor een werkelijk betrouwbaar resultaat zou dit onderzoek opnieuw gedaan moeten worden, met elimineren van de genoemde belemmerende factoren.

#### Referenties

1. Kivaria F.M., Noordhuizen J.P.T.M., Kapaga A.M. (2004) *Risk Indicators Associated with Subclinical Mastitis in Smallholder Dairy Cows in Tanzania*. Tropical Animal Health and Production 36(6): 581-592.
2. Mdegela R.H., Kusiluka L.J.M., Kapaga A.M., Karimuribo E.D., Turuka F.M., Bundala A., Kivaria F.M., Kabula B., Manjurano A., Loken T., Kambarage D.M. (2004) *Prevalence and Determinants of Mastitis and Milk-borne Zoonoses in Smallholder Dairy Farming Sector in Kibaha and Morogoro Districts in Eastern Tanzania*. Journal of Veterinary Medicine Series B 51: 123-128.
3. Kivaria F.M., Noordhuizen J.P.T.M., Kapaga A.M. (2006) *Evaluation of the Hygienic Quality and Associated Public Health Hazards of the Raw Milk Marketed by Smallholder Dairy Producers in the Dar es Salaam Region, Tanzania*. Tropical Animal Health and Production 38(3): 185-194.
4. Hogan J.S. et al. *Sample Collection and Handling*. In: *Laboratory Handbook on Bovine Mastitis*. National Mastitis Council, Madison. 1999: 1-12.
5. <http://www.ugcn.nl/media/default.aspx/emma/org/1041272/F412880254/F412880254/UGCN%20cmt.pdf>
6. [http://www.oxoid.com/UK/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=CM0131&c=UK&lang=EN](http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0131&c=UK&lang=EN)
7. Dekker N., Olde Riekerink R. (2006) *Laboratory Flowchart for Mastitis Diagnosis*. In: *Aanvullende Diagnostiek, practicum laboratoriumdiagnostiek (8b) bacteriologisch onderzoek*. Universiteit Utrecht, faculteit Diergeneeskunde, 3<sup>e</sup> jaar 1<sup>e</sup> trimester 2008-2009.
8. Mossel D.A.A., Jacobs-Reitsma W.F. *Mikrobiologisch Onderzoek van Levensmiddelen, strategie, principes en methoden*. Zeist: Uitgeverij P.C. Noordervliet B.V., 1990.
9. Pommerville J.C. *Alcamos Laboratory Fundamentals of Microbiology*. London: Jones & Bartlett Learning, 2011.
10. Field A. *Discovering Statistics Using SPSS*. London: Sage Publications, 2009.
11. Petrie A., Watson P. *Statistics for Veterinary and Animal Science*. Oxford: Blackwell Science, 1999.
12. Quinn P.J., Markey B.K., Carter M.E., Donnelly W.J., Leonard F.C. *Veterinary*

- Microbiology and Microbial Disease*. Oxford: Blackwell Science, 2007.
13. Radostits O.M., Gay C.C., Hinchcliff K.W., Constable P.D. *Veterinary Medicine, a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. London: Saunders Elsevier, 2007.
  14. Smith K.L., Hogan J.S. (2008) *Environmental Mastitis: Know Your Opponent*. NMC Regional Meeting Proceedings 2008: 1-7.
  15. Ruegg P.L., Smith R.A. *Mastitis in Dairy Cows, an Issue of Veterinary Clinics: Food Animal Practice*. London: Elsevier Health Sciences Division, 2012.
  16. Costa E.O., Ribeiro A.R., Watanabe E.T., Melville P.A. (1998) *Infectious Bovine Mastitis Caused by Environmental Organisms*. Journal of Veterinary Medicine series B 45 (1-10): 65-71.
  17. Nielen M. (2006) *Klinische Diasnositiek, studiewijzer studiepad LHVV*. Universiteit Utrecht, faculteit Diergeneeskunde, 3<sup>e</sup> jaar 1<sup>e</sup> trimester 2008-2009.
  18. Vanholder T., Melchior M. (2012) *Diagnostiek Mastitis*. Diergeneeskundig Memorandum 59 (1): 9-14.
  19. [http://www.oxid.com/UK/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=CM0115&org=124&c=UK&lang=EN](http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0115&org=124&c=UK&lang=EN)
  20. [http://www.highlands.edu/inc/files/userfiles/266-cd4a897f0fc62d7-catalase\\_coagulase\\_test.htm](http://www.highlands.edu/inc/files/userfiles/266-cd4a897f0fc62d7-catalase_coagulase_test.htm)
  21. Aneja K.R. *Experiments in Microbiology, Plant Pathology and Biotechnology*. New Delhi: New Age International Publishers, 2003.
  22. <http://nmconline.org/articles/freezing.htm>
  23. <http://www.nmconline.org/articles/nogrowth.htm>
  24. <http://www.nmconline.org/articles/misdiag.htm>

1-5	bacteriën op voedingsbodem	<+	sporadisch
6-20	bacteriën op voedingsbodem	+	enkele
21-100	bacteriën op voedingsbodem	++	matig
101-250	bacteriën op voedingsbodem	+++	veel
>250	bacteriën op voedingsbodem	++++	zeer veel

Tabel 1: Ordegroottes voor een semikwantitatieve kolonietelling van het VMDC te Utrecht.

leefomstandigheden	aantal boerderijen	gemiddelde kuddegrootte	spreiding	gemiddelde aantal koeien	spreiding	gemiddelde aantal lacterende koeien	spreiding
onhygiënisch	21	4,3	2-30	1,7	1-5	1,6	1-4
schoon	4	6,5	2-10	2	1-4	1,5	1-2
schoon & onhygiënisch	1	30	0	11	0	10	0

Tabel 2: Overzicht van de bezochte boerderijen. De leefomstandigheden zijn als ‘schoon’ beoordeeld, indien de koe(ien) genoeg ruimte hadden om op een schone, droge plek te kunnen liggen. Wanneer er over ‘onhygiënisch’ wordt gesproken, waren de koeien gedwongen om in de modder of hun eigen uitwerpselen te liggen. Op grotere bedrijven was een combinatie van beide omstandigheden mogelijk, door de aanwezigheid van meerdere stallen.

aantal kweken	% mengculturen	% reiculturen	% gecontamineerd	% geen groei
164	20	34	17	29

Tabel 3: Indruk van de kweken van het bacteriologisch onderzoek.

micro-organismen	# verschillende uitkomsten per kwartier (werkelijk gekweekt)	percentage	# kwartieren	percentage	#koeien	percentage
<i>staph. Aureus</i>	12 (7)	8.5	11	8.8	8	11.1
<i>staph. Spp.</i>	84 (38)	59.6	69	55.2	32	44.4
<i>strep. Agalactiae</i>	1 (1)	0.7	1	0.8	1	1.4
<i>strep. Uberis or other streps</i>	6 (4)	4.3	6	4.8	4	5.6
<i>C. Bovis or G+ bacillus</i>	24 (6)	17	24	19.2	15	20.8
<i>Arc. Pyogenes</i>	3 (2)	2.1	3	2.4	2	2.8
<i>Pasteurella or Pseudomonas</i>	1 (1)	0.7	1	0.8	1	1.4
<i>Klebsiella</i>	1 (1)	0.7	1	0.8	1	1.4
<i>Klebsiella, citrobacter of proteus</i>	1 (1)	0.7	1	0.8	1	1.4
<i>pseudomonas of klebsiella</i>	1 (1)	0.7	1	0.8	1	1.4
<i>staph. Spp or s.uberis or other streps</i>	1 (0)	0.7	1	0.8	1	1.4
<i>arc. Pyogenes or klebsiella edwardsii</i>	1 (1)	0.7	1	0.8	1	1.4
<i>C. Bovis or G+ bacillus or klebsiella</i>	1 (1)	0.7	1	0.8	1	1.4
<i>shigella or klebsiella</i>	2 (1)	1.4	2	1.6	2	2.8
<i>G+ coc</i>	2 (1)	1.4	2	1.6	1	1.4

Tabel 4: Voorkomen van de verschillende micro-organismes. Per micro-organisme is het aantal besmette kwartieren (kolom 4) en koeien (kolom 6) en de percentages hiervan weergegeven. In de eerste kolom “aantal verschillende uitkomsten per kwartier” staat weergegeven hoe vaak kolonies als een bepaalde bacterie zijn beoordeeld. Zo ziet u dat *staphylococcus Aureus* 12 keer is gevonden. Tussen haakjes staat achter dit getal een 7, hetgeen betekent dat voor 7 van deze kweken ook werkelijk is bepaald dat het een *Staph. Aureus* is. De rest van de kolonies zijn dan op het oog beoordeeld. Ook ziet u in kolom 4 dat het aantal besmette kwartieren maar 11 is. Dit betekent dat er in een kweek van 1 kwartier 2 qua uiterlijk verschillende kolonies zijn gevonden, die beiden als *Staph. Aureus* zijn bestempeld.

micro-organismen	# kwartieren	percentage	95%BHI	#koeien	percentage	95%BHI
<i>staph. Aureus</i>	11	8,8	0.04 - 0.14	8	11,1	0.04 - 0.18
<i>staph. Spp.</i>	69	55,2	0.46 - 0.64	32	44,4	0.33 - 0.56
<i>strep. Agalactiae</i>	1	0,8	0 - 0.024	1	1,4	0 - 0.04
<i>strep. Uberis or other streps</i>	6	4,8	0.01 - 0.09	4	5,6	0.003 - 0.109
<i>C. Bovis or G+ bacillus</i>	24	19,2	0.12 - 0.26	15	20,8	0.11 - 0.30
<i>Arc. Pyogenes</i>	3	2,4	0 - 0.051	2	2,8	0 - 0.066
<i>Pasteurella or Pseudomonas</i>	1	0,8	0 - 0.024	1	1,4	0 - 0.04
<i>Klebsiella</i>	1	0,8	0 - 0.024	1	1,4	0 - 0.04
<i>Klebsiella, citrobacter of proteus</i>	1	0,8	0 - 0.024	1	1,4	0 - 0.04
<i>pseudomonas of klebsiella</i>	1	0,8	0 - 0.024	1	1,4	0 - 0.04
<i>staph. Spp or s.uberis or other streps</i>	1	0,8	0 - 0.024	1	1,4	0 - 0.04
<i>arc. Pyogenes or klebsiella edwardsii</i>	1	0,8	0 - 0.024	1	1,4	0 - 0.04
<i>C. Bovis or G+ bacillus or klebsiella</i>	1	0,8	0 - 0.024	1	1,4	0 - 0.04
<i>shigella or klebsiella</i>	2	1,6	0 - 0.038	2	2,8	0 - 0.066
<i>G+ coc</i>	2	1,6	0 - 0.038	1	1,4	0 - 0.04

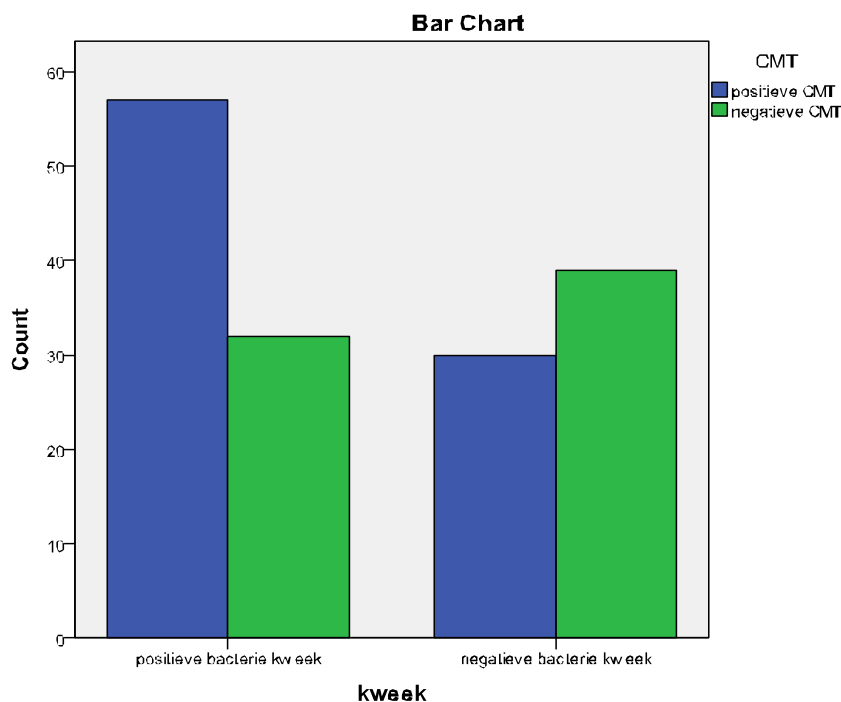
Tabel 5: Betrouwbaarheidsintervallen van de infecties per koe en per kwartier. Indien de ondergrens negatief was is deze op nul gesteld, aangezien negatieve proporties niet voor kunnen komen.

% koegebonden bacterien per kwartier	95% BHI	% omgevingsgebonden bacterien per kwartier	95% BHI	% ongedefinieerd per kwartier	95% BHI
84	0,78 - 0,9	12,8	0,07 - 0,19	3,2	0,016 - 0,048
% koegebonden bacterien per koe	95% BHI	%omgevingsgebonden bacterien per koe	95% BHI	% ongedefinieerd per koe	95% BHI
77,78	0,68 - 0,87	18,06	0,09 - 0,27	4,17	0,004 - 0,088

Tabel 6: Betrouwbaarheidsintervallen van het aantal koegebonden en omgevingsgebonden bacterien per koe en per kwartier. Onder de ongedefinieerde bacterien vallen de volgende uitkomsten: “gram positieve coc”, “*corynebacterium Bovis* of gram positieve *bacillus* of *klebsiella*” en “*staphylococcus spp.* Of *s. Uberis* of andere streptococcen”.<sup>10,11,12,13,14,15,16</sup>

kweek * CMT Crosstabulation					
			CMT		Total
			positieve CMT	negatieve CMT	
kweek	positieve bacterie kweek	Count	57	32	89
		Expected Count	49,0	40,0	89,0
		% within kweek	64,0%	36,0%	100,0%
	negatieve bacterie kweek	Count	30	39	69
		Expected Count	38,0	31,0	69,0
		% within kweek	43,5%	56,5%	100,0%
Total	Count	87	71	158	
	Expected Count	87,0	71,0	158,0	
	% within kweek	55,1%	44,9%	100,0%	

Tabel 7.1: Kruistabel van de CMT-uitkomst en de kweekuitkomst.



Figuur 2: Staafdiagram met weergave van de uitkomsten van tabel 7.1

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	6,644 <sup>a</sup>	1	,010		
Continuity Correction <sup>b</sup>	5,839	1	,016		
Likelihood Ratio	6,672	1	,010		
Fisher's Exact Test				,015	,008
Linear-by-Linear Association	6,602	1	,010		
N of Valid Cases	158				

a. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 31,01.

b. Computed only for a 2x2 table

Tabel 7.2:  $\chi^2$ -test behorende bij tabel 7.1 Er is een significant verband tussen de uitkomst van de bacteriekweek en of een CMT positief of negatief is  $\chi^2(1)=6.644$ ,  $0.001 < p < 0.01$ .<sup>11</sup>

Risk Estimate			
	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for kweek (positieve bacterie kweek / negatieve bacterie kweek)	2,316	1,217	4,407
For cohort CMT = positieve CMT	1,473	1,080	2,010
For cohort CMT = negatieve CMT	,636	,450	,899
N of Valid Cases	158		

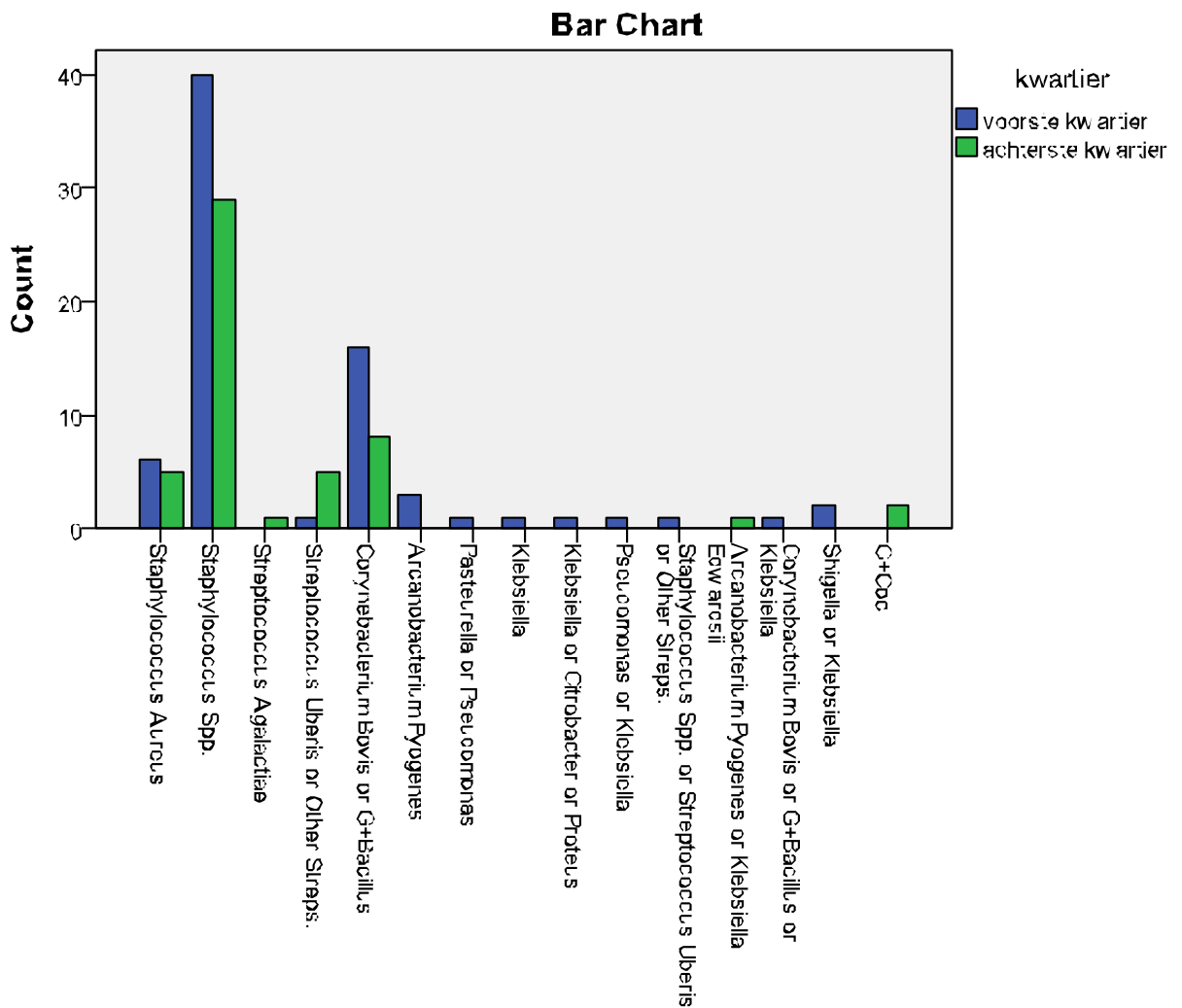
Tabel 7.3: Odds-ratio behorende bij tabel 7.2

bacterie * kwartier Crosstabulation					
			kwartier		Total
			vorste kwartier	achterste kwartier	
bacterie	<i>Staphylococcus Aureus</i>	Count	6	5	11
		Expected Count	6,5	4,5	11,0
		% within bacterie	54,5%	45,5%	100,0%
	<i>Staphylococcus Spp.</i>	Count	40	29	69
		Expected Count	40,8	28,2	69,0
		% within bacterie	58,0%	42,0%	100,0%
	<i>Streptococcus Agalactiae</i>	Count	0	1	1
		Expected Count	,6	,4	1,0
		% within bacterie	0,0%	100,0%	100,0%
	<i>Streptococcus Uberis or Other Streps.</i>	Count	1	5	6
		Expected Count	3,6	2,4	6,0
		% within bacterie	16,7%	83,3%	100,0%

Tabel 8.1 a: Kruistabel van de gedefinieerde bacteriën met de vindplaats in het uier (vervolg van de tabel; zie volgende bladzijde)

bacterie * kwartier Crosstabulation					
			kwartier		Total
			voorste kwartier	achterste kwartier	
bacterie	<i>Corynebacterium Bovis</i> or <i>G+Bacillus</i>	Count	16	8	24
		Expected Count	14,2	9,8	24,0
		% within bacterie	66,7%	33,3%	100,0%
	<i>Arcanobacterium Pyogenes</i>	Count	3	0	3
		Expected Count	1,8	1,2	3,0
		% within bacterie	100,0%	0,0%	100,0%
	<i>Pasteurella</i> or <i>Pseudomonas</i>	Count	1	0	1
		Expected Count	,6	,4	1,0
		% within bacterie	100,0%	0,0%	100,0%
	<i>Klebsiella</i>	Count	1	0	1
		Expected Count	,6	,4	1,0
		% within bacterie	100,0%	0,0%	100,0%
	<i>Klebsiella</i> or <i>Citrobacter</i> or <i>Proteus</i>	Count	1	0	1
		Expected Count	,6	,4	1,0
		% within bacterie	100,0%	0,0%	100,0%
	<i>Pseudomonas</i> or <i>Klebsiella</i>	Count	1	0	1
		Expected Count	,6	,4	1,0
		% within bacterie	100,0%	0,0%	100,0%
	<i>Staphylococcus Spp.</i> or <i>Streptococcus Uberis</i> or <i>Other Streps.</i>	Count	1	0	1
		Expected Count	,6	,4	1,0
		% within bacterie	100,0%	0,0%	100,0%
	<i>Arcanobacterium Pyogenes</i> or <i>Klebsiella Edwardsii</i>	Count	0	1	1
		Expected Count	,6	,4	1,0
		% within bacterie	0,0%	100,0%	100,0%
<i>Corynebacterium Bovis</i> or <i>G+Bacillus</i> or <i>Klebsiella</i>	Count	1	0	1	
	Expected Count	,6	,4	1,0	
	% within bacterie	100,0%	0,0%	100,0%	
<i>Shigella</i> or <i>Klebsiella</i>	Count	2	0	2	
	Expected Count	1,2	,8	2,0	
	% within bacterie	100,0%	0,0%	100,0%	
<i>G+Coc</i>	Count	0	2	2	
	Expected Count	1,2	,8	2,0	
	% within bacterie	0,0%	100,0%	100,0%	
Total	Count	74	51	125	
	Expected Count	74,0	51,0	125,0	
	% within bacterie	59,2%	40,8%	100,0%	

Tabel 8.1 b: Kruistabel van de gedefinieerde bacteriën met de vindplaats in het uier (vervolg van tabel 8.1 a)



Figuur 3: Staafdiagram met weergave van de uitkomsten van tabel 8.1 a & b.

Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	18,575 <sup>a</sup>	14	,182
Likelihood Ratio	24,020	14	,046
Linear-by-Linear Association	,565	1	,452
N of Valid Cases	125		

a. 25 cells (83,3%) have expected count less than 5. The minimum expected count is ,41.

Tabel 8.2:  $\chi^2$ -test behorende bij tabel 8.1 a & b. Er is geen verband aangetoond tussen de kwartieren en een bacteriële besmetting  $\chi^2(14)=18.575$ ,  $0.1 < p < 0.25$ .<sup>11</sup>