

Noodzakelijke stappen naar een daling van het antibioticumgebruik op de Vlaamse melkveebedrijven - Deel 3: sneltesten voor kiemdetectie

Necessary steps towards antibiotic reduction on Flemish dairy farm - Part 3: rapid tests for microbial identification

L. Creytens, S. Piepers, S. De Vliegher, K. Mertens

M-teamUGent, Vakgroep Interne Geneeskunde, Voortplanting en Populatiegeneeskunde, Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent, Salisburylaan 133, 9820 Merelbeke, België

Lien.Creytens@UGent.be

SAMENVATTING

De landbouwsector staat al enige tijd onder druk wat betreft het overvloedige gebruik van antibiotica. Daarom wordt in de melkveesector via het selectief droogzetten en het selectief behandelen van niet-ernstige klinische mastitis bijgedragen tot het noodzakelijk reduceren en het meer verantwoord gebruik van antibiotica. Sneltesten voor kiemdetectie in de melk, die – mits een gedegen opleiding, kwaliteitscontrole en een kleine investering – snel en gemakkelijk in te zetten zijn op dierenartsenpraktijken en melkveebedrijven, zijn hiervoor een handige tool aangezien ze als basis kunnen dienen voor het selectief droogzetten en selectief behandelen van niet-ernstige klinische mastitis. Verschillende soorten sneltesten zijn voorhanden, elk met hun eigen specifieke eigenschappen en testkarakteristieken. Sneltesten komen voor onder de vorm van specifieke agars, Petrifilms™, welletjes, microchips en zelfs PCR-testen. Sommige testen bezitten een inherent antibiogram en/of volautomatische aflezing via specifieke software. Er bestaan eenvoudige sneltesten waarbij het resultaat de kiemgroei kan classificeren als polybacterieel, geen groei, groei van een grampositieve kiem of groei van een gramnegatieve kiem. Deze testen volstaan om te beslissen of een koe met niet-ernstige mastitis of bij het droogzetten al dan niet met antibiotica kan behandeld worden. Andere, meer gesofisticeerde testen gaan verder in kiemdifferentiatie tot op genus- of zelfs speciesniveau, wat andere beslissingen met betrekking tot het behandelen en uiergezondheidsmanagement toelaat. Elke geïnteresseerde gebruiker dient na te gaan welke sneltest het beste aansluit bij zijn/haar noden.

ABSTRACT

The agricultural sector has been under pressure regarding the excessive use of antibiotics. In the dairy sector, selective dry cow therapy and selective treatment of non-severe clinical mastitis therefore contribute to the necessary reduction in and more responsible use of antibiotics. Rapid testing of milk samples for bacteriological culture, that – with proper training, quality control and a small investment – can be used quickly and easily at veterinary practices and dairy farms, is a useful tool in this respect as it can serve as a basis for selective dry cow treatment and selective treatment of non-severe clinical mastitis. Different types of rapid tests are available, each with its specific traits and test characteristics. Rapid tests are available as specific agars, Petrifilms™, wells, microchips and even as PCR tests. Some of them have an inherent antibiogram and/or fully automatic reading through specific software. Simple tests classify the sample growth as contaminated, no growth, growth of gram-positive or growth of gram-negative bacteria. These tests are sufficient to decide whether or not a cow should be treated with

antibiotics when suffering from non-severe clinical mastitis or at dry-off. Other more sophisticated tests allow for differentiation on genus or even species level, facilitating different decisions regarding treatment and udder health management. Every interested user has to determine which rapid test best suits his/her needs.

INLEIDING

Zowel voor het selectief droogzetten als voor het selectief behandelen van niet-ernstige klinische mastitis kunnen sneltesten voor kiemdetectie in melkstalen worden ingezet. Een sneltest is een test die mits een minimale uitrusting in de dierenartsenpraktijk of op het melkveebedrijf kan uitgevoerd worden en waarvan het resultaat in één oogopslag kan afgelezen worden.

Er zijn verschillende soorten sneltesten voor de identificatie van mastitisverwekkers voorhanden op de markt, elk met hun eigen karakteristieken. In dit artikel wordt een overzicht gegeven van een aantal sneltesten en wordt ingegaan op de praktische bruikbaarheid ervan binnen de concepten selectief droogzetten en selectief behandelen. Door gebruik te maken van sneltesten bij selectief droogzetten, kan men - naast celgetalmetingen en/of het gebruik van de CMT (California Mastitis Test) en/of het gebruik van standaard bacteriologie - vlak voor het droogzetten nagaan of een koe/een kwartier geïnfecteerd is met een major pathogeen (Cameron et al., 2013; Swinkels et al., 2021). De sneltesten helpen bij het nemen van de beslissing om een koe al dan niet met antibiotica droog te zetten. Bij het selectief behandelen van niet-ernstige klinische mastitis worden sneltesten enerzijds gebruikt om te beslissen of een koe al (in geval van een grampositieve kiem of bij contaminatie van het staal) dan niet (in geval van een gramnegatieve kiem of geen groei op de sneltest) met antibiotica behandeld zal worden. Anderzijds kunnen de sneltesten ook helpen bij de keuze van het te gebruiken antibioticum (de Jong et al., 2023). Beide concepten werden reeds in de eerste twee delen van deze artikelreeks over antibioticumgebruik bij melkvee uitgebreid beschreven (Cretyens et al., 2023; Cretyens et al., 2024).

SNELTESTEN

Benodigheden

Voor het uitvoeren van sneltesten voor kiemdetectie is slechts een minimale investering nodig. Een propere ruimte waar werken in quasi-steriele omstandigheden mogelijk is, is een eerste vereiste. Daarnaast is het ook noodzakelijk om over een incubator te beschikken. De vereisten voor een incubator zijn dat deze een constante temperatuur van 37°C kan aanhouden, dat deze proper is en blijft en dat er enkele testen tegelijk in kunnen geplaatst worden. Dit kan gaan van een meer geavanceerde (duurdere) in-

cubator, een test-specifieke incubator (bijvoorbeeld voor de MastaTest®, zie infra) tot een eenvoudige (en goedkopere) eierbroedstoof. Gezien de melkstalen en de meeste sneltesten gekoeld bewaard moeten worden, is ook een koelkast noodzakelijk. Steriele platen en reeds geïncubeerde platen dienen hier van elkaar gescheiden bewaard te worden. Verder moet ook klein labomateriaal aangekocht worden: alcohol om het werkblad en de handen te ontsmetten, handschoenen, steriele melkbuisjes en entnaalden. Voor het uitvoeren van additionele testen (zie infra) zijn draagglaasjes, gedemineraliseerd water, titerflesjes en de noodzakelijke testreagentia nodig. Tenslotte dient er ook rekening gehouden te worden met het correct verwerken van het afval. Melkstalen en gebruikt materiaal (sneltesten, entnaalden, draagglaasjes) dienen (na eventuele onderdompeling in bleekwater) bij het risicohoudend medisch afval (RMA) gedeponneerd te worden in een daarvoor voorziene RMA-container aangezien deze viraal, bacteriologisch of mycotisch besmet kunnen zijn (Handleiding beheer medische afvalstoffen, OVAM 2014).

Soorten sneltesten

Er zijn tal van commerciële sneltesten voor kiemdetectie voorhanden. Deze testen kunnen zowel uit specifieke agars bestaan, als uit een Petrifilm™, welletjes, microchips of een PCR--test (Ganda et al., 2016; Kiku et al., 2021; Leimbach en Krömker, 2018a; Mansion-de Vries et al., 2014a; Royster et al., 2014). Bij sommige testen wordt zelfs terzelfder tijd de antimicrobiële gevoeligheid van de geïdentificeerde kiem bepaald, hetgeen kan helpen bij de keuze van de meest geschikte behandeling (Bates et al., 2020; Jones et al., 2019).

Identificatie van (de) kiem(en) gebeurt aan de hand van (NMC, 2017; Heuvelink en Lam, 2017):

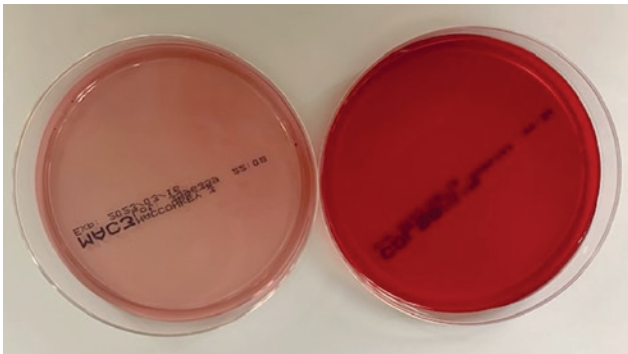
- (1) de aanwezigheid van groei al dan niet op een specifiek medium (agars, welletjes en Petrifilm™),
- (2) de morfologie van de kolonie (agars),
- (3) kleurverandering van de kolonies (chromogene agars),
- (4) colorimetrische analyse (welletjes),
- (5) hemolysepatroon,
- (6) additieve testen (agars) en/of
- (7) de aanwezigheid van bacterie-specifieke DNA-fragmenten (PCR).

De meeste sneltesten dienen gedurende 18 tot 24 uur geïncubeerd te worden bij een temperatuur van 37°C. Voor sommige traag groeiende bacteriën, zoals *Trueperella pyogenes*, *Corynebacterium* spp. en

Tabel 1. Opsomming van de beschikbare sneltesten, aan- of afwezigheid van een antibiogram en tot op welk niveau de kiemen op het eerste zicht gedifferentieerd kunnen worden.

Test	Type	Antibiogram	Minimale Incubatietijd	Kiemen	Bron
Minnesota Easy® bi-plate	Plaat met 2 agars	Nee	18-24u	Gr-, Gr+, PB	Lago et al., 2011a; c; Royster et al., 2014
Minnesota Easy® tri-plate	Plaat met 3 agars	Nee	18-24u	Gr-, <i>S. agalactiae</i> , andere streptokokken, <i>S. aureus</i> , andere stafylokokken, PB	Royster et al., 2014; Jones et al., 2019
VétoSlide®	Testbuis met 2 agars	Nee	18-24u	Gr-, <i>E. coli</i> , Gr+, PB	Malcata et al., 2021
VetoRapid®	Plaat met 3 agars	Nee	18-24u	<i>E. coli</i> , andere Gr- en coliformen, <i>S. aureus</i> , NAS, <i>S. uberis</i> , enterokokken, <i>S. dysgalactiae</i> , <i>S. agalactiae</i> , PB	Viora et al., 2014
MicroMast	Plaat met 3 agars	Nee	18-24u	Gr-, streptokokken, <i>S. aureus</i> , NAS, gisten, PB	www.micromast.com Geen peer-reviewed wetenschappelijke publicatie beschikbaar
Accumast®	Plaat met 3 agars	Nee	18-24u	<i>E. coli</i> , andere Gr- en coliformen, <i>Pseudomonas spp.</i> , <i>S. uberis</i> , andere streptokokken, enterokokken, <i>Lactococcus lactis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. haemolyticus</i> , andere stafylokokken, PB	Ganda et al., 2016; Ferreira et al., 2018
Check-Up®	Plaat met 4 agars	Nee	18-24u	<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella spp.</i> , <i>Pseudomonas spp.</i> , andere Gr-, <i>S. uberis</i> , <i>S. dysgalactiae</i> , <i>S. agalactiae</i> , <i>S. aureus</i> , NAS, andere Gr+, gisten en schimmels	McDougall et al., 2018
AC-3M™-Petrifilm™	Petrifilm	Nee	18-24u	Aerobe kiemen	McCarron et al., 2009; Mansion-de Vries et al., 2014b
CC-3M™-Petrifilm™	Petrifilm	Nee	18-24u	Coliformen	McCarron et al., 2009; Mansion-de Vries et al., 2014a
MastDecide®	2 welletjes	Nee	14u	Gr- en Gr+	Leimbach and Krömker, 2018a
Point of Cow®	Microchip	Nee	16u	Gr- en Gr+	www.pointofcow.dk Geen peer-reviewed wetenschappelijke publicatie beschikbaar
MastaTest®	24 welletjes	Ja, beperkt	24u	Coliformen, <i>Klebsiella spp.</i> , andere Gr-, <i>S. uberis</i> , <i>S. dysgalactiae</i> , <i>Streptococcus spp.</i> , <i>S. aureus</i> , NAS en andere Gr+	Jones et al., 2019; Bates et al., 2020
Speed Mam Color™	23 welletjes	Ja, uitgebreid	Antibiotica-gevoeligheid: 24u Kiemgroei: 48u <i>Mycoplasma spp.</i> : 7d	<i>E. coli</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas spp.</i> , <i>S. uberis</i> , streptokokken, enterokokken, stafylokokken, <i>Mycoplasma spp.</i> en <i>Listeria spp.</i>	www.virbac.com Geen peer-reviewed wetenschappelijke publicatie beschikbaar
Acumen®	PCR-test	Nee	3u	<i>S. aureus</i> , <i>S. uberis</i> , <i>Mycoplasma bovis</i> , andere <i>Mycoplasma spp.</i> en <i>Prototheca spp.</i>	www.acumendetection.com Geen peer-reviewed wetenschappelijke publicatie beschikbaar

PB: polybacterieel (3 of meer fenotypisch verschillende kolonies), Gr-: gramnegatieve bacteriën, Gr+: grampositieve bacteriën, *E. coli*: *Escherichia coli*, *S. uberis*: *Streptococcus uberis*, *S. agalactiae*: *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae*: *Streptococcus dysgalactiae*, *S. aureus*: *Staphylococcus aureus*, NAS: non-*aureus* stafylokokken, *S. haemolyticus*: *Staphylococcus haemolyticus*.



Figuur 1. Bloedagar (rechts) en MacConkey No.3 (links)



Figuur 2. Minnesota Easy® culture system. Links: bi-plaat, rechts: tri-plaat

Prototheca spp., is echter een langere incubatietijd (48 uur) nodig. Wanneer er een vermoeden is van een infectie met *Mycoplasma* spp. is het aangeraden om alsnog een melkstaal naar een gespecialiseerd labo op te sturen of de Acumen MYCOB™ (zie infra) te gebruiken aangezien *Mycoplasma* spp. kiemspecifieke kweekomstandigheden of een PCR-test vragen (NMC, 2017; Heuvelink en Lam, 2017).

In Tabel 1 wordt een korte samenvatting weergegeven van de meest gebruikte sneltesten en hun beschrijving.

Bloedagar en MacConkey-agar No.3

De combinatie van een bloedagarplaat met 5% schapebloed en een MacConkey agar No.3 is misschien wel de meest bekende test die in de praktijk gebruikt wordt (Figuur 1). De bloedagar (al of niet met esculine) is op zich ook voldoende om een diagnose te stellen aangezien dit een niet-selectieve groeibodem is, waar quasi alle micro-organismen op groeien. De combinatie met een MacConkey-agar (waar enkel gramnegatieve kiemen met uitzondering van de *Pasteurella* spp. op groeien) maakt het evenwel eenvoudiger om in één oogopslag te oordelen of het om een infectie met een grampositieve of een gramnegatieve kiem gaat. Bij groei op beide platen kan uit gegaan worden van de aanwezigheid van een gramnegatieve kiem, terwijl enkel groei op de bloedagar in de richting van een grampositieve kiem wijst. Daarnaast kunnen de kiemen op de bloedagar verder gedifferentieerd worden aan de hand van additieve testen. Het niet-selectieve karakter van de bloedplaat maakt het

daarenboven ook gemakkelijker om gecontamineerde stalen (= wanneer drie of meer fenotypisch verschillende kolonies zichtbaar zijn) te detecteren, dit in vergelijking met de meer selectieve agars.

Minnesota Easy® culture system

Het zogenaamde “Minnesota Easy® culture system” (University of Minnesota, St.Paul, USA) is beschikbaar in een bi- of een tri-plaat en bestaat uit een petrischaal met respectievelijk twee en drie sectoren (Figuur 2). De bi-plaat bestaat uit een McConkey-agar (selectief voor groei van gramnegatieve bacteriën) en een factor-agar (selectief voor de groei van grampositieve bacteriën) (Lago et al., 2011b; Royster et al., 2014). De tri-plaat heeft naast de McConkey- en de factor-agar nog een gemodificeerde TKT (Edwards)-agar (MTKT), selectief voor de groei van katalasenegatieve kokken, waartoe streptokokken en streptokokachtigen, zoals enterokokken en lactokokken, behoren (Royster et al., 2014). Dit laat bij een grampositieve groei toe om een streptokok (groei op zowel de MTKT- als de factor-agar), een *Streptococcus agalactiae* (naast groei op zowel de MTKT- als de factor-agar, ook volledige hemolyse te zien), een stafylokok (enkel groei op de factor-agar) of een *Staphylococcus aureus* (enkel groei op de factor-agar, met dubbele hemolyse) te onderscheiden. Beide types agarplaten zijn betrouwbaar (Tabel 2) wat betreft het identificeren van geen groei, de groei van grampositieve kiemen, de groei van gramnegatieve kiemen of een polybacteriële groei (= gecontamineerd melkstaal). Voor verdere differentiatie op genus- (bijvoorbeeld stafylokokken) en speciesniveau (bijvoorbeeld *Staphylococcus aureus*) is de tri-plaat de betere keuze (Royster et al., 2014).

VetoSlide® en VetoRapid® (Vetoquinol)

Binnen het gamma van Vetoquinol zijn twee sneltesten voor kiemdetectie te verkrijgen. De VetoSlide®-test (Vetoquinol, Niel, België) bestaat uit een buisje met een draagglas waarop aan de ene zijde een groeimedium specifiek voor grampositieve kiemen (roze) aangebracht is en op de andere zijde een groeimedium specifiek voor gramnegatieve (groen) kiemen (Figuur 3). Identificatie tot op kiemniveau kan enkel voor *Escherichia coli* doordat deze kolonies een roze kleur hebben bij groei op het gramnegatieve medium. Diagnosestelling via de VetoSlide®-test is hierdoor vrij beperkt maar volstaat om een beslissing te nemen bij het selectief behandelen van niet-ernstige klinische mastitis (Malcata et al., 2021; Creytens et al., 2024).

De VetoRapid®-test (Vetoquinol, Niel, België) bestaat uit een petrischaal met drie verschillende sectoren: een op maat gemaakte agar (met galzouten en vancomycine) specifiek voor de groei van gramnegatieve kiemen, een gemodificeerde mannitol-zout-agar (MSA) selectief voor de groei van stafylokokken en een gemodificeerde Edwards-agar specifiek

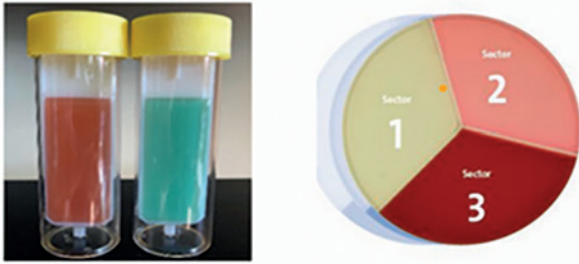
voor de groei van streptokokken (Viora et al., 2014) (Figuur 3). Deze drie selectieve agars maken van de VetoRapid®-test een vrij selectieve sneltest met de mogelijkheid tot verdere differentiatie van de aanwezige kiemen aan de hand van de aanwezigheid van kiemgroei op een specifieke agar, de kleurverandering van de agar na incubatie, de kleur van de kolonies na incubatie en de aan- of afwezigheid van hemolyse. Zo zullen (na 18-24 uur incubatie) op de gramnegatieve sector kolonies van *E. coli* blauw gekleurd zijn, kolonies van de niet-coliforme enterobacteriaceae (zoals

Klebsiella spp., *Serratia* spp., *Enterobacter* spp. en *Citrobacter* spp.) rood-paars gekleurd zijn en kolonies van niet-enterobacteriaceae (zoals *Pseudomonas* spp., *Proteus* spp., *Pasteurella* spp. en *Actinobacter* spp.) wit/geel gekleurd zijn. Onderscheid kan gemaakt worden tussen *S. aureus* en de andere stafylokokken (denon-*aureus*-stafylokokken of NAS) op basis van mannitolfermentatie. *Staphylococcus aureus* kan mannitol fermenteren, waardoor de MSA-agar geel verkleurt na 18-24 uur incubatie, terwijl de meeste NAS geen mannitol kunnen fermenteren en de agar

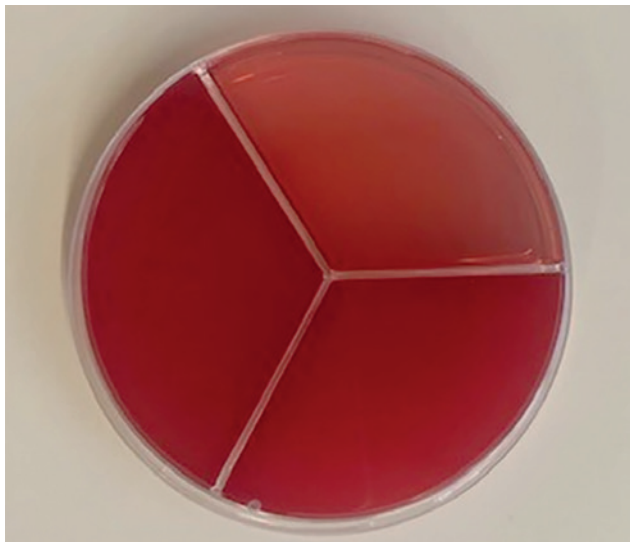
Tabel 2. Opsomming van de sneltesten met hun testkarakteristieken.

Test	Kiem	Se	Sp	PVW	NVW	Bron
Minnesota Easy® bi-plate		0,78 0,80-0,85	0,83 0,79-0,87	0,74 0,92-0,95	0,86 0,64-0,85	Lago et al., 2011a; c Royster et al., 2014
Minnesota Easy® tri-plate		0,80-0,86 0,78	0,76-0,93 0,78	0,91-0,97 0,71	0,62-0,66 0,84	Royster et al., 2014 Jones et al., 2019
VetoSlide®	Gramnegatief <i>Escherichia coli</i> Grampositief	0,83 0,84 0,82	0,94 0,97 0,77	0,93 0,96 0,76	0,87 0,91 0,83	Malcata et al., 2021 Malcata et al., 2021 Malcata et al., 2021
VetoRapid®	<i>Escherichia coli</i> Non- <i>aureus</i> Stafylokokken <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus uberis</i> Enterokokken	0,58 0,28 0,65 0,84 0,17	0,98 0,93 0,94 0,92 0,93	0,72 0,37 0,52 0,48 0,11	0,96 0,90 0,96 0,99 0,96	Viora et al., 2014 Viora et al., 2014 Viora et al., 2014 Viora et al., 2014 Viora et al., 2014
MicroMast		/	/	/	/	www.micromast.com Geen peer-reviewed wetenschappelijke publicatie beschikbaar
Accumast®		0,98 0,82	0,84 0,9	0,80 0,94	0,98 0,72	Ferreira et al., 2018 Ganda et al., 2016
Check-Up®	<i>Staphylococcus aureus</i> Andere Gram-positieve kiemen Gramnegatief Polybacterieel	0,64 0,82 0,79 0,05	0,92 0,52 0,94 0,95	0,44 0,64 0,39 0,13	0,96 0,73 0,99 0,88	McDougall et al., 2018 McDougall et al., 2018 McDougall et al., 2018 McDougall et al., 2018
AC-3M™-Petrifilm™		0,85	0,75	0,70	0,88	Mansion-de Vries et al., 2014
CC-3M™-Petrifilm™		0,9	0,88	0,71	0,96	Mansion-de Vries et al., 2014
MastDecide®		0,81	0,71	0,81	0,71	Leimbach en Krömker, 2018a
Point of Cow®		/	/	/	/	www.pointofcow.dk Geen peer-reviewed wetenschappelijke publicatie beschikbaar
MastaTest®	Algemeen <i>Streptococcus uberis</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	0,95 0,88 0,88	0,72 0,80 0,96	/ / /	/ / /	Jones et al., 2019
Speed Mam Color™		0,92	0,96	/	/	www.virbac.com Geen peer-reviewed wetenschappelijke publicatie beschikbaar
Acumen MYCOB™	<i>Mycoplasma bovis</i>	0,98	1	/	/	www.acumendetection.com Geen peer-reviewed wetenschappelijke publicatie beschikbaar

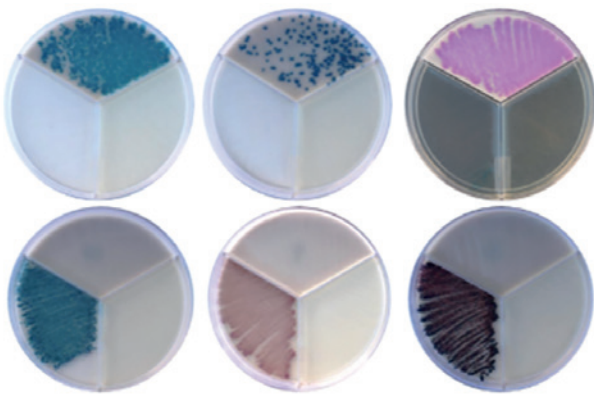
Se= sensitiviteit; Sp= specificiteit; PVW= positief voorspellende waarde, NVW= negatief voorspellende waarde.



Figuur 3. Vetoslide® (links) en Vetorapid® (rechts)



Figuur 4. MicroMast



Figuur 5. Accumast® -platen



Figuur 6. Check-up®

duis roze zal blijven na incubatie. Echter, sommige NAS-species zijn ook in staat om mannitol te fermenteren en sommige *S. aureus*-stammen kunnen juist geen mannitol fermenteren. Om deze reden is het aanbevolen om de kolonies op het stafylokokkendeele aan een tweede test zoals de agglutinatie-test, te onderwerpen (Boerlin et al., 2003; De Visscher et al., 2013; Kateete et al., 2010). Differentiatie van de streptokokken kan gebeuren door (1) de aanwezigheid van groei op de gemodificeerde Edward-agar, (2) de morfologie van de kolonie, (3) de kleur van de agar onder UV-licht (esculine-hydrolyse) en (4) het type hemolyse. Zo kan onderscheid gemaakt worden tussen esculine-positieve kokken (*Streptococcus uberis* en enterokokken) en de esculinenegatieve kokken *S. dysgalactiae* en *Streptococcus agalactiae* (Viora et al., 2014). Het selectieve karakter van de drie sectoren maakt het evenwel moeilijker om gecontamineerde stalen te detecteren via deze test; dit in vergelijking met bijvoorbeeld de MicroMast-test (zie infra), die een niet-selectieve agar bevat waarop contaminatie snel en in één oogopslag kan gedetecteerd worden.

MicroMast

Een derde sneltest bestaande uit drie verschillende agars is het Tsjechische product MicroMast (MicroMast, Světlá nad Sázavou, Tsjechië) (Figuur 4). Deze sneltest bestaat uit een niet-selectieve bloedagar waarop alle mastitisverwekkers behalve *Mycoplasma* spp. kunnen groeien, een selectieve agar voor grampositieve kiemen en een McConkey-agar selectief voor de groei van gramnegatieve kiemen. Dankzij de niet-selectieve bloedagar is het mogelijk om gecontamineerde (drie of meer verschillende types kolonies te zien) melkstalen (bijvoorbeeld door onhygiënische staalname) gemakkelijk te detecteren. Ook gisten en schimmels groeien op deze agar. Verdere differentiatie bij de grampositieve kiemen kan door de aanwezigheid van (dubbele) hemolyse en door het uitvoeren van additionele testen (zoals de katalase- en agglutinatie-test). Zo kan er bij de groei op het grampositieve deel verder onderscheid gemaakt worden tussen streptokokken, NAS en *S. aureus*. Er kan ook gekozen worden voor de variant van de plaat waaraan esculine werd toegevoegd aan de sector voor grampositieve groei om verdere differentiatie tussen de streptokokken toe te laten.

Accumast®

Ook Accumast® (FERA Animal Health LCC, Itasca, USA) is een sneltest die uit drie verschillende selectieve media bestaat: een groeimedium voor stafylokokken, een groeimedium voor streptokokken en een groeimedium voor gramnegatieve kiemen (Figuur 5). Deze media zijn daarenboven chromogeen, wat wil zeggen dat bepaalde kiemen verschillende koloniekleuren zullen aannemen bij groei (Ganda et al., 2016). Deze kleurverandering maakt dat het stellen

van een diagnose tot op kiemniveau gemakkelijk in één oogopslag kan gebeuren (Ferreira et al., 2018). Zo zullen bijvoorbeeld *E. coli* een roze kleur, *Klebsiella* spp. een blauwe kleur en *Pseudomonas* spp. een witte kleur aannemen bij groei op de agar voor gram-negatieve kiemen. Op de stafylokokken-groeibodem zal *S. aureus* dan weer een roze kleur en andere stafylokokken dan *S. aureus* een andere kleur dan roze aannemen. Bij de streptokokken-groeibodem zullen streptokokken blauw en enterokokken roze aankleuren (Tabel 1).

Check-up®

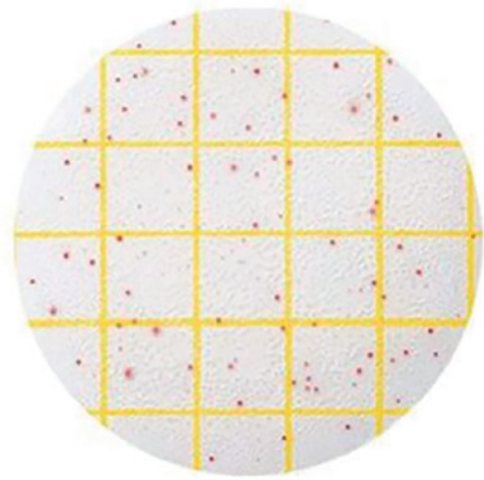
Deze selectieve sneltest wordt door Semex™ (Morrinsville, Nieuw-Zeeland) geproduceerd en heeft vier verschillende sectoren op één plaat: een chromogene agar selectief voor grampositieve groei, een chromogene agar selectief voor gramnegatieve groei, een agar voor gisten en schimmels en ten slotte een bloedagar met esculine (Figuur 6). Identificatie van de kiem gebeurt bij deze sneltest aan de hand van (1) de aan- of afwezigheid van groei op een bepaalde agar, (2) de kleur van de kolonie (3) de capaciteit tot esculine-hydrolyse en (4) de aan- of afwezigheid van (dubbele) hemolyse (Tabel 1).

3M™ Petrifilms™

Er bestaan verschillende soorten 3M™ Petrifilms™ (M Microbiology, St. Paul, USA) waarvan de Aerobic Count (AC) en de Coliform Count (CC) de belangrijkste zijn met het oog op het selectief behandelen (Figuur 7). Op de AC Petrifilm™ groeien alle aerobe kiemen, op de CC Petrifilm™ groeien enkel coliforme kiemen. Elke test heeft een indicatorvloeistof, waardoor het tellen van kolonies gemakkelijker gemaakt wordt doordat deze een kleur krijgen. Om een koe met klinische mastitis aan een behandelingsprotocol (al of niet met antibiotica behandelen) toe te kunnen wijzen, moet bij een melkstaal zowel de AC- als de CC-test uitgevoerd worden. Wanneer enkel de AC-test positief is, spreekt men van een grampositieve kiem en wanneer zowel de AC- als de CC-test positief zijn, is er sprake van de groei van gramnegatieve bacteriën. In een studie van McCarron et al. (2009) werd aangetoond dat de beste resultaten behaald worden wanneer een AC-test als positief beschouwd wordt vanaf vijf kolonies, een CC-test vanaf twintig kolonies en waarbij van het melkstaal een 1:10-verdunning gemaakt wordt met steriel water om debris op het testmedium te voorkomen (McCarron et al., 2009).

MastDecide®

Het Duitse MastDecide® (Quidee GmbH, Homburg, Duitsland) bestaat -in tegenstelling tot de vorige sneltesten- niet uit een agar, maar uit twee welletjes



Figuur 7. 3M™ Petrifilm™ AC



Figuur 8. MastDecide®

met daarin een testmedium dat roze kleurt bij kiemgroei na incubatie (Figuur 8). Wanneer beide tubes roze verkleuren dan is dit indicatief voor de groei van grampositieve kokken, roze verkleuring van slechts één tube wijst in de richting van coliformen. Wanneer geen van beide tubes roze verkleurt na incubatie, is dit suggestief voor de afwezigheid van bacteriegroei. Bacteriegroei kan echter niet volledig uitgesloten worden, aangezien *Prototheca* spp., *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp. en *Trueperella pyogenes* niet kunnen groeien in het medium (Leimbach en Krömker, 2018a). Ook gecontamineerde melkstalen worden via deze test niet gedetecteerd. Deze test is na een relatief korte incubatietijd af te lezen, volstaat om basisbeslissingen te nemen rond het al dan niet met antibiotica behandelen bij niet-ernstige klinische mastitis en is gemakkelijk op melkveebedrijven te gebruiken (Leimbach en Krömker, 2018a).



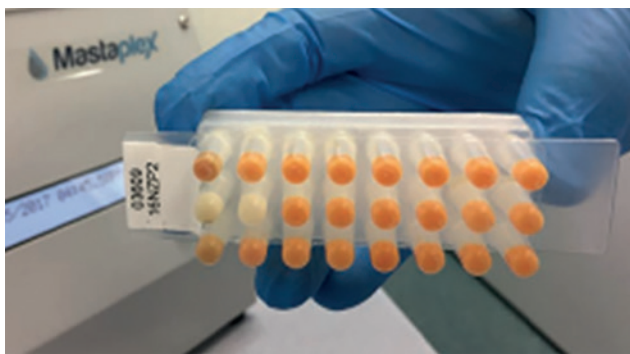
Figuur 9. Point of Cow®

Point Of Cow®

Point Of Cow® is een Deense sneltest (Point of Cow, Glostrup) die bestaat uit een wegwerpbare microchip, waarop een melkdruppel moet aangebracht worden (Foto 9). De chip bevat een reagens waardoor bacteriën groeien. Na 16 uur incuberen in een daarvoor voorziene mini-incubator of een gewone incubator, geeft de chip een indicatie of er bacteriële groei is en of er sprake is van grampositieve of gramnegatieve bacteriën. Net als bij de MastDecide®, worden gecontamineerde melkstalen bij de Point Of Cow® niet gedetecteerd.

Mastatest®

De Nieuw-Zeelandse Mastatest® (Mastaplex Ltd, Dunedin, Nieuw-Zeeland) is een gemodificeerde ELISA-test en bestaat uit 24 welltjes met media die van kleur veranderen wanneer een specifieke bacterie aanwezig is (Figuur 10). Zes van de 24 welltjes geven bacteriegroei aan. Bij groei is detectie van *S. uberis*, *S. dysgalactiae*, andere *Streptococcus* spp., *S. aureus*, NAS, 'andere grampositieve bacteriën, *Klebsiella* spp. en coliformen/gramnegatieve kiemen mogelijk. Aan de hand van de andere 18 welltjes wordt de minimaal inhibitorische concentratie (MIC) voor benzylpenicilline, cloxacilline en tylosine bepaald, zodat in gevallen van een infectie met een grampositieve kiem ook de antibioticumkeuze mee kan gestuurd worden. Melk wordt via een patroon in de welltjes aangebracht waarna de welltjes gedurende 24 uur in een speciaal voorziene incubator (Lapbox™) gezet worden. Beelden van de kleurveranderingen in de welltjes worden via de incubator naar de bijhorende software verzonden die via een automatisch analytisch algoritme de test afleest en de resultaten per mail doorstuurt naar de veehouder en/of de dierenarts. De kans op misinterpretatie van de resultaten wordt op deze manier gereduceerd in vergelijking met sneltesten die met het blote oog afgelezen worden (Bates et al., 2020; Jones et al., 2019). Doordat de resultaten automatisch afgelezen worden (kleine kans op misinterpretatie) en doordat er geen eventuele additieve testen hoeven gedaan te worden met levende kiemen (elke manipulatie met levende kiemen houdt immers een risico in), is deze test zeer gemakkelijk en veiliger in te zetten op melkveebedrijven.



Figuur 10. Mastatest®

Speed Mam Color™ (Virbac)

Deze sneltest bestaat, net als de Mastatest®, uit welltjes waarin bacteriegroei en antibioticumgevoeligheid getest worden (Figuur 11). Speed Mam Color™ (Virbac, Carros, Frankrijk) is een arbeidsintensievere test. Melk wordt toegevoegd aan een flacon met kweekmedium waarna dit in elk van de 23 welltjes ingebracht wordt. Daarna voegt men het supplement voor stafylokokkenidentificatie en paraffineolie



Figuur 11. Speed Mam Color™



Figuur 12. Acumen®

toe in de aangegeven welletjes. Na 24 uur incubatie kan ook de gevoeligheid voor 14 antibiotica en antibioticacombinaties afgelezen worden, na nog eens 24 uur incuberen, kan de groei van acht bacteriën geïdentificeerd worden. De identificatie van bacteriegroei is mogelijk voor stafylokokken, streptokokken, *S. uberis*, *E. coli*, *Enterobacteriaceae*, enterokokken, *Mycoplasma* spp. (na zeven dagen incuberen) en *Pseudomonas* spp.. Een welletje wordt als positief beschouwd als de rode kleur na incubatie omgeslagen is naar geel. Bacteriegroei kan pas na 48 uur afgelezen worden, waardoor deze test in mindere mate als een “sneltest” kan worden beschouwd. De interpretatie van de resultaten is bij deze test ook niet altijd eenduidig, aangezien de beoordeling van de kleurverandering onderhevig is aan subjectiviteit.

Acumen®

Acumen® (Acumen Detection, Syracuse, USA) is een real-time-PCR-test die binnen de drie uur bacterie-specifieke DNA-fragmenten (oligonucleotiden) in de melk detecteert (Figuur 12). De melk wordt voorbereid door deze in een welletje te doen en een lysaat toe te voegen. Daarna wordt het PCR-reagens toegevoerd en wordt het welletje in een daarvoor voorziene incubator geplaatst. Zo zijn er kits beschikbaar voor de detectie van stafylokokken (STAPH), streptokokken (STREP), *Mycoplasma bovis* (MYCOB™), *Mycoplasma* spp. gecombineerd met *Prototheca* spp. (MYPRO™) en voor de detectie van *S. aureus* gecombineerd met *S. uberis* (SASUB™). Acumen® is de enige beschikbare sneltest die een snelle detectie van *Mycoplasma bovis* toelaat.

Eigenschappen van sneltesten

Het grote voordeel van sneltesten voor kiemdetectie is dat het resultaat (zowel van de kiem als van een eventueel antibiogram) sneller kan geleverd worden aan de gebruiker dan het geval is bij uitgebreid onderzoek van melkstalen uitgevoerd door conventionele laboratoria. Waar het bij conventionele laboratoria vaak enkele dagen duurt voordat het resultaat bij de gebruiker terechtkomt (omdat het transporteren van het melkstaal van het melkveebedrijf tot aan het laboratorium enige tijd in beslag kan nemen), kan een sneltest meestal na 18 tot 24 uur incuberen reeds worden afgelezen en krijgt men een initiële indicatie van het type mastitisverwekker. De sneltesten zijn inzetbaar in de dierenartsenpraktijken en afhankelijk van het gebruiksgemak ook op melkveebedrijven. Hierdoor verliest men geen tijd voor lang transport naar regionale laboratoria. Dit maakt dat er sneller kan overgegaan worden tot het nemen van gerichte, goed onderbouwde (behandel-)beslissingen in verband met de uiergezondheid.

Naast het snel leveren van een resultaat, moet de sneltest gemakkelijk visueel af te lezen zijn. Door gebruik te maken van selectieve agars, chromogene

agars (agars die bij incubatie van kleur veranderen bij de groei van een bepaald type kiem) en soms zelfs volautomatische aflezing, wordt het interpreteren van de resultaten gemakkelijker gemaakt (Viora et al., 2014; Ganda et al., 2016; Jones et al., 2019). Om het selectief behandelen van niet-ernstige klinische mastitis toe te passen, volstaat het om te weten of de kiem grampositief dan wel gramnegatief is. In dit opzicht is het enten van melk op bijvoorbeeld een gewone bloedagar en een McConkey-agar voldoende. Wil men echter de kiemen verder differentiëren, dan zijn meer selectieve sneltesten aan de orde. Zo laat een agar die mannitol bevat (bijvoorbeeld in de Vetorapid®), de identificatie van *S. aureus* sneller toe doordat de groeibodem van roze naar geel verkleurt (Viora et al., 2014). Naast selectieve groeibodems kunnen ook additionele testen, zoals de agglutinatietest (onderscheid tussen NAS en *S. aureus*), de kaliumhydroxide-test (onderscheid tussen grampositief en gramnegatief) en de katalasetest (onderscheid tussen enerzijds streptokokken en streptokokachtigen zoals enterokokken en lactokokken, en anderzijds stafylokokken) meer informatie geven over de soort bacterie die groeit (Chauhan en Jindal, 2020). Wanneer twee (of drie bij sneltesten met een niet-selectieve plaat) of meer verschillende types kolonies geïdentificeerd kunnen worden, wordt het staal als polybacterieel of gecontamineerd beschouwd.

Testkarakteristieken

Elke sneltest heeft zijn eigen testkarakteristieken en voorspellende waarden. Indien de sneltesten enkel gebruikt worden om te beslissen of er al dan niet met antibiotica kan behandeld worden (niet-ernstige klinische mastitis), dan volstaat het om het resultaat te kunnen classificeren als polybacterieel, geen groei, groei van een grampositieve kiem (reincultuur) of groei van een gramnegatieve kiem (reincultuur). MastDecide®, Point of Cow®, VetoSlide® en Minnesota Easy® culture system bi-plaat zijn voorbeelden van sneltesten die volstaan voor het nemen van deze beslissingen.

Voor andere beslissingen zoals het afstemmen van het antibioticum op de meest voorkomende resistentiepatronen en het spectrum, de therapieduur, het al dan niet met antibiotica droogzetten van een koe of een kwartier en het optimaliseren van het uiergezondheidsmanagement (zoals het afzonderen en opruimen van dieren), is het aangeraden om gebruik te maken van een test waar verdere kiemdifferentiatie tot op genus- en zelfs speciesniveau mogelijk is zoals bij VetoRapid®, Accumast®, Check-up®, Mastatest®, Speed Mam Color™ en Acumen® (Lago en Godden, 2018).

In ideale omstandigheden wordt vooral naar de positief en negatief voorspellende waarden (PVW respectievelijk NVW) van de sneltesten gekeken. De PVW vertelt iets over de kans dat een koe/kwartier ook effectief geïnfecteerd is bij een positieve test, terwijl de NVW de kans weergeeft dat een koe/kwartier effectief niet geïnfecteerd is bij een negatieve test. Deze waarden zijn bij de sneltesten echter laag aan-

gezien ze sterk afhangen van de prevalentie en van de testkarakteristieken [sensitiviteit (Se) en specificiteit (Sp)]. Aangezien de prevalentie van mastitis verschilt van bedrijf tot bedrijf maar doorgaans niet zeer hoog is (Verbeke et al., 2014), is het beter vooral te focussen op de testkarakteristieken die niet afhangen van de prevalentie. Hoe hoger de Se, hoe hoger de kans dat wanneer een koe/kwartier geïnfecteerd is, de test ook effectief positief zal zijn en hoe lager de kans op een vals-negatief resultaat. Hoe hoger de Sp daarentegen, hoe hoger de kans dat wanneer een koe/kwartier niet geïnfecteerd is, de test ook effectief negatief zal zijn en hoe lager de kans op een vals-positief resultaat. In Tabel 2 wordt een overzicht gegeven van de snelsten met hun testkarakteristieken. Voor de uiergezondheid op een bedrijf is het van belang dat koegebonden pathogenen, zoals *S. aureus* en *S. agalactiae*, zeker gedetecteerd worden. Ook andere grampositieve major pathogenen, zoals *S. uberis* en *S. dysgalactiae*, worden het best herkend zodat de koe behandeld kan worden. In dit opzicht is een test die een hoge Se heeft voor grampositieve kiemen het meest geschikt, omdat er weinig vals-negatieve resultaten zijn en koeien die geïnfecteerd zijn met een grampositieve kiem een behandeling met antibiotica behoeven, bijgevolg ook zeker met antibiotica worden behandeld. Testen waarvan een hoge sensitiviteit voor grampositieve kiemen werd beschreven zijn onder andere Accumast® (algemene Se voor grampositieve kiemen van 98%), MastaTest® (algemene Se voor grampositieve kiemen van 95% en Se van 88% voor zowel *S. aureus* als *S. uberis*) en Speed Mam Color® (algemene Se voor grampositieve kiemen van 92%). Daarnaast mag Sp niet verwaarloosd worden om het hoofddoel van het selectief behandelen, namelijk het verminderen in antibioticumgebruik, niet te ondermijnen. Wanneer de Sp van een test laag is, wordt de kans groter dat koeien die niet-geïnfecteerd zijn met een grampositieve kiem, toch met antibiotica behandeld worden. Testen met elkaar vergelijken is niet eenvoudig. Voor de vergelijking van testen is het belangrijk om over een referentiemethode of gouden standaard te beschikken. Voor de identificatie van mastitisverwekkers wordt standaard bacteriologisch onderzoek nog steeds als de gouden standaard gezien, maar ook voor deze test zijn de sensitiviteit en specificiteit niet 100%. In een recente studie werd een vergelijking van de testkarakteristieken van MastaTest® en standaard bacteriologisch onderzoek gesimuleerd aan de hand van een gesofisticeerde statistische analyse (Jones et al., 2019). Er werden geen significante verschillen gevonden voor wat de detectie van *S. uberis*, *S. aureus* en coliformen betreft tussen beide testen. Verder onderzoek is nodig om het vermogen tot identificatie van de verschillende mastitisverwekkers van MastaTest® in het veld te evalueren. Om het doel van het selectief behandelen (namelijk gericht behandelen met antibiotica om zo tot een reductie in het gebruik en een tot een meer verantwoordelijk gebruik te komen) zo goed mogelijk na te streven, is een hoge algemene Sp van

de snelst nodig met betrekking tot het differentiëren van het grampositief of -negatief zijn van de infectie, met meer aandacht voor de gramnegatieve kiemen. VetoRapid® (98% Sp voor *E. coli*), Speed Mam Color™ (96% algemene Sp), VétoSlide (94% Sp voor gramnegatieven en 97% voor *E. coli*) en Check-Up® (94% Sp voor gramnegatieven) scoren hierbij het beste. Voor de detectie van *Mycoplasma bovis* is Acumen MYCOB™ de aangewezen test met hoge (door de producent beschreven) waarden voor zowel Se (98%) als voor Sp (100%) (Tabel 2). Deze laatste test werd in de wetenschappelijke literatuur nog niet beschreven. Bijgevolg is voorzichtigheid aangewezen bij het hanteren van deze cijfers.

Elke gebruiker dient voor zichzelf na te gaan welke snelst het beste zijn/haar verwachtingen invult, rekening houdend met de testkarakteristieken maar daarnaast ook met de kostprijs, leveringsvoorwaarden en het gebruiksgemak.

TRACEERBAARHEID, DATAVERWERKING EN RAPPORTAGE AAN DE KLANT

Even belangrijk als het aseptisch nemen van het melkstaal en steriel uitvoeren van de snelst, is de correcte identificatie van de melkstalen en de snelsten. Minimale identificatie op elk melkstaal en op elke snelst houdt in: (1) datum van de staalname/enting van de snelst, (2) koe-identificatie, (3) identificatie veehouder, (4) kwartierpositie, (5) klinische mastitis of ter beslissing van selectief droogzetten en (6) eventueel een dossiernummer bij de snelst indien met labosoftware gewerkt wordt. Identificatie kan gebeuren aan de hand van een sticker of met een permanente markerstift. Bij agarplaten dient erop gelet te worden dat de identificatie gebeurt aan de onderzijde van de agar en niet op het dekseltje zodat er nadien bij het aflezen geen verwisseling tussen verschillende testen mogelijk is.

Het verzamelen en verwerken van de data kunnen gebeuren aan de hand van gespecialiseerde labosoftware [zoals MEX@LAB® (Mexcellence BV, België), inherente software zoals bij de MastaTest®] of softwareprogramma's die op de melkveebedrijven gebruikt worden (zoals Unifarm®) die toelaten om alle info te verzamelen, te analyseren en op te slaan. Ook het creëren en rapporteren van een advies aan de veehouder kunnen via dergelijke programma's gebeuren. Dit laat toe om het algemene overzicht te behouden, zeker wanneer er verschillende stalen van verschillende koeien en verschillende bedrijven tegelijk geanalyseerd moeten worden.

PRAKTISCH

1. Een propere werkruimte met incubator en klein labomateriaal met de nodige aandacht voor bioveiligheid voorzien.

2. Beslissing over het werkdoel van de resultaten:
 - a. Als dierenarts de veehouder ondersteunen bij het toepassen van selectief behandelen (brede diagnosestelling is hier voldoende: grampositief of gramnegatief) (Creytens et al., 2024)
 - b. De bedrijfsspecifieke preventieplannen met betrekking tot uiergezondheid aanpassen (verdere kiemdifferentiatie nodig)
 - c. De behandelprotocollen op de bedrijven aanpassen, rekening houdend met eventuele antimicrobiële resistentie (mee bepalen van de antibioticumgevoeligheid).
3. Se en Sp van de test nakijken om de betrouwbaarheid van de verkregen resultaten na te gaan
4. Een duidelijk advies voor de veehouder formuleren
5. De resultaten van de sneltesten (indien kiemdifferentiatie mogelijk is) samenbundelen met de resultaten van bacteriologisch onderzoek uit andere laboratoria om een beeld te vormen van de meest voorkomende mastitispathogenen op het bedrijf en om zo het mastitis preventieplan aan te passen.

CONCLUSIES

Er zijn verschillende soorten sneltesten voor kiemdetectie in melk op de markt, elk met hun eigen testkarakteristieken en eigenschappen. Om het principe van het selectief behandelen van klinische mastitis te kunnen uitvoeren, zijn eenvoudige testen die aangeven of het om een grampositieve of gramnegatieve bacterie gaat, voldoende. Voor een meer diepgaande diagnosestelling, wordt een meer specifieke en complexe sneltest aangeraden die verdere kiemdifferentiatie toelaat. Voor de meeste sneltesten is een minimale investering in een labo-omgeving (propere ruimte, incubator, koelkast en klein labomateriaal) voldoende. De meer uitgebreide testen vragen een iets grotere investering (zoals de specifieke incubator en software voor de MastaTest®). Het is ook aangewezen om geregeld een kwaliteitscontrole uit te voeren bij het gebruiken en interpreteren van de sneltesten. Dit kan bijvoorbeeld door middel van een ringtest (onafhankelijke controle op de analysekwaliteit). Persoonlijke voorkeur en noden zijn beslissend wie welke sneltest zal gebruiken. Het mag duidelijk zijn dat iedere dierenarts, mits een degelijke basisopleiding, in staat moet zijn om sneltesten te gebruiken op zijn/haar praktijk en deze in te passen in een innoverende service, waardoor hij/zij (opnieuw) meer betrokken wordt bij het managen van de uiergezondheid bij zijn/haar klanten. Daarnaast kunnen ook melkveehouders bacteriologisch onderzoek aan de hand van sneltesten zelf uitvoeren op hun bedrijf. Een degelijke opleiding en voldoende externe ondersteuning zijn hierbij onontbeerlijk. In beide omstandigheden (uitvoering op de dierenartsenpraktijk/op het melkveebedrijf) is een voldoende aantal casussen (voldoende groot cliënteel respectievelijk voldoende aantal lacterende dieren)

van belang om genoeg ervaring te kunnen opbouwen en vast te houden.

REFERENTIES

- Bates A., Laven R., Bork O., Hay M., McDowell J., Saldias B. (2020). Selective and deferred treatment of clinical mastitis in seven New Zealand dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine* 176, 104915.
- Boerlin P., Kuhnert P., Hüsey D., Schaellibaum M. (2003). Methods for identification of *Staphylococcus aureus* isolates in cases of bovine mastitis. *Journal of Clinical Microbiology* 41(2), 767.
- Cameron M., Keefe G. P., Roy J. P., Dohoo I. R., MacDonald K. A., McKenna S. L. (2013). Evaluation of a 3M Petrifilm on-farm culture system for the detection of intramammary infection at the end of lactation. *Preventive Veterinary Medicine* 111(1-2), 1-9.
- Chauhan A., Jindal T. (2020). Biochemical and molecular methods for bacterial identification. *Microbiological Methods for Environment, Food and Pharmaceutical Analysis*, 425-468.
- de Jong E., Creyten L., De Vlieghe S., McCubbin K. D., Baptiste M., Leung A. A., Speksnijder D., Dufour S., Middleton J. R., Ruegg P. L., Lam T. J. G. M., Kelton D. F., McDougall S., Godden S. M., Lago A., Rajala-Schultz P. J., Orsel K., Krömker V., Kastelic J. P., Barkema H. W. (2023). Selective treatment of non-severe clinical mastitis does not adversely affect cure, somatic cell count, milk yield, recurrence, or culling: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Dairy Science* 106(2), 1267-1286.
- De Visscher A., Haesebrouck F., Piepers S., Vanderhaeghen W., Supré K., Leroy F., Van Coillie E., De Vlieghe S. (2013). Assessment of the suitability of mannitol salt agar for growing bovine-associated coagulase-negative staphylococci and its use under field conditions. *Research in Veterinary Science* 95(2), 347-351.
- Ferreira J. C., Gomes M. S., Bonsaglia E. C. R., Canisso I. F., Garrett E. F., Stewart J. L., Zhou Z., Lima F. S. (2018). Comparative analysis of four commercial on-farm culture methods to identify bacteria associated with clinical mastitis in dairy cattle. *PLoS ONE*, 13(3).
- Ganda E. K., Bisinotto R. S., Decter D. H., Bicalho R. C. (2016). Evaluation of an on-farm culture system (Accumast) for fast identification of milk pathogens associated with clinical mastitis in dairy cows. *PLoS ONE*, 11(5).
- Jones G., Bork O., Ferguson S. A., Bates, A. (2019). Comparison of an on-farm point-of-care diagnostic with conventional culture in analysing bovine mastitis samples. *Journal of Dairy Research* 86(2), 222-225.
- Kateete D. P., Kimani C. N., Katabazi F. A., Okeng A., Okee M. S., Nanteza A., Joloba M. L., Najjuka F. C. (2010). Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 9-23.
- Kiku Y., Nagasawa Y., Sugawara K., Yabusaki T., Oono K., Fujii K., Maehana K., Hayashi T. (2021). Evaluation of a rapid coliform detection kit from clinical mastitis milk using colloidal gold nanoparticle-based immunochromatographic strips. *Journal of Veterinary Medical Science* 83(11), 1628-1633.

- Lago A., Godden S. M. (2018). Use of rapid culture systems to guide clinical mastitis treatment decisions. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 34(3), 389-412.
- Lago A., Godden S. M., Bey R., Ruegg P. L., Leslie K. (2011a). The selective treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results: I. Effects on antibiotic use, milk withholding time, and short-term clinical and bacteriological outcomes. *Journal of Dairy Science* 94(9), 4441-4456.
- Lago A., Godden S. M., Bey R., Ruegg P. L., Leslie K. (2011b). The selective treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results: II. Effects on lactation performance, including clinical mastitis recurrence, somatic cell count, milk production, and cow survival. *Journal of Dairy Science* 94(9), 4457-4467.
- Leimbach S., Krömker V. (2018a). Laboratory evaluation of a novel rapid tube test system for differentiation of mastitis-causing pathogen groups. *Journal of Dairy Science* 101(7), 6357-6365.
- Malcata F., Zadoks R., Viora L. (2021). Laboratory-based evaluation of a simplified point-of-care test intended to support treatment decisions in non-severe bovine clinical mastitis. *Article in Journal of Dairy Research* 88, 170-175.
- Mansion-de Vries E. M., Knorr N., Paduch J. H., Zinke C., Hoedemaker M., Krömker V. (2014a). A field study evaluation of Petrifilm™ plates as a 24-h rapid diagnostic test for clinical mastitis on a dairy farm. *Preventive Veterinary Medicine* 113(4), 620-624.
- McCarron J. L., Keefe G. P., McKenna S. L. B., Dohoo I. R., Poole D. E. (2009). Laboratory evaluation of 3M petrifilms and University of Minnesota Bi-plates as potential on-farm tests for clinical mastitis. *Journal of Dairy Science* 92(5), 2297-2305.
- McDougall S., Niethammer J., Graham E. M. (2018). Antimicrobial usage and risk of retreatment for mild to moderate clinical mastitis cases on dairy farms following on-farm bacterial culture and selective therapy. *New Zealand Veterinary Journal* 66(2), 98-107.
- Royster E., Godden S., Goulart D., Dahlke A., Rapnicki P., Timmerman J. (2014). Evaluation of the Minnesota Easy Culture System II Bi-Plate and Tri-Plate for identification of common mastitis pathogens in milk. *Journal of Dairy Science* 97(6), 3648-3659.
- Swinkels J. M., Leach K. A., Breen J. E., Payne B., White V., Green M. J., Bradley A. J. (2021). Randomized controlled field trial comparing quarter and cow level selective dry cow treatment using the California Mastitis Test. *Journal of Dairy Science* 104(8), 9063-9081.
- Van de Velde P., Baert J., Hermans D., Marjaux E., Ska B., Van Praet W. (2014). *Handleiding Beheer Medische Afvalstoffen*. OVAM, Mechelen.
- Verbeke J., Piepers S., Supré K., De Vlieghe, S. (2014). Pathogen-specific incidence rate of clinical mastitis in Flemish dairy herds, severity, and association with herd hygiene. *Journal of Dairy Science* 97, 6926-6934.
- Viora L., Graham E. M., Mellor D. J., Reynolds K., Simoes P. B. A., Geraghty T. E. (2014). Evaluation of a culture-based pathogen identification kit for bacterial causes of bovine mastitis. *Veterinary Record* 175(4), 89-89.

