

***Escherichia coli*-mastit hos mjölkkor**

Jennie Redander

**Handledare: Karin Persson Waller
Inst för kliniska vetenskaper, avd för reproduktion
Avd för lantbrukets djur, SVA
Biträdande handledare: Anna Aspán och Helle Ericsson Unnerstad
Avdelning för bakteriologi, SVA**

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning.....	1
Inledning.....	1
Etiologi och diagnostik.....	2
Patogenes.....	2
Virulensfaktorer.....	3
<i>Serumresistens</i>	3
<i>Endotoxin</i>	3
Opportunistiska kontra persistenta stammar	4
Klinik.....	4
Förekomst.....	5
Riskfaktorer.....	6
Miljö och skötsel faktorer.....	6
<i>Hygien</i>	6
<i>Mjölkning</i>	7
Kofaktorer.....	7
<i>Immunförsvar</i>	7
<i>Ålder</i>	8
<i>Besättningstyp och mjölmängd</i>	8
<i>Öppna spenkanaler</i>	8
<i>Smittrisk mellan kor</i>	8
Behandling på individnivå.....	9
Basåtgärder.....	9
<i>Urmjölkning</i>	9
<i>Allmänt god omvårdnad</i>	9
Understödjande behandling.....	9
<i>Vätsketerapi</i>	9
<i>Oxytocin</i>	10
<i>NSAID</i>	10
Antibiotika.....	10
<i>Antibiotikaresistens</i>	11
Besättningsarbete – behandling och profylax.....	11
Referenser.....	14
Bilaga 1	
Biokemisk undersökning av juverpatogena <i>Escherichia coli</i> med phenplate.....	18

SUMMARY

Escherichia (E) coli is one of the most common udder pathogens associated with acute clinical mastitis in Swedish dairy cows. The aim of this study is to review some of the existing literature on *E coli* mastitis from a Swedish perspective. The bacteria, its most important characteristics, and diagnostics under field conditions is covered, as well as what happens during infection, how *E coli* affects the cow and which consequences this have. Clinical symptoms associated with *E coli* mastitis are described and information on when these cases of mastitis usually occurs is given. Risk factors in the cow's environment are described as well as the importance of the cow's immune defence. Swedish recommendations regarding therapy and prophylaxis are described at individual and herd level. Finally, a comparison of biochemical characteristics of Swedish *E coli* isolates using the Pheneplate-method is described.

SAMMANFATTNING

Escherichia (E) coli är en av de vanligaste juverpatogenerna i samband med akut klinisk mastit hos svenska mjölkkor. Avsikten med detta arbete är att utifrån svenska förhållanden ge en sammanställning av en del av den litteratur som finns rörande *E coli*-mastit. Bakterien, dess främsta egenskaper och fältmässig diagnostik behandlas liksom vad som händer i samband med infektion samt hur *E coli* påverkar kon och vad det får för följder. Kliniska symptom vid *E coli*-mastit beskrivs och information om när dessa mastiter vanligen förekommer ges. Riskfaktorer i kons närmiljö beskrivs liksom betydelsen av kons immunförsvar. Svenska rekommendationer rörande behandling och profylax beskrivs på individ- och besättningsnivå. Slutligen beskrivs en jämförelse av biokemiska egenskaper hos svenska *E coli*-isolat gjord med hjälp av s k Pheneplate-metodik.

INLEDNING

Escherichia (E) coli orsakar ungefär 16 % av de akuta kliniska mastiter svenska mjölkkor drabbas av (Bengtsson et al 2005). *E coli* är en vanlig bakterie i kons magtarmsystem. Den urskiljs kontinuerligt med avföringen, och finns i riklig mängd i kons närmiljö. Infektion med *E coli* ger ofta akut klinisk mastit med varierande grad av kliniska symptom med ökad risk för reducerad mjölkproduktion och för tidig utslagning av kon. Både miljöfaktorer såsom hygienförhållanden och kofaktorer såsom immunstatus spelar in vid insjuknandet. Runt kalvningen är immunförsvaret försvagat och kon är då extra mottaglig för juverinfektion med *E coli*-bakterier. Traditionellt betraktas *E coli* som en miljöbakterie. Dessa är opportunisterna i kons miljö som bara tillfälligt orsakar sjukdom. Kroniska *E coli*-infektioner förekommer dock, men troligen i mycket liten omfattning. Avsikten med detta arbete är huvudsakligen att, utifrån svenska förhållanden, ge en överblick över befintlig kunskap rörande *E coli*-mastit. Dessutom beskrivs en jämförelse av biokemiska egenskaper hos svenska *E coli*-isolat gjord med hjälp av s k Pheneplate-metodik.

ETIOLOGI OCH DIAGNOSTIK

E coli är gramnegativa små, korta stavar som tillhör familjen *Enterobacteriaceae* och kan växa både aerobt och anaerobt (Sandholm 1995). *E coli* är den vanligaste bakterien i tarmfloran hos både djur och människor och urskiljs kontinuerligt med avföringen. Bakterien medverkar i flera olika sjukdomstillstånd och har virulensfaktorer anpassade för att kunna infektera och undkomma värdens immunförsvar (Lehtolainen 2004). Bakterierna växer snabbt på blodagar där de bildar grå-bruna, fuktiga kolonier med jämn kant. Kolonierna är 2-3 mm i diameter och är i samband med isolering från juvret ej hemolytiska (Sandholm 1995). Vid provtagning är det av största vikt att god aseptik används då *E coli* är en vanlig kontaminant i mjölkprover. Provtagning bör utföras i tidigt skede av sjukdomen eftersom kon själv ofta eliminerar bakterierna snabbt, vilket kan resultera i negativ odling (Hogan & Smith 2003). Vid odling av mjölkprov på Selma-platta växer koliforma bakterier snabbt ut på blodagarfältet och det gramnegativa fältet innehållande MacConkeyagar. På det senare fältet växer *E coli* med röd-violetta kolonier vilket är ett resultat av laktosjäsning. Kolonierna har ofta en karaktäristisk doft. Utifrån koloniutseende kan man dock inte med säkerhet skilja *E coli* från andra gramnegativa bakterier. För säkrare resultat bör man använda Selma PLUS-plattan som har ett fjärde agarfält med PGUA (p-nitrophenyl- β -D-glucopyranosiduronic acid)-agar. *E coli* växer där med ett gul-grönt färgomslag vilket övriga koliforma bakterier inte gör. Det finns också filterpapperslappar med intorkat PGUA som kan placeras på koliforma bakteriekolonier på blodagar. Efter inkubering i 37°C i 1-4 timmar färgas lappen gul om den ligger i kontakt med en *E coli*-koloni. Dessa lappar kan dock vara svåravlästa. Andra tester som kan utföras är ureas- och oxidastest. *E coli* är som regel negativa för båda dessa tester medan *Klebsiella* spp och flera andra koliformer för det mesta är ureaspositiva. Bakterier i familjen *Enterobacteriaceae* är katalaspositiva vilket innebär att de bildar gas när treprocentig väteperoxid droppas på ett objektglas med kolonimaterial. De blir också tråddragande när kolonimaterial blandas med lika mängd 3-5-procentig kaliumhydroxid (KOH). Dessa tester är lätta att utför i fält.

PATOGENES

Mastit orsakad av *E coli* är en infektion där bakterier kommer in i juvret via spenkanalen. Spenkanalen är juvrets första skydd mot penetration av juverpatogener, fysiskt genom sin mekaniska slutningsförmåga och antibakteriellt genom bl a sin keratinlinjering. Bakterierna koloniserar vanligen inte spen- och juverepitelet utan förökar sig i mjölken vilken kan vara ett bra medium för bakterietillväxt (Frost et al 1980). *E coli*-bakterier kan multiplicera sig initialt 8-10 gånger varannan timme, med frisättning av stora mängder endotoxin som följd (Akers & Thompson 1987). Riskperioder för infektion är ffa tillfällen då spenkanalen står öppen t ex i samband med mjölkkläckage. Detta gäller strax före och efter mjölkning, före kalvning och vid sinläggning. I det senare fallet innebär den upphörda mjölkningen att det inre trycket i juvret ökar vilket kan leda till att spenkanalen står öppen mer än normalt. I samband med involutionen av juvret har

kons fagocyter också fullt upp med att äta mjölkfett och debris vilket konkurrerar med fagocytos av bakterier. Därtill har det antibakteriella proteinet laktoferrin sämre effekt i mjölk än i sinsekret varför järn, som är viktigt för tillväxt av *E coli*, finns tillgängligt för bakterierna. Mitt i sinperioden är koncentrationen av laktoferrin hög i sinsekret vilket har en kraftigt bakteriehämmande effekt på *E coli* (Oliver & Bushe 1987).

Virulensfaktorer

Ett antal virulensfaktorer har identifierats hos *E coli* (Kaipainen et al 2002, Bean et al 2004), men inga studier har lyckats finna specifika virulensfaktorer som kan sammankopplas med att just vissa typer av *E coli* orsakar mastit (Kaipainen et al 2002, Wenz et al 2006). Inte heller har man funnit någon koppling mellan sjukdomens allvarlighet och förekomsten av särskilda virulensfaktorer (Kaipainen et al 2002, Bean et al 2004, Wenz et al 2006). För att *E coli* ska kunna orsaka mastit verkar det räcka med att bakterierna kan växa och multiplicera sig i juversekret (Hogan & Smith 2003). Något som är ordentligt undersökt hos *E coli* är förekomst av serumresistens och endotoxin.

Serumresistens

I serum finns komplementfaktorer som kan ha baktericid effekt bl a mot *E coli*. Koncentrationen av komplement är dock normalt låg i mjölk (Targowski 1983) och dessutom hämmar mjölk serums baktericida effekt (Rainard et al 1984). Serumresistens, dvs kapaciteten att motstå opsonisering, är dessutom vanligt hos *E coli*-stammar isolerade i samband med mastit. I en finsk studie var mindre än 10 % av stammarna känsliga för serum (Kaipainen et al 2002). Detta kan bl a förklaras genom att TraT, ett lipoprotein som interagerar med komplement, förekom hos nästan 40 % av dessa stammar. Serumresistens tycks dock inte vara ett krav för att *E coli* ska kunna orsaka intramammär infektion (Hogan et al 1989a, Kaipainen et al 2002, Wenz et al 2006). Ingen skillnad har heller setts gällande serumresistens hos bakterier som koloniserat juvret under laktation jämfört med under sintid, detta trots att komplement är mycket mer aktivt i juvret under sintiden (Hogan et al 1989a).

Endotoxin

Endotoxin är lipopolysackarider i *E coli*-bakteriens cellvägg som frisätts när bakterierna dör, samt till viss del medan de växer. Vid endotoxinemi är komponenten Lipid A den som är mest verksam (Sandholm 1995). Frisläppning av endotoxin i juvret i samband med *E coli*-infektion är grundorsaken till många av de kliniska symptom som ses vid *E coli*-mastit. Monocyter-makrofager och endotelceller reagerar kraftigt på endotoxinet vilket resulterar i en omfattande frisättning av cytokiner såsom TNF- α , IL-1 β och IL-6, men även andra inflammationsmediatorer frisätts. Dessa mediatorer attraherar i sin tur neutrofiler som förutom sin bakteriedödande förmåga även kan skada vävnadsceller i juvret. Det är cytokinerna som ger upphov till många av sjukdomens kliniska symptom såsom feber, förmagsatoni och nedsatt allmäntillstånd (Sandholm 1995). Mängden cytokiner som frisätts kan kopplas till symptomens allvarlighet

(Ohtsuka et al 2001). Om frisättningen av de inflammatoriska mediatorerna blir för stor utvecklas endotoxisk chock. Lokalt kan endotoxin då ge cirkulatoriska störningar, perialveolära blödningar, interlobulära ödem och dilaterade lymfkärl (Frost & Brocker 1986). Kor med kraftiga symptom (bedömt utifrån allmäntillstånd, rektaltemperatur, uttorkningsgrad och antal våmkontraktioner) har ofta bakteriemi, vilket mer sällan drabbar kor med milda till måttliga symptom (Wenz et al 2001). Bakteriemi kan uppträda vid omfattande skador på basalmembranet i epitelet i juvercisternen och större mjölkgångar i juvrets ventrala delar. Vid dessa tillfällen kan bakterien isoleras från lokala lymfknutor (Frost & Brooker 1986).

Opportunistiska kontra persistenta stammar

E coli-mastit anses vanligen vara orsakad av opportunistiska stammar från kons närmiljö, där inga subtyper är vanligare än andra. I en nyligen genomförd svensk studie (Bilaga 1) undersöktes likheten mellan 168 *E coli*-stammar från akuta kliniska mastiter insamlade i Sverige 2002-2003 (Bengtsson et al 2005). Stammarna undersöktes med hjälp av s.k. Pheneplate-metodik baserad på ett antal biokemiska tester (Kühn & Möllby 1993). Resultaten visade inte på att någon speciell subtyp av *E coli* dominerar i landet. Mastiterna i undersökningen orsakades av totalt 56 olika subtyper där två subtyper var vanligare med 29 respektive 18 bakterieisolat vardera. För övriga subtyper återfanns 1-12 bakterieisolat per subtyp. Detta tyder på att de flesta *E coli*-mastiterna i Sverige orsakas av opportunistiska infektioner. I en studie av Nemeth et al (1994) kunde ingen avgörande skillnad rörande biokemiska egenskaper och potentiella virulensfaktorer identifieras mellan *E coli*-stammar i kors avföring och *E coli*-stammar isolerade i samband med mastit. Det finns dock studier som tyder på att vissa stammar kan orsaka mer persistenta infektioner. Döpfer et al (1999) upptäckte i en holländsk kohortstudie med 300 besättningar att 4,77 % av korna med *E coli*-mastit var persistent infekterade. Samma ko hade då ett nytt utbrott av *E coli*-mastit i samma juverdel med samma bakteriestam inom ett år. Bakterierna typades i studien med hjälp av PCR. I studier av Bradley & Green (2001a) och Ackerman et al (2003) har *E coli*-bakterier kunnat återisoleras från juvret några veckor efter sjukdomens utbrott. *E coli*-stammar som ger persistenta infektioner binder starkare till juvervävnaden än de som orsakar kortvariga infektioner (Dogan 2005). De invaderar värdcellerna dubbelt så ofta och tre gånger så fort som stammar som endast ger kortvariga infektioner (Döpfer et al 2000). Detta gör att de lättare undslipper ursköljning ur juvret vid mjölkning och de kommer också undan kons immunförsvar mer effektivt. Trots dessa fynd tycks det ändå vara absolut vanligast med kortvariga infektioner med opportunistiska stammar förekommande i kons närmiljö.

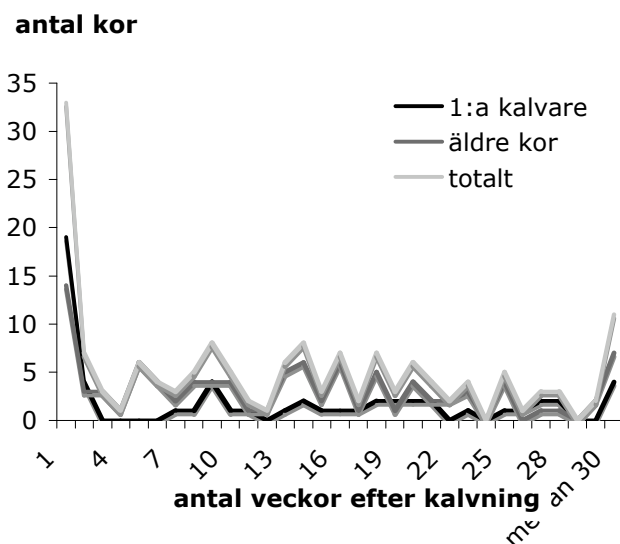
KLINIK

Juverinfektioner med *E coli* är ofta kortvariga och leder främst till akuta kliniska mastiter av olika allvarlighetsgrad. Ibland kan dock korna drabbas av en perakut form av mastit. Kronisk klinisk *E coli*-mastit respektive subklinisk *E coli*-mastit kan också uppstå men är relativt ovanliga.

Vid akut klinisk *E coli*-mastit uppträder symptomen snabbt och kan variera från mycket lindriga, med endast lokala symptom, till mycket höggradiga med kraftigt påverkat allmäntillstånd och risk för endotoxisk chock och dödsfall. Vid höggradig akut klinisk mastit är mjölken förändrad, den kan först vara serös och gul och senare bli tjock med flockor. Undersökning med CMT avslöjar ofta mycket höga celltal i mjölken. Juvret blir hårt, svullet, varmt och ömt. Som svar på endotoxinet ses systemiska tecken såsom feber, ökad hjärtfrekvens, förmagsatoni, nedsatt allmäntillstånd, anorexi samt starkt nedsatt mjölkproduktion (Lehtolainen 2004). Den minskade mjölkproduktionen är bland annat ett resultat av att endotoxin stör mjölk-blod barriären så att mjölkkomponenter såsom laktos läcker ut i blodet. Laktos ses i ökad mängd i urinen under endotoxisk mastit. Förekomst av lokala ödem och frisläppning av inflammationsmediatorer stör också juvrets mjölkproduktion (Shuster et al 1991). Vid akut klinisk mastit har kon förhöjd hematokrit, leukopeni samt neutropeni med vänsterförskjutning (Radostits 2000). Förhöjda urea och kreatinivärden är vanligt, troligtvis på grund av hämmad njurfunktion som ett resultat av endotoxinemi (Menzies et al 2000). Vid den perakuta formen blir kon mycket snabbt dålig med hög feber, helt upphörd mjölkproduktion, mycket hög puls, diarré, uttorkning och anorexi. Dessa symptom är tecken på att hon drabbats av endotoxisk chock. Som ett resultat blir kon ofta liggande utan möjlighet att ta sig upp. Försämringen av allmäntillståndet sker snabbt och inom några timmar kan hennes kroppstemperatur istället vara under det normala och risken att hon dör är stor. Då de lokala symptomen i juvret kan vara små är detta ett tillstånd som kan föranleda felaktig diagnos t ex kalvningsförlamning (Radostits 2000).

FÖREKOMST

I en studie av Bengtsson et al (2005) konstaterades att under 2002-2003 var 16 % av de akuta kliniska mastiterna i Sverige orsakade av *E coli*. Motsvarande siffra från en liknande svensk studie från 1994-1995 var likaså 16 % (Nilsson et al 1997). I övriga Europa har andelen kliniska mastiter orsakade av *E coli* rapporterats variera mellan 20 och 40 % (Suriyasathaporn et al 2000, Bradley et al 2007). Alla åldersgrupper av lakterande kor kan drabbas av *E coli*-mastit, men risken att en äldre ko drabbas är större än att en förstakalvare insjuknar (Smith et al 1985). Äldre kor har generellt ett sämre neutrofilsvär i samband med infektion vilket förutom ökad risk för sjukdom också ökar risken för att mastiten ska bli allvarlig (Vangroenweghe et al 2004). I ovan nämnda svenska studie från 2002-2003 (Bengtsson et al 2005) förekom fall av *E coli*-mastit under hela laktationsperioden. Nästan en fjärdedel av fallen uppträdde i den studien under den första veckan efter kalvning (Figur 1). Även studier utomlands (Jones & Ward 1989, Hogan & Smith 2003, Burvenich et al 2007) visar att *E coli*-mastit är vanligast under veckorna direkt efter kalvning men att det även är en ökad förekomst i samband med sinläggning.



Figur 1. Fördelningen av fall av akut klinisk *E coli*-mastit hos förstakalvare ($n=59$), äldre kor ($n=105$) och totalt hos alla kor ($n=168$) över tiden relativt kalvning under 2002-2003. En större andel av förstakalvarna (36 %) insjuknade i akut *E coli* mastit den första veckan efter kalvning jämfört med äldre kor (14 %).

Andelen *E coli*-infektioner vid subklinisk mastit anses vara låg i Sverige liksom i andra länder. Det finns ingen rikstäckande svensk undersökning över infektionsagens vid subklinisk mastit. Vid Mastitlaboratoriet, SVA, görs dock en årlig sammanställning av diagnoser från prover som tagits med hjälp av Mastistrip™. Dessa prover har till stor del tagits från kor med subklinisk mastit. Under kontrollåret 2006/2007 var andelen *E coli*-fynd bland bakteriepositiva prover 3 %. Liknande siffror har rapporterats från Finland där man 1991 samlade in över 12 000 mjölkprover från slumpvis utvalda mjölkkor. Knappt 1,5 % av de bakteriologiskt positiva odlingarna visade växt av *E coli* (Pitkälä et al 2004). I en tysk studie där 948 kor med subklinisk mastit undersöktes med avseende på agens identifierades 3,3 % som *Enterobacteriaceae*, däribland *E coli* (Sobiraj et al 1997).

RISKFAKTORER

Miljö och skötselfaktorer

Hygien

E coli finns i stora mängder i kons avföring och förökar sig snabbt i varma och fuktiga miljöer. Dessa förutsättningar finns i stor utsträckning i den varma ladugården och framför allt på kons liggplats. I ströbäddarna trivs bakterierna bäst i organiska strömaterial som drar till sig fukt som t ex halm och spån. Från ströbädden överförs bakterierna enkelt till kons spenar och juver. Mängden bakterier på spen huden är en direkt avspegling av hur mycket bakterier som finns i kons liggmiljö (Hogan et al 1989b). Det finns också ett linjärt samband mellan antalet bakterier i ströbädden och antalet koliforma mastiter i besättningen (Hogan et al 1989b). *E coli*-mastit är vanligast under sommarmånaderna (Bishop et al 1980, Smith et al 1985, Olde Riekerink et al 2007). Då finns det mer gramnegativa bakterier i bäddarna eftersom värme påverkar bakteriernas tillväxt positivt (Hogan et al 1989b).

Av detta kan man förstå att smutsiga, dåligt rengjorda liggbåsar ökar risken för *E coli*-mastit. I lösdriftssystem med för få liggbåsar eller liggbåsar som inte har tillräcklig kokomfort ökar också risken för mastit. Korna kan där söka sig till alternativa liggplatser som inte är tillräckligt rena. Gödselbemängda gångar där gödsel stänker upp på juvret ökar också risken för infektioner, speciellt i anslutning till mjölkningen då spenkanalen står öppen. Smutsiga beten medför på samma sätt en ökad risk. Utfodring med alltför energirikt foder eller med foder eller vatten av dålig hygienisk kvalitet kan leda till lösare avföring vilket stänker ännu mer, med ökad risk för förorening av juvret som följd.

Mjölkning

Mjölknigen kan också ha betydelse för risken för *E coli*-mastit. Barkema et al (1999) har t ex visat att mjölkningsorsakad hyperkeratos och skador på spenspetsen predisponerar för *E coli*-mastit då bakterier lättare kan ta sig in i spenen. Våt rengöring av juvret före mjölkning ökar också risken för infektion om man inte torkar helt torrt innan mjölkning. Annars kan vätskedroppar med bakterier samlas på spenspetsen med risk för att dessa kommer in i spenen i samband med mjölkningen (Schukken et al 1991). Risken för infektion ökar dessutom om korna direkt efter mjölkningen ges möjlighet att lägga sig eftersom spenkanalerna då fortfarande är öppna varför direktkontakt med liggytan kan vara riskabelt. Spendoppning/sprayning efter mjölkning har också rapporterats kunna öka risken för *E coli*-mastit, främst på gårdar med lågt celltal i tankmjölken (Barkema et al 1999). Detta beror troligen på att den naturliga bakteriefloran på spen huden störs och att kons egna skydd mot miljöpatogener därigenom minskar. I en holländsk studie ökade incidensen klinisk mastit orsakad av *E coli* med minskande celltal i tankmjölken (Barkema et al 1998). En ökad risk för mastit vid lägre tankcelltal har dock inte observerats i Sverige (Persson Waller, personligt meddelande).

Kofaktorer

Immunförsvar

Kons immunförsvar har stor betydelse för risken för *E coli*-mastit. Om immunförsvaret är nedsatt av olika skäl ökar risken för infektioner och mastit. Immunförsvarets förmåga att ta hand om infektioner varierar under laktationen. Juvrinfectioner med *E coli* i mitt- och senlaktation klarar kon oftast själv av att läka ut utan annat än mycket milda symptom. Vid tiden kring kalvning är kon däremot extra mottaglig för juvrinfectioner med *E coli* eftersom immunförsvaret då är hämmat. Flera immunologiska faktorer har betydelse för motståndskraften mot infektion men avgörande för utgången av en infektion är hur snabbt och effektivt kons naturliga immunförsvar, framförallt neutrofilerna, reagerar (Burvenich et al 2007). Vid kalvning ses bland annat en nedgång i neutrofilernas diapedes på grund av förhöjda kortisolvärden. Att neutrofilerna inte i tillräckligt stort antal kommer ut i juvervävnaden i samband med infektionsstart ger *E coli*-bakterierna en chans att multiplicera sig på ett för mastitens utgång avgörande sätt (Burvenich et al 2007). Bakterierna multiplicerar sig initialt 8-10 gånger varannan timme, med frisättning av stora mängder endotoxin som följd (Akers &

Thompson 1987). Förutom att neutrofilerna kommer långsammare till platsen för infektionen är deras bakteriedödande förmåga nedsatt liksom deras förmåga att detoxifiera endotoxin. Därtill är kon i samband med kalvning och i tidig laktation i negativ energibalans vilket ytterligare bidrar till det försämrade immunförsvaret (Burvenich et al 2007). Andra näringsämnen som är viktiga för immunförsvaret och juverhälsan under perioden runt kalvning är vitamin E och selen. Tillskott av vitamin E och selen under sinperioden har visats förbättra immunfunktioner och även ha positiv effekt på juverhälsan (Smith et al 1984, Weiss et al 1990). I en nyligen genomförd svensk fältstudie sågs dock ingen effekt på juverhälsan av extra tillskott av vitamin E runt kalvningen (Persson Waller et al 2007). I en svensk studie av förstakalvare sågs dock ett samband mellan höga nivåer av vitamin E i blodet vid kalvning och lågt mjölkcelltal vid första provmjölkningen (Nyman 2007). Andra faktorer som kan vara negativa för immunförsvaret vid tiden runt kalvningen är om djuret utsätts för stress av olika slag och/eller utfodras med foder och vatten av dåligt hygienisk kvalitet (Persson Waller 2000).

Alder

En annan riskfaktor är kons ålder. Äldre kor drabbas ofta av allvarligare mastiter då deras neutrofiler generellt sett har sämre funktion än hos unga djur, vilket för dessa kor ytterligare försämrar immunförsvaret i samband med kalvningen (Vangroenweghe et al 2004).

Besättningstyp och mjölmängd

I en nyligen genomförd svensk studie (Persson Waller, personligt meddelande) var *E coli* ett vanligare fynd än andra bakterieagens vid akut klinisk mastit i lösdriftsbesättningar jämfört med i uppbundna besättningar och hos högmjölkkande kor jämfört med normal-lågmjölkkande kor.

Öppna spenkanaler

Kor som läcker mycket mjölk före mjölkning och inte sluter spenkanalen snabbt efter mjölkningen har också ökad risk att drabbas av mastit (Schukken et al 1991). På samma sätt inverkar slutning av spenkanalen vid sinläggning. Sinläggning vid hög mjölkproduktion och högt tryck i spenen gör att det tar längre tid innan spenkanalen sluter sig inför sinperioden vilket ökar risken för infektion. Samma risk föreligger hos kor som läcker mjölk innan kalvningen.

Smittrisk mellan kor

E coli-mastit anses vanligtvis vara orsakad av en kortvarig infektion av *E coli*-bakterier från miljön och anses i allmänhet inte vara smittsam mellan kor eller juverdelar. I en studie av Döpfer et al (1999) studerades 300 mjölkkobesättningar under 2,5 år och *E coli* från akuta kliniska mastiter differentierades med hjälp av PCR. I den studien tyckte man sig dock se att bakteriestammar kan smitta mellan olika juverdelar hos samma ko. Samma *E coli*-stam identifierades där i en annan juverdel hos 2,98 % av korna vid ny episod av mastit. I den studien fann man också några tillfällen där kor på samma gård blivit infekterade med samma *E coli*-

stam, vilket skulle kunna tyda på någon typ av överföring mellan kor. Risken för smittspridning mellan kor bedöms dock som liten jämfört med risken för infektion från miljön. Trots det bör man vid *E coli*-mastit, precis som vid alla juverinfektioner, vara noggrann med hygien vid hanteringen av en mastitko och att alltid mjölka drabbade kor sist.

BEHANDLING PÅ INDIVIDNIVÅ

I Sverige rekommenderas idag att klinisk *E coli*-mastit behandlas med basåtgärder som urmjolkning och allmän god omvårdnad. Kon skall också få understödjande behandling med NSAID, vätska intravenöst och/eller peroralt samt oxytocin efter behov (Persson Waller, personligt meddelande). Endast i undantagsfall rekommenderas antibiotikabehandling såsom om kon är nykalvad och mycket dålig med stark bakteriell växt i mjölkprovet (Pyörälä 2003). I samband med subklinisk *E coli*-mastit rekommenderas att kon mjölkas efter friska kor, eventuellt sinläggning av juverdel och utslagning om infektionen kvarstår.

Basåtgärder

Urmjolkning

Urmjolkning så ofta det är möjligt brukar rekommenderas för att hjälpa kon att bli av med bakterier, endotoxiner och inflammationsprodukter som uppehåller sig i mjölken. I en studie av Leininger et al (2003) mjölkades fyra kor med inducerad *E coli*-mastit efter oxytocingiva var 4:e timme från 16-36 timmar efter infektion, och sedan var 6:e timme från 36 till 84 timmar efter infektion. De urmjolkade kornas mjölkcelltal, deras bakterieelimination och deras tid till kliniskt tillfrisknande skiljde sig dock ej signifikant från motsvarande fynd hos de fyra infekterade kontrollkorna som bara mjölkades vid ordinarie mjölkningar.

Allmänt god omvårdnad

Kon skall om möjligt flyttas till en lugn sjukbox med mjuk bädd, hon ska ha rent vatten, och gott foder. Blir hon liggande behöver man vända henne eller hjälpa henne upp till stående (Pyörälä 2003).

Understödjande behandling

Vätsketerapi

Vätsketerapi är i samband med *E coli*-mastit viktigt då endotoxinemi ger henne diarré och hon snabbt blir uttorkad. Vätska hjälper henne att återställa vätskebalansen och bidrar till ökad urinproduktion vilket hjälper kon att göra sig av med en del av de toxiska metaboliterna (Gyles 1994). Är kon uttorkad bör hon alltså få vätska, helst intravenöst eftersom endotoxin försämrar hennes cirkulation och minskar motiliteten i mag-tarmkanalen vilket försämrar vätskeupptaget per oralt (Tyler et al 1994a). Men då det inte alltid är praktiskt möjligt att ge hela vätskebehovet intravenöst kan man ge en del intravenöst och en del per oralt. Försök utomlands (Tyler et al 1994b) har gjorts med intravenös tillförsel av hyperton lösning istället för isoton lösning som vanligen används eftersom det kan

vara tillräckligt att ge endast 1-2 liter av en sådan lösning till en fullvuxen ko. Hyperton vätska inducerar törst hos kon och hon dricker själv. Gör hon inte det är det viktigt att ge henne rikligt med vatten per oralt via slang.

Oxytocin

I samband med akut klinisk mastit kan kons juver ibland vara mycket ömt och svullet varför hon inte gärna släpper ner mjölken. För att underlätta mjölknedsläppningen kan man under några dagar ge henne oxytocin intramuskulärt några minuter innan mjölkningen.

NSAID

Det finns ett antal olika NSAID-preparat på marknaden men i Sverige finns idag endast preparat innehållande ketoprofen eller meloxicam med indikationen akut klinisk mastit. Båda dessa ämnen är antiinflammatoriska, antipyretiska och analgetiska. Meloxicam utsöndras i stor utsträckning via mjölken vilket ketoprofen inte gör (FASS 2007). I samband med akut klinisk *E coli*-mastit har ketoprofen visats kunna förbättra kons allmäntillstånd, sänka hennes rektaltemperatur, minska svullnad och smärta i juvret och förbättra hennes aptit (Ziv & Longo 1991). I en fältstudie av Shpigel et al (1994) där kor med akut klinisk mastit, framför allt orsakade av *E coli*-infektion, behandlades med ketoprofen i samband med diagnos konstaterades att behandlingen signifikant förbättrade tillfrisknandet. Tillfrisknande innebar i studien att kon fått tillbaka mer än 75 % av sin mjölkproduktion. Drygt 90 % av de behandlade djuren tillfrisknade i jämförelse med drygt 80 % av kontrollkorna. I en jämförande studie av meloxicam och flunixin meglumin av Hamann (2003) såg man att en dos meloxicam hade samma eller bättre effekt än flunixin meglumin.

Antibiotika

Att behandla *E coli*-mastit med antibiotika är omdiskuterat på grund av att behandlingseffekten bedöms vara begränsad eftersom självläkningen i många fall är hög. Pyörälä & Pyörälä (1998) konstaterade t ex att tillfriskningsgraden, räknat som bakteriologiskt fri 3-4 veckor efter insjuknandet, hos kor med akut klinisk *E coli*-mastit som behandlats med penicillin var 74 % medan motsvarande resultat för obehandlade kor var 71 %. Tillfriskningsgraden för enrofloxacinbehandlade kor var i samma studie 50 %. När *E coli*-mastit behandlas med antibiotika i Sverige används idag främst fluorokinoloner och då framför allt enrofloxacin. Enligt färsk statistik används kinoloner vid 10 % av alla svenska mastitbehandlingar och trenden är att dessa behandlingar ökar (Landin 2006). Enrofloxacin är teoretiskt sett bra mot *E coli*-mastit då det når höga koncentrationer i mjölk (Kaartinen et al 1995) och MIC är lågt bland de *E coli* som orsakar mastit (Sandholm 1995). *E coli* som isoleras från akuta kliniska mastiter är ofta känsliga *in vitro* mot något antibiotikum, men *in vivo* fungerar de flesta antibiotika ändå inte på grund av olika farmakokinetiska och farmakodynamiska anledningar (Pyörälä 2003). Mängden endotoxiner kan dessutom öka vid antibiotikaanvändning på grund av den ökade frisättningen från avdödade bakterier (Dosogne et al 2002).

I en finsk fältstudie (Pyörälä S, personligt meddelande) under 2003-2005 behandlades 49 kor med akut klinisk *E coli*-mastit med enrofloxacin (Baytril 100 mg/ml, 5 mg/kg/dag i 2 dagar) och ketoprofen (Comforion 100 mg/ml, 3 mg/kg/dag i 2-3 dagar). Sextio kontrollkor med akut *E coli*-mastit fick enbart ketoprofen. Om kon 21 dagar efter sjukdomsutbrottet lämnade bakteriologiskt negativt mjölkprov betraktades hon som bakteriologiskt frisk. Om hon vid samma tid var symptomfri och återfått sin mjölkproduktion betraktades hon som kliniskt frisk. I den enrofloxacinbehandlade gruppen blev 97 % bakteriologiskt friska och 43 % kliniskt friska. I kontrollgruppen blev 76 % bakteriologiskt friska och 57 % kliniskt friska. Det bakteriologiska tillfrisknandet var signifikant bättre i den behandlade gruppen än i den obehandlade gruppen, men ingen skillnad mellan grupperna kunde ses rörande det kliniska tillfrisknandet.

Motsvarande resultat har setts i experimentella studier där man experimentellt infekterat juvret med *E coli*-bakterier. Både Dosogne et al (2002) och Hoeben et al (2000) konstaterade att kor som behandlats med enrofloxacin (5 mg/kg, 10 och 30 timmar efter infektion) hade snabbare elimination av bakterier i mjölken än de obehandlade kontrollkorna. Mängden endotoxin i plasma påverkades däremot inte av behandlingen. Det kliniska tillfrisknandet och mjölkens utseende skiljde sig inte mellan behandlade och obehandlade grupper. I ovan nämnda studier tyckte man sig se en snabbare återhämtning av mjölkproduktionen hos de behandlade djuren jämfört med de obehandlade. I en annan experimentell studie av Rantala et al (2002) där kor med inducerad *E coli*-mastit behandlades med antingen en kombination av enrofloxacin och flunixin, eller enbart flunixin, kunde ingen skillnad på bakterieeliminationen ses.

Vid antibiotikabehandling av *E coli*-mastit används i Sverige idag alltid allmänbehandling. Det finns idag inte heller några preparat på den svenska marknaden som lämpar sig för intramammär behandling av *E coli*-mastit. I försök av Pyörälä et al (1994) och Guterbock et al (1993) har akuta *E coli*-mastiter behandlats med trimsulfa, colistin, amoxicillin eller cephalosporin intramammärt. Bakterierna har *in vitro* varit känsliga för använda antibiotika och MIC har uppnåtts i mjölken. Men inga skillnader gällande tillfrisknande har kunnat ses jämfört med helt obehandlade kontrollkor.

Antibiotikaresistens

I en svensk undersökning från 2002-2003 (Bengtsson et al 2005) undersöktes 169 isolat av *E coli* från akuta kliniska mastiter med avseende på resistens. Av isolaten var 5-10 % resistenta mot ampicillin, streptomycin, sulphonamider eller tetracykliner medan 1,8 % var resistenta mot enrofloxacin. Uppträdandet av enrofloxacinresistens kan förklaras av en signifikant ökande trend att använda kinoloner i Sverige idag jämfört med för tio år sedan (Landin 2006). Detta utgör naturligtvis en risk för utvecklande av fler resistenta colistammar.

BESÄTTNINGARBETE – BEHANDLING OCH PROFYLAX

I besättningar som har återkommande *E coli*-mastiter måste man göra en noggrann utredning för att finna källan eller källorna till problemet. Förutsättningslöst går man igenom besättningens rutiner och börjar lämpligen

med hygienrutinerna. Genom att hålla kons närmiljö ren och torr minskas juvrets exponering för bakterier. Förutom kons liggplats ska gångar i ladugården, gångar från ladugården till betet, betet och utrymmet hon väntar i innan mjölkningen också hållas så rena och torra som möjligt. God hygien ska följa kon vart hon än befinner sig (Smith & Hogan 1993). Då mängden bakterier på kons liggplats intimt hänger samman med antalet fall av koliforma mastiter i en besättning (Hogan et al 1989b), bör båspallen skrapas ren från smutsigt strö minst två gånger per dag och nytt strö bör läggas på varje dag. Innan korna kommer tillbaka från mjölkningen bör gångarna skrapas då hennes spenkanaler är öppna och känsliga för stänk. Likaså bör hon fodras direkt efter mjölkningen så hon inte lägger sig innan spenkanalerna hunnit stänga sig.

En annan källa att kontrollera är mjölkmaskinen. Kontrollera spenarna så att det inte är vanligt med mjölkkningsrelaterade skador såsom hyperkeratos och utkrängda spenkanaler. Om spenspetsarna är skadade störs den mekaniska tillslutningen vilket underlättar för bakterierna att orsaka infektion (Smith & Hogan 1993). Kons juver ska vara torrt och rent i samband med att hon mjölkas. Används vatten till rengöring av juvret måste man säkerställa att juvret är helt torrt innan mjölkkopparna sätts på. Desinfektion av spenarna efter mjölkningen kan i besättningar med lågt tankmjölksceltal öka risken för att problem med *E coli* ska öka. I litteraturen finns förslag på att sätta ut spendesinfektion när omfattande problem med *E coli* förekommer. Detta måste dock göras under noggrann övervakning av enskilda kors celltal då smittsamma patogener som kontrolleras av spendesinfektion annars kan börja dyka upp (Barkema et al 1999).

Förutom hygien har de enskilda kornas immunförsvar stor betydelse för uppkomsten av *E coli*-mastit. Om besättningens problem inte tycks finnas i hygienrutinerna bör man se över rutinerna kring de enskilda korna. För att hjälpa kon i samband med kalvningen då hennes immunförsvar är nedsatt är det viktigt att man tar extra väl hand om henne. Stressen kon utsätts för runt kalvning kan minskas genom att flytta henne mellan olika avdelningar i god tid, inte hålla henne i för stora grupper på trång yta, utfodra henne balanserat, se till att hon får tillräckligt med selen och E-vitamin, låta henne kalva övervakad i en egen, ren box och inte ha henne tillsammans med sjuka kor (Smith & Hogan 1993, Barkema et al 1999). Goda rutiner i samband med sinläggningen är också av vikt då hon är extra mottaglig för infektioner i juvret även då. Planera sinläggningen och utfodra kon utifrån det.

Vaccination mot *E coli*-mastit är inget som är aktuellt i Sverige idag, men som kanske kan bli aktuellt i framtiden i problembesättningar. I USA vaccineras idag mer än 50 % av korna mot *E coli* med så kallat J5-vaccin (Smith & Hogan 2004). Vaccinerade kor löper dock lika stor risk att drabbas av *E coli*-mastit som icke vaccinerade djur. Vaccinerade kor får dock mildare symptom i samband med en *E coli*-mastit och sjukdomens duration blir något kortare (Hogan et al 1992).

Idag finns inget preparat på den svenska marknaden som lämpar sig för sintidsbehandling av *E coli*-mastit. Det finns också studier där man menar att sintidsbehandling inte har någon effekt mot *E coli*-mastit (Smith & Hogan 1993). I en engelsk studie såg dock Bradley & Green (2001b) att sintidsbehandlade kor hade minskad risk för att drabbas av *E coli*-mastit under laktationens första 100

dagar jämfört med kor som inte sintidsbehandlats. I studien användes ett preparat speciellt riktat mot koliformer. Sådan sintidsbehandling kommer kanske att bli aktuellt i framtiden även i svenska problembesättningar.

TACK

Stort tack till min handledare Karin Persson Waller för utmärkt engagemang och fantastiskt snabb respons under hela arbetets gång.

REFERENSER

- Ackerman, CE., Wehrman CT., Busman, PA., Neuder, LM., Sears PM. (2003) Identifying persistent infections from cases of clinical coliform mastitis. National Mastitis Council 42nd Annual Meeting proceedings, January 26-29, 2003, Fort Worth, Texas, 376-377.
- Akers, RM. & Thompson, W. (1987) Effect of induced leukocyte migration on mammary cell morphology and milk component biosynthesis. *J Dairy Sci.* 70:1685-1695
- Barkema, HW., Schukken, YH., Lam, TJ., Beiboer, ML., Wilmink, H., Benedictus, G., Brand, A. (1998) Incidence of clinical mastitis in dairy herds grouped in three categories by bulk milk somatic cell counts. *J Dairy Sci.* 81:411-419
- Barkema, HW., Schukken, YH., Lam, TJ., Beiboer, ML., Benedictus, G., Brand, A. (1999) Management practices associated with the incidence rate of clinical mastitis. *J Dairy Sci.* 82:1643-1654
- Bean, A., Williamson, J., Cursons, RT. (2004) Virulence genes of *Escherichia coli* strains isolated from mastitic milk. *J Vet Med. B* 51:285-287.
- Bengtsson, B., Unnerstad, H., Ekman, T., Persson Waller, K., Lindberg, A., Artursson, K., Jovanovic, J., Nilsson Öst, M. (2005) Prevalence and antimicrobial susceptibility of bacteria causing acute clinical mastitis in dairy cows in Sweden 2002-2003. In: Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference, June 2005, Maastricht, The Netherlands, pp 888-889.
- Bishop, JR., Bodine, AB., Janzen, JJ. (1980) Sensitivities to antibiotics and seasonal occurrence of mastitis pathogens. *J Dairy Sci.* 63:1134-1137
- Bradley, AJ & Green, MJ. (2001a) Adaption of *Escherichia coli* to the bovine mammary gland. *J Clin Microbiol.* 39:1845-1849
- Bradley, AJ. & Green, MJ. (2001b) An investigation of the impact of intramammary antibiotic dry cow therapy on clinical coliform mastitis. *J Dairy Sci.* 84:1632-1639
- Bradley, AJ., Leach KA., Breen, JE., Green, LE., Green, MJ. (2007) Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. *Vet Rec.* 160:253-257
- Burvenich, C., Bannerman, DD., Lippolis, JD., Peelman, L., Nonnecke, BJ., Kehrli, ME Jr., Paape, M.J. (2007) Cumulative physiological events influence the inflammatory response of the bovine udder to *Escherichia coli* infections during the transition period. *J Dairy Sci.* 90(E. Suppl.):E39-E54
- Dogan, B., Klaessig, S., Simpson, K., Oliver, S., Almeida, R., Schukken, Y. (2005) Pathogenesis of chronic *Escherichia coli* intramammary infections. In: Mastitis in dairy production – current knowledge and future solutions. Ed: H. Hogeveen, Wageningen academic Publishers, pp. 131
- Dosogne, H., Meyer, E., Sturk, A., van Loon, J., Massart-Leën, AM., Burvenich, C. (2002) Effect of enrofloxacin treatment on plasma endotoxin during bovine *Escherichia coli* mastitis. *Inflamm Res.* 51:201-205
- Döpfer, D., Barkema, HW., Lam, TJ., Schukken, YH., Gaastra, W. (1999) Recurrent clinical mastitis caused by *Escherichia coli* in dairy cows. *J Dairy Sci.* 82:80-85
- Döpfer, D., Almeida, RA., Lam, TJ., Nederbragt, H., Oliver, SP., Gaastra, W. (2000) Adhesion and invasion of *Escherichia coli* from single and recurrent clinical cases of bovine mastitis in vitro. *Vet Microbiol.* 74:331-43

- FASS VET. 2008. Läkemedelsföreningen, LIF. Legoprint, Lavis, Italien
- Frost, AJ., Hill, AW., Brooker, BE. (1980) The early pathogenesis of bovine mastitis due to *Escherichia coli* Proc R Soc Lond B Biol Sci. 209:431-439
- Frost, AJ. & Brooker, BE. (1986) Hyperacute *Escherichia coli* mastitis of cattle in the immediate post-partum period. Aust Vet J. 63:327-331
- Guterbock, WM., Van Eenennaam, AL., Anderson, RJ., Gardner, IA., Cullor, JS., Holmberg, CA. (1993) Efficacy of intramammary antibiotic therapy for treatment of clinical mastitis caused by environmental pathogens. J Dairy Sci. 76:3437-3444
- Gyles, CL. *Escherichia coli* in domestic animals and humans 1994. CAB International, Wallingford, UK.
- Hamann J., Friton, G. (2003) Klinische wirksamkeit nicht steroidaler Antiphlogistika beim Vorliegen akuten Mastiden. Praktischer Tierarzt 84:390-396
- Hoeben, D., Monfardini, E., Burvenich, C., Hamann, J. (2000) Treatment of acute *Escherichia coli* mastitis in cows with enrofloxacin : effect on clinical signs and chemiluminescence of circulating neutrophils. J Dairy Res. 67:485-502
- Hogan, JS., Todhunter, DA., Smith, KL., Schoenberger, PS. (1989a) Serum susceptibility of coliforms isolated from bovine intramammary infections. J Dairy Sci. 72:1893-9
- Hogan, JS., Smith, KL., Hoblet, KH., Todhunter, DA., Schoenberger, PS., Hueston, WD., Pritchard, DE., Bowman, GL., Heider, LE., Brockett, BL. (1989b) Bacterial counts in bedding materials used on nine commercial dairies. J Dairy Sci. 72:250-258
- Hogan, JS., Hogan, JS., Weiss, WP., Todhunter, DA., Smith KL., Schoenberger PS. (1992) Efficacy of an *Escherichia coli* J5 mastitis vaccine in an experimental challenge trial. J Dairy Sci. 75:415-422
- Hogan, JS., & Smith, KL. (2003) Coliform mastitis. Vet Res. 34:507-519
- Jones, GF., & Ward, GE. (1989) Cause, occurrence, and clinical signs of mastitis and anorexia in cows in a Wisconsin study. J Am Vet Med Assoc. 195:1108-1113
- Kaartinen, L., Kaartinen, L., Salonen, M., Alli, L., Pyörälä, S. (1995) Pharmacokinetics of enrofloxacin after single intravenous, intramuscular and subcutaneous injection in lactating cows. J Vet Pharmacol Ther. 18:357-362
- Kaipainen, T., Pohjanvirta, T., Shpigel, NY., Schwimmer, A., Pyörälä, S., Pelkonen, S. (2002) Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from bovine clinical mastitis. Vet Microbiol. 85:37-46.
- Kühn, I. & Möllby, R. (1993) The PhP RS system. A simple microplate method for studying coliform bacterial populations. J Microbiol Meth. 17:255-259
- Landin, H. (2006) Mastitbehandling i svensk mjölkproduktion. Svensk veterinärtidning 4:19-25
- Lehtolainen, T. (2004) *Escherichia coli* mastitis. Bacterial factors and host response. Diss. University of Helsinki
- Leininger, DJ., Roberson, JR., Elvinger, F., Ward, D., Akers, RM. (2003) Evaluation of frequent milkout for treatment of cows with experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. J Am Vet Med Assoc. 222:63-66
- Menzies, FD., McBride, SH., McDowell, SW., McCoy, MA., McConnell, W., Bell, C. (2000) Clinical and laboratory findings in cases of toxic mastitis in cows in Northern Ireland. Vet Rec. 147:123-8
- Nemeth, J., Muckle, CA., Gyles, CL. (1994) In vitro comparison of bovine mastitis and faecal *Escherichia coli* isolates. Vet Microbiol. 40:231-238

- Nilsson, L., Franklin A., Funke H. (1997) Antimicrobial drug susceptibility of bovine udder pathogens in Sweden. Proceedings Society for Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine, Chester, England
- Nyman, A. (2007) Epidemiological studies of risk factors for bovine mastitis. Doctoral Thesis No 2007:80. Swedish University of Agricultural sciences, Uppsala, Sweden.
- Ohtsuka, H., Kudo, K., Mori, K., Nagai, F., Hatsugaya, A., Tajima, M., Tamura, K., Hoshi, F., Koiwa, M., Kawamura, S. (2001) Acute phase response in naturally occurring coliform mastitis. *J Vet Med Sci.* 63:675-678
- Olde Riekerink, RG., Barkema, HW., Stryhn, H. (2007) The effect of season on somatic cell count and the incidence of clinical mastitis *J Dairy Sci.* 90:1704-1715
- Oliver, SP. & Bushe, T. (1987) Growth inhibition of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* during involution of the bovine mammary gland: relation to secretion composition. *Am J Vet Res.* 48:1669-1673
- Persson Waller, K. (2000) Mammary gland immunology around parturition. Influence of stress, nutrition and genetics. *Adv Exp Med Biol.* 480:231-45
- Persson Waller, K. et al. (2007) Supplementation of RRR-alpha-tocopheryl acetate to periparturient dairy cows in commercial herds with high mastitis incidence. *J Dairy Sci.* 90:3640-3646.
- Pitkälä, A., Haveri, M., Pyörälä, S., Myllys, V., Honkanen-Buzalski, T. (2004) Bovine mastitis in Finland 2001- prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *J Dairy Sci.* 87:2433-2441
- Pyörälä, SH., Kaartinen, L., Käck, H., Rainio, V. (1994) Efficacy of two therapy regimens for treatment of experimentally induced *Escherichia coli* mastitis in cows. *J Dairy Sci.* 77:453-461
- Pyörälä, SH. & Pyörälä, EO. (1998) Efficacy of parenteral administration of three antimicrobial agents in treatment of clinical mastitis in lactating cows: 487 cases (1989-1995). *J Am Vet Med Assoc.* 212:407-412
- Pyörälä, SH. (2003) Treatment of coliform mastitis: Finland method. The North American Veterinary Conference, Orlando, Florida 2003
- Radostits (Ed)(2000) Veterinary medicine. A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses. 9:e upplagan. Edinburgh: WB Saunders Company Ltd.
- Rainard, P., Poutrel, B., Caffin, JP. (1984) Assessment of hemolytic and bactericidal complement activities in normal and mastitic bovine milk. *J Dairy Sci.* 67:614-619
- Rantala, M., Kaartinen, L., Välimäki, E., Stryman, M., Hiekkaranta, M., Niemi, A., Saari, L., Pyörälä, S. (2002) Efficacy and pharmacokinetics of enrofloxacin and flunixin meglumine for treatment of cows with experimentally induced *Escherichia coli* mastitis *J Vet Pharmacol Therap.* 25:251-258
- Sandholm, M. (Ed) (1995) The bovine udder and mastitis. Helsinki. Gummerus Kirjapaino Oy. Jyväskylä.
- Schukken, YH., Grommers, FJ., van de Geer, D., Erb, HN., Brand, A. (1991) Risk factors for clinical mastitis in herds with a low bulk milk somatic cell count. 2. Risk factors for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Dairy Sci.* 74:826-832
- Shpigel, NY., Chen, R., Winkler, M., Saran, A., Ziv, G., Longo, F. (1994) Anti-inflammatory ketoprofen in the treatment of field cases of bovine mastitis. *Res Vet Sci.* 56:62-68
- Shuster, DE., Harmon, RJ., Jackson, JA., Hemken, RE. (1991) Suppression of milk production during endotoxin-induced mastitis. *J Dairy Sci.* 74:3746-3774

- Smith, KL., Harrison, JH., Hancock, DD. , Todhunter, DA., Conrad, HR. (1984) Effect of vitamin E and selenium supplementation on incidence of clinical mastitis and duration of clinical symptoms. *J Dairy Sci.* 67:1293-1300
- Smith, KL., Todhunter, DA., Schoenberger, PS. (1985) Environmental pathogens and intramammary infection during the dry period *J Dairy Sci.* 68:402-417
- Smith, KL. & Hogan, JS. (1993) Environmental mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 9:489-498
- Smith, KL. & Hogan, J.S. (2004) Vaccination against coliform mastitis: A historical perspective. *International Dairy Federation mastitis newsletter no 22*
- Sobiraj, A., Kron, A., Schollmeyer, U., Failing, K. (1997) Federal investigations on the distribution and in vitro resistance of udder pathogenic bacteria in the milk of cows with subclinical mastitis. In German. *Tierarztl Prax.* 25:108-115
- Suriyasathaporn, W., Schukken, YH., Nielen, M., Brand, A. (2000) Low somatic cell count: a risk factor for subsequent clinical mastitis in a dairy herd. *J Dairy Sci.* 83:1248-1255
- Targowski, SP. (1983) Role of immune factors in protection of mammary gland. *J Dairy Sci.* 66:1781-1789
- Tyler, JW., Welles, EG., Erskine, RJ., Lin, HC., Williams, MA., Spano, JS., Gaslin, JT., McClure, K.A. (1994a) Clinical and clinicopathologic changes in cows with endotoxin-induced mastitis treated with small volumes of isotonic or hypertonic sodium chloride administered intravenously. *Am J Vet Res.* 55:278-287
- Tyler, JW., DeGraves, FJ., Erskine, RJ., Riddell, MG., Lin, HC., Kirk, JH. (1994b) Milk production in cows with endotoxin-induced mastitis treated with isotonic or hypertonic sodium chloride solution *J Am Vet Med Assoc.* 204:1949-1952
- Vangroenweghe, FL., Rainard, P., Paape, M., Duchateau, L., Burvenich, C. (2004) Increase of *Escherichia coli* inoculum doses induces faster innate immune response in primiparous cows. *J Dairy Sci.* 87:4132-4144
- Weiss, WP., Hogan, JS., Smith, KL., Hoblet, KH. (1990) Relationships among selenium, vitamin E, and mammary gland health in commercial dairy herds. *J Dairy Sci.* 73:381-390.
- Wenz, JR., Barrington, GM., Garry, FB., McSweeney, KD., Dinsmore, RP., Goodell, G., Callan, RJ. (2001) Bacteremia associated with naturally occurring acute coliform mastitis in dairy cows. *JAVMA* 219:976-981
- Wenz, JR., Barrington, GM., Garry, FB., Ellis, RP., Magnuson, RJ. (2006) *Escherichia coli* isolates' serotypes, genotypes, and virulence genes and clinical coliform mastitis severity. *J Dairy Sci.* 89:3408-3412
- Ziv, G. & Longo, F. 1991. Comparative clinical efficacy of ketoprofen and flunixin in the treatment of induced *E. coli* endotoxin mastitis in lactating dairy cows. Pages 207–208 in *Mammites des vaches laitières, Société Française de Buiatrie, Paris, France.*

BILAGA 1

BIOKEMISK UNDERSÖKNING AV JUVERPATOGENA *ESCHERICHIA COLI* MED PHENEPLATE

INTRODUKTION

Escherichia (E) coli orsakar ungefär 16 % av de akuta kliniska mastiter svenska mjölkkor drabbas av (Bengtsson et al 2005). Infektion med *E coli* ger ofta akut mastit med varierande grad av kliniska symptom samt risk för minskad mjölkproduktion och för tidig utslagning. Både miljöfaktorer i form av hygienförhållanden samt kofaktorer såsom immunstatus spelar in vid insjuknandet.

Traditionellt indelas juverpatogena bakterier i kobundna eller miljöbundna vilket syftar på var den viktigaste smittkällan finns. Kobundna bakterier är smittsamma mellan kor och orsakar ofta kroniska infektioner medan miljöbakterierna är opportunisterna i kons miljö som bara tillfälligt orsakar sjukdom. *E coli* tillhör den senare av dessa båda grupper. Kroniska *E coli* infektioner förekommer dock, men troligen i liten omfattning. Traditionellt har man ansett att akut klinisk *E coli*-mastit få orsakas av ett stort antal olika stammar men detta har inte undersökts ordentligt under svenska förhållanden.

Det finns flera olika sätt att jämföra olika *E coli*-isolat biokemiskt och gruppera dem efter egenskaper och släktskap. Ett sätt är att använda ett sk Pheneplate-system (Kühn 1993) som baseras på bakteriernas förmåga att jäsa ett antal olika sockerarter över viss tid. Bakterierna kan utifrån jäsningsmönstret indelas i grupper om närbesläktade typer.

SYFTE

Denna studie hade som mål att undersöka om akut klinisk *E coli*-mastit vanligen orsakas av opportunistiska stammar med stor variation eller om vissa stammar är vanligare, t ex inom vissa regioner. Det skulle i sådant fall kunna tyda på spridning av enstaka kloner mellan kor och gårdar.

MATERIAL OCH METODER

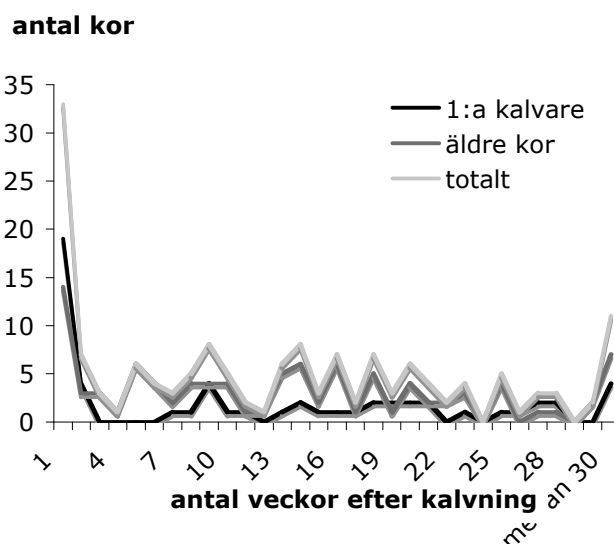
Studien utfördes på 168 isolat av *E coli* som insamlats under en nationell undersökning rörande den bakteriella etiologin vid akut klinisk mastit i Sverige 2002-2003 (Bengtsson et al 2005). För att ett sjukdomsfall skulle få medverka i studien krävdes att den aktuella kon ej behandlats för mastit tidigare i laktationen, att hon inte haft ett celltal på över 200 000 celler/ml vid den senaste provmjölkningen samt att hon inte behandlats med antibiotika under den senaste

månaden. Mjölksprov togs från juverdelar med mastit och undersöktes bakteriologiskt. Bakteriefynd typades enligt ackrediterade metoder. I samband med provtagning samlades även information om kons identitet (gård och individ), laktationsnummer samt datum för hennes senaste kalvning. Alla bakterieisolat frystes för senare undersökningar.

E coli-stammarna undersöktes biokemiskt med hjälp av Pheneplate rapid-screening (PhP-RS) enligt metod beskriven av Kühn & Möllby (1993). Efter att bakterieisolaten tinats odlades de över natt på blodagar. Cirka 0,3-3 mg bakteriematerial blandades med substratlösning bestående av proteospepton, bromthymolblått samt destillerat vatten. Lösningen inokulerades sedan i mikrotiterplattor med torkade reagenter bestående av 11 sockerarter, speciellt utvalda för att kunna särskilja olika typer av *E coli*, och ett pH-test. Sockerarterna var cellobiose, sucrose, gentobiose, raffinose, adonitol, subrose, l-fucose, arbutin, citrat, malonat och ornithine. Efter inkubation i 37° C avlästes plattorna i en fotospektrometer (620nm) efter 16, 40 och 64 h. Med hjälp av speciellt framtagen mjukvara jämfördes bakterieisolatens biokemiska reaktioner och deras släktskap beräknades.

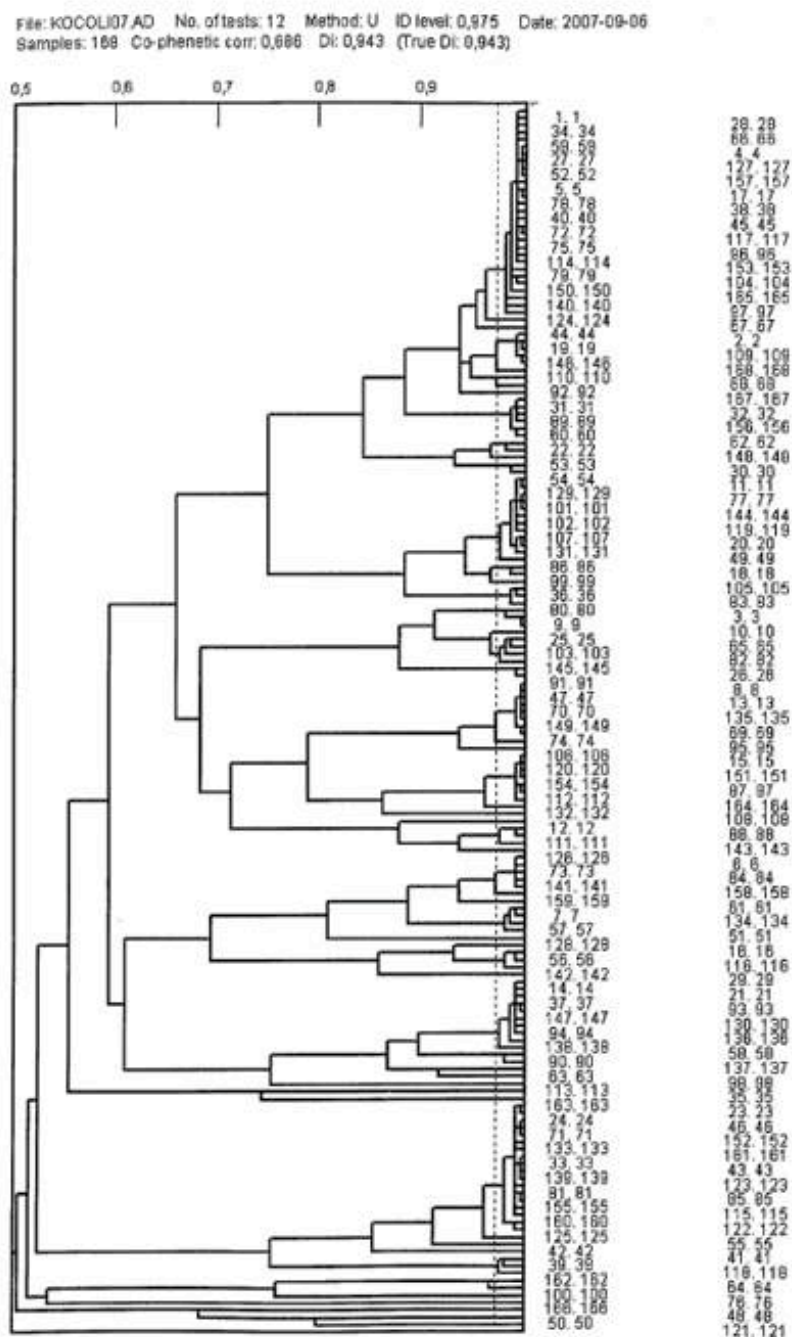
RESULTAT

E coli-isolaten härrörde från 59 förstakalvare och 105 äldre kor. För 4 kor fanns ingen uppgift om laktationsnummer. En stor andel (36 %) av de drabbade förstakalvarna insjuknade i akut *E coli* mastit den första veckan efter kalvning (Figur 1). Även bland de äldre korna drabbades många (14 %) första veckan efter kalvning men en större andel uppträdde jämnt utspritt under resten av laktationen.



Figur 1. Fördelning av fall av akut klinisk *E coli*-mastit hos förstakalvare, äldre kor och totalt hos alla kor över tiden relativt kalvning.

I Figur 2 visas ett släktskapsdendrogram från Pheneplate-analysen av de undersökta stammarna. Resultaten visar att det fanns totalt 56 olika PhP-typer av *E coli* i materialet. Två typer var vanligare än övriga med 29 respektive 18 isolat per typ. Resterande typer hade 1-12 isolat per typ.



Figur 2. Släktskapsdendrogram från Pheneplate-analysen.

De två dominerande PhP-typerna återfanns över hela landet. Vid 13 tillfällen drabbades mer än en individ av *E coli*-mastit på samma produktionsplats. Intervallet mellan sjukdomsfallen var från några dagar till mer än sex månader,

endast vid tre tillfällen var det mindre än en månad emellan. Endast vid ett av dessa tillfällen återfanns samma PhP-typ av *E coli* vid bägge mastitfallen, i det fallet var det 6 månader mellan fallen.

SLUTSATS

Slutsatsen av denna studie blir att det i Sverige, i enlighet med studier från andra länder, förekommer många olika stammar av *E coli* i samband med akut klinisk *E coli*-mastit. Ingen av de två typer som hade högst antal isolat per typ återfanns inom någon speciell region utan fanns utspridda över landet. Resultaten stödjer tanken att akut klinisk *E coli*-mastit vanligen orsakas av infektion med opportunistiska bakteriestammar och inte av ett mindre antal dominerande stammar vilket ofta är fallet t ex i samband med infektion med kobundna bakterier som *Staphylococcus aureus*.

REFERENSER

- Kühn, I. & Möllby, R. (1993) The PhP RS system. A simple microplate method for studying coliform bacterial populations. *J Microbiol Meth* 17:255-259
- Bengtsson, B., Unnerstad, H., Ekman, T., Persson Waller, K., Lindberg, A., Artursson, K., Jovanovic, J., Nilsson Öst, M. (2005) Prevalence and antimicrobial susceptibility of bacteria causing acute clinical mastitis in dairy cows in Sweden 2002-2003. In: Proceedings of the 4th IDF International Mastitis Conference, June 2005, Maastricht, The Netherlands, pp 888-889.