

Förekomst av *Klebsiella pneumoniae* i avföring hos mjölkkor – en riskfaktor för mastit?

Marie Lektonius

**Handledare: Karin Persson Waller
Inst. för kliniska vetenskaper
Biträdande handledare: Anna Aspán
Avd. för bakteriologi, SVA
Biträdande handledare: Helle Unnerstad
Avd. för bakteriologi, SVA**

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

SUMMARY	1
SAMMANFATTNING	2
INLEDNING	3
SYFTE	5
MATERIAL OCH METODER	6
Utprovning av metod	6
Djurmaterial	6
Förvaring och transport av proverna.....	6
Undersökning av klebsiellaförekomst	6
Analys av avföringsprover från mjölkbesättningar	7
Djurmaterial	7
Förvaring och transport av proverna.....	8
Analys	8
PFGE-undersökning av klebsiellaisolat.....	8
Metod	8
RESULTAT	9
Utprovning av metod	9
Fynd av <i>K. pneumoniae</i> i avföringsprov	9
PFGE-fynd vid analys av <i>K. pneumoniae</i> isolat	9
Mjölkprover	9
Miljöprover	10
Avföringsprover.....	11
DISKUSSION.....	13
LITTERATURFÖRTECKNING.....	16

SUMMARY

Cows affected by mastitis caused by *Klebsiella (K.) pneumoniae* often become seriously ill. In some cases herd problems may occur. Contaminated bedding material is considered to be one of the most common risk factors for *klebsiella* mastitis. In a recently performed study in USA it was found, however, that more than 80 % of healthy, lactating dairy cows excreted *K. pneumoniae* in faeces. Such a high degree of excretion of *klebsiella* bacteria was considered to possibly be a new risk factor for mastitis.

The overall aim of this work was to find more knowledge regarding important risk factors for *klebsiella* mastitis in Swedish dairy cows. More specifically one aim was to test out a method for analysis of *K. pneumoniae* in faecal samples from dairy cows, and with the use of this method investigate the presence of *K. pneumoniae* in faeces from dairy cows in Swedish herds with or without problems due to *klebsiella* mastitis. To better understand the spread of *K. pneumoniae* within Swedish dairy herds another aim was to compare isolates of *K. pneumoniae* from milk samples from clinical cases of mastitis, faecal samples and environmental samples using PFGE.

One hundred faecal samples were collected from one hundred dairy cows on ten farms. Five of these farms had problems with *Klebsiella* mastitis. The samples were analysed by a method based on a recently developed American method to detect *Klebsiella pneumoniae* in faeces of dairy cows. MacConkey agar containing ampicillin was used. Confirmation of the diagnosis *K. pneumoniae* was done using API 20E. Twenty-two milk isolates, five environmental isolates and two faecal isolates from the five farms with mastitis problems were genotyped using PFGE (pulsed-field gel electrophoresis).

One faecal sample from a farm with mastitis problems was positive for *K. pneumoniae*. Two isolates came from this sample. Among in total twenty-seven isolates (milk, environmental and faecal) thirteen pulsotypes were found, and six of those were found more than once. One pulsotype was found in milk isolates from two farms. On two farms, all samples belonged to the same herd specific pulsotype. On another farm, one environmental isolate had the same pulsotype as a milk isolate. Two other milk isolates from the same farm were of the same pulsotype. The two faecal isolates belonged to the same pulsotype. In the rest of the cases single isolates were found of the remaining pulsotypes.

Faecal shedding of *K. pneumoniae* does not seem to be an important risk factor for *klebsiella* mastitis in Swedish dairy cows. The PFGE results showed large diversity among milk isolates, but that farm outbreaks of *klebsiella* mastitis caused by the same *klebsiella* strain can occur.

SAMMANFATTNING

Kor som drabbas av mastit orsakad av *Klebsiella (K.) pneumoniae* blir ofta allvarligt sjuka. I vissa fall kan besättningsproblem uppstå. Kontaminerat strömaterial anses som en av de vanligaste riskfaktorerna för klebsiellamastit. I en nyligen genomförd studie i USA fann man dock att mer än 80 % av friska, lakterande kor utsöndrade *K. pneumoniae* i avföringen. Utsöndring av klebsiellabakterier i sådan grad ansågs kunna vara en ny riskfaktor för mastit.

Det övergripande syftet med detta arbete var att försöka få större klarhet över betydelsefulla riskfaktorer för klebsiellamastit hos svenska mjölkkor. Mer specifikt var ett syfte att sätta upp en metod för analys av *K. pneumoniae* i avföring från mjölkkor och att med hjälp av denna metod undersöka förekomsten av *K. pneumoniae* i avföring från mjölkkor i svenska besättningar med eller utan problem med klebsiellamastit. För att bättre förstå spridningen av *K. pneumoniae* i svenska mjölkkobesättningar var ett annat syfte att med hjälp av PFGE jämföra isolat av *K. pneumoniae* från mjölkprov från kliniska mastiter, avföringsprov samt miljöprover.

Etthundra avföringsprover togs från hundra lakterande kor på tio gårdar. Fem av dessa gårdar hade klebsiellamastitproblem. Proverna analyserades med hjälp av en metod som baserades på en nyligen framtagen amerikansk metod för att detektera klebsiellabakterier i avföringen från mjölkkor. MacConkey-agar innehållande ampicillin användes. Verifiering av diagnosen *K. pneumoniae* gjordes med API 20E. Tjugotvå mjölkisolat, fem miljöisolat och två avföringsisolat från de fem problemgårdarna genotypades med PFGE (pulsfält gel elektrofores).

Ett avföringsprov från en gård med mastitproblem var positivt för *K. pneumoniae*. Från provet odlades två isolat fram. Bland de totalt tjugosju isolaten (mjölk-, miljö- och avföringsprover) återfanns tretton olika pulstyper och sex av dessa återfanns mer än en gång. En pulstyp återfanns i mjölkisolat från två gårdar. På två gårdar tillhörde alla mjölkisolat en gårdsspecifik pulstyp. På en annan gård hade ett miljöisolat samma pulstyp som ett mjölkisolat. Två andra mjölkisolat från samma gård visades vara av samma pulstyp. De två avföringsisolaten tillhörde en och samma pulstyp. Denna pulstyp återfanns inte bland mjölkisolaten på den gården. I övriga fall återfanns enstaka isolat av resterande pulstyper.

Utsöndring av *K. pneumoniae* via avföringen verkar inte vara en stor riskfaktor för utvecklandet av klebsiellamastit hos svenska mjölkkor. PFGE-resultaten visade att det fanns stor diversitet bland mjölkisolaten men att besättningsutbrott av klebsiellamastit orsakad av samma klebsiellastam kan ske.

INLEDNING

Juverinflammation (mastit) är den vanligaste sjukdomen som drabbar mjölkkor i Sverige. Bakterier som orsakar mastit kommer från miljön eller från kroniskt infekterade djur. Koliformer är exempel på miljöbakterier. Bland dessa ger *Escherichia coli* upphov till flest mastiter. *Klebsiella* spp är den näst vanligaste typen av koliform som orsakar mastit hos mjölkkor i Sverige. *Klebsiella* spp som orsak till akut klinisk mastit uppgick till 4,2 % i en studie gjord 2002/2003 (Bengtsson et al., 2005). De klebsiellaarter man talar om vid klebsiellamastit är *K. oxytoca* och *K. pneumoniae*. Av dessa är *K. pneumoniae* den mest frekvent förekommande. *K. pneumoniae* kan också framkalla sjukdom hos andra djurslag och människor. Vid ovan nämnda undersökning från 2002/2003 orsakade *K. pneumoniae* 75 % av klebsiellamastiterna medan *K. oxytoca* orsakade 23 % av dessa mastiter. Två procent orsakades av övriga klebsiellaarter (Bengtsson et al., 2005). Klebsiellabakterier är alltså inte en av de vanligaste orsakerna till uppkomst av mastit i Sverige. Det har dock skett en fördubbling av förekomsten av *Klebsiella* spp vid klinisk mastit mellan 1994/1995 (Nilsson et al., 1997) och 2002/2003 (Bengtsson et al., 2005).

Kor som drabbas av klebsiellamastit blir ofta allvarligt sjuka. Av djurskyddsskäl eller på grund av kroniska skador avlivas eller slaktas korna i flera fall (Persson Waller och Unnerstad, 2004). Tillfrisknande har i två studier uppskattats till 34-37 % (Smith et al., 1985; Robertson et al., 2004). Det är större risk för dödsfall vid klebsiellamastit än vid *E. coli*-mastit (Erskine et al., 2002). Kor som dött på grund av klebsiellamastit visar en massiv inflammation och utspridd nekros i juvervävnaden (Bannerman et al., 2004).

Klebsiellamastit drabbar inte bara enstaka djur utan kan även utgöra ett besättningsproblem. I de besättningar där många kor drabbas kan det ta lång tid att bli av med problemet och det kan leda till stora ekonomiska förluster (Persson Waller och Unnerstad, 2004). Produktionsförluster hos förstakalvare och äldre kor har i en undersökning uppgått till 5-6 respektive 10 kg/dag (Gröhn et al., 2004). Det kan ibland vara svårt att komma till rätta med ett klebsiellamastitproblem. Orsaken till detta kan bero på att patogenesen för klebsiellamastit är ofullständigt känd.

Det finns flera olika riskfaktorer för uppkomst av klebsiellamastit. Riskfaktorer som man hittills identifierat är kontaminerat strömmaterial, förorenat bete och vatten samt kroniskt infekterade djur (Persson Waller och Unnerstad, 2004). Även dålig spenkondition kan vara en riskfaktor (Neijenhuis et al., 2001). Det finns ett antal faktorer som kan öka exponeringsrisken för klebsiellainfektioner. Dessa är hög kotäthet, dålig ventilation, otillräcklig rengöring av framför allt bakre delen av liggbåset, gångar, utfodringsområden och motionsområden, tillgång till dammar och leriga motionsområden, smutsiga kalvningsboxar samt allmänt dålig hygien och rengöring (Persson Waller och Unnerstad, 2004).

Kontaminerat strömmaterial är den vanligaste smittkällan för klebsiellamastit (Todhunter et al., 1991). Bland strömmaterialen är det sågspån och kutterspån som visats vara de största källorna till smitta. Detta beror på att klebsiellabakterier, som är en vanlig opportunistisk bakterie i jord, förorenar stockar som dras på marken. Vid tillverkning av spån kontamineras spånet med klebsiellabakterier

(Bagley, 1985). Klebsiellabakterierna växer sedan till på lagringsplatsen på gården eller på båspallen i ladugården. Även halm och återanvänt tidningspapper som strömedel kan vara en bra grogrund för klebsiellatillväxt (Hogan et al., 1990). Bakterieförorening av spenspetsarna och antalet kliniska mastiter har korrelerats till bakteriemängden på båspallarna (Hogan et al., 1989, Zdanowicz et al., 2004). Oorganiska strömaterial som sand och krossad kalksten innehåller mycket lägre bakterieantal än organiska strömaterial (Hogan et al., 1989) och rekommenderas därför som strö till mjölkkor i vissa länder. Det finns dock fall av klebsiellamastit där man inte har kunnat identifiera smittkällan. Trots goda hygienrutiner och användandet av oorganiskt strömaterial som sand har gårdar i USA drabbats av klebsiellamastit. I dessa fall skulle nya, okända riskfaktorer kunna vara orsaken.

I USA har man i en studie undersökt förekomsten av klebsiellabakterier i avföringen från friska mjölkkor (Munoz et al., 2006). I studien undersökte man avföringsprover från en gård med hundra friska mjölkkor en gång i månaden under fem månader. Från ytterligare tio gårdar tog man vid ett tillfälle avföringsprover från tio friska mjölkkor per gård. Analysmetoden baserades på användandet av MacConkey-agar innehållande ampicillin. Avföring innehåller mycket kolibakterier och de flesta av dessa är känsliga för ampicillin medan klebsiellabakterier är resistenta. Resultatet visade att mer än 80 % av avföringsproverna från friska mjölkkor innehöll *K. pneumoniae*.

Utsöndring av klebsiellabakterier via avföringen skulle därmed kunna vara en orsak till förekomst av klebsiellamastiter i besättningar där man inte hittat några andra riskfaktorer. Hos människor har man sett att klebsiellabakterier kan finnas i gastrointestinalkanalen och att utsöndring av dessa via faeces är en orsak till spridning av infektioner (Desimoni et al., 2004; Pai et al., 2004). Infektion med *K. pneumoniae* är en av de viktigaste sjukhusorsakade infektionerna. På sjukhus infekteras nedsatta patienter av icke-virulenta stammar från omgivningen (Podschun et al., 1986). Om utsöndring av klebsiellabakterier via faeces hos människor kan bidra till infektioner, så varför skulle det inte kunna vara så även bland mjölkkor?

Munoz & Zadoks (2007) har även utfört en uppföljande studie för att se om utsöndringen av klebsiellabakterier via avföringen är tillfällig eller persistent och jämförde klebsiellastammar från avföringsprover med så kallad random-amplified polymorphic DNA typning. Om det finns persistenta smittbärare/smittspridare skulle man genom isolering av dessa kor kunna minska smittrisen i mjölkkobesättningar med klebsiellaproblem. I studien hittades dock många olika stammar av klebsiella i avföring vilket enligt författarna tyder på att det rör sig om tillfällig snarare än persistent närvaro av klebsiellabakterier i gastrointestinalkanalen. Det finns flera studier där man undersökt klebsiellastammar från människor med infektioner och från mjölkkor med mastit. I dessa studier har man sett en stor diversitet bland stammarna (Brian et al., 1984; Podschun et al., 1986; Kikuchi et al., 1995; Paulin-Curlee et al., 2007) vilket stämmer väl överens med resultatet i ovan nämnda studie av Munoz & Zadoks (2007). Man har även sett att det ibland sker utbrott av klebsiellamastit där samma klebsiellastam isolerats från flera smittade kor (Munoz et al., 2007).

Spridningen av mastitpatogener på en mjölkgård kan studeras genom att jämföra bakteriestammar isolerade från mjölk i samband med mastit och från

omgivningsprover. Om flera kor infekterats med samma bakteriestam anser man att smitta mellan djur har skett. Det skulle dock också kunna vara så att en bakteriestam från miljön smittat flera kor eller att en specifik stam är mer patogen än andra (Zadoks & Munoz, 2007). Vid smittspårning av ett utbrott av *K. pneumoniae* på en gård i staten New York i USA såg man att diversiteten av olika klebsiellastammar var högre hos isolat från avförings-, foder- och vattenprover än isolat från mjölkprover (Munoz et al., 2007)

Det finns flera olika metoder för att jämföra bakteriestammar. Paulin-Curlee et al. (2007) jämförde i en studie tre olika metoder för subtypning av klebsiellabakterier från mjölkprover. De metoder de använde var repetitive DNA sequence PCR (rep-PCR), pulsält gel elektrofores (PFGE) och multilocus sequence typing (MLST). De tre metoderna gav liknande resultat. Metoden rep-PCR var enligt författarna litet sämre än de andra två metoderna men på grund av att den är lätt att utföra, särskilt om det rör sig om många isolat, ansågs den i stort sett lika användbar som de andra två metoderna. I en annan studie använde Kikuchi et al. (1995) plasmidprofiler för att jämföra klebsiellabakterier isolerade från mjölk vid mastit. Hansen et al. (2002) jämförde typning av klebsiellabakterier med PFGE och O:K-serotypning. De ansåg att PFGE var något bättre på att urskilja de olika stammarna och att metoden också var mycket bra för typning av utbrott med få isolat.

PFGE är idag den mest använda metoden för smittspårning av klebsiella. Den är reproducerbar, robust och inte så dyr som sekvensbaserade metoder. Vid PFGE renas bakteriens DNA vilket sedan klyvs på speciella ställen med restriktionsenzym. DNA-fragmenten separeras sedan i en gel med hjälp av elektrofores. Gelen färgas slutligen och fotograferas. På fotografiet ses distinkta bandmönster för de olika stammarna.

I Sverige har det inte gjorts några undersökningar rörande utsöndring av klebsiellabakterier via avföringen hos mjölkkor. Det har inte heller undersökts hur stor variationen är inom och mellan gårdar hos klebsiellastammar som isolerats från mjölk vid klinisk mastit.

SYFTE

Det övergripande syftet med examensarbetet var att försöka få större klarhet över betydelsefulla riskfaktorer för klebsiellamastit hos svenska mjölkkor.

Mer specifikt var ett syfte att sätta upp en metod för analys av *K. pneumoniae* i avföring från mjölkkor och att med hjälp av denna metod undersöka förekomsten av *K. pneumoniae* i avföring från mjölkkor i svenska besättningar med eller utan problem med klebsiellamastit.

För att bättre förstå spridningen av *K. pneumoniae* i svenska mjölkbesättningar var ett annat syfte att med hjälp av PFGE jämföra klebsiellastammar isolerade från mjölkprov från kliniska mastiter, avföringsprov samt miljöprover.

MATERIAL OCH METODER

Utprovning av metod

Djurmaterial

En metod för detektering av *Klebsiella* spp i avföring från mjölkkor utprovades. Till detta togs avföringsprov från rektum från två friska, lakterande kor på Kungsängens försöksgård, Uppsala. Proverna togs med steril (vänd ut och in) rektalhandske utan hjälp av glidslem.

Förvaring och transport av proverna

Proverna förvarades i rektalhandsken och paketerades i kyllådor med frysklampor för transport till laboratoriet på SVA. Analys utfördes samma dag.

Undersökning av klebsiellaförekomst

Den metod som användes för detektering av *Klebsiella* spp i avföring från mjölkkor har beskrivits av Munoz et al. (2006). Följande ändringar gjordes jämfört med originalmetodbeskrivningen. Sterila mjölkprovror av plast (10 ml med skruvkork) samt glasbägare användes och hälften så mycket avföring och spädningvätska togs till varje prov. En uppskattning av antalet kolonier gjordes och för konfirmering av klebsiellaliknande kolonier användes API 20E.

För att undersöka om det var möjligt att detektera *K. pneumoniae* i avföring tillsattes klebsiellabakterier (referensstam *K. pneumoniae* 425 odlad i buljong över natt) till avföringsproverna. Klebsiellabakterierna späddes 1:10 i koksalt i fyra spädningsteg. Från träckproverna (n=2) överfördes 0,5 g träck till vardera fem sterila mjölkror innehållande 4,5 ml 0,9 % koksalt per rör. Därefter tillsattes 100 µl klebsiellaspädning till vardera rör (n=4). Till det femte röret tillsattes enbart 100 µl koksalt som negativ kontroll. Proverna preinkuberades sedan i 37 °C under 4 timmar. Därefter ströks material från varje prov ut på MacConkey-agar innehållande 10 mg/l ampicillin (MacA-agar) samt på nötblodagar med hjälp av en steril tops. Plattorna inkuberades därpå i 37 °C över natt. De preinkuberade proverna sparades och förvarades i kylskåp (4 °C). Efter inkuberingen räknades antalet klebsiellaliknande kolonier på plattorna. Kriterierna för klebsiellaliknande kolonier var att de skulle ha följande utseende: små till stora (1-7 mm), kupolformade, fuktiga, slemmiga, glänsande kolonier med hel kant. Vidare skulle det inte finnas precipitat i omgivande agar och kolonierna skulle vara rosafärgade i mitten och runt kanterna eller gula i mitten med gula eller rosa kanter. Dessutom uppskattades antalet övriga kolonier. Om det inte växte några klebsiellaliknade kolonier men mindre än 200 kolonier med annat utseende preinkuberades 1:10 spädningen av träck/koksalt i ytterligare 20 timmar. Därefter ströks de på MacA-agar och inkuberades i 20 timmar. Om inga klebsiellaliknande bakterier hittades och det växte mer än 200 men mindre än 800 kolonier med annat utseende tolkades provet som negativt. Vid växt av mer än 800 kolonier totalt gjordes en ny 1:10 spädning i koksalt från det ursprungliga träckprovet. Spädningen skulle sedan strykas direkt på MacA-platta utan preinkubering. De klebsiellaliknande kolonier som hittades ströks på nötblodagar och inkuberades över natt. Konfirmering av klebsiellaliknande kolonier gjordes med API 20E. Om minst en klebsiellaliknande koloni konfirmerades som *Klebsiella* spp ansågs avföringsprovet vara positivt.

Analys av avföringsprover från mjölkbesättningar

Djurmaterial

Fem försöksgårdar med klebsiellaproblem identifierades med hjälp av fältpraktiserande veterinärer. Kriterierna för klebsiellaproblem var att gården skulle ha haft minst tre fall av klinisk klebsiellamastit inom de senaste två månaderna eller haft problem med klebsiellamastit under en längre tid. Från dessa gårdar skickade veterinärer in mjölkprover till Mastitlaboratoriet, SVA, för konfirmering av diagnosen *K. pneumoniae*. I ett fall skickades även miljöprover in från gården. Konfirmering av *K. pneumoniae* gjordes med hjälp av API 20E. Alla dessa klebsiellastammar frystes för senare analys.

Fem kontrollgårdar som hade likartat inhysnings- och mjölkningssystem samt koantal identifierades med hjälp av fältpraktiserande veterinärer. För beskrivning av besättningsdata för försöks- och kontrollgårdar se Tabell 1.

Från varje försöks- och kontrollgård togs tio avföringsprover från mjölkande kor enligt beskrivning ovan. Från försöksgårdarna togs om möjligt prov från fem friska kor och från fem kor som hade pågående eller som nyligen hade haft klinisk eller subklinisk klebsiellamastit. Proverna togs av handledaren, djurägaren eller anställda på gården mellan den 4/7-07 och 28/8-07.

Tabell 1. Besättningsuppgifter om gårdarna i vilka avföringsprov togs för analys av förekomst av klebsiellabakterier (F= gård med klebsiellamastitproblem, K= kontrollgård)

Gårda r	Anta l kor	Mjölkvastnin g (medel kg/år)	Driftsfor m	Mjölkningsät t	Strömateria l	Antal kor med pågående klebsiellamasti t
1 (F)	220	10000	Lösdrift	Grop	Torv	5
2 (F)	65	10500	Lösdrift	Grop	Hackad halm	3
3 (F)	120	10500	Lösdrift	Robot	Sågspån	5
4 (F)	220	11500	Lösdrift	Grop	Sågspån	4
5 (F)	100	12200	Lösdrift	Grop	Torv	4
6 (K)	130	8200	Lösdrift	Grop	Hackad halm	-
7 (K)	150	9500	Lösdrift	Grop	Torv	-
8 (K)	110	9500	Lösdrift	Grop	Spån	-
9 (K)	80	9000	Lösdrift	Grop	Kutterspån	-
10 (K)	100	9000	Lösdrift	Robot	Spån	-

Förvaring och transport av proverna

Proverna förvarades i provtagningshandskar och skickades omedelbart till SVA under kylförvaring.

Analys

Proverna analyserades inom 48 timmar från provtagning enligt den metodbeskrivning som togs fram i samband med utprovning av metoden enligt ovan.

PFGE-undersökning av klebsiellaisolat

Metod

Alla isolat av *K. pneumoniae* (från mjölk-, miljö- och avföringsprover) undersöktes med hjälp av PFGE vid avdelningen för bakteriologi, SVA. Metoden som användes har arbetats fram på SVA för att göra arbetet lätt och bygger på ett standardprotokoll från Center of Disease Control i Atlanta, USA (www.cdc.gov/pulsenet).

Bakteriestammarna tinades och odlades på blodagar. Från varje isolat (n=31) togs material från en bakteriekoloni med plastögla och blandades med 250 µl lysbuffert. Bakterierna gjöts in i agarosgel för att det fria DNAt som skulle renas fram behövde något som håller ihop det för att det inte skulle sönderfalla. Flytande agaros (low meltingpoint, 56°C) blandades med bufferten innehållande bakterierna och överfördes till gjutformar (tre för varje prov). Gjutformarna ställdes i kylskåp några minuter för att agarosen skulle stelna. Gelpluggarna trycktes ut ur gjutformarna och överfördes till glasprovrör med vardera 5ml lysbuffert tillsammans med 100 µl av enzymet lysozym (från en stamlösning om 20 mg/ml), för att bryta ned bakteriernas cellväggar. Proverna inkuberades sedan i 37°C i 4-5 timmar placerade på en skakmaskin. Bufferten byttes ut mot ny lysbuffert, denna gång med en tillsats av 100 µl proteinas K, för att bryta ned bakteriernas proteiner. Rören förvarades i 54°C placerade på skakmaskin ca ett och ett halvt dygn. Efter detta tvättades gelpluggarna sex gånger med 15 minuters mellanrum. Till de första två tvättningarna användes avjoniserat vatten. Till de fyra efterföljande tvättningarna användes buffert (TE-buffert). Gelpluggarna delades sedan på mitten och en halva överfördes till Eppendorfrör. Resten av gelpluggarna förvarades i kylskåp i rör med TE-buffert. Restriktionsenzymbuffert (tillhandahålls av leverantören av restriktionsenzymet) blandades till och 0,2 ml tillsattes till Eppendorfrören som sedan fick stå i 37°C i 20 minuter. Bufferten ersattes sedan med ny buffert och restriktionsenzymet *XbaI* (0,1ml). Restriktionsenzymet bryter ned bakterie-DNAt i bestämda storlekar. Denna blandning inkuberades sedan över natten på skakmaskin i 37°C. Millimeterstora bitar skars av gelpluggarna och placerades på en gelelektroforeskam. Lambdastege och en referensstam (*Salmonella Braenderup* stam H9812) användes som kontroller. Gelpluggarna gjöts in i elektroforesgelen. Elektroforesen kördes i en speciell elektroforesutrustning, där strömfältet kan växla riktning för att underlätta separationen av stora DNA-fragment. Inställningen var 6V under 24 timmar, och det elektriska fältet fick växla riktning med en pulstid om 2,2 sekunder som sedan successivt ökade till 60 sekunder. De färdigkörda gelerna färgades med etidiumbromid och fotograferades.

Bandmönstren på fotografierna avlästes manuellt. De bandmönster som var identiska med varandra tillhörde en och samma pulsotyp.

RESULTAT

Utprovning av metod

Klebsiellaliknande kolonier hittades i alla prover där klebsiellabakterier hade tillsatts. Antalet kolonier per prov överensstämde med den bakteriespädning som hade tillsatts avföringsproverna. I de negativa kontrollerna där inga bakterier hade tillsatts avföringsproverna hittades inga klebsiellaliknande kolonier. De klebsiellaliknande kolonierna konfirmerades och visade sig vara *K. pneumoniae* vid analys med API 20E.

Fynd av *K. pneumoniae* i avföringsprov

Totalt analyserades etthundra avföringsprover. Inga klebsiellaliknande kolonier isolerades från något prov från kontrollbesättningarna. Från försöksgårdarna hittades klebsiellaliknande kolonier i ett prov från gård 1, noll prover från gård 2, fyra prover från gård 3, fem prover från gård 4 och noll prover från gård 5. Efter renodling och konfirmering, konfirmerades förekomst av *K. pneumoniae* i ett prov från en frisk ko från gård 4. Från detta prov identifierades två isolat av *K. pneumoniae*. I övriga prover isolerades *Escherichia coli*, *Kuyvera* spp, *Evulneris* spp, *Enterobacter aerogenes* samt *K. oxytoca*. Det senare isolatet härstammade från det prov där *K. pneumoniae* isolerades.

PFGE-fynd vid analys av *K. pneumoniae* isolat

Från de fem försöksgårdarna insamlades totalt tjugonio isolat av *K. pneumoniae*. Av dessa kom tjugotvå från mjölkprov, fem från mjölkprov (endast från gård 1) och två från avföringsprov från gård 4 (Tabell 2). Ett isolat av *K. oxytoca* som kom från samma avföringsprov som isolaten av *K. pneumoniae* analyserades också med PFGE. Bilder på bandmönstren resulterande från PFGE-analyserna ges i Figur 1-2. En sammanställning av antalet pulsotyper identifierade på de olika gårdarna ges i Tabell 2.

Tjugosju av de tjugonio isolaten gav avläsningsbara DNA-stegar efter PFGE. Av de tjugosju isolaten kunde tretton olika pulsotyper utläsas. Sex av dessa pulsotyper återfanns mer än en gång (Tabell 2).

Mjölkiolat

Med hjälp av PFGE kunde man av tjugo avläsningsbara mjölkiolat se totalt nio olika pulsotyper. På tre (1, 3, 4) av de fem gårdarna kunde man se samma pulsotyp i flera av mjölkproverna från samma gård.

Från gård 1, där sju klebsiellaisolat odlats från mjölkprover sågs totalt fyra pulsotyper (A, B, F, G). En pulsotyp (A) återfanns i två juverdelar på en ko medan pulsotyp F sågs i tre isolat från två kor. Från den ena av dessa kor återfanns typ F i två juverdelar. Pulsotyperna B och G sågs en gång vardera från två isolat från två olika kor.

De tre mjölkisolaten från gård 2 kom från tre olika kor. Ett isolat var av pulstyp M medan de andra två inte kunde avläsas med PFGE på grund av tekniska skäl. Dessa två isolat fick utgå ur försöket.

Tabell 2. Antal isolat av *Klebsiella pneumoniae* isolerade från mjölk-, miljö- och avföringsprover från fem gårdar med klebsiellaproblem samt pulstyper (A-M) identifierade med PFGE. Miljöproverna kom från vattenkoppar (n=2), napp (n=1), bås (n=1) och tunna (n=1).

Gård	Mjolkprov		Miljöprov		Avföringsprov	
	Antal isolat	Pulstyp (antal per typ)	Antal isolat	Pulstyp (antal per typ)	Antal isolat	Pulstyp (antal per typ)
1 (F)	7	A (2), B (1), F (3), G (1)	5	A (1), C (2), D (1), E (1)	0	-
2 (F)	3	M (1), utgår (2)	0	-	0	-
3 (F)	3	K (3)	0	-	0	-
4 (F)	6	H (6)	0	-	2	L (2)
5 (F)	3	H (1), I (1), J (1)	0	-	0	-
Totalt	22	-	5	-	2	-

Från gård 3 fanns tre isolat från mjölkprover från tre olika kor. Alla tre isolaten tillhörde pulstyp K.

Från gård 4 fanns sex isolat från mjölkprover från 5 kor. Två isolat kom från två olika juverdelar från samma ko. Alla sex isolaten tillhörde samma pulstyp (H).

Från gård 5 fanns tre isolat från tre olika kor. Alla tre isolaten tillhörde olika pulstyper (H, I, J). En av pulstyperna (H) var identisk med ett isolat från gård 4. Inga andra pulstyper utöver H återfanns på mer än en gård.

Miljöisolat

Fem miljöprover som blivit positiva för *K. pneumoniae* hade tagits på gård 1. Dessa prover kom från två olika vattenkoppar, en tunna, en napp och ett bås. Med hjälp av PFGE jämfördes de isolat som identifierats från dessa prover med varandra och med mjölkisolat från samma gård. De fem isolaten tillhörde pulstyperna A, C, D och E. Två av miljöisolaten tillhörde samma pulstyp (C). Dessa kom från en vattenkopp och en tunna. De andra tre isolaten tillhörde tre andra pulstyper (A, D, E). Ett av dessa isolat (pulstyp A) var identiskt med två

mjölkisolat från två olika juverdelar från en ko. Detta miljöisolat kom från en napp.

Avföringsisolat

Ett avföringsprov från gård 4 var positivt för *K. pneumoniae* och från detta prov undersöktes två isolat. PFGE visade att dessa isolat båda tillhörde samma pulstyp (L). Inget av mjölkisolaten från gården tillhörde samma stam som de två avföringsisolaten.

Fig. 1. PFGE av Klebsiella pneumoniae från mjölk- och miljöprov. Prov 1-12 kom från gård 1 (prov 1-2: mjölkprov från två juverdelar från samma ko; prov 10-11: mjölkprov från två juverdelar från samma ko; prov 3, 9 och 12: mjölkprov från tre olika kor; prov 4 och 6: miljöprov från två olika vattenkoppar; prov 5: miljöprov från en tunna; prov 7: miljöprov från en napp; prov 8: miljöprov från bås i avdelning fyra), prov 13-15 kom från mjölkprov från tre olika kor från gård 5. Kontroller: L=lambdastege, S=Salmonella Braenderup H9812)

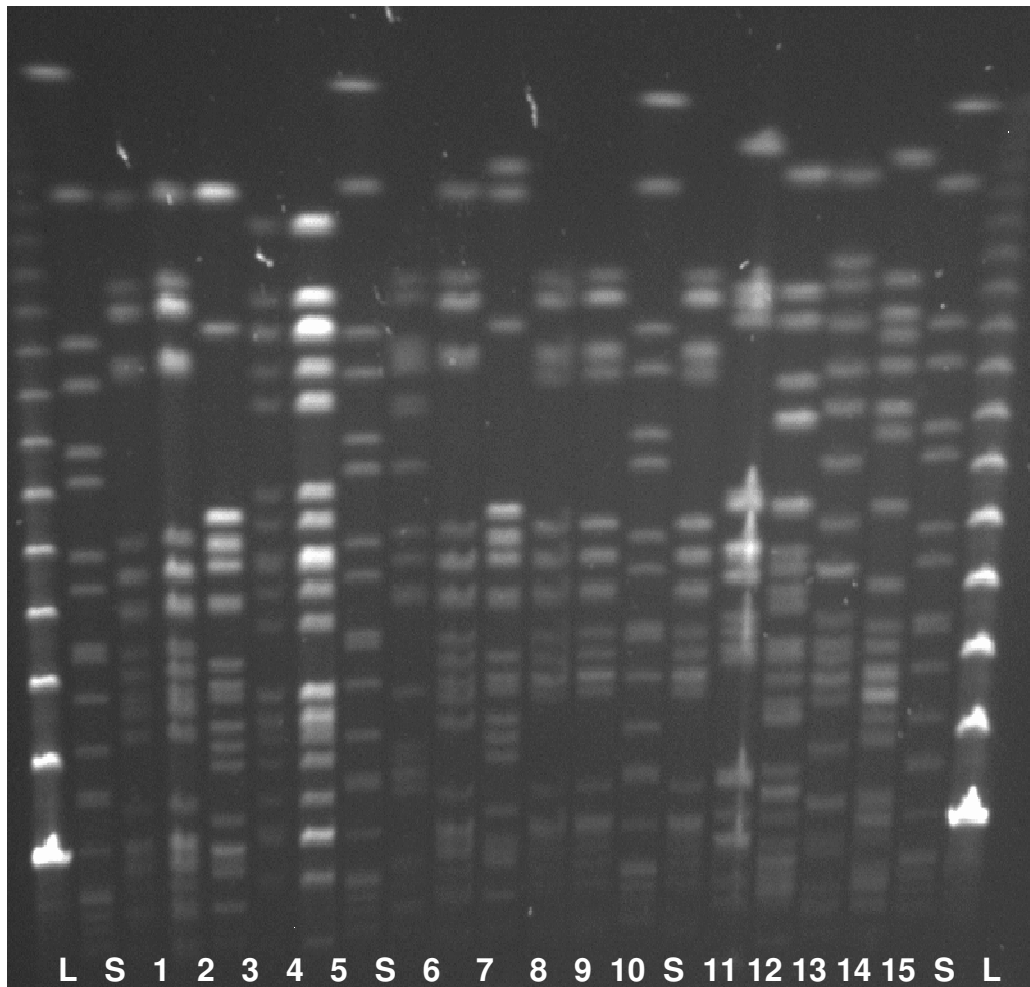
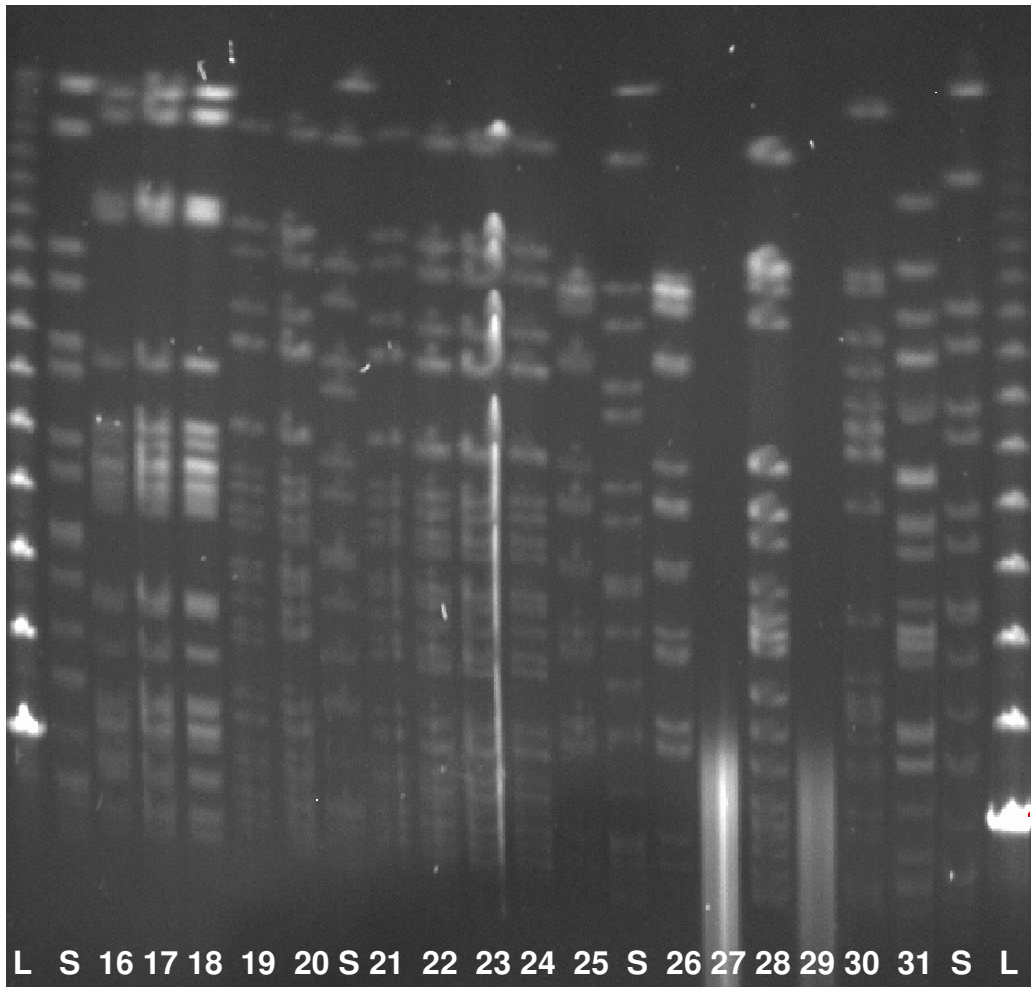


Fig 2. PFGE av *Klebsiella pneumoniae* från mjölkprov och ett avföringsprov samt *Klebsiella oxytoca* från samma avföringsprov som ovan. Prov 16-18 kom från gård 3 (mjölkprov från tre olika kor); prov 19-24 kom från gård 4 (mjölkprov från fem kor varav två prover från två juverdelar från samma ko); prov 25-26 kom från gård 4 (två isolat från avföringsprov från en ko); prov 27-29 kom från gård 2 (mjölkprov från tre olika kor); prov 30 kom från referensstam *K pneumoniae* 425; prov 31 kom från gård 4 (*K. oxytoca*). Kontroller: L=lambdastege, S=Salmonella Braenderup H9812)



DISKUSSION

I nyligen genomförda studier i USA fann man att en stor andel (>80 %) av undersökta mjölkkor utsöndrade *K. pneumoniae* via avföringen (Munoz et al., 2006). Utsöndring av klebsiellabakterier i sådan grad ansågs kunna vara en ny riskfaktor för klebsiellamastit.

I denna studie, som är den första svenska undersökningen rörande utsöndring av klebsiellabakterier i avföringen hos mjölkkor, kunde vi dock bara hitta *K. pneumoniae* i ett av hundra prover (1 %) tagna från hundra kor i tio besättningar. Detta prov kom från en besättning som hade pågående problem med klebsiellamastiter. De isolat som isolerades från avföringsprovet tillhörde inte samma stam som de isolerade från mjölkprov tagna på gården i samband med klebsiellamastit.

Studiens resultat tyder alltså inte på att utsöndring av *K. pneumoniae* i avföring hos mjölkkor är en viktig riskfaktor för klebsiellamastit i Sverige. Resultaten visar dock att det finns kor som utsöndrar klebsiellabakterier i avföringen. Dessa kor skulle kunna sprida bakterierna till omgivningen där de sedan förökas då både avföring och organiskt strömaterial är en bra grogrund för bakterier. Det är dock inte undersökt om de klebsiellastammar som utsöndras via avföringen kan orsaka mastiter (Munoz et al., 2006). I denna studie togs endast ett prov per djur varför vi inte vet om den positiva kon var persistent bärare av klebsiellabakterier i mag-tarmkanalen eller inte. I en studie från USA togs avföringsprover på en gård under fem månader. Dessa prover jämfördes och många olika klebsiellastammar isolerades. Detta tyder på att utsöndringen av klebsiellabakterier är tillfällig snarare än persistent (Munoz et al., 2007). Antagligen skulle detta även kunna vara fallet hos oss.

Det låga antalet positiva prov skulle kunna bero på att den metod vi använde inte fungerade optimalt eller var känslig nog för att detektera förekomst av klebsiellabakterier i avföringsproverna. Metoden som användes baserades på en metod som tagits fram av Munoz et al. (2006) och fungerade väl då vi i en förstudie undersökte förekomst av klebsiellabakterier efter tillsatts av olika klebsiellaspädningar. Mängden bakterier på plattorna följde spädningarna väl i denna undersökning. Vi var också noga med att renodla och undersöka alla klebsiellaliknande kolonier som återfanns efter odling av avföringsproverna från fältstudien. Totalt renodlades trettiofem klebsiellaliknande kolonier från tio prover och tolv (34 %) av dessa konfirmerades med API 20E. Orsaken till att inte fler isolat undersöktes med API 20E var att kolonierna efter renodling inte längre var klebsiellaliknande eller hade ett utseende karakteristiskt för någon annan bakterie t ex *E. coli*.

En ursprunglig tanke med projektet var att metoden att odla fram klebsiellabakterier från avföringen från mjölkkor skulle kunna ingå i de analyser som erbjuds vid Mastitlaboratoriet, SVA, och skulle kunna användas vid utredningar på gårdar med klebsiellaproblem. Resultaten visar dock inte på att det för närvarande finns ett behov av denna metod i framtida utredningar. Om inte kontaminering av miljön genom utsöndring av klebsiellabakterier i avföringen är en betydande riskfaktor för utvecklandet av klebsiellamastit behövs ytterligare

utredningar om vilka riskfaktorer som kan vara bidragande orsaker till klebsiellamastit i besättningar där hittills kända riskfaktorer uteslutits som orsak.

Att verifiera smittspridning av klebsiellabakterier från miljön till kor eller mellan kor inom en besättning kan vara betydelsefullt och skulle kunna underlätta saneringsprogram vid klebsiellaproblem. Det finns flera exempel från internationell litteratur där man använt sig av genotypning för att spåra klebsiellamitta (Brian et al., 1984; Munoz et al., 2007). PFGE är en bra metod att använda för genotypning och är dessutom den mest använda metoden. I denna studie undersöktes endast tjugosju mjölk- och miljöisolat från fem gårdar med klebsiellaproblem varför resultaten får tolkas försiktigt.

Resultaten från PFGE visade att det fanns ett stort antal olika klebsiellastammar bland mjölkisolaten vilket överensstämmer med tidigare studier vilka visat att klebsiellamastit ofta orsakas av opportunistiska stammar (Brian et al., 1984; Kikuchi et al., 1995; Paulin-Curlee et al., 2007). I vår studie tillhörde mjölkisolaten från gård 1 och 5 flera olika stammar. Endast i ett fall återfanns samma stam i mjölkprov från mer än en gård. Gård 5 hade ett mjölkisolat som var identiskt med mjölkisolaten från gård 4. Dessa gårdar ligger ca 6,5 mil från varandra men använder olika typ av strömmaterial och tillhör två olika veterinärdistrikt. Det är inte omöjligt att de två gårdarna kan ha en gemensam nämnare som bidragit till fyndet av samma klebsiellastam på båda gårdarna men denna är inte känd.

På tre gårdar (1, 3 och 4) återfanns samma stam av *K. pneumoniae* i flera juverdelar på samma ko eller hos flera kor, vilket skulle kunna tyda på att smittspridning skett mellan juverdelar/kor till exempel vid mjölkning eller via en specifik smittkälla i miljön. På två av gårdarna (3 och 4) var alla mjölkisolaten identiska inom gården vilket tyder på att det skett ett utbrott av klebsiellamastit med gemensam smittkälla i dessa besättningar. Orsaken till utbrotten är inte känd men det har tidigare visat sig att spenkoppar kan härbärgera klebsiellabakterier (Munoz et al., 2007) vilket skulle kunna vara en smittkälla till mastiterna. Båda gårdarna har spån som strömmaterial. Det är sedan länge känt att kontaminerat spån kan bidra till klebsiellamastit. Men alla delar av miljön som kommer i kontakt med juvret kan vara en källa till kontamination med klebsiellabakterier. Exempelvis kan tvättvatten och juverdukar som man tvättar juvret med vara orsaker till spridning av smitta (Radostits et al., 2003). Eftersom bakterier kan växa till i organiskt strömmaterial som halm och spån, framförallt om det är fuktigt till exempel vid tillsats av avföring, skulle en klebsiellastam från mjölk från en läckande ko med klebsiellamastit kunna ha växt till i ströet på båspallen och smittat andra kor som lagt sig på samma ställe.

Miljöprov fanns endast tillgängliga från gård 1 där det visade sig att en stam från ett prov från en napp i kalvavdelningen var identiskt med en stam isolerad från två mjölkprover från en ko. Detta fynd skulle kunna tyda på att kon smittats av bakterier i miljön eller att de bakterier man funnit i miljön kommer från denna ko. Det är inte känt i vilka avdelningar kon stått och inte heller om det finns ett samband mellan nappen i kalvavdelningen/boxen och denna ko. En teori kan vara att kon var nykalvad och att hennes kalv flyttats till box eller kalvavdelning och där fört över kons bakterier till nappen. Ett annat scenario skulle kunna vara att

kalvarna fick mjölk från den sjuka kon och att nappen inte rengjorts ordenligt. Det känns dock långsökt att tro att kon smittats av bakterierna som hittats på nappen.

PFGE är en tidskrävande metod men mycket användbar när man vill jämföra olika klebsiellaisolat för att t ex klarlägga smittvägar. Vid utredningar av besättningar som har problem med klebsiellamastiter tas ofta miljöprover från olika delar av omgivningen. Dessa skulle med hjälp av PFGE kunna jämföras med klebsiellaisolat från mjölkprover för att därmed identifiera smittkällor och underlätta saneringsarbetet. Kostnaden för PFGE-analys är dock hög (ca 1000 kr per isolat) vilket kommer att begränsa dess användning i samband med utredningar av klebsiellamastit.

Sammanfattningsvis visar denna studie att klebsiellautsöndring via avföringen från mjölkkor inte verkar vara en viktig riskfaktor för klebsiellamastit i Sverige. PFGE är en bra metod för smittspårning vid utredning på gårdar med klebsiellaproblem. Metoden är dock kostsam och utvecklandet av en lika bra metod som är mer kostnadseffektivt vore önskvärt för att genotypning ska kunna bli en rutinanalys vid besättningsutredningar. För att komma till rätta med ett klebsiellaproblem är fortfarande förbättrade hygienfaktorer den viktigaste åtgärden.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Bagley ST. 1985. Habitat association of *Klebsiella* species. *Inf. Control.* 6: 52-58.
- Bannerman DD, Paape MJ, Hare WR & Hope JC. 2004. Characterization of the bovine innate immune response to intramammary infection with *Klebsiella pneumoniae*. *J. Dairy Sci.* 87: 2420-2432.
- 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 2002-03. In: Hogeveen, H. (Ed) Mastitis in dairy production. Current knowledge and future solutions. Wageningen Academic Publishers, Proceedings of the 4th International Mastitis Conference, 12-15 June, Maastricht, The Netherlands, p. 888.
- Brian J, Nonnecke ? & Newbould FHS. 1984. Biochemical and serologic characterization of *Klebsiella* strains from bovine mastitis and the environment of the dairy cow. *Am. J. Vet. Res.* 45: 2451-2454.
- Desimoni MC, Esquivel GP & Merino LA. 2004. Fecal colonization by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 22: 507-511.
- Erskine RJ, Bartlett PC, VanLente JL & Phipps CR. 2002. Efficacy of systemic ceftiofur as a therapy for severe clinical mastitis in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 85: 2571-2575.
- Gröhn YT, Wilson DJ, Gonzalez RN, Hertl JA, Schulte H, Bennett G & Schukken YH. 2004. Effect of pathogen-specific clinical mastitis on milk yield in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87: 3358-3374.
- Hansen DS, Skov R, Benedi JV, Sperling V & Kolmos HJ. 2002. *Klebsiella* typing: pulse-field gel electrophoresis (PFGE) in comparison with O:K-serotyping. *Clin. Microbiol. Infect.* 8: 397-404.
- Hogan JS, Smith KL, Hoblet KH, Todhunter DA, Schoenberger PS, Hueston WD, Pritchard DE, Bowman GL, Heider LE & Brockett BL. 1989. Bacterial counts in bedding materials used on nine commercial dairies. *J. Dairy Sci.* 72: 250-258.
- Hogan JS, Smith KL, Todhunter DA & Schoenberger PS. 1990. Bacterial counts associated with recycled newspaper bedding. *J. Dairy Sci.* 73: 1756-1761.
- Kikuchi N, Kagota C, Nomura T, Hiramune T, Takahashi T & Yanagawa R. 1995. Plasmid profiles of *Klebsiella pneumoniae* isolated from bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 47: 9-15.
- Munoz MA & Zadoks RN. 2007. Short Communication: Patterns of fecal shedding of *Klebsiella* by dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90: 1220-1224.
- Munoz MA, Ahlström C, Rauch BJ & Zadoks RN. 2006. Fecal shedding of *Klebsiella pneumoniae* by dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89: 3425-3430.
- Munoz MA, Welcome FL, Schukken YH & Zadoks RN. 2007. Molecular epidemiology of two *Klebsiella pneumoniae* mastitis outbreaks on a dairy farm in New York State. *J. Clin. Microbiol.* [online] (10 Oktober 2007) Available from: <http://jcm.asm.org/cgi/content/abstract/JCM.00795-07v1> [20 November 2007].
- Neijenhuis F, Barkema HW, Hogeveen H & Noordhuizen JP. 2001. Relationship between teat-end callosity and occurrence of clinical mastitis. *J. Dairy. Sci.* 84: 2664-2672.
- 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.

- Pai HC, Kang CI, Byeon JH, Lee KD, Park WB, Kim HB, Kim EC, Oh MD & Choe KW. 2004. Epidemiology and clinical features of bloodstream infections caused by AmpC-type-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:3720-3728.
- Paulin-Curlee GG, Singer RS, Reevatsan S, Isaacson R, Reneau J, Foster D & Bey R. 2007. Genetic diversity of mastitis-associated *Klebsiella pneumoniae* in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90: 3681-3689.
- Persson Waller K & Unnerstad H. 2004. Klebsiellamastit – ett potentiellt gissel för mjölkproducenten. *Svensk Veterinärtidning* 10, 11-17.
- Podschun R, Heineken P, Ullmann U, Sonntag HG. 1986. Comparative investigations of *Klebsiella* species of clinical origin: plasmid patterns, biochemical reactions, antibiotic resistances and serotypes. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg.* 262:335-345.
- Radostits OM, Gay CC, Blood DC & Hinchcliff KW. 2003. *Veterinary Medicine A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses.* BookPower formerly ELST.
- Robertson JR, Warnick LD & Moore G. 2004. Mild to moderate clinical mastitis: Efficacy of intramammary amoxicillin, frequent milk-out, a combined intramammary amoxicillin, and frequent milk-out treatment versus no treatment. *J. Dairy Sci.* 87:583-592.
- Smith KL, Todhunter DA & Schoenberger PS. 1985. Environmental mastitis: Cause, prevalence, prevention. *J. Dairy Sci.* 68: 1531-1553.
- Todhunter DA, Smith KL, Hogan JS & Schoenberger PS. 1991. Gram-negative bacterial infections of the mammary gland in cows. *Am. J. Vet. Res.* 52: 184-188.
- Zadoks RN & Munoz MA. 2007. The emergence of *Klebsiella* as a major mastitis organism. *NMC Annual Meeting Proceedings.* 100-111.
- Zdanowicz M, Shelford JA, Tucker CB, Weary DM & von Keyserlingk MA. 2004. Bacterial populations on teat ends of dairy cows housed in free stalls and bedded with either sand or sawdust. *J. Dairy Sci.* 87: 1694-1701.