

Effekt av myrsyra och β -laktamas på penicillin- och *S. aureus*-halt i mjölk till kalvar

Trine Raustein

Handledare: Torkel Ekman, inst. f. obstetrik och gynekologi, SLU

Bitr. handledare: Karin Artursson och Jelena Jovanovic, mastitlab, SVA
Åse Sternesjö och Lotta Wall, inst. f. livsmedelsvetenskap, SLU

Examensarbete 2003:20
Veterinärprogrammet
Veterinärmedicinska fakulteten
SLU
ISSN 1650-7045
Uppsala 2003

Inledning	2
Syfte	4
Material och metoder	4
Försökets genomförande	5
Sammanfattning av försökets genomförande	7
Resultat	8
Diskussion	11
Konklusioner	13
Summary	13
Tack	13
Referenser	14

Inledning

Cirka 25% av kostnaderna vid en akut klinisk mastit består i mjölk som ej kan levereras till mejeriet (Torkel Ekman, muntligt meddelande). Om denna mjölk i stället kan användas till kalvarna, kan en del av dessa pengar sparas in. Detta förutsätter dock att kalvarna inte blir sjuka eller får sämre tillväxt av att dricka denna mjölk. En annan aspekt är att när kon har blivit behandlad med antibiotika, finns en risk för utveckling av resistens i kalvarnas tarmflora.

Flera studier har gjorts på kalvar som har fått mastitmjölk respektive mjölk från friska kor. Få försök har visat någon skillnad i tillväxt mellan dessa grupper, oberoende av huruvida mjölken har varit fermenterad (Keys et al., 1980, Kesler, 1981) eller färsk (Chardavoine och Kesler, 1977, Chardavoine et al., 1979, Chik et al., 1975, Kesler, 1981). Wray et al. (1990) såg dock i ett av sina två försök att kalvarna som hade fått antibiotikahaltig mastitmjölk växte sämre än kontrollgruppen som fick mjölkersättning. I hans försök var det också svårt att få kalvarna att dricka den antibiotikahaltiga mjölken, speciellt den som var fermenterad (pH 4,61 jämfört med ofermenterad pH 5,1). Det har också visat sig svårt att få kalvar att dricka mastitmjölk med olika tillsatser; i ett försök där kalvar fick mastitmjölk med formalin, drack kalvarna sämre, och fick mer frekvent diarré än kalvar som fick fermenterad råmjölk (Chardavoine et al., 1979). Dessa kalvar åt också sämre, och fick en signifikant sämre tillväxt än kontrollgruppen. I ett annat försök ville inte kalvarna dricka råmjölk med propionsyra (pH 3,9) lika gärna som råmjölk med pH 4,6 (Otterby et al., 1980), men i detta försök sågs ingen skillnad i tillväxten mellan grupperna. I ett informationsblad från DeLaval (Syrning av mjölk till kalvar), uppges att en långvarig utfodring med mjölk med pH under 4,2 kan skada kalvarnas slemhinna och därmed störa funktioner i mag-tarmkanalen, och att pH-värden under 4,0 kan leda till dödsfall. I detta informationsblad rekommenderas pH 5 vid syring av sötmjölk och pH 4,5 vid syring av pulvermjölk.

En ökad sjukdomsfrekvens (ffa diarré) har i vissa försök observerats hos kalvar som fått mastitmjölk jämfört med kalvar som fått mjölk från friska kor (Chik et al., 1975), i andra försök har inga skillnader setts (Chardavoine et al., 1979, Keys et al., 1980, Otterby et al., 1980, Kesler, 1981, Barto et al., 1982). Om spädkalvar däremot fått råmjölk från infekterade juver, har höga sjukdomsfrekvenser (50-71%) rapporterats (Volovenko, 1972, refereras i Kesler, 1981, Chardavoine et al., 1979 och Keys et al., 1976). Selim och Cullor (1997) undersökte 189 mjölkprover till kalvar, och hittade i genomsnitt tre olika bakteriearter per giva. Författarna hävdar att så höga bakterieantal som de observerade (genomsnitt 10^5 per ml), sannolikt ökar risken för infektioner hos kalvarna, och att speciellt mjölk med höga halter av specifika patogener är ett potentiellt hot mot kalvhälsan. Denna konklusion stärks, menar de, av Chardavoines et al. studie (1979) där pasteurisering av mjölken minskade antalet kliniska sjukdomsfall och ökade tillväxten hos kalvarna.

Studier för att ta reda på om intag av mastitmjölk som kalv leder till ökad risk för mastit som inkalvande kviga, har gjorts. Ingen ökad risk har kunnat påvisas (Kesler, 1981, Keys et al., 1980, Barto et al., 1982). I Keys' studie hade 9 av 10 inkalvande kvigor i kontrollgruppen, dvs de som hade druckit frisk mjölk som kalvar, mastit i första laktationen, vilket gör det svårt att dra slutsatser om frekvensen är större eller inte hos inkalvande kvigor som fått mastitmjölk under diperioden.

Enligt Roberson (1994:b), är kvigor som koloniserats av *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) på kroppsytan en reservoar för *S. aureus*, och kan vara den viktigaste predisponerande faktorn för *S. aureus*-mastit hos kviga. Vidare finner man i samma studie att kvigor med *S. aureus*-mastit vid kalvningen kan vara den viktigaste reservoaren för oinfekterade kor i en besättning med låg förekomst av *S. aureus*, och att den infekterade juverdelen på en lakterande ko är den mest troliga reservoaren för *S. aureus*. Roberson hävdar (1999) att ge kalvar mjölk innehållande *S. aureus* innebär en väg att föra över organismen till kvigkalvar. Alltså blir kvigkalvar koloniserade på kroppsytan från infekterade kors mjölk, den koloniserade kroppsytan predisponerar för infektion hos inkalvande kvigor, som sprider smittan vidare till lakterande kor, och vi får en ond cirkel av smittspridning på gården. Roberson visar också att ingen av kvigkalvarna i studien som före avvänjning koloniserades av *S. aureus* på kroppsytan var persistent koloniserade från födelse till kalvning (Roberson et al., 1998), så det är kanske inte just den kalven som druckit mastitmjölken som sedan infekteras, utan smittan kan också spridas mellan kalvar/ungdjur som har närkontakt med varandra.

Penicillin i mjölken som ges till kalvar har också varit ämne för diskussion. I motsättning till nyfödda djur av andra arter, har kalvar väl utvecklad sekretorisk elimineringsfunktion i njuren, och en betydande förmåga att eliminera penicillin G redan vid 2 dagars ålder. Denna förmåga utvecklas kontinuerligt fram till 5 veckors ålder (Musser och Anderson, 2001). Penicillin G hydrolyseras också till viss grad i löpmagens låga pH, vilket ger en begränsad absorption (Musser och Anderson, 2001, Prange et al., 1984). I en studie hittades penicillin i urinen från 13 av 18 kalvar som fick 47 520 IU prokainpenicillin G dagligen i mjölken i tre dagar. Från 5 av kalvarna var urinen positiv efter alla tre givorna med penicillin, från övriga kalvar efter en eller två av tre givorna med penicillinhaltig mjölk (Prange et al., 1984). I en annan studie där kalvarna fick penicillinhaltig mjölk (0,68 mg/kg kroppsvikt) i tre påföljande givor, hittades penicillin i urinen i upptill 24 timmar efter sista givan (Musser et al., 2001:a). I en tredje studie där kalvarna fick mjölk motsvarande 6 % av kroppsvikten hittades penicillin i urinen från 1 av 6 kalvar 13 timmar efter oral giva av penicillinhaltig mjölk (5,85 µg per ml mjölk). I samma studie hittades penicillin i plasma 4 timmar efter giva, inte senare (Musser et al., 2001:b). Efter administrering av 4 mg penicillin per kg kroppsvikt, intravenöst eller peroralt med mjölk, återfanns inga penicillinhalter i plasma efter 24 timmar (Musser och Anderson, 2001).

Överdriven användning av antibiotika favoriserar resistenta bakteriestammar genom att eliminera möjliga konkurrenter (White, 1999).

Wray et al. fann i et av sina försök att MIC (Minimum Inhibitory Concentration) för streptomycin var signifikant högre i tarmbakterieisolat från kalvar som fått fermenterad antibiotikahaltig mjölk än kalvar som fått mjölkersättning (Wray et

al., 1990). Selim och Cullor refererar till flera studier där utveckling av resistens hos tarmbakterier eller ökning i sjukdomsfrekvens har rapporterats efter terapeutisk eller profylaktisk användning av antibiotika till kalvar (Selim och Cullor, 1997). Vilken form penicillinet finns i (natrium- eller prokainpenicillin) i mjölken borde inte spela någon roll, eftersom dessa former är bioekvivalenta när de administreras oralt via mjölk (Musser och Anderson, 2001).

Det finns alltså fortfarande osäkerhet om vilka effekter mastitmjölk, med eller utan antibiotika, har på kalvarnas hälsa både under diperioden och senare i livet. Det vore önskvärt om man på ett relativt enkelt och billigt sätt kunde få bort, eller åtminstone kraftigt reducera, både antibiotikan och bakterierna i mjölken från behandlade mastitkor innan man ger den till kalvarna.

Vissa bönder tillsätter syrade mjölkprodukter eller myrsyra till mjölken i konserverande syfte. För att få bort penicillin från mjölk från antibiotikabehandlade kor under behandling och i karenstiden, har en ny finsk produkt (Antipen, tillverkad av Finnzymes Oy) innehållande betalactamasenzym, framtagits.

Syfte

Syftet med studien var att undersöka myrsyras effekt på *S. aureus* och penicillin G i mjölk vid pH 5, att undersöka Antipenets effekt på *S. aureus* och penicillin G i mjölk, samt att se hur myrsyra och Antipen tillsammans påverkar antalet *S. aureus* och halten av penicillin G i mjölk.

Mängden *S. aureus* och penicillin-koncentrationen i försöket skulle efterlikna de halter som finns i mjölken från en ko med klinisk *S. aureus*-mastit som står under penicillinbehandling. pH skulle vara på en nivå som inte är skadlig för kalvar att dricka, som inte förstör mjölkens proteiner, och som inte ger en osmaklig mjölk för kalvar.

Material och metoder

För en sammanfattning av genomförandet, se sidan 7.

En penicillin-negativ kontrollstam av *S. aureus* från mastitlab, SVA användes i försök B, C och D. En vit ögla bakterier motsvarar 1 µl bakteriekultur från agarplatta, och en blå ögla motsvarar 10 µl bakterier från agarplatta. Som substrat användes femprocentig nötblodagar med eskulintillsats. Plattorna lästes av efter 18-24 timmars inkubation i 37 °C om ej annat anges, varefter antalet kolonier *S. aureus* räknades. Om flera spädningar kunde räknas, togs ett genomsnitt av dessa bakterieantal. Spädning före utodling gjordes i steril NaCl.

I försök A och B användes tankmjölk från Jälla (SLU's försöksgård), i försök C och D användes UHT-behandlad mjölk köpt i affären.

Antipenet späddes i försök A till 1:100 i destillerat vatten, i försök B, C och D till 1:100 i 20 mM K₂HPO₄ och KH₂PO₄.

En stamlösning penicillin G på 1mg/ml späddes på så sätt att koncentrationen i försök B blev 150 ppb, i försök C och D 300 ppb.

Analysmetoderna som använts vid arbetet är β ta s.t.a.r (UCB Bioproducts, Belgien) och Delvotest SP (DSM Group, Netherlands). När inte annat anges, är Delvotestet använt.

β ta s.t.a.r är en snabbtest för kontroll av β -laktamantibiotika i mjölk. Metoden upptäcker penicillin G vid halter strax under MRL-värdet (Maximum Residue Limits, 4 μ g/kg för benzylopenicillin i mjölk). Teströret innehåller ett frystorkat receptorprotein specifikt för β -laktamantibiotika. Mjölk tillsätts provet och blandningen inkuberas. Under inkuberingen bildar eventuella β -laktamantibiotika närvarande i mjölkprovet komplex med receptorproteinet. I nästa steg placeras en teststicka i röret varvid mjölken och receptorproteinet suggs upp på stickan. Om provet inte innehåller β -laktamantibiotika binder receptorproteinet till reagensstickans testfält varvid ett rött band framträder. Om β -laktamer finns i provet, reagerar receptorprovet i stället med dessa, och bandet i testfältet uteblir eller syns mycket svagt i jämförelse med det referensband som alltid framträder vid korrekt utförd analys.

Delvotest SP är en mikrobiologisk metod för kontroll av antibiotika och andra syrningshämmande ämnen i mjölk. Också denna metod upptäcker β -laktamantibiotika vid halter strax under MRL-värdet. Testet reagerar även på en kraftigt avvikande sammansättning av mjölken. Testplattans brunnar innehåller agar med en pH-indikator och sporer från *Bacillus stearothermophilus* var. *caldiolactis*. Näringstabletter tillsätts brunnarna, sedan tillsätts mjölken. Under inkuberingen (63 °C) utvecklas sporer till vegetativa bakterieceller varvid gas produceras och pH sjunker. Detta ger ett färgomslag från blått till gult. Om mjölkprovet innehåller antibakteriella ämnen inhiberas emellertid sporer och färgomslaget uteblir, agarn förblir då blå. Testet lästes av efter ca 3 timmar, dvs när den negativa kontrollen blivit gul.

Försökets genomförande

A. *Tankmjölk med penicillin G och Antipen vid pH 5 respektive 6,7:*
Fem kolvar med 200 ml tankmjölk i varje, tillsattes olika koncentrationer penicillin G (0, 10, 25, 50 respektive 100 ppb). Sedan delades proverna i två grupper. I den ena gruppen behöll mjölken sin normala pH, dvs 6,7. I den andra gruppen sänktes pH till 5,0 med 700 μ l 20% myrsyra per 100 ml mjölk. Mjölken med pH 6,7 delades sedan i två grupper, en med 40 ml och en med 60 ml mjölk av vardera koncentration. Till gruppen med 40 ml mjölk sattes 100 μ l utspädd Antipen (1:100) till varje prov, förutom 0-provet. Mjölken med pH 5,0 delades på samma sätt, och 100 μ l Antipen tillsattes 40 ml-proverna. Alla prov, samt ett prov med ren tankmjölk analyserades med Delvotest och β ta s.t.a.r direkt och 3 timmar efter tillsatsen av Antipen. Mjölkproverna förvarades i kylskåp under de 3 timmarna mellan analyserna.

B. *Tillväxtkurva samt tillsats av Antipen eller myrsyra till tankmjölk med och utan penicillin:*

En spädningsserie i NaCl gjordes för att kontrollera antalet *S. aureus* som rymts i en vit ögla (1 µl). Utifrån spädningsserien gjordes odlingar på blodplattor, spädningen som gav mellan 10-50 bakteriekolonier, användes för att räkna hur många bakterier ögla innehöll.

Vid en spädning på $1:10^8$ växte 24 kolonier efter utstryk med vit ögla på blodagar. En vit ögla beräknades utifrån detta innehålla 10^9 *S. aureus*.

För att hitta tidpunkten då *S. aureus* är i tillväxtfas efter inokulering i mjölk, gjordes en tillväxtkurva. Från en renkultur med penicillin-negativa *S. aureus* togs 20 µl bakterier (2 blå öglor) och slammades upp i tankmjölk från Jälla. Mjölken späddes till en koncentration på 10^6 bakterier per ml, och en del av denna mjölk späddes vidare till 10^5 bakterier per ml. Odling utfördes från respektive spädning som sedan inkuberades i 37 °C. Efter 2, 4, 6, 8, 12, 15, 17, 19, 21 och 24 timmars inkubering togs odlingar från respektive spädning. Plattorna lästes av efter 18-24 timmars inkubation i 37 °C, och antalet kolonier räknades.

På tankmjölk utfördes odling och analys med beta s.t.a.r. 10 µl *S. aureus* slammades upp i mjölken, och späddes till 10^5 bakterier per ml, fördelat på två kolvar. Odling utfördes på båda kolvarna, som sedan inkuberades i 37 °C i 4 timmar på långsam skakning. Sedan gjordes ny odling från vardera kolven. Till ena kolven sattes 150 ppb penicillin G. Analys med beta s.t.a.r utfördes på denna mjölk, samt på positiv och negativ kontroll. Mjölken inkuberades sedan en timme i 37 °C, varefter ny odling och analys med beta s.t.a.r utfördes. Till 40 ml av mjölken sattes 100 µl utspädd Antipen, sedan utfördes odling och Delvotest. 100 ml av mjölken tillsattes 700 µl 20% myrsyra, sedan utfördes odling och Delvotest. Mjölken med Antipentillsats inkuberades i 3 timmar vid rumstemperatur, därefter gjordes odling och Delvotest, tillsammans med mjölken från kolven (innehållande bakterier och penicillin G). Mjölken med myrsyratillsats inkuberades i 4 timmar vid rumstemperatur, sedan gjordes odling och Delvotest som ovan. Från den andra kolven med bakterier togs 100 ml och tillsattes 700 µl 20% myrsyra, sedan gjordes odling, och mjölken inkuberades i rumstemperatur i 4 timmar, varefter ny odling samt Delvotest gjordes både på denna mjölk och från resterande mjölk i kolven. 40 ml av mjölken från kolven tillsattes 100 µl utspädd Antipen. Mjölken odlades sedan och inkuberades i rumstemperatur i 3 timmar, varefter odling och Delvotest enligt ovan utfördes.

C. *Tillväxtkurva samt tillsats av Antipen eller myrsyra till UHT-mjölk med och utan penicillin:*

UHT-behandlad mjölk med 3% fett användes för att göra en tillväxtkurva motsvarande den i försök B. 1 µl penicillin-negativa *S. aureus* späddes till 10^5 respektive 10^4 bakterier per ml. Mjölken inkuberades i 37 °C på långsam skakning. Odlingar gjordes direkt samt efter 2, 4, 6, 8, 12 och 24 timmar.

I 100 ml UHT-behandlad mjölk innehållande 10^5 penicillinasnegativa *S. aureus* per ml, mättes pH efter inkubering i 4 timmar i 37 °C, före och efter tillsats av 700 µl 20% myrsyra. pH mättes också i 100 ml UHT-behandlad mjölk utan tillsats av bakterier efter inkubering i 4 timmar i 37 °C, före och efter tillsats av 700 µl 20% myrsyra.

Försöket i B upprepades på den UHT-behandlade mjölken, med enda skillnad att penicillinkoncentrationen som användes var 300 ppb i stället för 150 ppb, eftersom den högre koncentrationen ligger närmare den koncentration som finns i juvret vid en antibiotikabehandlad mastit.

D. *Tillsats av Antipen och myrsyra till UHT-mjölk med penicillin:*

UHT-mjölk inokulerades på samma sätt som i ovanstående försök med 10^5 *S. aureus* per ml, inkuberades vid 37 °C i 4 timmar, och tillsattes sedan 300 ppb penicillin G varefter mjölken inkuberades i ytterligare en timme vid 37 °C.

Odlingar gjordes före penicillintillsats samt efter sista inkuberingen. Efter sista inkuberingen delades mjölken i tre;

◆ 100 ml tillsattes 250 µl Antipen, odlades direkt efter tillsatsen samt efter 3 timmar i rumstemperatur. Sedan tillsattes 700 µl 20% myrsyra, ny odling gjordes direkt samt efter ytterligare 4 timmar i rumstemperatur. Nya odlingar gjordes efter 24 och 48 timmar, samt efter 7 dagar i rumstemperatur.

◆ 100 ml tillsattes 250 µl Antipen och 700 20% myrsyra, och odlingar gjordes direkt, efter 4, 7, 24, och 48 timmar, samt efter 7 dagar.

◆ 40 ml tillsattes 100 µl Antipen, och odlingar gjordes direkt, efter 3, 4, 7, 24 och 48 timmar, samt efter 7 dagar.

Delvotest utfördes efter en timmes inkubering med penicillin G, samt i alla tre prover efter 3, 7, 24 och 48 timmar.

Sammanfattning av försökets genomförande

A. *Tankmjölk med penicillin G och Antipen vid pH 5 respektive 6,7:*
Dubbla mjölkprover med olika penicillinkoncentrationer tillsattes myrsyra till pH 5. Till ena halvan av prover sattes Antipen. Analys med Delvotest och beta s.t.a.r utfördes efter 0 och 3 timmar. Samma försök gjordes med dubbla mjölkprover med olika penicillinkoncentrationer vid pH 6,7.

B. *Tillväxtkurva samt tillsats av Antipen eller myrsyra till tankmjölk med och utan penicillin:*

Två mjölkprov med 10^5 *S. aureus* per ml inkuberades i 37°C i 4 timmar, varefter ena provet tillsattes penicillin G och inkuberades ytterligare en timme i 37°C. Proven delades i två, varav en del tillsattes Antipen, och en del tillsattes myrsyra. Odlingar och Delvotest utfördes i alla prov efter 0 och 3 (eller 4) timmar.

C. *Tillväxtkurva samt tillsats av Antipen eller myrsyra till UHT-mjölk med och utan penicillin:*

pH mättes i mjölk med och utan tillsats av *S. aureus*, både före och efter tillsats av myrsyra, för att se om bakterietillsatsen ändrade pH. Sedan upprepades försöket i B med högre penicillinkoncentration, samt odlingar även efter 24 och 48 timmar.

- D. *Tillsats av Antipen och myrsyra till UHT-mjölk med penicillin:* Mjölk med 10^5 *S. aureus* per ml inkuberades i 37°C i 4 timmar, tillsattes penicillin G och inkuberades i ytterligare en timme vid 37°C. Mjölken delades i tre, varav en tillsattes endast Antipen, en tillsattes både Antipen och myrsyra samtidigt, och den tredje tillsattes Antipen först, och efter 3 timmar även myrsyra. Odlingar och Delvotest gjordes efter 0, 3 (eller 4), 7, 24 och 48 timmar.

Resultat

- A. *Tankmjölk med penicillin G och Antipen vid pH 5 respektive 6,7:*

Beta s.t.a.r.-analyserna för penicillin (pc) direkt efter Antipentillsats var alla positiva förutom 0-proverna.

Efter 3 timmar, var alla proverna med Antipentillsats negativa, oberoende av pH och koncentration. Proverna utan Antipentillsats var fortfarande positiva. I Delvotestet var 0-proverna samt provet med 10 ppb penicillin G och Antipen vid pH 6,7 negativa direkt. De andra proven var positiva. Efter 3 timmar var samtliga prover med Antipentillsats negativa. Övriga var positiva. I båda Delvotesterna gav proverna med pH 6,7 tydligare positivt svar än proverna med pH 5.

- B. *Tillväxtkurva samt tillsats av Antipen eller myrsyra till tankmjölk med och utan penicillin:*

Tillväxtkurvan:

Efter 6-8 timmars inkubation av tankmjölken började även koliformer växa till i mjölken, och vid 12 timmars inkubation var koliformerna de dominerande bakterierna. Dock framträdde efter 4-6 timmars inkubering en klar tillväxtökning för *S. aureus* i båda kolvarna, vilken därefter stagnerade vid en koncentration på 10^7 efter 6 timmar, och fram mot 12 timmars inkubering sjönk markant.

Delvotest och Beta s.t.a.r:

Tankmjölken var negativ för pc med Beta s.t.a.r. Efter penicillintillsats var mjölken positiv både före (Beta s.t.a.r) och efter (Beta s.t.a.r och Delvotest) inkubering. Direkt efter tillsats av Antipen respektive myrsyra, var mjölken fortfarande positiv (Delvotest). Mjölken med Antipentillsats var efter 3 timmar negativ. Då var mjölken med bara penicillin positiv, vilket den också var efter 4 timmar. Mjölken med myrsyratillsats var efter 4 timmar svagt positiv. Efter 24 timmar var alla prov negativa. Mjölken utan penicillin var hela tiden negativ.

Odlingar:

Före tillsats av *S. aureus* innehöll tankmjölken många koliformer och några streptokocker. Dessa växte under inkuberingen till, och det blev mycket svårt att räkna antalet *S. aureus*, varför detta resultat ej redovisas.

C. *Tillväxtkurva samt tillsats av Antipen eller myrsyra till UHT-mjolk med och utan penicillin:*

Tillväxtkurvan: *S. aureus* växte i renkultur, och också här var tillväxten störst mellan 4-6 (3-6) timmar, för sedan att avta och stagnera efter ca 8 timmar vid koncentrationer på 10^9 för båda ursprungskoncentrationerna.

pH:

Efter inkubation av mjölken i 4 timmar, var pH i mjölken utan bakterier 6,63 och i mjölken med bakterier 6,67, 6,67 och 6,68. Efter tillsats av 700 μ l 20 % myrsyra var pH i kolvorna 5,11 respektive 5,02.

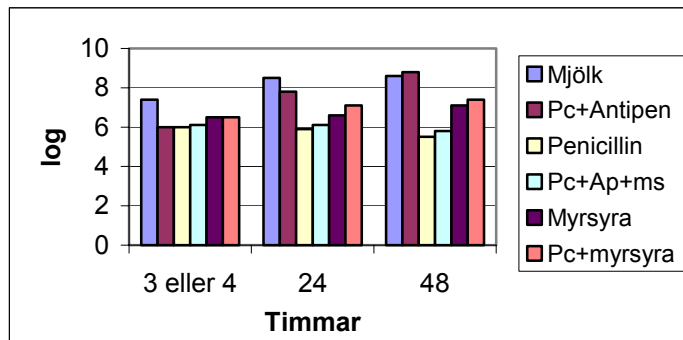
Delvotest och β ta s.t.a.r:

UHT-mjölken var negativ avseende penicillin (β ta s.t.a.r). Efter tillsats av penicillin var mjölken positiv både före och efter inkubering (β ta s.t.a.r). Direkt efter myrsyratillsats var mjölken positiv på β ta s.t.a.r och svagt positiv på Delvotestet (β ta s.t.a.r tog lång tid innan testfältet syntes). Efter 4, 24, 48 och 96 timmar var mjölken positiv på β ta s.t.a.r och svagt positiv på Delvotestet. Direkt efter Antipentillsats var mjölken positiv, men efter 3, 24, 48 och 96 timmar var den negativ. Mjölken med endast penicillin var positiv efter 3, 4, 24, 48 och 96 timmar. Efter 7 dygn var också denna mjölk negativ.

Odlingar med penicillintillsats:

Från den oinokulerade UHT-mjölken växte ingenting. Efter inockulering av 10^5 *S. aureus* per ml och inkubering i 4 timmar, växte $2,6 \times 10^6$ *S. aureus* per ml.

Efter en timmes inkubering med penicillin, växte ca 6×10^5 per ml. Det var svårt att räkna eftersom ingen spädning gjorts. Efter 3 och 4 timmar växte ca 1×10^6 per ml i mjölken, efter 24 timmar $7,1 \times 10^5$, efter 48 timmar $3,0 \times 10^5$, och efter 7 dygn $1,0 \times 10^4$. Direkt efter Antipentillsats växte ca 6×10^5 *S. aureus* per ml, efter 3 timmar ca 1×10^6 , efter 24 timmar ca 7×10^7 , efter 48 timmar $5,7 \times 10^8$ per ml, och efter 7 dygn $3,0 \times 10^7$. Direkt efter myrsyratillsats växte ca 6×10^5 *S. aureus* per ml, efter 4 timmar ca 3×10^6 per ml, efter 24 timmar $1,3 \times 10^7$, efter 48 timmar $2,5 \times 10^7$ per ml, och efter 7 dygn $1,1 \times 10^7$. Jämförelser av de logaritmiska värdena efter 3 (eller 4), 24 och 48 timmarna visas i figur 1 och figur 2.



Figur 1. Mängden *S. aureus* (log) i mjölk med olika tillsatser 3 (eller 4), 24 och 48 timmar efter tillsatsen.

Odlingar utan penicillintillsats:

Efter inkubering av 10^5 *S. aureus* i 4 timmar, växte $2,4 \times 10^6$ *S. aureus* per ml, efter 3 timmar $2,8 \times 10^7$ per ml, efter 4 timmar $3,0 \times 10^7$ per ml, efter 24 timmar $3,0 \times 10^8$, efter 48 timmar $4,0 \times 10^8$ per ml, och efter 11 dagar $1,3 \times 10^9$.

I mjölken med Antipentillsats växte 3 timmar efter tillsats $3,7 \times 10^7$ *S. aureus* per ml, efter 24 timmar $3,4 \times 10^8$ per ml, efter 48 timmar $2,8 \times 10^8$ per ml, och efter 11 dagar $2,0 \times 10^8$.

I mjölken med myrsyratillsats växte 4 timmar efter tillsats $3,1 \times 10^6$ *S. aureus* per ml, efter 24 timmar $4,3 \times 10^6$ per ml, efter 48 timmar $1,3 \times 10^7$ per ml, och efter 11 dagar $4,0 \times 10^6$. Jämförelser av de logaritmiska värdena efter 3 (eller 4), 24 och 48 timmar visas i figur 1 och 2.

D. Tillsats av Antipen och myrsyra till UHT-mjölk med penicillin:

Delvotest:

Efter inkubering med penicillin var Delvotestet som förväntat positivt. Efter 3 timmar var alla prov negativa.

Odlingar:

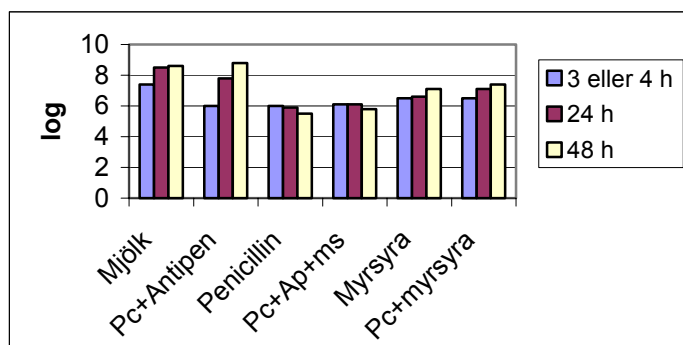
Från UHT-mjölken växte en koloni (inte *S. aureus*). Efter 4 timmars inkubering växte $2,5 \times 10^6$ *S. aureus* per ml, och efter penicillininkubering $1,6 \times 10^6$ per ml, alltså hade penicillinet av någon anledning sämre effekt den här gången. Mjölken med

endast Antipentillsats blev efter ett tag förorenad med andra bakterier, varför detta resultat inte redovisas, eftersom det försöket redan gjorts en gång.

Mjölken som först tillsattes Antipen innehöll efter 3 timmar $1,7 \times 10^6$ *S. aureus*

per ml, direkt efter myrsyratillsats $9,0 \times 10^5$ per ml, efter 7 timmar från Antipentillsatsen $6,0 \times 10^5$ per ml, efter 24 timmar $1,4 \times 10^6$ per ml, efter 48 timmar $1,1 \times 10^6$ per ml, och efter 7 dagar $9,0 \times 10^4$ per ml.

Mjölken som fick tillsats av Antipen och myrsyra samtidigt, innehöll efter 4 timmar $1,2 \times 10^6$ *S. aureus* per ml, efter 7 timmar $2,2 \times 10^6$ per ml, efter 24 timmar $1,2 \times 10^6$, efter 48 timmar $6,5 \times 10^5$ per ml, och efter 7 dagar $7,0 \times 10^4$ per ml. Jämförelser av de logaritmiska värdena efter 3 (eller 4), 24 och 48 timmar visas i figur 1 och 2.



Figur 2. Mängden *S. aureus* i mjök med olika tillsatser 3 (eller 4), 24 och 48 timmar efter tillsats.

Diskussion

I försöken har mjölken inkuberats i 37 °C i 4 timmar, vilket gör att *S. aureus* är i tidig tillväxtfas, och fortfarande har en stor tillväxtpotential, när olika tillsatser adderas till mjölken. Detta visar sig i att bakterierna inte dör vid myrsyratillsats, utan antalet hålls mer eller mindre konstant, vilket kan förklaras av att bakterierna troligen dör av i samma takt som de delar sig. Detta stöds av det faktum att mjölken utan myrsyra innehöll ett stadigt ökande antal *S. aureus*.

Samma sak gäller för mjölken med penicillin. Under en timme i 37 °C dog ungefär en 10-potens *S. aureus*, men under ett dygn i rumstemperatur hålls antalet ganska konstant i mjölken med penicillin, och ökar betydligt i mjölken med penicillin och Antipen, dvs mjölken som inte längre innehåller penicillin. Efter 2 och 7 dygn, minskar bakterierna betydligt snabbare i alla mjölkprov som fortfarande innehåller penicillin, och bakterierna i provet med bara mjök växer inte till lika snabbt längre, kanske för att bakterierna inte längre har så stor tillväxtpotential.

Effekten av myrsyra på *S. aureus* i mjölken tycktes vara ganska jämförbar med effekten av penicillinet i rumstemperatur (se figur 1). Generellt ligger kurvan för mjök med myrsyra lite högre än kurvan för mjök med penicillin, vilket betyder att den förra mjölken innehåller flera *S. aureus*, men man får ha i åtanke att

penicillinet har fått verka en extra timme i 37 °C, så att bakterieantalet faktiskt är lägre i mjölken med penicillin direkt efter inkuberingen än i mjölken direkt efter myrsyratillsatsen. Detta kan också förklara att kurvan för myrsyra ligger högre än kurvan för penicillin, Antipen och myrsyra (figur 1), vilka annars skulle kunna förväntas vara identiska.

I försöket med mjölk med enbart penicillin hade penicillinet efter inkubering i 37 °C i 1 timme bättre effekt på avdödningen av *S. aureus* än motsvarande försök med kombinationer av penicillin, Antipen och myrsyra (6×10^5 respektive $1,6 \times 10^6$ per ml). Detta är svårt att förklara. Samma procedur har utförts i de två försöken. Kurvan för kombinationerna ligger lite över kurvan för endast penicillin (se figur 1), vilket möjligen kan förklaras av detta, och effekten av myrsyra på avdödning av *S. aureus* kan jämföras med penicillinets.

Mjölk med både penicillin och myrsyra gav bättre tillväxt av bakterier än mjölk med endera tillsatsen (se figur 1), vilket är anmärkningsvärt. Dock växte färre bakterier i mjölk med både penicillin och myrsyra än i mjölk med penicillin och Antipen, dvs mjölk med inaktiverat penicillin, så viss bakteriedödande effekt kan kombinationen ha haft. Myrsyran verkade inte bryta ned penicillinet, eftersom penicillinet fanns kvar flera dygn efter tillsats av myrsyra. Penicillinet verkade heller inte ha någon långvarig hämmande effekt på myrsyran eftersom myrsyran hade samma effekt på bakterierna när penicillinet tagits bort från mjölken via Antipen som den hade i mjölk utan penicillin från början.

I försök B (med 150 ppb penicillin) var alla mjölkprov negativa för penicillin efter 24 timmar. I försök C (med 300 ppb penicillin) var alla prov förutom provet med Antipen fortfarande positiva efter 4 dygn, men negativa efter 7 dygn. Flera författare hävdar att penicillinet bryts ned i sur mjölk, och Keys et al. (1979) fann att bakterierna i fermenteringsprocessen degraderar penicillin i mjölk. I våra försök har dock ingen bakteriekultur tillsatts, vilket kan vara en förklaring till att penicillinet finns kvar så länge. Penicillin bryts dock ned vid lågt pH, till exempel i löpmagen (Musser och Anderson, 2001, Prange et al., 1984), vilket man kanske skulle kunna överföra till mjölk, men samtidigt hämmar penicillin fermenteringsprocessen (Keys et al., 1976).

I några försök, samt i vissa spädningar i andra försök, blev mjölken kontaminerad av koliformer, vilket gjorde det svårt att räkna antalet *S. aureus*, och koliformerna kan också ha hämmat växten av *S. aureus*, varför plattor med mycket koliformer inte har räknats och tagits med i resultaten.

Det går inte att direkt överföra dessa resultat till praktiken, eftersom bakterieantalet och bakteriernas fas i tillväxtkurvan kan variera. Andra bakterier än *S. aureus* kan finnas i mjölken, vilket kan påverka resultatet, och penicillinkoncentrationerna kan variera från ko till ko. Intensiteten av mastiten påverkar också penicillinhalten i mjölken (Franklin et al., 1984). Frågan är också om lägre pH borde användas, med risk för att proteinerna denaturerar och kalvarna inte vill dricka mjölken.

Konklusioner

Slutsatserna som kan dras av den här studien, är

- ♦ att Antipen inom tre timmar bryter ned en penicillinkoncentration på 300 ppb, även i syrad mjölk
- ♦ att *S. aureus* inte växer lika bra i mjölk som är syrad med myrsyra till pH 5, som i mjölk med normalt pH
- ♦ att penicillin eller myrsyra i de använda koncentrationerna inte tar död på alla *S. aureus* som fanns i mjölken
- ♦ att myrsyran inte bryter ned penicillinet i mjölken

Antipenet har fungerat genom att bryta ned penicillinet utan att ha någon effekt på *S. aureus*, men eftersom inte alla *S. aureus*-bakterier dog efter myrsyratillsats, kan man inte direkt gå ut med någon rekommendation till bönder att använda dessa produkter i mjölken i syfte att få den bakteriefri.

Studier på mastitmjölk måste utföras innan man kan dra några slutliga konklusioner om myrsyrans effekt på *S. aureus* i mastitmjölk.

Summary

A sample of milk inoculated with *S. aureus* was treated with penicillin, and Antipen (a new commercial product containing penicillinase) was added. To another sample with *S. aureus* and penicillin, formic acid to pH 5 was added, and to yet another sample, a combination of formic acid and Antipen was added. Controls with no penicillin were treated in the same way. All samples were cultured in room temperature. Bacterial culture on blood agar plates were done, and the samples were analysed to see whether penicillin remained. After 3 hours with Antipen, the penicillin was gone in all samples. *S. aureus* did not grow in the milk with penicillin only. In the milk with formic acid only, there was a slightly growth after 24 hours. In the milk with penicillin and formic acid, the bacteria grew to some extent, and in the samples with milk only, or with penicillin and Antipen, the bacterial growth was considerable. In the samples with penicillin, Antipen and formic acid, the same result as in the sample with formic acid only, was seen.

Tack

En stor tack till mina handledare Karin Artursson, Torkel Ekman, Jelena Jovanovic, Åse Sternesjö och Lotta Wall, samt alla på MastitLab, SVA för all hjälp med arbetet! Stort tack också till Agnes, Sofia och övriga kurskamrater som hjälpt mig att tämja datorerna.

Referenser

1. Barto, P. B., L. J. Bush, & G. D. Adams. 1982. Feeding milk containing *Staphylococcus aureus* to calves. *J. Dairy Sci.* 65:271.
2. Chardavoigne, J. R., J. A. Ibeawuchi, E. M. Kesler, & K. M. Borland. 1979. Waste milk from antibiotic treated cows as feed for young calves. *J. Dairy Sci.* 62:1285.
3. Chardavoigne, J. R. & E. M. Kesler. 1977. Waste milk from treated cows as a feed for calves. *J. Dairy Sci.* 60:74. (Abstr.)
4. Chik, A. B., A. S. Achacoso, D. L. Evans, & L. L. Rusoff. 1975. Growth and feed efficiency of young calves fed milk replacer, "waste" milk, or fermented colostrum. *J. Dairy Sci.* 58:742. (Abstr.)
5. DeLaval. Syrning av mjölk till kalvar.
6. Franklin, A., O. Holmberg, M. Horn af Rantzien, & G. Åström. 1984. Effect of procaine benzylpenicillin alone or in combination with dihydrostreptomycin on udder pathogens in vitro and in experimentally infected bovine udders. *Am. J. Vet. Res.*, Vol. 45, no.7.
7. Kesler, E. M. 1981. Feeding mastitis milk to calves: review. *J. Dairy Sci.* 64:719-723.
8. Keys, J. E., R. E. Pearson, & L. A. Fulton. 1976. Fermentation of mastitic milk from antibiotic-treated cows. *J. Dairy Sci.* 59:1746.
9. Keys, J. E., R. E. Pearson, & B. T. Weinland. 1979. Effect of starter culture, temperature, and antibiotic residue in fermentation of mastitic milk to feed dairy calves. *J. Dairy Sci.* 62:1408.
10. Keys, J. E., R. E. Pearson, & B. T. Weinland. 1980. Performance of calves fed fermented mastitic milk, colostrum, and fresh whole milk. *J. Dairy Sci.* 63:1123-1127.
11. Musser, J. M. B., K. L. Anderson, J. E. Rushing, & W. A. Moats. 2001:a. Potential for milk containing penicillin G or amoxicillin to cause residues in calves. *J. Dairy Sci.* 84:126-133.
12. Musser, J. M. B., K. L. Andersson, & J. O. Boison. 2001:b. Tissue disposition and depleting of penicillin G after oral administration with milk in unweaned dairy calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* Vol. 219, no. 3.
13. Musser, J. M. B. & K. L. Andersson. 2001. Bioavailability and disposition of sodium and procaine penicillin G (benzylpenicillin) administered orally with milk to calves. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 24:161-169.
14. Otterby, D. E., D. G. Johnson, J. A. Foley, D. S. Tomsche, R. G. Lundquist, & P. J. Hanson, 1980. Fermented or chemically-treated colostrum and nonsalable milk in feeding programs for calves. *J. Dairy Sci.* 63:951-58.
15. Prange, R. W., O. P. Oliver, R. T. Duby, & J. P. Tritshler. 1984. Residues in young veal calves after consumption of milk containing penicillin. *J. Dairy Sci.* 67:2970-2973.
16. Roberson, J. R., L. K. Fox, D. D. Hanock, & C. C. Gay. 1994:a. Coagulase-positive *Staphylococcus* intramammary infections in primiparous dairy cows. *J. Dairy Sci.* 77:958-969.
17. Roberson, J. R., L. K. Fox, D. D. Hanock, & J. M. Gay. 1994:b. Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms. *J. Dairy Sci.* 77:3354-3364.
18. Roberson, J. R. 1999. The epidemiology of *Staphylococcus aureus* on dairy farms. *National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings.*

19. Roberson, J. R., L. K. Fox, D. D. Hanock, J. M. Gay, & T. E. Besser. 1998. Sources of intramammary infections from *Staphylococcus aureus* in dairy heifers at first parturition. *J. Dairy Sci.* 81:687-693.
20. Selim, S. A., & J. S. Cullor. 1997. Number of viable bacteria and presumptive antibiotic residues in milk fed to calves on commercial dairies. *JAVMA*, Vol. 211, no. 8.
21. White, D. G. 1999. Use and misuse of antimicrobials in veterinary medicine. *National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings*.
22. Wray, C., S. Furnish, & C. L. Benham. 1990. Feeding antibiotic-contaminated waste milk to calves -effects on physical performance and antibiotic sensitivity of gut flora. *Br. Vet. J.* 146:80.